



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: segmentación

La segmentación de imágenes se refiere al proceso mediante el cual se agrupan determinados píxeles de una imagen como pertenecientes a un mismo objeto. Este procedimiento puede ser considerado como el paso de más bajo nivel hacia una comprensión de la semántica de una imagen: ¿qué es qué dentro de una imagen? En biología, la segmentación cada vez cobra más importancia, puesto que la creciente cantidad de imágenes producidas requieren de etiquetas que permitan el procesado automático de la información.

La segmentación de imágenes es el proceso mediante el cual asignamos una etiqueta a cada uno de los píxeles de una imagen, de manera que píxeles con características comunes son agrupados como pertenecientes a una misma entidad (ver Fig. 1). Nuestro objetivo es que estas entidades se correspondan con los diferentes objetos de una imagen. Sin embargo, como decían los antiguos griegos: “La belleza está en el ojo del observador”. En este caso, los objetos de interés también están en el ojo del observador o, dicho de otra forma, puede haber múltiples formas de entender cuáles son los diferentes objetos de una imagen, lo que se traduce tanto en diversas metodologías de segmentación, como en el proceso de asignación de etiquetas a cada una de las clases. Tomemos como ejemplo la Figura 1, en la sección de la derecha se muestra una segmentación que ha clasificado los píxeles como pertenecientes a diferentes células, mien-

tras que en la sección central los píxeles se han clasificado como pertenecientes al núcleo o al citoplasma. Vemos, así, que la segmentación es un proceso complejo, que depende en gran medida de lo que se esté buscando en una imagen. Es más, a veces un proceso de segmentación de bajo nivel, como el que se muestra en la sección central de la Figura 1, sirve de

de secuencias de vídeo bidimensional, o vídeo tridimensional (ver Fig. 2).

Las propiedades deseables de una región serían la homogeneidad del color o intensidad dentro de la misma, la homogeneidad de su textura y la existencia de bordes claros con las regiones adyacentes. Cómo medir la homogeneidad de

.....
“La segmentación no tiene por qué limitarse a la imagen bidimensional, sino que el mismo concepto puede ser extendido a volúmenes tridimensionales, análisis de secuencias de vídeo bidimensional, o vídeo tridimensional”
.....

entrada a una segmentación posterior de más alto nivel, como la realizada en la sección derecha de la figura. La segmentación no tiene por qué limitarse a la imagen bidimensional, sino que el mismo concepto puede ser extendido a volúmenes tridimensionales, análisis

la intensidad o la textura son puntos abiertos actualmente y continúan publicándose nuevos algoritmos que tratan de resolver este problema. La homogeneidad del color es aún un problema mayor, puesto que los sistemas estándares de representación de color (RGB, HSI,

HSV y CMYK) no son uniformes desde el punto de vista de la percepción humana: es decir, la distancia entre dos colores definidos como vectores en estos espacios no se corresponde con la distancia percibida por las personas. Es por ello que se han definido nuevos espacios de representación del color (CIE $L^*u^*v^*$ y CIE $L^*a^*b^*$) más ajustados a la percepción humana de distancia entre colores. También son reseñables aquellos trabajos que intentan incorporar a la información de color estimaciones de la reflectividad del material (es decir, si se trata de un material metálico o un dieléctrico y cuál es su radiancia). Sin embargo, y debido a la evolución histórica de los algoritmos de segmentación, encontramos métodos operando en cualquiera de los espacios de color así como utilizando únicamente información de intensidad. De hecho, la segmentación en color no es todavía un estándar debido al aumento de la computación por el hecho de utilizar vectores tridimensionales en lugar de escalares, así como por el aumento de la complejidad técnica del algoritmo.

Las técnicas de segmentación utilizadas en biología no difieren en absoluto de las técnicas estándar utilizadas en procesamiento de imágenes, si bien, y debido a la

dependencia de la segmentación con los resultados deseados por el usuario, los programas suelen ofrecer soluciones semiautomáticas en las que el usuario indica algunos puntos pertenecientes a una misma región y el programa “completa” la región con el resto de puntos similares. Esta técnica se verá más abajo y es lo que se conoce como crecimiento de regiones.

