

# Capítulo 3. Bases Teóricas, Digitalización y Análisis de Imágenes

ÁNGEL MARTÍNEZ NISTAL

El desarrollo de la microinformática en los últimos años ha propiciado que cada vez sea más común el trabajar con imágenes digitalizadas. La imagen digital se ha incorporado a la práctica totalidad de los equipos de microscopía electrónica y microscopía confocal y está sustituyendo rápidamente a las tradicionales cámaras fotográficas en los microscopios ópticos.

Las ventajas de la imagen digital frente a la analógica vienen dadas por las múltiples posibilidades de manipulación que nos ofrece. Además podemos procesar dichas imágenes para obtener información. Reconocer, contar y medir tamaño, forma, posición o densidad de determinados objetos (por ejemplo el área de los núcleos en una imagen histológica), es algo que, con una correcta preparación de la muestra, está al alcance de cualquier ordenador personal complementado con un software adecuado de análisis de imágenes.

## 3.1.- La imagen digital

Desde un punto de vista físico, una imagen puede considerarse como un objeto plano cuya intensidad luminosa y color puede variar de un punto a otro. Si se trata de imágenes monocromas (blanco y negro), se pueden representar como una función continua  $f(x,y)$  donde  $(x,y)$  son sus coordenadas y el valor de  $f$  es proporcional a la intensidad luminosa (nivel de gris) en ese punto.

Para obtener una imagen que pueda ser tratada por el ordenador es preciso someter la función  $f(x,y)$  a un proceso de discretización tanto en las coordenadas como en la intensidad, a este proceso se le denomina digitalización (fig. 3.1).

