

Análisis de imágenes biomédicas en color procedentes de microscopía en campo claro

Carlos Platero

Grupo de Bioingeniería Aplicada
Dpto. Electrónica, Automática e Informática Industrial
Universidad Politécnica de Madrid
28012 Madrid
carlos.platero@upm.es

Resumen

Se presenta un marco de trabajo para la segmentación de cuerpos biológicos procedentes de imágenes en color. Éstas fueron adquiridas mediante microscopía en campo claro. La estrategia de segmentación se sustenta en tres pilares: a) Selección del espacio de representación de los colores, b) Técnicas de procesamiento vectorial empleando morfología en color y c) Proceso de segmentación en dos etapas, una de determinación de las regiones de interés y otra de refinamiento en la segmentación de los cuerpos biológicos.

1. Introducción

Cada vez más se emplea el análisis de imágenes para la realización de diagnósticos médicos. En ciertas patologías, las imágenes adquiridas por microscopía son imprescindibles para determinar el nivel de infección del paciente. Mayoritariamente se han empleado técnicas de marcaje, basada en propiedades de fluorescencia, acompañadas con el uso de filtros ópticos de color. Normalmente, se optaba por tomar diferentes imágenes del mismo escenario, con la diferencia de haber cambiado el filtro de color. La consecuencia era que se tenía imágenes en las que se había destacado algunas propiedades biológicas sobre el resto, por ejemplo, algún tipo de proteína, de un determinado virus o de una célula especializada. Por otro lado, las cámaras de vídeo acopladas en los microscopios solían ser monocromáticas.

Con la evolución de la tecnología, en los últimos años, se ha hecho factible el uso de cámaras en color. Gracias a este impulso

tecnológico, se ha favorecido el cambio hacia técnicas de adquisición en microscopía en campo claro. Las ventajas son extraordinarias en el ahorro de tiempo de trabajo para la preparación de las muestras. La tediosa elaboración de la fluorescencia y el cambio de filtros han sido suprimidos. Por el contrario, el marco de análisis de las imágenes se vuelve más complejo al pasar del análisis de imágenes en niveles de grises a imágenes en color.

Si con las imágenes monocromáticas, en microscopía, eran de bajo contraste, con abundante solapamiento entre los cuerpos biológicos y de baja calidad. Ahora, con la presencia del color, los problemas aumentan. La tonalidad de colores de los tejidos varía de un paciente a otro. La presencia de colores insaturados, bien debido a la presencia de ciertos objetos biológicos, como la grasa, o bien a la propia saturación en el proceso de adquisición, hace que el análisis se vuelva más dificultoso.

Tanto para el análisis de imágenes monocromática, como en color, el problema de segmentación no tiene una única solución. Se dice que está mal condicionado[15]. La solución es incorporar conocimiento a priori. De hecho, en muchas aplicaciones de análisis de imágenes biomédicas así se actúa; sus algoritmos se fundamentan en el conocimiento a priori de la forma o el tamaño de los cuerpos biológicos que van a parecer delante del microscopio. Ahora, con el color, también se le puede añadir atributos relacionados con el color, tales como el matiz o la saturación.

En la bibliografía sobre segmentación de cuerpos biológicos, se encuentran soluciones basadas en el análisis del histograma [18][13], en técnicas de crecimiento, división y agrupamiento de regiones[16][2], en aquellos que emplean en sus

soluciones las detecciones de bordes[4][19] y los que utilizan técnicas de clustering[1]. 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. En la primera etapa corresponde con el empleo de las técnicas mencionadas anteriormente, mientras en la segunda se pretende delimitar los objetos biológicos con precisión y resolver el problema del solapamiento entre los objetos biológicos. Para esta segunda fase se emplea técnicas basadas en los contornos activos[14], transformadas de Hough[4][8] o en métodos morfológicos como *watershed*[17].

2. Representación del color

Recientemente se está produciendo una proliferación de los métodos de análisis de imágenes en color. Muchos de ellos son extensiones de técnicas empleadas sobre imágenes en niveles de grises; por tanto, los fundamentos de estos algoritmos están bien asentados. Otros son técnicas *ad hoc* que resuelven un problema concreto. En [9] se puede encontrar un estado actual de las técnicas de segmentación en color.