Las técnicas de segmentación se pueden dividir en técnicas basadas en el color o técnicas basadas en la imagen. Las primeras asignan la misma etiqueta a colores o intensidades similares, independientemente de si los píxeles etiquetados forman un conjunto espacialmente compacto. Las técnicas basadas en imagen asignan la misma etiqueta sólo a píxeles que forman una región compacta. Revisemos brevemente cada una de estas dos familias de técnicas. El lector interesado puede leer las revisiones del campo realizadas por Freixenet [1] y Lucchese [2].

■ Técnicas basadas en el color

Estas técnicas utilizan la información de color o intensidad de un píxel y, en los algoritmos más

avanzados en los que se incorpora información de textura, el color de sus vecinos a la hora de definir las diferentes regiones. Históricamente, las técnicas de umbralización se desarrollaron en la década de los 80, las de clustering a principios de los 90, y las de color local a finales de los 90.

- **Umbralización:** quizás la técnica más simple de separar objetos en una imagen es asignando etiquetas diferentes a diferentes zonas del histograma de intensidades. Esta técnica se puede extender a varias clases simplemente dividiendo el histograma en más clases y a imágenes de color, aunque en este caso no es tan fácil la asignación de clases en los histogramas de las tres componentes de color. Muchas veces la umbralización es manual, aunque hay algoritmos que tratan de hacer una segmentación automática por medio de *watersheds* (el histograma se interpreta como una serie de montañas y valles que al inundarse con agua van dejando diferentes “islas” o clases) o buscando umbrales que maximicen la entropía de las clases separadas.
- **Clustering:** siempre que podamos codificar la información local de un píxel mediante un

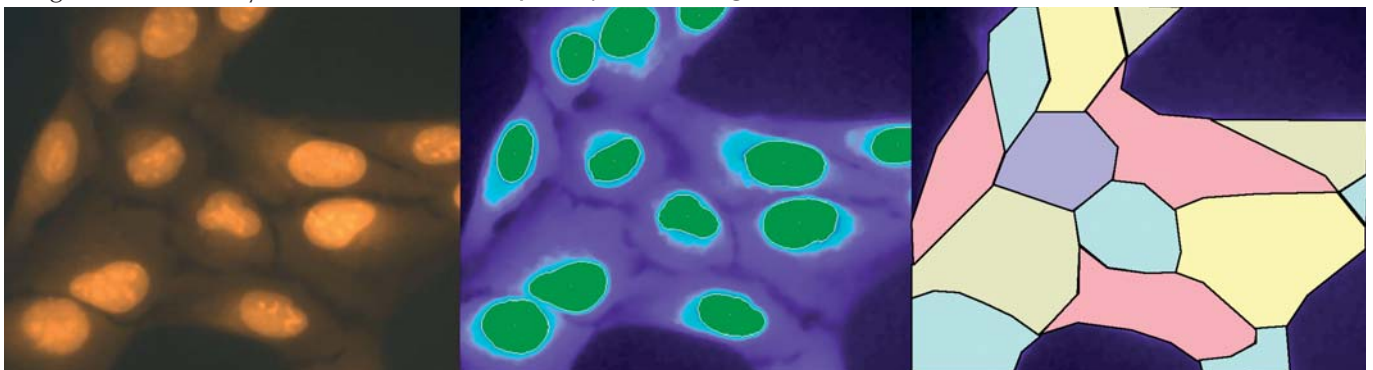


Fig. 1. Ejemplo de segmentación en imágenes de microscopía. En la figura de la izquierda se muestran una células teñidas al microscopio de fluorescencia. En la imagen central se asigna una etiqueta diferente (representada con un color diferente) al núcleo y al citoplasma de varias células. En la figura de la derecha se asignan etiquetas según a la célula a la que pertenecen los píxeles.

