



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Estimación de Volumen a partir de Imágenes Microscópicas Bidimensionales

Itzel María Abundez Barrera iabundezb@toluca.tecnm.mx, Instituto Tecnológico de Toluca
Luis Bernal Velazquez, luis_bernalv@hotmail.com, Instituto Tecnológico de Toluca
Eréndira Rendón Lara erendon@ittoluca.edu.mx, Instituto Tecnológico de Toluca

Resumen

La estimación de volumen a partir de imágenes bidimensionales ha sido una de las principales aplicaciones de métodos estereológicos y de tratamiento digital de imágenes, especialmente en el área de la medicina en estudios biomédicos. Las imágenes microscópicas presentan contenido complejo, o bien formas geométricas irregulares, lo que complica la determinación de volumen y el análisis del contenido de dichas imágenes. El objetivo del presente trabajo es determinar el espacio tridimensional del contenido de imágenes microscópicas bidimensionales, haciendo uso del método de Cavalieri. Utilizando una muestra de diez imágenes microscópicas (obtenidas de un microscopio electrónico de barrido) de tamaño 1280x960 pixeles y con una resolución de 256dpi y 300dpi. Las imágenes fueron sometidas a un preprocesado para mejorar la calidad de las mismas, y para posteriormente aplicar el método de Cavalieri, dividiendo cada imagen en diferentes secciones de igual tamaño para calcular el área de cada sección utilizando el método de conteo de puntos. Conociendo el área, se determinó el volumen del contenido de cada imagen haciendo uso de la ecuación matemática basada en el estimador de Cavalieri. La estimación de volumen para cada imagen se realizó con tres diferentes tamaños de sección, obteniendo tres volúmenes diferentes por cada tamaño de sección. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con el método de Análisis de Varianza de acuerdo a la Razón F, con el objetivo de conocer la diferencia existente entre los diferentes



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

valores o estimaciones obtenidas. Este análisis sugiere que los resultados son confiables ya que la diferencia entre estimaciones es despreciable, lo que indica la convergencia a un valor.

Palabras Clave

Estimación de volumen, imágenes microscópicas, estimador de Cavalieri

I. Introducción

En la actualidad el cálculo o estimación del volumen partiendo de imágenes bidimensionales ha tomado relevante importancia, especialmente en el campo de la medicina donde conocer el volumen de áreas o secciones con formas irregulares de órganos de vital relevancia es un requisito apremiante en el diagnóstico oportuno de diversas enfermedades. Tal como lo muestra (*Jia-Yann, Kun-Ju, & Yung-Sheng, 2012*) en su trabajo “Sistema de estimación de volumen asistido por ordenador totalmente automatizado para la gammagrafía planar de la tiroides”, donde el cálculo del volumen de la glándula tiroidea da paso a determinar la dosis de yodo activo (o radioactivo) en terapias para tratar el hipertiroidismo, lo cual toma relevancia ya que una dosis equivocada en dichas terapias causaría consecuencias graves en el paciente.

De la misma manera, la utilización de herramientas estereológicas ha incrementado en estudios biomédicos, donde el cálculo de área superficial, la estimación de volumen y la estimación de longitud de curvas representan las principales aplicaciones de los métodos pertenecientes a la estereología en el desarrollo y progreso científico. De dichas aplicaciones, la estimación del volumen es en la que más se ha procurado indagar, y la que por ende ha sido la de mayor aplicación, en especial en el campo de la medicina. Ejemplo de esto, es el trabajo de (*Coronado, y otros, 2010*) en el cual hacen uso del Principio de Cavalieri para



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

estimar el volumen de la órbita ocular, lo cual ayuda a restablecer la posición normal de las estructuras orbitales en traumatismos faciales o implantes oculares, donde devolver un volumen deficiente puede traducirse en desplazamiento posterior de un globo ocular dentro de la órbita.

Otro trabajo donde hacen uso de la estimación de volumen a través del Método de Cavalieri es el que desarrollaron (*Fernández-Viadero, y otros, 2008*) en el cual calculan el volumen de la corteza cerebral para ocuparlo como índice de diagnóstico de la demencia en personas ancianas. La estimación del volumen de la corteza cerebral se realiza a partir de imágenes de resonancia magnética.