En una primera aproximación, el procesamiento se podría dividir en dos categorías: a) marginal y b) vectorial. En el primer caso, cada canal de color es procesado de forma independiente. En el segundo, se considera como una terna o vector que debe ser tratado de forma unitaria. Sin embargo, las mayorías de las aplicaciones de procesamiento, ya sean de forma marginal o vectorial, producen en el espacio RGB falsos colores.

Aunque la representación del color mediante el sistema RGB es ampliamente utilizado para el almacenamiento y visualización de las imágenes, no resulta el sistema más apropiado para el procesamiento empleando atributos de color. La alternativa es un cambio a otro espacio de representación. Básicamente, se suele proponer o bien un espacio de percepción uniforme y fundado en la teoría de los colores opuestos, dando paso a las transformaciones CIELab y CIELuv[10]; o bien se busca un espacio 3D de coordenadas cilíndricas (ver figura 1). En esta nueva base, el color está definido por las siguientes propiedades:

- Luminancia o brillo (L): corresponde al eje axial del nuevo espacio. Su información es acromática. Este atributo está relacionado con la cantidad de luz que emite el cuerpo.
- Matiz (M): es el argumento en el plano perpendicular al eje axial. Hace referencia a las componentes frecuenciales dominantes del espectro visible de la superficie del objeto.
- Saturación: módulo en el plano perpendicular al eje axial. Propiedad asociada a la proporción cromática contenida en la sensación de color.

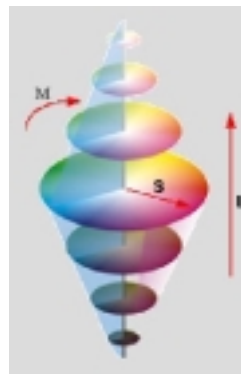


Figura 1. Variaciones del espacio de coordenadas cilíndricas (HLS)

Hay varias propuestas para este sistema 3D de coordenadas cilíndricas: HSV, HSI, HLS, HSB, etc. Adolecen la mayoría de ellas de una falta de uniformidad en la percepción de los colores. Muchas de ellas fueron pensadas para aplicaciones de Computación Gráfica. La forma natural de presentación de todo el espectro de color sería un cilindro. Sin embargo, estas transformaciones han expandido artificialmente el espectro de colores desde espacios en forma de conos o bi-conos a cilindros. La consecuencia es un acoplamiento entre la luminancia y la saturación. Una propuesta de mejora ha sido dada por Hanbury y Serra[5]. A este nuevo espacio le ha denominado IHLS (*Improved Hue, Luminance and Saturation*).

Una de las características de estos espacios de coordenadas cilíndricas es su éxito con el procesamiento morfológico. Sus operaciones básicas coinciden con la intuición de la percepción visual humana. En la práctica, estas operaciones se van a presentar como una herramienta muy eficiente para la interpretación de las imágenes en color.

3. Morfología en color

El procesamiento morfológico marginal se suele descartar por introducir cambios de colores que para muchas aplicaciones de análisis de imágenes resultan inaceptables. Por el contrario, en el procesamiento vectorial se necesita de la determinación de un orden y el establecimiento claro de un ínfimo y un supremo. Varias propuestas se recogen de la literatura especializada:

- Ordenamiento por una componente.
- Ordenamiento canónico
- Ordenamiento por una función de distancia
- Ordenamiento lexicográfico.

En el ordenamiento por una componente, éste es establecido por un canal del espacio del color. En el ordenamiento canónico, las tres componentes del espacio de color deben ser superiores o inferiores, a la vez, a otro vector de color. La definición de una función de distancia, estableciendo una relación entre espacio de color a una dimensión, permitirá definir el ordenamiento. Por último, el ordenamiento lexicográfico se asemeja al empleado en un diccionario de la lengua. Se basa en la asignación de prioridades a los elementos del vector para que posean más o menos peso. En este orden, sean dos vectores $x=(x_1, x_2, x_3)$ e $y=(y_1, y_2, y_3)$, se define el ordenamiento de la siguiente manera:

$$x > y \begin{cases} x_1 > y_1 & o \\ x_1 = y_1 & x_2 > y_2 & o \\ x_1 = y_1 & x_2 = y_2 & x_3 > y_3 \end{cases} \quad (1)$$

El orden lexicográfico es un orden total del vector, esto es, no hay ningún par de vectores cuyo orden no esté definido y en el conjunto está claramente establecido el ínfimo y el supremo. La desventaja de este ordenamiento es el papel dominante de la primera componente. En [11] estos métodos de ordenamiento son discutidos en profundidad.

