



**Carlos Óscar Sánchez Sorzano**

Profesor adjunto y coordinador del área de teoría de la señal y las comunicaciones de la Universidad San Pablo CEU



**José Mª Carazo García**

Director de la unidad de biocomputación del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC

## Avances en el procesamiento de imágenes biológicas a nivel microscópico

La biología es actualmente uno de los campos científicos con mayor nivel de acumulación de conocimientos debido a los descubrimientos celulares, moleculares y genéticos que se están llevando a cabo. El análisis de estas grandes cantidades de datos es particularmente poderoso cuando se pueden interpretar de una forma gráfica mediante imágenes que representen cómo se producen los diferentes eventos a nivel celular y a nivel molecular. Esto nos lleva a imágenes de objetos en el rango microscópico. Existen diversas técnicas de adquisición de esta información, cada vez más potentes, pero cuyas imágenes deben ser procesadas para poder destacar aquella parte de la información más relevante. Es en este punto donde los ingenieros de telecomunicación juegan un papel fundamental, puesto que el procesamiento de imágenes no es más que un procesamiento de señales bidimensionales, y el procesamiento de señales es algo muy conocido en nuestra ingeniería.

**E**n un artículo editorial de la revista de divulgación Proceedings of the IEEE de 2006, uno de los editores, Fawwaz Ulaby, se planteaba cómo hacer

biología como uno de los terrenos científicos que más rápido está avanzando en la comprensión de los fenómenos que estudia, gracias a los nuevos descubrimientos (en

tisular (de tejidos), celular y molecular. Es evidente que una de las posibles formas de contribuir a este progreso desde la ingeniería es la de participar en las mejoras de las técnicas necesarias en los diferentes aspectos que se necesitan en la investigación biológica científica.

**“Desde muchos sectores se reconoce actualmente a la biología como uno de los terrenos científicos que más rápido está avanzando en la comprensión de los fenómenos que estudia, gracias a los nuevos descubrimientos (en gran parte favorecidos por los avances técnicos desde otras áreas)”**

ingeniería en la era de la biología. Desde muchos sectores es cierto que se reconoce actualmente a la

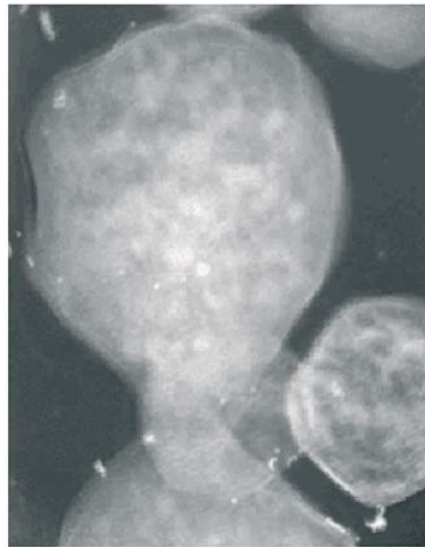
gran parte favorecidos por los avances técnicos desde otras áreas) que se están produciendo a nivel



Microscopía óptica

Uno de estos campos es sin duda el procesamiento de imágenes, algo habitualmente estudiado en nuestras escuelas de ingeniería y que es utilizado por la biología y otras ciencias de la vida para poder describir con profundidad un determinado fenómeno. Es decir, no describirlo tan sólo desde su aspecto fenotípico y bioquímico sino también estructural, de cómo realmente se disponen en el espacio los diversos elementos que participan en un determinado proceso y cómo es cada uno de ellos por separado. Para adquirir esta información no hay más remedio que recurrir a técnicas microscópicas que nos permitan visualizar el proceso estudiado desde diferentes puntos de vista y resoluciones.

Vamos a hacer un barrido de las diferentes técnicas microscópicas



Microscopía de rayos X

dentamente fueron los fotones y la propiedad que se modificaba era principalmente la cantidad de fotones (y su color) presentes en el haz (éste era el principio de acción del microscopio óptico de Anton

## “Actualmente un microscopio óptico puede llegar a un poder de magnificación de 5.000 veces con luz azul monocromática”

y mencionaremos aquellos puntos de la ingeniería más activos en la actualidad en cada una de ellas.

### ► Conceptos básicos de microscopía

Casi todos los dispositivos microscópicos se basan en la iluminación de una muestra con un haz de partículas. Las partículas (o el haz) al interactuar con la materia modifican algunas de sus propiedades físicas y es esta modificación la que se recoge en el llamado plano de formación de imagen.

**Haz de partículas:** Las primeras partículas que se utilizaron evi-

van Leeuwenhoek en 1650). Es decir, cuando se hace incidir un haz de luz blanca sobre un objeto y se recoge la imagen a su través que resulta ser, por ejemplo, de color rojo, realmente la información que recogemos es que los fotones de otros colores son absorbidos por la muestra y la intensidad de rojo registrada es proporcional a la absorción de la muestra de los fotones de la longitud de onda (o conjunto de longitudes de onda) del color observado.

