

# Segmentación automática de imágenes de espermatozoides humanos mediante técnicas de difusión isotrópicas y anisotrópicas

Carlos Platero

Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Industrial (UPM), c/ Ronda de Valencia, 3, 28012 Madrid, [cplatero@elai.upm.es](mailto:cplatero@elai.upm.es)

## Resumen

*La segmentación automática de cuerpos biológicos, vistos desde un microscopio, es una necesidad creciente para la generación de diagnósticos biomédicos fiables. Sin embargo, por el nivel de ruido y los solapamientos entre los objetos biológicos, estas segmentaciones están mal condicionadas. Se presenta una metodología novedosa basada en las técnicas tradicionales combinadas con las PDEs ('Partial Differential Equations'). Este marco de trabajo ha sido aplicado con éxito en la determinación de la calidad genética de los espermatozoides humanos. También se añade un apartado a la metodología de implementación, ya que las peculiaridades propias de los algoritmos de Visión, donde se suelen encontrar varias etapas comunes, como el preprocesado, la segmentación, la extracción de características,..., suscita la idea de emplear un marco de trabajo (Framework) que constituya una plantilla para muchos proyectos, de investigación o industrial, cuya orientación este guiada por el Proceso Unificado.*

**Palabras Clave:** Segmentación de espermatozoides. PDE. Difusión isotrópica y anisotrópica. Proceso Unificado.

## 1 INTRODUCCIÓN

Muchas de las aplicaciones biomédicas actuales requieren de diagnósticos fiables basados en los análisis morfológicos de los cuerpos biológicos observados a través de microscopía, tanto en campo claro como en fluorescencia o en confocal. Células, virus, proteínas, ... sus tamaños, texturas y formas son básicamente esenciales para pronosticar, predecir o verificar pautas de comportamiento de los sistemas biológicos. Mayoritariamente se espera medir con precisión las características de morfología de estos cuerpos biológicos y en general, para sacar conclusiones rigurosas, se necesitan analizar cientos, incluso miles, de estos objetos. Por tanto, se precisa de algoritmos de segmentación exactos y automáticos para realizar estas tareas.

Las imágenes procedentes de estos escenarios, esto es, de microscopía, suelen ser de bajo contraste, con presencia abundante de solapamiento entre los objetos biológicos e imágenes de baja calidad. El problema de segmentación en estas imágenes está mal condicionado[15]. La solución es incorporar conocimiento a priori. De hecho, muchas aplicaciones de análisis de imágenes biomédicas así actúan; sus algoritmos se fundamentan en el conocimiento a priori de la forma, el tamaño o la textura de los cuerpos biológicos que van a parecer delante del microscopio.

En la bibliografía se encuentran soluciones basadas en el análisis del histograma, sobre todo cuando la iluminación es uniforme [14][22]. También se emplean algoritmos de crecimiento, división y agrupamiento de regiones[3][19]. Y evidentemente aquellos que emplean en sus soluciones las detecciones de borde[5][25]. Con todo, en las actuales publicaciones se encuentra un consenso en el marco de actuación. Una primera fase de determinación de la región aproximada del cuerpo biológico, para pasar a una segunda de refinamiento. Resumiendo, la primera etapa corresponde con el empleo de las técnicas tradicionales y mencionadas anteriormente, mientras en la segunda se fundamenta en el empleo de los contornos activos[8].

## 2 LOCALIZACIÓN DE LA REGIÓN APROXIMADA DEL CUERPO BIOLÓGICO

En muchas imágenes adquiridas por microscopía, donde sólo unas pocas de micras cuadradas han sido muestradas, el problema de una falta de iluminación uniforme no suele darse. Por tanto, se sugiere el empleo del elenco de técnicas de umbralización global, basadas en el análisis del histograma[16]. Los resultados suelen ser los esperados. Sin embargo, el cambio de tinción en los cuerpos biológicos o en las preparaciones de los cristalinios producen desajustes en la segmentación de las regiones aproximadas. La solución bien puede residir en un diseño *ad hoc* del algoritmo de segmentación de las regiones aproximadas, las cuales variarán dependiendo de la técnica de preparación, la óptica de la cámara y de

otros parámetros que hacen variar el resultado final de la imagen adquirida. La viabilidad de este camino dependerá de si merece la pena emplear el esfuerzo de particularización, a la vez, que pueda suponer un universo suficiente del problema.