3.1. El orden lexicográfico en el espacio de colores

Las operaciones básicas de morfología sobre el espacio RGB, empleando lexicografía, son factibles, aunque sus resultados son difíciles de interpretar físicamente. En cambio, en el espacio de colores de coordenadas cilíndricas tiene correspondencia con la intuición visual humana. Las componentes de luminancia y saturación son conjuntos totalmente ordenados. Sin embargo, se requiere previamente redefinir el canal matiz, por su carácter de magnitud circular.



Figura 2. Componente matiz del espacio de color de coordenadas cilíndricas

La elección de un color de referencia permite definir un ordenamiento de este canal. Peters [12] ha definido un orden para el matiz mediante una función de distancia, en valor absoluto, entre la gama de colores, M_i , y un color referencia, M_{ref} :

$$d(M_i, M_{ref}) = \begin{cases} |M_i - M_{ref}| & |M_i - M_{ref}| \leq \pi \\ 2\pi - |M_i - M_{ref}| & |M_i - M_{ref}| > \pi \end{cases} \quad (2)$$

El ínfimo corresponderá al matiz de referencia y el supremo al opuesto de éste. Sin embargo, la aplicación de esta distancia sobre las operaciones morfológicas, con orden lexicográfico, teniendo a este componente como principal, resultan ser inpropias. Por ejemplo, si se coloca la referencia sobre el matiz rojo y considerando un objeto rojo rodeado sobre un fondo blanco, se le aplica una operación de erosión, con un orden lexicográfico $M \rightarrow S \rightarrow L$ (matiz, saturación, luminancia), el efecto es contrario a la intuición. Los píxeles blancos, insaturados, invaden al objeto rojo. Esta consecuencia se debe a la indefinición de los

píxeles acromáticos o en niveles de grises, cuyo matiz es próximo al rojo y su nivel de saturación tiende a ser nulo.

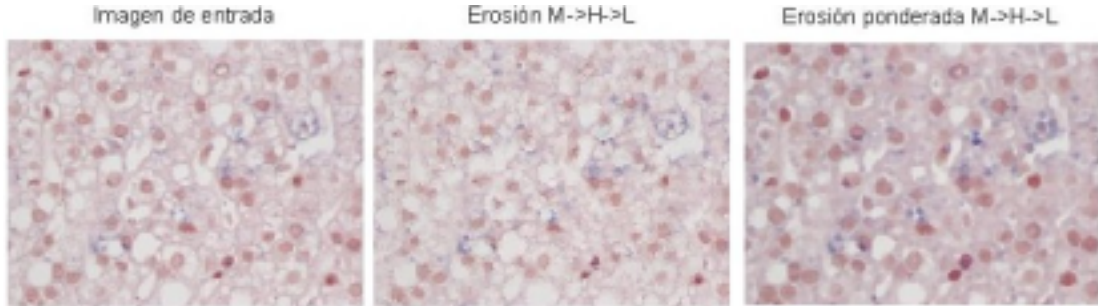


Figura 3. Comparación entre erosión con componente principal matiz y matiz ponderada con saturación en el espacio IHSL

Para evitar este efecto indeseado, se propone clasificar previamente a los píxeles en dos grandes grupos: saturados e insaturados. Aquellos píxeles que pertenezcan a la categoría de saturados, se les aplicará el orden lexicográfico siguiente:

$$x > y \begin{cases} d(M_x, M_{ref}) > d(M_y, M_{ref}) \\ d(M_x, M_{ref}) = d(M_y, M_{ref}) \\ S_x > S_y \quad o \\ d(M_x, M_{ref}) = d(M_y, M_{ref}) \\ S_x = S_y \quad L_x > L_y \end{cases} \quad (3)$$

Por el contrario, para los píxeles catalogados como insaturados, se les asignará el nivel de máximo o mínimo del rango de la distancia de matiz, según la operación morfológica a aplicar. Posteriormente, se le aplicará un orden para la preservación de los contornos. La lexicografía quedará definida para estos píxeles como:

$$x > y \begin{cases} L_x > L_y \quad o \\ L_x = L_y \quad S_x > S_y \end{cases} \quad (4)$$

En la figura 3 se puede comparar la erosión sobre una imagen de microscopía en campo claro, con elemento estructurante de tipo disco

con radio 2. Nótese las diferencias entre una operación con componente principal matiz, con otra de componente matiz ponderado con la saturación.