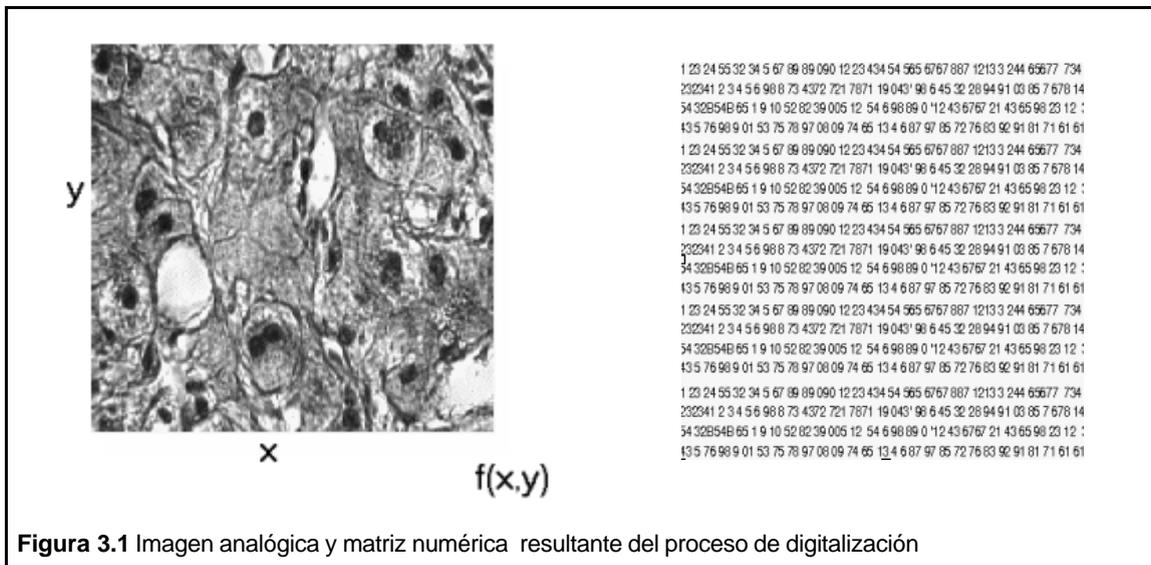
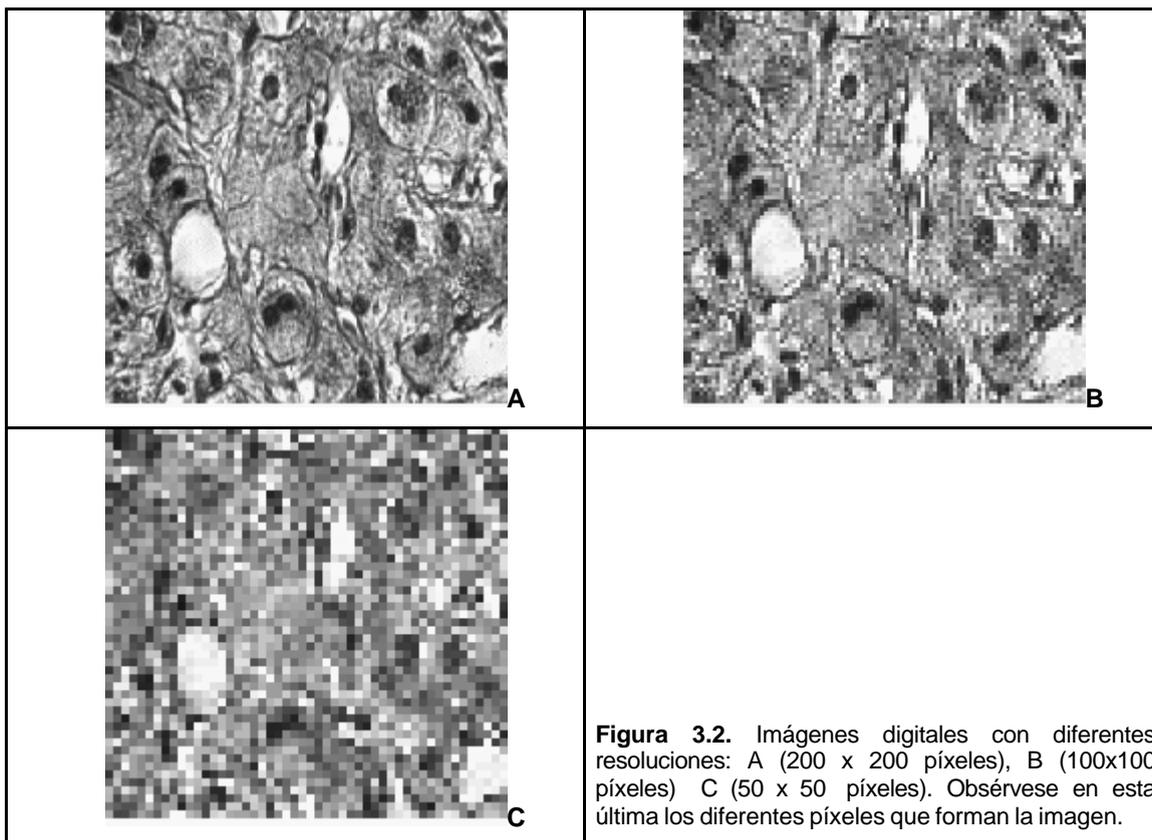


Figura 3.1 Imagen analógica y matriz numérica resultante del proceso de digitalización

La digitalización consiste en la descomposición de la imagen en una matriz de  $M \times M$  puntos (fig.3.1), donde cada uno tiene un valor proporcional a su nivel de gris. Dado que este valor puede ser cualquiera dentro de un rango continuo, es preciso dividir dicho rango en una serie de  $k$  intervalos, de forma que el nivel de gris de cada punto sea asignado a uno de los valores que representa dicho intervalo. Los modernos sistemas de proceso digital de imágenes suelen trabajar con 256 niveles de gris.

Cada elemento en que se divide la imagen recibe el nombre de "píxel" (picture element). El número de niveles de gris y las dimensiones de la matriz (número de filas por número de columnas) nos condicionan la capacidad de resolución de la imagen digital. (fig. 3.2)



En el caso de imágenes en color la intensidad puede considerarse como un vector tridimensional cuyas componentes son las intensidades en las tres bandas espectrales: rojo, verde y azul. Hablándose en este caso de una imagen multibanda, puesto que la información de la imagen color se desglosa en tres imágenes correspondientes a cada una de las bandas del espectro visible. Para cada una de las bandas se utilizan 8 bits de información, 24 bits en total, lo que nos dan más de 16 millones de posibles combinaciones de colores.