**Longitud de onda:** Es por tanto la longitud de onda una cualidad fundamental del haz de exploración. Por este motivo, el avance en

el diseño de nuevos microscopios ha estado muy ligado al uso de longitudes de onda menores, como es el caso del microscopio de rayos X (1940) y del microscopio electrónico (1938), si bien el funcionamiento del microscopio electrónico no se basa en la absorción de los electrones sino en la reflexión de electrones secundarios emitidos por la superficie o en los cambios de fase que sufren los electrones al interactuar con la muestra.

**Resolución:** La resolución se define como la separación mínima entre dos puntos tal que pueden ser observados como dos puntos independientes y no como uno sólo. Intuitivamente la resolución se relaciona con el tamaño de los objetos más pequeños que somos capaces de observar con una determinada técnica. Es este punto uno de los más activos desde el punto de vista de la ingeniería, puesto que continuamente se están proponiendo nuevas técnicas de procesamiento de imágenes con el objetivo de alcanzar mejores resoluciones con los mismos dispositivos de adquisición.

**Coherencia de haz:** Uno de los aspectos en los que más se ha avanzado últimamente en microscopía es en el de conseguir haces de partículas cada vez más coherentes, es decir, todos emitidos con una fase común. Este avance ha sido posible gracias al descubrimiento del láser que ha dado lugar a nuevos tipos de microscopías que aprovechan la coherencia del haz para descubrir facetas antes desconocidas.

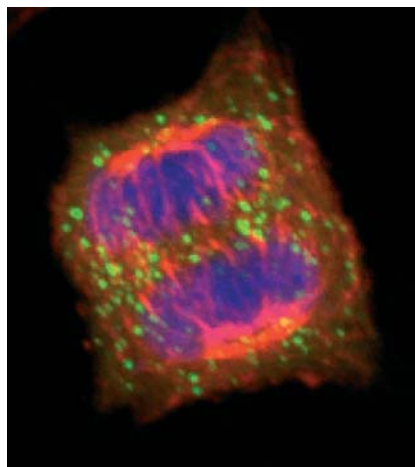
**Transmisión, reflexión o emisión:** Lo más habitual es iluminar externamente la muestra con una fuente de partículas controla-

da por el operador. La imagen se forma, por tanto, por el registro de las propiedades de las partículas que llegan al punto de observación, bien sea por transmisión (parte del haz atraviesa el objeto) o por reflexión (parte del haz se refleja en el objeto). Sin embargo, aparecen nuevos tipos de microscopía en los que la fuente de partículas se encuentra situada dentro del mismo objeto. Éste es el caso de la autoradiografía (la muestra contiene isótopos radiactivos que son detectados desde el exterior) o la fosforescencia (la muestra emite fotones en el rango visible y no contiene isótopos). La fluorescencia es similar a la fosforescencia ya que la muestra es iluminada con un haz de una determinada longitud de onda (normalmente en el rango del ultravioleta), la muestra absorbe estos fotones, se excita y posteriormente se relaja en un tiempo muy corto (ésta es su principal diferencia con respecto a la fosforescencia) emitiendo fotones de una longitud de onda mayor en el rango del visible.

## Tipos de microscopía

El primer microscopio óptico se diseñó en Holanda en 1650. Durante casi tres siglos los avances en microscopía se han limitado a las mejoras constructivas de las lentes, los microscopios, mejoras en la calidad de imagen, etc. Actualmente un microscopio óptico puede llegar a un poder de magnificación de 5.000 veces con luz azul monocromática.

Sin embargo, los avances de la física cuántica y física atómica a principios del siglo XX posibilitaron un avance espectacular en la microscopía. En primer lugar se diseñó el microscopio electrónico



Microscopía confocal

en 1932 (los autores del mismo recibieron el premio Nobel de física en 1986). Luego sobrevino el microscopio de emisión de campo (1936), el microscopio de rayos X (1940), el microscopio de iones de campo (1951), el microscopio confocal de barrido (1957), y el microscopio electrónico de barrido y de efecto túnel (1981) también premio Nóbel de física en 1986.

Los diferentes tipos de microscopía difieren en:

- La fuente energética utilizada, que pueden ir desde una simple

- La disposición geométrica entre la fuente, la muestra y el punto de información.
- El principio de interacción con la materia (absorción, reflexión, cambio de fase, etc.).

Las diferentes combinaciones de elementos en cada uno de estos puntos dan lugar a una infinidad de distintas microscopías, cada una con sus puntos fuertes y sus puntos débiles, por lo que cada una de ellas termina encontrando su nicho de aplicación.

## Problemas de procesamiento de imágenes asociados

Los problemas de tratamiento de imágenes relacionados con el procesamiento de imágenes microscópicas son muy numerosos. En este artículo nos limitaremos a mencionar algunos de ellos:

### Eliminación de aberraciones:

Los microscopios pueden ser modelados con una función de transferencia que da cuenta de cómo una imagen ideal es visuali-

.....

**“Los avances de la física cuántica y física atómica a principios del siglo XX posibilitaron un avance espectacular en la microscopía”**

.....

lámpara (microscopía óptica), un láser (microscopía confocal), un sincrotrón (microscopía de rayos X), o una fuente de electrones (microscopía electrónica).