Las distintas combinaciones de las componentes del espacio de color de coordenadas cilíndricas, según el orden lexicográfico para operaciones morfológicas, sugiere las siguientes aplicaciones:

- La mejor preservación de los contornos de los objetos se consigue empleando, en primer lugar, la componente de luminancia.
- Si la escena se caracteriza por objetos altamente coloreados sobre un fondo insaturado, un aumento del contraste se puede conseguir con operaciones morfológicas con orden lexicográfico priorizadas con la saturación.
- La selección de objetos por color puede ser potenciada con un ordenamiento en primer lugar con la componente de matiz ponderada con la saturación.

4. Aplicaciones

Para determinar el nivel de infección del virus C de la Hepatitis sobre un paciente, se extrae una biopsia del hígado de éste y se hace una contabilidad entre el número de hepatocitos respecto del número de señales del virus C. Un aumento de la fiabilidad del diagnóstico depende de la automatización del proceso de análisis de las imágenes.

En el pasado, se emplearon técnicas de análisis en imágenes acromáticas. Por cada paciente se tomaban dos grupos de imágenes: a) escenarios de hepatocitos en fluorescencia y b) señales de virus en campo claro.

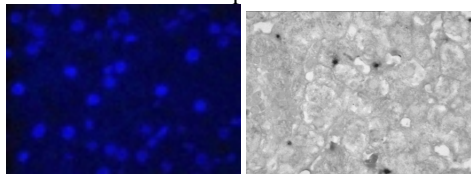


Figura 4. Imágenes acromáticas de la biopsia a) Hepatocitos en fluorescencia b) señales de virus C

Con la adquisición de cámaras en color, sólo es necesaria una única captura en campo claro. Los escenarios se caracterizan por una presencia abundante de objetos insaturados, correspondientes al fondo. Los hepatocitos tienen una tonalidad rojiza mientras las señales de virus se aproximan a un color azul oscuro.

Según el marco de trabajo establecido, se propone, en primer lugar, determinar las regiones de interés. Una dilatación, con orden lexicográfico $S \rightarrow L \rightarrow M$, realzará las zonas de los hepatocitos respecto del fondo. En menor medida se destacarán las señales del virus C. Un posterior análisis del histograma del canal de saturación facilitará la determinación de las regiones de los hepatocitos. En la figura 5 se aprecian las diferencias de segmentación de las regiones con y sin procesamiento previo de la dilatación morfológica.

Las señales del virus tienen una tonalidad azul, por lo que se procede a una erosión de matiz ponderado con la saturación y colocando como referencia el matiz a 225° (ver figura 2). Una vez realzado la señal del virus C, se procede a la segmentación basado en el criterio de un matiz de $\pm 45^\circ$ alrededor de la referencia (figura 6).

En el refinamiento de los hepatocitos se emplea la reconstrucción geodésica y la eliminación de áreas espurias que pertenecían al virus C. Para el solapamiento entre hepatocitos se emplea la técnica de *watershed* controlado por marcadores, aplicándolo exclusivamente en áreas de células que se salen del tamaño normal (figura 7).

Este proceder se hace robusto ante variaciones en la captura de las imágenes, ya sea por cambios en la adquisición o en la preparación de la muestra. En la figura 8 se presentan otros resultados de pacientes distintos y con variaciones sensibles en la adquisición:

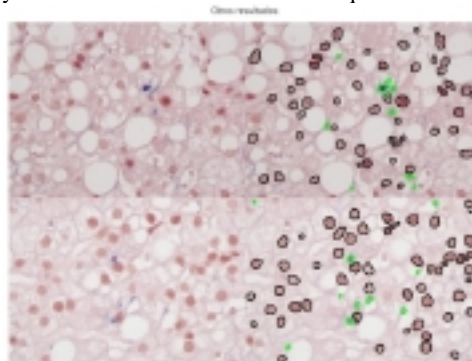


Figura 8. Otros resultados del algoritmo sobre preparaciones distintas

La algoritmia ha sido implementada e introducida en la aplicación *VirusCCount*®. Para su diseño se ha utilizado el Proceso Unificado[6] y los patrones de diseño GRASP[7] y GoF[3]. En [14] se detalla un *framework* para la implementación de aplicaciones basadas en el análisis de imágenes, con lenguajes orientados a objetos.