Otra solución, si acaso se emplean imágenes en color, fenómeno cada vez más usual en microscopía, se basa en buscar una transformación de RGB a otra dimensión o dimensiones que aumenten la discrepancia entre el fondo y las regiones de interés[23]. En las cuales emplean técnicas de clustering[2] o de procesamiento en color[12].

La variabilidad de las imágenes adquiridas rompe con las técnicas de umbralización. Pero la dispersión de tonos y colores no deforma las formas de los objetos, por lo que sugiere emplear técnicas de detección de los bordes y de procesamiento morfológico. Además, éstas se presentan más proclives a introducir conocimiento a priori, como consecuencia de encontrar formas típicas de los cuerpos biológicos vistos desde la microscopía. Aún con ello, la determinación de las regiones empleando la detección de bordes, implica algunas desventajas. Las inestabilidades de estos algoritmos producen falsos bordes, provocados por el ruido, y la discontinuidad del recorrido en la frontera de los cuerpos biológicos.

Yang et al[25], así como Garrido et al[5], aplican los detectores de Canny, habiendo suavizado las imágenes con una máscara gaussiana. Aun así, se precisa de un postprocesado de las cadenas generadas. Dos argumentos son empleados. A) El número de vecinos encadenados y B) El uso de las direcciones normales de la cadenas, de forma que en su encadenamiento ofrezca una curva cerrada sin convexidades.

Una solución robusta está en emplear la información de umbralización con procesamiento morfológico más la información de la detección de bordes. En este sentido, se han presentado, recientemente, técnicas que mezclan *watershed* con la información de los bordes[20].

### 3 SEGMENTACIÓN DEL CUERPO BIOLÓGICO

Con la información de la etapa anterior se pasa a un ajuste fino de la detección del cuerpo biológico, dando paso al uso de contornos activos. Algunos autores han colocado una etapa previa basada en las Transformadas de Hough Generalizadas [10][5]. En parte, para paliar los problemas de detección de los bordes, esto es, contornos llenos de irregularidades, discontinuos y con mucho ruido.

Sin embargo, la novedad, aquí propuesta, se encuentra en la realización de un procesado combinado de isotropía y anisotropía[13]. Con esta etapa se consigue la eliminación de ruido y la preservación de los patrones existentes en la imagen. La funcionalidad del procesamiento de difusión no lineal en la segmentación de las células, se da en una triple vertiente: a) mejora los resultados de la localización de la curva inicial del contorno activo, b) la detección de bordes se presenta mucho menos ruidosa e irregular y c) el campo vectorial que empuja al contorno activo está mejor regularizado y necesita menos iteraciones para converger.

Los contornos activos pueden trabajar de forma local o global. Un planteamiento global está ligado a un modelo paramétrico del cuerpo biológico que se trata de segmentar[21]. La forma elíptica de las células han originado varias propuestas de optimización y algunas de ellas han considerado el solapamiento de células. No obstante, aunque puede ser robusto en aspectos de solapamiento, ofrece una delimitación inexacta del cuerpo biológico que se pretende segmentar. En esta problemática no es lo que se busca, luego se orienta hacia un contorno activo local, que busque con precisión subpixel el límite exacto del cuerpo biológico, para extraer de él, las características morfológicas deseadas.

Tradicionalmente se ha empleado como vector de campo exterior, en los contornos activos, el gradiente local de intensidad con difusión lineal, pero la baja convergencia hacia el contorno cerrado, suele provocar que si la solución inicial no está próxima al borde final, el *snake* queda paralizado. No hay solución con independencia de la elección de sus parámetros. Han habido varias planteamientos para su resolución [1][11][18]. La propuesta que se propone es calcular el vector de campo GVF[24] con la imagen procesada empleando la combinación de difusión isotrópica y anisotrópica.

### 4 APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA A LA SEGMENTACIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Las imágenes de los espermatozoides humanos presentan tres zonas bien diferenciadas: el fondo, el halo del espermatozoide y su núcleo. El algoritmo de segmentación debe ser capaz de separar las tres zonas.