Las dimensiones de las imágenes digitales varían en función de las capacidades del sistema empleado. Por lo general se utiliza un octeto para almacenar cada píxel, por lo que las intensidades de las imágenes se cuantifican en 256 niveles (8 bits). Según estos tamaños una imagen digital con 256 niveles de gris y una dimensión de 256 x 256 píxeles , ocupa 64 KB de memoria, la misma imagen con una dimensión de 512 x 512 píxeles ocupa 256 KB y si se trata de una imagen de 1024 x 1024 ocupa 1 MB de memoria. Esta misma imagen en color ( 3 bandas), necesitaría 3MB de memoria para ser almacenada. En otros capítulos de este manual se tratarán los distintos formatos de ficheros de imágenes y la posibilidad de algunos de estos formatos de utilizar algoritmos de compresión para disminuir sus tamaño.

### **3.2.- Proceso de imágenes**

Dentro de lo que se denomina proceso de imágenes se engloban una serie de técnicas que comprenden operaciones cuyo origen es una imagen y cuyo resultado final es otra imagen. El valor del píxel en la imagen de salida puede ser función del valor que tenía en la imagen de entrada, de los valores de sus vecinos o del valor de todos los puntos de la imagen de entrada.

Según González & Wintz (1977), el objetivo de estas técnicas es procesar una imagen de tal modo que la resultante sea más adecuada que la imagen original para una aplicación específica. El término "específico" es importante porque establece que el valor de la imagen resultante está en función del problema que se trata. Así, un método que es útil para realzar un determinado tipo de imágenes puede no serlo para otras.

Las funciones de este grupo se engloban en tres grandes apartados:

- **Operaciones puntuales.** El valor de un píxel en la imagen de salida depende del valor de ese mismo píxel en la original. Dentro de éstas tenemos las denominadas transformaciones de histograma como son: el realce, la linearización y el escalado.

Imágenes poco contrastadas, cuyo rango de niveles de gris es escaso, se pueden mejorar realizando una expansión de su histograma de niveles de gris (Fig. 3.3).