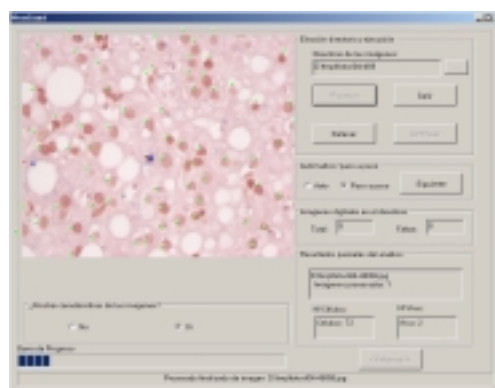


Figura 9. Aplicación *VirusCCount*

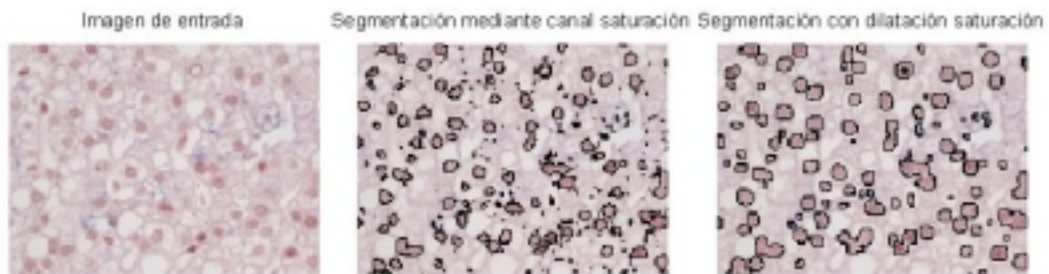


Figura 5. Proceso de determinación de las regiones de los hepatocitos

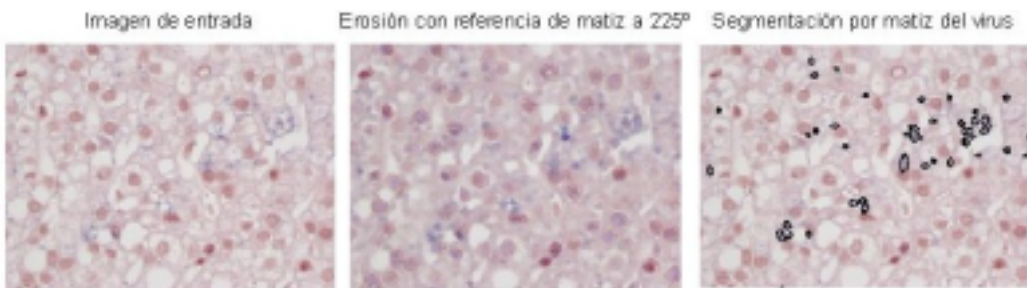


Figura 6. Segmentación de las señales de virus C

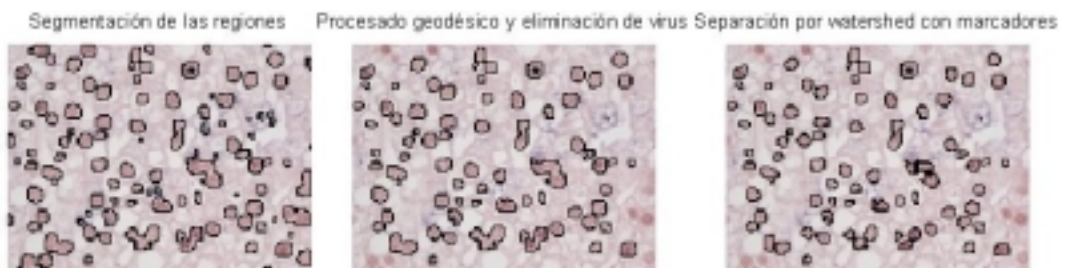


Figura 7. Segmentación de los hepatocitos

5. Conclusiones

Se ha presentado una aplicación de análisis de imágenes biomédicas en color. En concreto, la segmentación de hepatocitos y virus C, para el diagnóstico sobre el nivel de infección de los pacientes.