La primera etapa busca las regiones de interés, esto es, la separación de los espermatozoides respecto del fondo. La transformación del color a una única dimensión que incremente el máximo contraste, entre

los objetos de interés y el fondo es aplicado. El análisis del histograma, el uso de un umbral global y la aplicación de técnicas de morfología producirán las regiones de interés. Éstas serán zonas con presencias de halo con uno o varios núcleos.

La segunda etapa se basa en el procesado de difusión isotrópica y anisotrópica de cada región de interés. La reducción sensible del espacio de procesado, hace que sea compatible con el alto coste computacional de la difusión PDE propuesta.

Tras ella, se procede a un análisis local y a una segmentación inicial del núcleo o núcleos existentes en cada región de interés. En la figura 1 se observa los resultados de este proceder sin aplicar el proceso de difusión y con su aplicación.

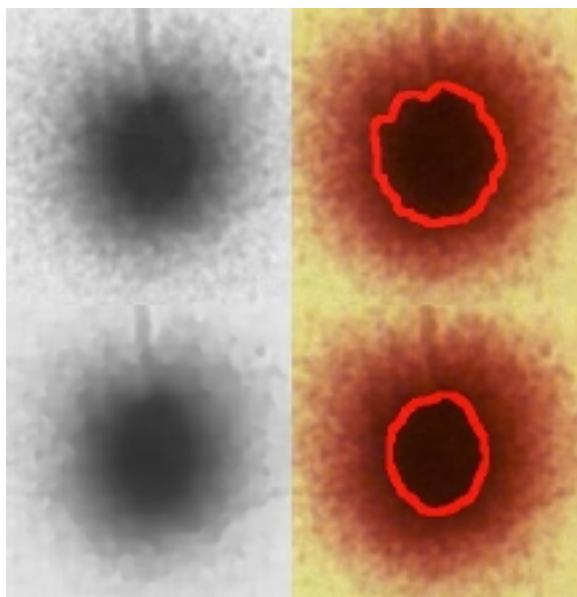


Figura 1: En la parte superior izquierda se presenta una región de interés, con máxima discrepancia. A su derecha se presenta el contorno inicial elegido sobre la imagen original. La parte inferior muestra el procesamiento de regularización PDE, así como el contorno inicial habiendo empleado la técnica combinada de difusión isotrópica y anisotrópica.

Esta curva o curvas iniciales de la etapa anterior son la entrada al contorno activo. Pero también son las regiones procesadas para determinar los bordes y el campo vectorial GVF. En la figura 2 aparecen los resultados del detector de Canny con la región sin y con procesamiento de difusión.

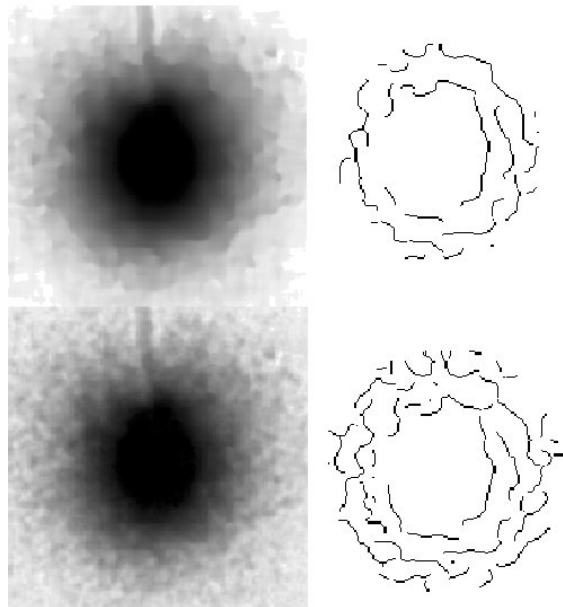


Figura 2: En la parte superior se aprecia la imagen con procesamiento PDE y a su derecha los resultados del detector de Canny. La parte inferior indica los resultados sin aplicar el procesamiento de difusión no lineal.

Por último, en la figura 3 se presenta la evolución del contorno activo empleando GVF.