- La colocación de la fuente energética: externa a la muestra o interna.

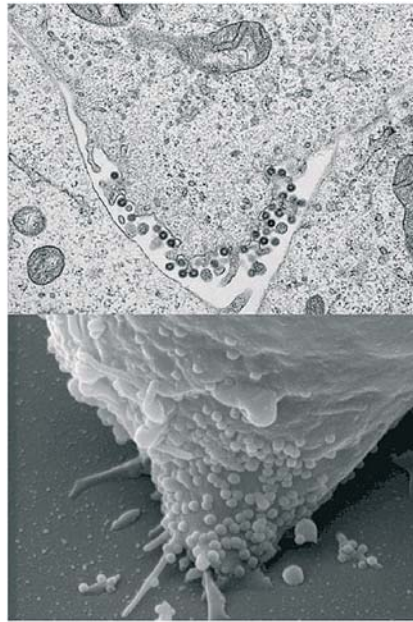
zada en la práctica (esto es, relaciona la imagen ideal con la real). Idealmente esta función de transferencia sería la función identidad (de forma que ambas imágenes sean iguales). Sin embargo, es de prever que éste no es el caso en ningún microscopio (entonces se dice que el microscopio introduce

aberraciones). Posteriormente, hay que corregir las imágenes adquiridas, intentando que se parezcan lo más posible a las imágenes ideales, dando lugar a un proceso que se conoce como restauración de imágenes y que en el caso de modelos lineales recibe el nombre de deconvolución.

**Eliminación de ruido:** Los microscopios y los sistemas de digitalización de imágenes introducen ruido en el sistema en diferentes puntos del proceso de adquisición de imágenes. Es importante caracterizar estas fuentes de ruido y diseñar las técnicas de procesamiento de señal adecuadas para disminuir su influencia sobre la imagen final.

**Segmentación:** La segmentación es el proceso mediante el cual se selecciona de forma automática la parte "interesante" de nuestra imagen, es decir, se delimitan los contornos de nuestros objetos de interés. Hay mucha investigación en desarrollar métodos automáticos de segmentación de imágenes. Todos ellos deben contar con información *a priori* de lo que el usuario entiende por "interesante". Esta información previa puede venir en forma de una descripción estadística, semántica, formal o de cualquier otro tipo de las características buscadas, o bien por una colección de ejemplos. En este punto el procesamiento de imágenes se une en gran medida con las técnicas de análisis de datos y reconocimiento de patrones provenientes de la estadística y con las técnicas de inteligencia artificial provenientes de las ciencias de la computación.

**Reconstrucción:** En muchas ocasiones la información visual de un objeto no viene dada por una única imagen, sino que se encuen-



Microscopía electrónica

tra dispersa en varias imágenes. La información sobre nuestro objeto se encuentra repartida entre varias señales y debemos desarrollar el procedimiento de tratamiento de señal adecuado capaz de extraer la información de las diferentes partes e integrarlas en un todo. Dependiendo de cómo se encuentre la información dispersa, este problema recibe el nombre de fusión de imágenes, tomografía, interpolación, técnicas de mosaico, registro de imágenes, mejora de la resolución, etc.

**Integración y representación:** la información recogida sobre un objeto biológico puede ser muy diversa y proveniente de diferentes tipos de microscopía e incluso otras técnicas experimentales no visuales. Es importante poder integrar toda esta información en un único modelo de representación que permita al usuario "navegar" de forma intuitiva y cómoda por la enorme cantidad de información espacial y contextual del objeto estudiado, permitiéndole en cada caso visualizar únicamente aque-

lla información que le resulte relevante en ese momento.

**Interpretación:** Por último, los datos visuales pueden ser sometidos a un posterior procesamiento que intente extraer información "oculta", o por lo menos no obviamente visible. En este punto, las tareas de investigación están muy relacionadas con las técnicas de minería de datos y con las técnicas de reconocimiento de patrones. Del mismo modo encuentran aplicación en esta tarea técnicas de inteligencia artificial.

## Conclusiones

Es muy difícil concebir el avance científico sin tener en cuenta la capacidad de las imágenes de representar grandes cantidades de datos de una forma que permite la exploración interactiva. Las técnicas microscópicas proveen dicha información visual, aunque en muchas ocasiones, dicha información se encuentra enmascarada por aberraciones, ruido, dispersa en varias piezas de información, etc. La investigación desarrollada por los ingenieros de telecomunicación en este campo (debido sobre todo a su formación en el procesamiento de señales) es fundamental para lograr alcanzar una mayor comprensión de los procesos biológicos que se llevan a cabo. De hecho, hay grandes grupos y centros interdisciplinarios (como el National Center for Microscopy and Imaging Research en La Jolla, California) cuyo objetivo es el de concentrar en un mismo recinto a científicos de las ciencias de la vida y a matemáticos, físicos e ingenieros de todas las disciplinas para avanzar en nuestra comprensión de los fenómenos biológicos a través de su visualización. ♦