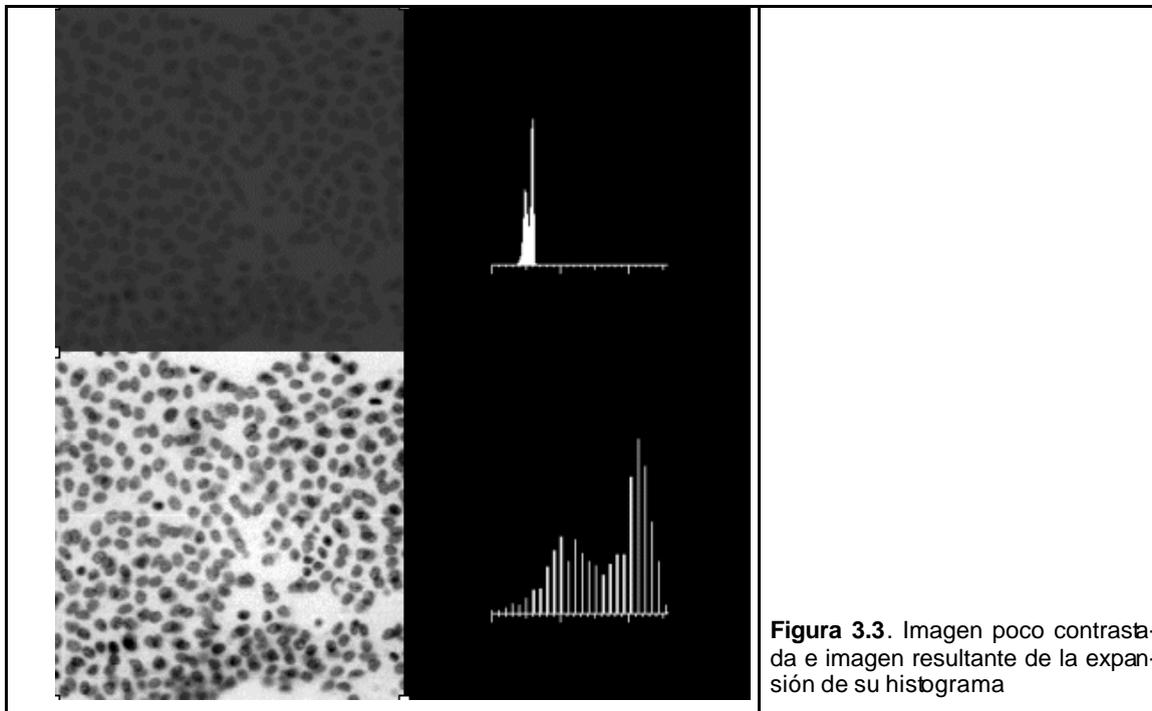


Figura 3.3. Imagen poco contrastada e imagen resultante de la expansión de su histograma

**Operaciones locales.** El valor del píxel en la imagen de salida es función del de sus vecinos más próximos y del suyo propio en la imagen original. Se suelen presentar como operaciones alrededor del píxel tratado. El objetivo de estos procesos es modificar las imágenes para mejorar su calidad o resaltar aspectos de las mismas que nos interesan. Comprende filtros de realce y suavizamiento como: paso bajo, paso alto, mediana, laplaciano, gradiente, gaussiano, etc .

Supongamos la siguiente ventana de 3 x 3 píxeles:

a	b	c
d	e	f
g	h	i

Filtro de paso bajo. Sirve para uniformizar zonas de imagen. Se basa en tomar para cada píxel los valores de sus x vecinos, según la ventana de trabajo definida, ( 9 en el caso de una ventana de 3 x 3 píxel ) y realizar el cálculo de la media de sus valores de gris. Este valor medio se asigna al píxel central en la imagen de salida (fig. 3.4). Una variante de este filtro es asignar el valor de la mediana en lugar de la media

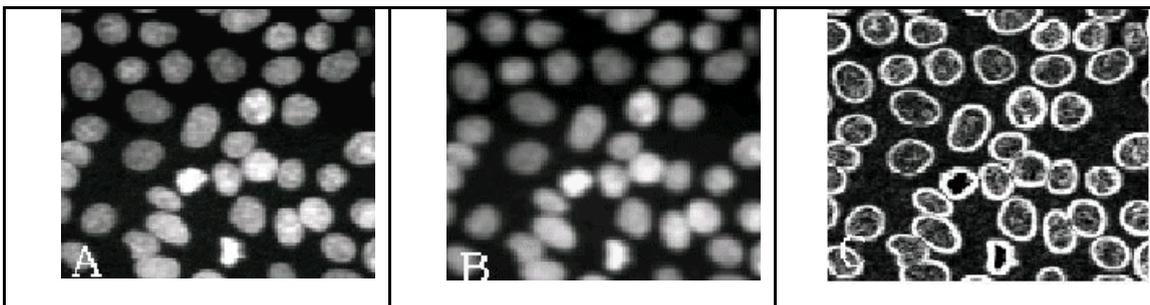
Filtros de Gradiente. Se utilizan diversos operadores de gradiente. El filtro denominado Sobel, consiste en asignar al valor central de la ventana, el valor obtenido por la siguiente fórmula:

$$G_{sobel} = |(a+2b+c)-(g+2h+i)| + |(a+2d+g)-(c+2f+i)|$$

Otro tipo de filtro es el denominado Roberts, cuya fórmula es la siguiente:

$$G_{roberts} = \text{Max. } (|a-e|, |b-d|)$$

Una descripción detallada de las transformaciones de histograma y diferentes tipos de filtros puede encontrarse en las principales monografías sobre proceso de imágenes: González & Wintz (1977), Rosenfeld & Kak (1981), Russ (1990, 1995).