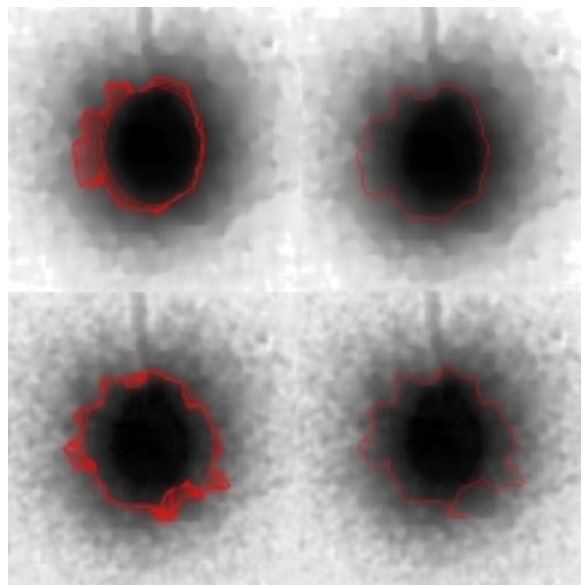


Figura 3: Iteraciones de GVF sobre la imagen procesada y sin procesar, así como sus resultados finales

Estas técnicas han sido ensayadas con éxito sobre imágenes tomadas tanto x40 como x100, además de con diferentes microscopios, filtros y cámaras. En la figura 4 se muestran los resultados definitivos de algunas imágenes.

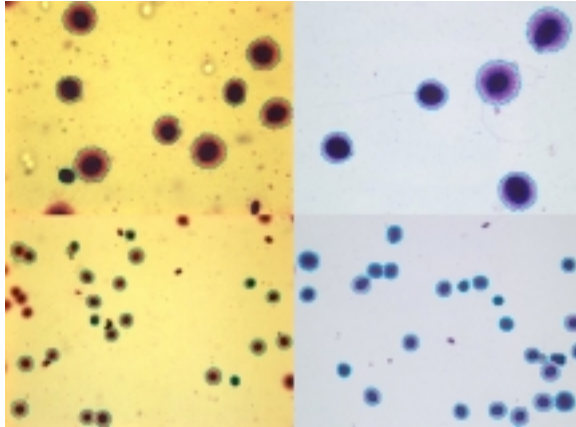


Figura 4: Resultados de los algoritmos de segmentación de los halos y los núcleos de los espermatozoides a x40 y x100, con diferentes cámaras, ópticas y preparaciones

## 5 IMPLEMENTACIÓN SEGÚN EL PROCESO UNIFICADO

La elaboración de nuevos y poderosos algoritmos de procesamiento de las imágenes requieren de una plataforma que contenga una sintaxis potente y flexible, capaz de incorporar las nuevas estrategias del procesado y segmentación de imágenes. Así se puede encontrar librerías en C++, como VTK[17], ITK[6], o bien, enmascaradas mediante un interprete de comando, como Matlab.

Ahora bien, una vez depurada la algoritmia, ésta requiere, en muchos casos, que se convierta en un paquete del dominio. Es aquí donde entra el Proceso Unificado[7]. Si bien muchos artefactos serán específicos de cada proyecto, los vocabularios de cada problemática en Visión tienen factorizadas algunas clases conceptuales[9]. Por ejemplo, el Procesador de Imágenes, el Clasificador, el Extractor de Características, etc. Un diagrama del dominio simplificado queda reflejado en la figura 5.

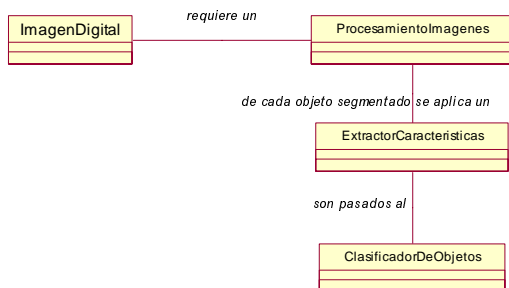


Figura 5: Modelo del dominio (clases conceptuales)

Siguiendo esta línea argumental, la aplicación de los patrones sugiere que para realizar Variaciones Protegidas (GRASP)[9], se propone emplear el patrón GoF estrategia [4] sobre el Procesador de Imágenes, el Clasificador, etc. De manera que las nuevas versiones de estos algoritmos de implementación no generen inestabilidad a los clientes de este paquete. Al frente del paquete se propone un coordinador (Fachada –GoF) y una herencia de clase observable ( Observador – GoF), haciendo que el paquete evite tener dependencias cíclicas y que sea fácilmente de mantener, gracias a su arquitectura de delegación de responsabilidades y de clases de alta cohesión. En la figura 6 y 7 se muestran los diagramas de colaboración de los objetos del paquete y de su diagrama de clases de diseño (DCD).