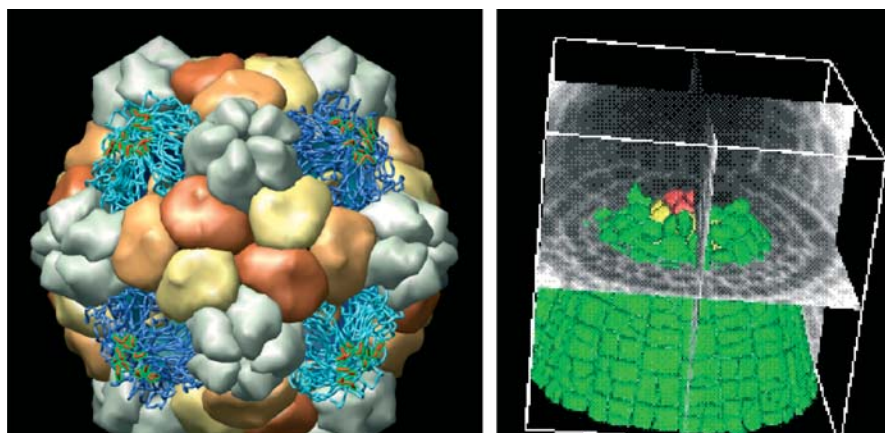


Fig.2. Ejemplo de la segmentación de las proteínas de un virus (izq.) y de una célula meristemática (der.)

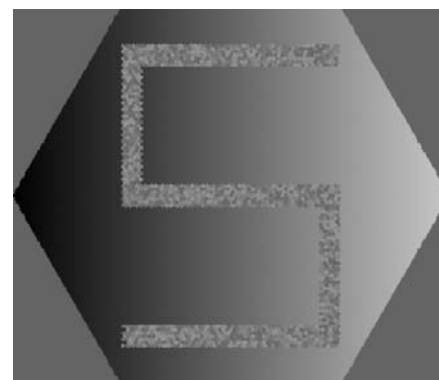


Fig.3. Ejemplo de variación local en una imagen. La imagen del 5 es difícilmente segmentable utilizando los valores de intensidad de forma global.

vector, podemos utilizar técnicas de agrupamiento de vectores (clustering) para definir las clases tales como k-medias, k-medias difusas, mapas autoorganizativos, división de grafos, etc. Un inconveniente habitual en todas estas técnicas de agrupamiento es que el usuario debe indicar el número de clases en las que quiere dividir la imagen (en el ejemplo central de la Fig.1 serían tres clases: núcleo, citoplasma, y fondo). Si se dispone de un conjunto de imágenes de entrenamiento, entonces se pueden emplear técnicas de clasificación de vectores en lugar de clustering. Entre estas técnicas figurarían las redes neuronales, las redes bayesianas, el análisis discriminante, las máquinas de vectores de soporte (*Support Vector Machines*), etc.

- **Color local:** hay técnicas que adaptan los criterios de homogeneidad a las variaciones locales de color (ver Fig. 3) y así permiten el seguimiento de un mismo objeto a lo largo de la imagen aunque los niveles de intensidad del mismo y los del fondo varíen. La idea es que dos puntos pertenecen a un mismo

objeto si puedo encontrar un camino entre ellos tal que las características locales del color no varían demasiado de un punto al siguiente en ese camino (así, estas técnicas son un híbrido entre las técnicas basadas en color y las basadas en la imagen).

■ Técnicas basadas en la imagen

Como hemos visto anteriormente, las técnicas basadas en el color (salvo las de color local) no consi-

derecha de la Fig. 1). Las siguientes técnicas se orientan hacia la consecución de regiones con esta propiedad.

- **Split-and-merge:** La dinámica de estos algoritmos es bien sencilla: se comienza considerando la imagen completa como una única región. Luego se comprueba si la región es suficientemente uniforme. Si no lo es, se subdivide en cuatro regiones iguales, y para cada una de ellas se vuelve a aplicar el criterio anterior (es lo que se conoce como división en *quad-tree*).

.....

“Las propiedades deseables de una región serían la homogeneidad del color o intensidad dentro de la misma, la homogeneidad de su textura y la existencia de bordes claros con las regiones adyacentes”

.....

deran la proximidad espacial de los píxeles pertenecientes a una misma región, pero en ocasiones es interesante que las clases se correspondan con regiones compactas de la imagen (como es el caso de la segmentación de la

Una vez que se ha terminado de subdividir la imagen, se van uniendo regiones adyacentes que cumplan el criterio de homogeneidad. Existen multitud de algoritmos con variaciones sobre el criterio de homogenei-

dad y sobre la estrategia de unión de regiones adyacentes. Por su simplicidad, estas técnicas fueron desarrolladas a comienzos de los 80.