**Figura 3.4.** Imagen de núcleos celulares y resultantes de aplicar varios tipos de filtros: a) original, b) paso bajo, c) gradiente (Sobel)

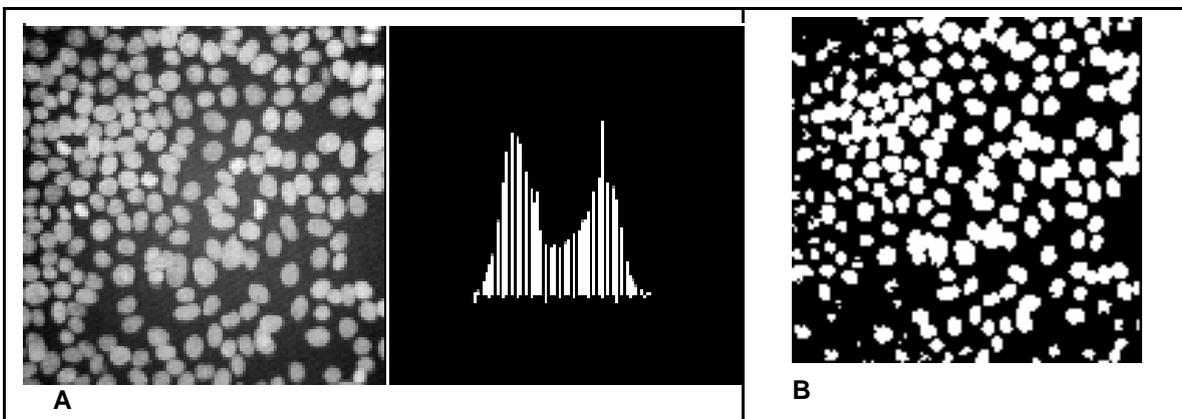
Existe otro tipo de transformaciones de la imagen en las que el valor de la intensidad de los píxeles en la imagen original y en la imagen resultante permanece invariable cambiándose las coordenadas de los píxeles. Dentro de este grupo están operaciones como las rotaciones, traslaciones, zoom, imagen espejo, etc.

### **3.3.- Análisis de imágenes**

Para poder cuantificar automáticamente determinados objetos presentes en una imagen es preciso que el ordenador realice una clasificación.

La clasificación es el proceso por el cual los píxeles pertenecientes a una imagen son divididos en clases, normalmente dos: objetos de interés y fondo. Objetos de interés pueden ser núcleos en imágenes histológicas, áreas de fibrosis en tejido hepático, vainas de mielina en axones nerviosos, etc.

Un método sencillo de clasificación es el denominado "thresholding". Se utiliza para convertir una imagen de niveles de gris en una imagen binaria. Cada píxel es clasificado como ON blanco (valor 255) o OFF negro (valor 0) dependiendo de si su nivel de gris excede o no un valor umbral. La selección del umbral se realiza a partir de un estudio del histograma de niveles de gris de la imagen. Si tenemos una preparación con unos núcleos que presentan un valor de gris claro sobre un fondo oscuro (fig 3.5 A) y visualizamos el histograma de distribución de niveles de gris de dicha imagen se observa como dicho histograma es claramente bimodal con dos picos bien diferenciados, el primero corresponde al fondo y el segundo a los núcleos. En este caso el proceso de clasificación consistirá en tomar como umbral el valle entre ambos picos y dar el valor 255 a los píxeles con un valor superior al umbral dejando con el valor 0 los restantes. (figura 3.5 B).



**Figura 3.5.** A) Imagen de niveles de gris de núcleos celulares y su correspondiente histograma. B) Imagen binaria resultante del proceso de clasificación.

La clasificación puede realizarse de modo interactivo visualizando como queda la imagen según varía el valor del umbral, o de modo automático, donde el ordenador determina el valor de los umbrales de segmentación siguiendo diversos criterios (Rosenfeld, 1979, Russ&Russ 1988).