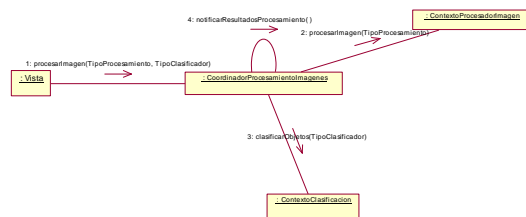


Figura 6: Diagrama de colaboración entre los objetos del paquete del dominio

En el DCD sólo se ha reflejado, a modo de ejemplo, cuál sería el esqueleto del diseño, sin entrar en detalle de las clases de implementación. De hecho, se menciona el uso de Factorías GoF de manera comentada, por si se desease una visibilidad global de estos objetos del dominio. Éstas serían combinadas con un Singleton GoF.

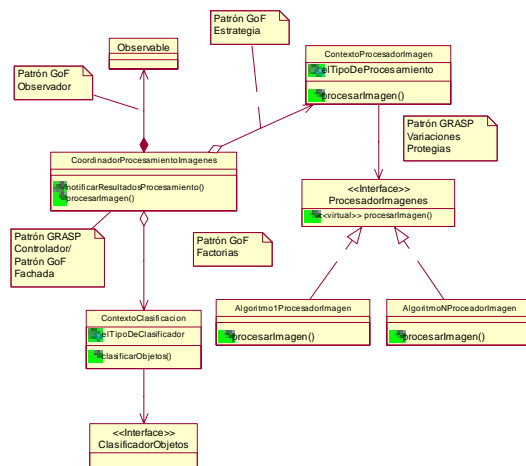


Figura 7: Diagrama de clases de diseño (DCD) del paquete

## 6 CONCLUSIONES

La segmentación automática de los cuerpos biológicos en imágenes biomédicas es una necesidad creciente. Se ha hecho un repaso a las distintas técnicas empleadas y ha habido la presentación de una metodología basada en el procesamiento PDE.

La aplicación de difusión isotrópica y anisotrópica mejora tanto los resultados de las técnicas de umbralización basadas en histogramas globales y/o locales, así como en la detección de bordes y en los campos vectoriales que deslizan el contorno activo. Estas técnicas han sido aplicadas con éxito a la segmentación de imágenes con espermatozoides humanos.

En el último punto, se han añadido algunos comentarios de cómo se puede desarrollar las aplicaciones con procesamiento de imágenes empleando el Proceso Unificado.

### Agradecimientos

El autor agradece a Jaime Gosálvez del Departamento de Genética de la Universidad Politécnica de Madrid la cesión de las imágenes de microscopía de espermatozoides humanos.

Este proyecto tiene financiación dentro del contrato de asistencia técnica entre la Universidad Autónoma de Madrid y la Universidad Politécnica de Madrid “ANÁLISIS Y CLASIFICACIÓN DE IMÁGENES DE ESPERMATOZOIDEOS HUMANOS OBTENIDOS MEDIANTE TÉCNICAS SCD (SPERM CHROMATIN DISPERSION)”.