II. Metodología

Tomando en consideración la resolución y naturaleza de las imágenes en estudio, se propone iniciar el procedimiento con el preprocesado digital de imágenes con el objetivo de mejorar la calidad de las imágenes. Preprocesada la imagen se aplica el método o estimador de Cavalieri, en el cual se identifican dos pasos principales:

Calcular Áreas de Sección.- El objetivo de este paso es dividir la imagen en diferentes secciones del mismo tamaño mediante una “sonda sistemática” de planos (una malla), para proceder a calcular el área de cada sección haciendo uso del método “conteo de puntos”.

Estimación del Volumen.- Se procede a calcular o estimar el volumen del área deseada en la imagen haciendo uso del *Estimador de Cavalieri*. para realizar adecuadamente el cálculo del volumen es necesario considerar la resolución y especificaciones de las imágenes microscópicas, es decir, los píxeles por pulgada de la imagen y las especificaciones propias del microscopio con el que fueron tomadas las imágenes (profundidad, enfoque y unidad de medida).



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Figura 1 muestra el método propuesto.

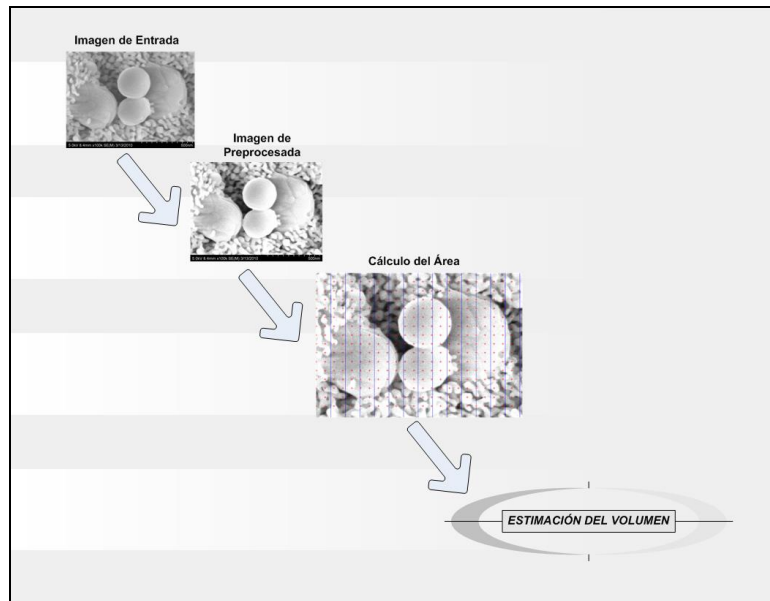


Figura 1 Método Propuesto

El desarrollo de toda la metodología fue implementada con el software *MatLab*[®].

Cálculo del Área

Esta etapa se inicia con la utilización del *Método de Cavalieri*; este método parte considerando el problema general de estimar el volumen V de un objeto tridimensional de forma arbitraria, fijo y acotado (Fernández-Viadero, y otros, 2008).



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

El procedimiento inicia trazando un eje de dirección arbitraria (*eje de muestreo*); sobre este eje se genera una malla sistemática de puntos a una distancia T , para posteriormente generar un plano de sección perpendicular al eje de muestreo por cada uno de los puntos de la malla. El resultado es una sonda sistemática de planos paralelos (Ver *Figura 0*). Al cortar la imagen con esta sonda, se obtiene una muestra sistemática de áreas de sección $\{A_1, A_2, \dots, A_n\}$. Por lo cual el estimador de Cavalieri sigue la *Ecuación (1)*.

$$\hat{V} = T (A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n) \tag{1}$$

Este estimador es un estimador *insesgado*, lo que indica que para cualquier valor de T la media de todas las realizaciones de \hat{V} obtenidas mediante extracciones repetidas de un número aleatorio, es precisamente V . Además \hat{V} es *consistente*, decir, que converge a V cuando T tiende a cero (Fernández-Viadero, y otros, 2008).

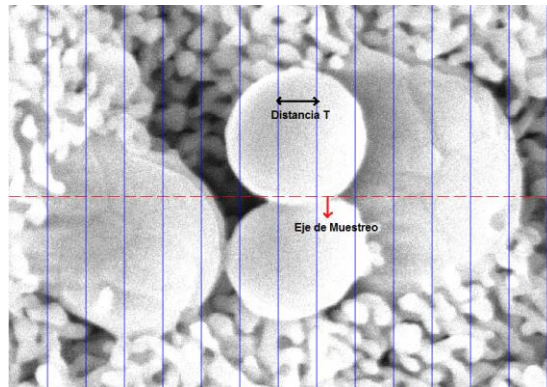


Figura 0. Sonda Sistemática de Planos Paralelos.