En el caso de imágenes en color la detección se puede realizar en función del histograma de intensidades de cada una de las bandas (roja, verde y azul) que componen la imagen .

La imagen binaria resultante del proceso de clasificación puede que no represente perfectamente los objetos de interés debido a problemas inherentes en la imagen original, como objetos que se tocan, o problemas del propio proceso de las imágenes, por ejemplo, pequeñas áreas mal clasificadas. Con el fin de solucionar estos problemas se pueden aplicar distintos operadores morfológicos para: separar zonas, cribar áreas de determinados tamaños, erosionar o dilatar regiones, mirar conectividades, extraer bordes, etc.

Dos de las operaciones morfológicas más utilizadas en análisis de imágenes son la erosión y la dilatación. La primera consiste en examinar cada píxel y cambiarlo de ON a OFF si alguno de sus vecinos está en OFF. Normalmente se utilizan como vecinos los ocho que rodean al píxel examinado, aunque para algunas aplicaciones se pueden utilizar conectividades de 4 vecinos (los 2 verticales y los 2 horizontales) e incluso conectividades de 2 vecinos (los verticales o los horizontales). La dilatación es el proceso inverso, consiste en cambiar los píxeles de OFF a ON si alguno de sus vecinos está ON. Al resultado de una erosión más una dilatación se le denomina apertura ("opening") (fig. 3.6). El nombre proviene de la tendencia de esta secuencia de operaciones a separar (abrir) puentes de unión entre objetos próximos o a abrir cavidades próximas al borde. La operación opuesta (dilatación más erosión) es denominada cierre ("closing") y puede usarse para conectar objetos muy próximos o para rellenar pequeños huecos (Fig. 3.6). En Serra J.( 1982, 1988) se puede encontrar una completa descripción sobre estas y otras técnicas de morfología matemática.

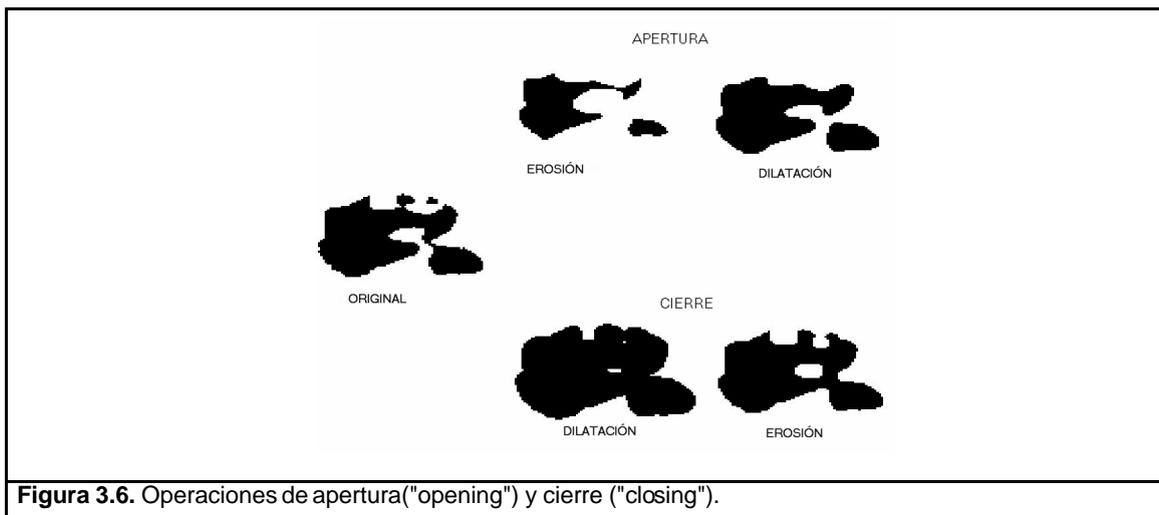


Figura 3.6. Operaciones de apertura("opening") y cierre ("closing").