### Referencias

- [1] Cohen, L.D., Cohen, I., (1993) *Finite-element methods for active contour models and balloons for 2-D and 3-D images*, IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intelligence, 15(11), 1131-1147.
- [2] Comaniciu, D., Meer, P., (1999) *Mean Shift Analysis and Applications*, IEEE Int'l Conf. Comp. Vis., Kerkyra, Greece, 1197-1203.
- [3] Fresno, M., Vénere, M., (2002) *Segmentación de imágenes médicas por crecimiento de regiones con conocimiento adicional*, Universidad Nacional del Centro.
- [4] Gamma, E., Helm, R., Johnson, R., Vissides, J., (1995) *Design Patterns: Elements of Reusable Object-Oriented Software*. Addison-Wesley.
- [5] Garrido A, Perez N., (2000) *Applying deformable templates for cell image in early vision*. Proc AARPA Image Understanding Workshop segmentation. Pattern Recognition, 33, 821-832.
- [6] Ibáñez, L., Schoeder, W., Ng, L.,(2003) *The ITK Software Guide*, [www.itk.org](http://www.itk.org)
- [7] Jacobson, I., Booch, G., Rumbaugh, J., (1999) *The Unified Software Development Process*. Addison-Wesley.
- [8] Kass, M., Witkin, A., Terzopoulos, D., (1987) *Snakes: active contour model*, Proc. IEEE Conf. Comput. Vision, London, England, 8-11, 259-268.
- [9] Larman, C., (2002) *Applying UML and Patterns*. Prentice Hall.
- [10] Lee, K., Streeby, N., (1999) *A Fast and Robust Approach for Automated Segmentation of Breast Cancer Nuclei*, Computer Science Department, University of Iowa.
- [11] Leroy, B., Herlin, I., Cohen, L.D., (1996) *Multi-resolution algorithms for active contour models*, 12<sup>th</sup> International Conference on Analysis and Optimization of System, 58-65.
- [12] Ortiz, F., Torres F., E. De Juan, E. N. Cuenca (2002) *Colour Mathematical Morphology For Neural Image Analysis*, Real-Time Imaging 8, 455-465.
- [13] Platero, C., Asensio G., Moreno, J.,(2004) *Combinación de la difusión isotrópica y anisotrópica en el procesamiento de imágenes*, Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial, en revisión.
- [14] Platero, C., Trillo, A., Úbeda, A.,(2002), *Procesamiento de imágenes biomédicas para el estudio de la influencia de la radiación electromagnética GSM sobre células madre neurales*, XXIII Jornadas de Automática, La Laguna, 9-11 sept.
- [15] Poggio, T., Torre, V., (1984) *Ill-posed problems and regularization analysis in early vision*, Proc. AARPA Image Understanding Workshop, 257-263.

- [16] Sahoo, P.K. ,(1988) *A survey of Thresholding Techniques*, Computer Vision, Graphics and Image processing, 41, 233-260.
- [17] Schoeder, W., Martin, K., Lorensen, B.,(2002) *The Visualization Toolkit. An Object-Oriented Approach to 3D Graphics*, Kitware – Pearson Education, Third Edition.
- [18] Tek, H., Kimia, B.B., (1995) *Image segmentation by reaction-diffusion bubbles*. Proc. Fifth Int. Conf. On Computer Vision, 156-162.
- [19] Umesh, P.S., Chaudhuri, B.B., (2000) *Segmentation and counting FISH signals in confocal microscopy images*, Microm 32, 5-15
- [20] Wählby, C., Bengtsson, E., (2003) *Segmentation of Cell Nuclei in Tissue by combining seeded watershed with gradient information*, SCIA 2003, LNCS 2749, 408-414.
- [21] Wu HS, Barba J, Gil J., (1998) *A parametric fitting algorithm for segmentation of cell images*. IEEE Trans Biomed Eng 45, 400–407.
- [22] Wu, K., Gauthier, D., Levine, D., (1995) *Live Cell Image Segmentation*, IEEE Trans. Biomedical Engineering, 40(1) 1-12.
- [23] Würflinger, T., Stockhausen, J., Meyer-Ebrecht, D., Böcking, A., (2004) *Robust automatic coregistration, segmentation, and classification of cell nuclei in multimodal cytopathological microscopic images*, Computerized Medical Imaging and Graphics 28, 87-98.
- [24] Xu, Ch., Prince, J.L., (1997) *Gradient Vector Flow: A New External Force for Snakes*, IEEE Proc. Conf. On Computer Vision and Pattern Recognition, 66-71.
- [25] Yang, F., Jiang, T, (2001) *Cell Image Segmentation with Kernel-based Dynamic Clustering and an Ellipsoidal Cell Shape Model*, Journal of Biomedical Informatics, 34, 67-73.