Bajo el marco de trabajo propuesto, se determinan los objetos en dos etapas: a) Segmentación de las regiones de interés y b) refinamiento en la obtención de los objetos biológicos. Para estas dos fases se ha empleado

la representación del color en coordenadas 3D cilíndricas.

La dilatación con orden lexicográfico $S \rightarrow L \rightarrow M$ ha realizado los cuerpos de interés. La determinación de las regiones de interés se produce por un análisis de la componente de saturación.

Las señales de virus C se han determinado por un procesado de erosión ponderado con la saturación y con referencia en la tonalidad azul. La segmentación está basada en la distancia al matiz de referencia.

El refinamiento de los hepatocitos se consigue con una combinación de técnicas de

reconstrucción geodésica y de *watershed* con marcadores.

Agradecimientos

El autor agradece a la Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales la cesión de las imágenes que se ha empleado para este trabajo.

Referencias

- [1] Bak, E., Najarian, K., Brockway, J.P., *Efficient segmentation framework of cell images in noise environments*, Proceedings of The 26th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEEE/EMBS 2004), San Francisco, CA, U.S.A., Sept 1–5, 2004.
- [2] Fresno, M., Vénere, M., *Segmentación de imágenes médicas por crecimiento de regiones con conocimiento adicional*, Universidad Nacional del Centro, 2002.
- [3] Gamma, E., Helm, R., Johnson, R., Vissides, J., *Design Patterns: Elements of Reusable Object-Oriented Software*. Addison-Wesley, 1995.
- [4] Garrido A, Perez N., *Applying deformable templates for cell image in early vision*. Proc AARPA Image Understanding Workshop segmentation. Pattern Recognition, 33, 821–832, 2000.
- [5] Hanburry, A., Serra, J., A 3D-polar coordinate colour representation suitable for image analysis, technical report PRIP-TR-077, TU Wien, 2002.
- [6] Jacobson, I., Booch, G., Rumbaugh, J., *The Unified Software Development Process*. Addison-Wesley, 1999.
- [7] Larman, C., *Applying UML and Patterns*. Prentice Hall, 2002.
- [8] Lee, K., Streety, N., *A Fast and Robust Approach for Automated Segmentation of Breast Cancer Nuclei*, Computer Science Department, University of Iowa, 1999.
- [9] Lucchese, L., Mitra, S.K., *Color Image Segmentation: A State-of-the-Art Survey*, Proc. of the Indian National Science Academy (INSA-A), New Delhi, India, Vol. 67 A, No. 2, pp. 207-221, 2001.
- [10] Mahy, M., Van, B., Van, L., Oosterlinck, A., *The influence of uniform color spaces on color image processing: A comparative study of CIELAB, CIELUV, and ATD*, J. Imaging Tech. I7, 5, 232-243, 1991.
- [11] Ortiz, F., *Procesamiento morfológico de imágenes en color. Aplicación a la reconstrucción geodésica*, Tesis doctoral, Universidad de Alicante, 2002.
- [12] Peters, A., *Mathematical morphologic for angle-valued images*, Processing of SPIE, Non Linear Image Processing VIII, vol. 3026, 84-94, 1997.
- [13] Platero, C., Trillo, A., Úbeda, A., *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., 2002.
- [14] Platero, C., *Segmentación automática de imágenes de espermatozoides humanos mediante técnicas SDC*, XXV Jornadas de Automática, Ciudad Real, 9-11 sept., 2004.
- [15] Poggio, T., Torre, V., *Ill-posed problems and regularization analysis in early vision*, Proc. AARPA Image Understanding Workshop, 257-263, 1984.
- [16] Umesh, P.S., Chaudhuri, B.B., *Segmentation and counting FISH signals in confocal microscopy images*, Microm 32, 5-15, 2000.
- [17] Wählby, C., Bengtsson, E., *Segmentation of Cell Nuclei in Tissue by combining seeded watershed with gradient information*, SCIA 2003, LNCS 2749, 408-414, 2003.
- [18] Wu, K., Gauthier, D., Levine, D., *Live Cell Image Segmentation*, IEEE Trans. Biomedical Engineering, 40(1) 1-12, 1995.
- [19] Yang, F., Jiang, T., *Cell Image Segmentation with Kernel-based Dynamic Clustering and an Ellipsoidal Cell Shape Model*, Journal of Biomedical Informatics, 34, 67-73, 2001.