El "thinning" o adelgazamiento es otro tipo de operación morfológica, consistente en obtener la línea media o eje de un objeto. Este tipo de procedimiento reduce los objetos a un conjunto de líneas sin perderse la conectividad del objeto original. Resulta de gran utilidad su aplicación al estudio de longitudes y orientaciones de estructuras alargadas, por ejemplo dendritas neuronales.

Una vez que las imágenes binarias muestran de una forma individualizada los objetos que deseamos cuantificar, se procederá a su identificación y medida. Los parámetros a medir se pueden clasificar en:

- **Morfométricos.** Aquellos que cuantifican tamaño, forma, orientación y relaciones espaciales de los objetos.
- **Densitométricos.** Cuantifican nivel de gris o parámetros derivados del nivel de gris (transmitancia, densidad óptica, intensidad de fluorescencia, etc. )

#### ? **Parámetros morfométricos.**

Dentro de estos podemos distinguir entre parámetros morfométricos globales, aquellos que se aplican a una determinada estructura pero sin distinguir detalles de como se organizan sus componentes y parámetros objeto, que cuantifican tamaño y forma de cada objeto considerado individualmente.

**Parámetros globales:**

- **Porcentaje en volumen.** Porcentaje de un determinado componente en la imagen.
- **Superficie específica.** Superficie de un determinado componente de la imagen por unidad de volumen.
- **Nº por unidad de volumen.** Nº de objetos por unidad de volumen

**Parámetros objeto:**

- **Área.**
- **Perímetro**
  - **Perímetro convexo.** Se define como la longitud de una línea convexa que circunscribe el objeto a medir.
  - **Diámetro máximo y mínimo (longitud y anchura).**
  - **Orientación.**
- **Forma Circular.**
- **Elongación ("Aspect Ratio")** . Relación entre la longitud y la anchura).
- **Forma Rugosa.** Este parámetro también denominado convexidad relaciona el perímetro convexo del objeto con su perímetro total.
- Etc.,

? **Parámetros densitométricos.**

En ocasiones lo que se desea cuantificar no es el tamaño o forma de los objetos sino otro tipo de propiedades como puede ser el valor de gris medio de cada objeto y a partir de este deducir otro tipo de parámetros como pueden ser la densidad óptica (DO), y la densidad óptica integrada

$$DO \text{ ? } \log_{10} \frac{\text{Intensidad.Transmitida.}}{\text{Intensidad.Incidenente.}}$$

(DOI), según las fórmulas siguientes:

$$DOI \text{ ? } DO * AREA$$

Para llegar a la cuantificación es preciso contar con una imagen clasificada donde tengamos perfectamente identificadas los objetos. En el caso de las cuantificaciones densitométricas la imagen clasificada se utiliza como máscara para extraer los valores de gris, de las zonas de interés, en la imagen original.

En las medidas densitométricas es muy importante estandarizar las condiciones de tinción e iluminación de la muestra de tal forma que las variaciones en la densidad de la imagen sean debidas a las propias variaciones de densidad de la muestra y no a otros factores externos.

**Bibliografía**

1. González RC, Wintz P. Digital Image Processing. Adisson-Wesley, 1977.
2. Levine, MD. Vision in Man and Machine. McGraw-Hill. New York, 1985.
3. Martínez-Nistal A, Sampedro A. Introducción al Proceso Digital de Imágenes. Técnicas de Fluorescencia en Microscopía y Citometría. Universidad de Oviedo. Servicio de Publicaciones, 1995.
4. Rosenfeld A. Some experiments on variable thresholding. Pattern Recognition 1979; 11: 191.
5. Rosenfeld A, Kak AC. Digital Picture Processing. Vol.1 & 2. Academic Press. London, 1981.
6. Russ JC. Computer-Assisted Microscopy, The Measurement and Analysis of Images. Plenum Press. New York, 1990.
7. Russ JC. The Image Processing Handbook. CRC Press, 1995.
8. Serra J. Image Analysis and Mathematical Morphology, Vol. 1 & 2. Academic Press. London, 1982: 1988.