- **Crecimiento de regiones:** Estas técnicas también se basan en una idea muy sencilla: a partir de una semilla perteneciente a una región, se van añadiendo píxeles adyacentes mientras se cumpla un criterio de homogeneidad de la región completa o local. Normalmente estas semillas son proporcionadas por el usuario, aunque también se pueden calcular de forma automática mediante operaciones de morfología matemática (erosiones y dilataciones), mediante la selección de puntos máximamente alejados de los contornos extraídos automáticamente de la imagen, o bien mediante *watersheds*
- **Contornos activos:** Una de las subfamilias de esta técnica es conocida como modelos deformables o *snakes*, se basan en el hecho de que una región debe ser una zona del espacio con máxima homogeneidad interna y con máximas diferencias con las regiones circundantes. Por ello se diseña una curva (o una superficie en el caso de volúmenes), normalmente continua, que evoluciona por medio de una ecuación diferencial hasta maximizar un funcional que refleja estas dos propiedades de una región. Normalmente estas técnicas comienzan por la inicialización por parte del usuario de una curva aproximada que posteriormente es refinada mediante una ecuación diferencial. Esta técnica fue muy activa en los años 90 y aún hoy día siguen apareciendo un buen número de artículos. La otra subfamilia importante y actual-

mente más en auge sería la conocida como *level sets*. La idea es similar, pero en lugar de buscar una curva que delimite bien la región, se busca una superficie tal que su isocurva de nivel 0 (es decir la unión de todos los puntos de la superficie que tienen "altura" cero) es la curva que delimita la región. Esta subfamilia de métodos tiene la ventaja frente a las *snakes* que permiten la definición de regiones inconexas como pertenecientes a una misma región de una forma muy natural.

Refinamiento del resultado

Los algoritmos presentados hasta ahora pueden combinarse con algunos de los siguientes refinamientos orientados a mejorar los resultados de la segmentación:

- **Segmentación multirresolución:** Si construimos una pirámide multirresolución de la imagen (por ejemplo, consideramos la imagen original de tamaño 300x300 píxeles, la misma imagen más pequeña a un tamaño de 150x150, y una aún más pequeña a 75x75), entonces un píxel de un nivel debe tener una etiqueta equivalente a la de su "padre" en una imagen más pequeña.
- **Segmentación de consenso:** Dado que los algoritmos de segmentación tienden a quedarse atrapados en soluciones subóptimas, una idea puede ser ejecutar el mismo o diferentes algoritmos varias veces y combinar las diferentes segmentaciones en una segmentación de consenso.
- **Sobresegmentación:** Siguiendo la idea anterior, podemos ejecu-

tar el algoritmo de segmentación varias veces con parámetros que generan regiones más pequeñas que las realmente buscadas. Posteriormente estas regiones más pequeñas se agrupan (*merge*) en regiones mayores, buscando un consenso entre las diferentes segmentaciones.

- **Incorporación de información de bordes:** Se pueden extraer previamente de forma automática los bordes de la imagen y utilizar esta información en la evaluación de las regiones, de forma que una región no es homogénea si contiene en su interior un píxel que ha sido clasificado como borde de la imagen.

Como vemos, las técnicas de segmentación utilizadas para imagen microscópica no son diferentes de las empleadas en otros campos del procesamiento de imágenes. En este artículo hemos dado una visión muy genérica de las diferentes aproximaciones existentes. En muchos casos, la segmentación se realiza de forma semiautomática debido a que en gran medida el resultado de la misma depende del tipo de objetos que el usuario esté buscando. Como veremos en artículos posteriores, el disponer de un etiquetado de las diferentes zonas de una imagen es fundamental para permitir posteriores análisis automáticos. ♦

Bibliografía

- [1] Freixenet, J.; Muñoz, X.; Raba, D.; Martí, J. & Cufí, X. Yet another survey on image segmentation: region and boundary information integration Lecture Notes in Computer Science, 2002, 2352, 408-422
- [2] Lucchese, L. & Mitra, S.K. Color Image Segmentation: A State-of-the-Art Survey Proc. Indian Natl. Science Academy, 2001, 67, 207-221