Procediendo a calcular cada área de sección mediante el método de *Conteo de Puntos*, el cual indica que para estimar el área A de una figura plana cualquiera se

“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

genera una malla sistemática de puntos en el plano, la cual se superpone sobre la figura uniformemente al azar (Ver *Figura 2*), y proceder con el conteo del número P de puntos que cortan a dicha figura plana. De esta manera se obtiene la *Ecuación (2)*.

$$\hat{A} = a \cdot P \quad (2)$$

Donde a es el área que corresponde a un punto de la malla. Por ejemplo, para una malla o rejilla cuadrada de lado d , se obtiene $a = d^2$.

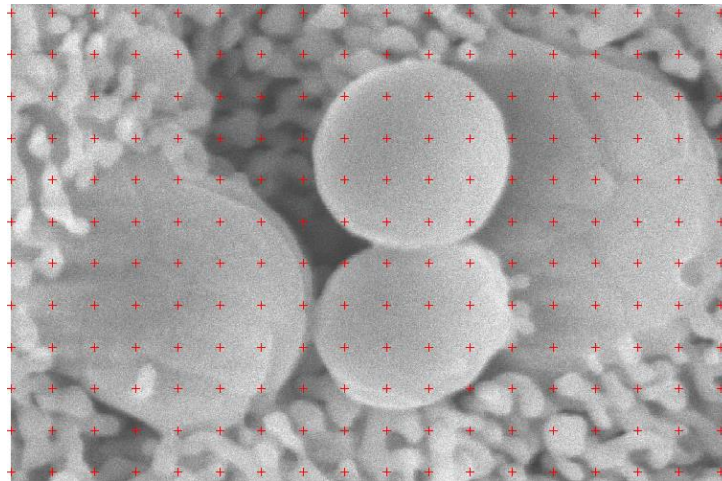


Figura 2 Malla Sistemática de Puntos

Para el conteo de puntos se propuso realizarlo por dos métodos.

- *Manual*.- En este procedimiento se hace uso de un “eje coordenado” que sirve como herramienta de selección de puntos.
- *Automático*.- Este procedimiento hace uso de la imagen preprocesada, su funcionamiento se basa en los niveles de color de la imagen. El conteo de puntos se realiza obteniendo las coordenadas de cada punto, de la malla



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

sistemática de puntos, para cotejar ese mismo valor de coordenadas en la imagen, y obtener el valor o tonalidad de color (VC) de esa coordenada. Posteriormente se compara el valor VC con un umbral de tonalidad clara (por defecto 255), si VC supera el umbral esto indicará que ese punto debe ser contabilizado, y en caso contrario el punto deberá ser descartado.

Estimación del Volumen

En esta etapa, se procede a hacer uso de los valores obtenidos en la etapa anterior para calcular el estimador de Cavalieri (*Ecuación 1*). Para este cálculo es necesario realizar ajustes en cuanto a unidades de medida y así obtener resultados adecuados. Como primer paso calcular el tamaño de la imagen en centímetros, por lo que es necesario conocer la resolución de la imagen (*ppi* o *ppm*) y la unidad de medida en la que está expresada la resolución (pulgadas o metros) para obtener la equivalencia de un pixel en centímetros. De esta forma es posible ajustar el Volumen estimado, originalmente en pixeles, a centímetros.

III. Resultados

En esta sección se presentan las pruebas realizadas para la estimación de volumen a imágenes microscópicas bidimensionales.

Conjunto de datos para prueba

Se conformó una muestra de diez imágenes microscópicas con un tamaño de: 1280x960 pixeles, a cada imagen fue calculada el Área Estimada (Cm²) y el



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Volumen Estimado (Cm3), con valores de Distancia T (distancia entre planos de sección) de 200, 320 y 480 pixeles y distancia D (distancia entre puntos de la malla sistemática de puntos utilizada para calcular el área de sección) de 30,20 y 10 pixeles. Obteniendo 9 valores de Áreas y 9 volúmenes por imagen.

Para comprobar estadísticamente los resultado, se realizó el Análisis de Varianza de acuerdo a la Razón F. para cada distancia T =200, 320 y 448. A continuación solo se desarrollara el Análisis de Varianza con Distancia T = 200.

H₀ = Los volúmenes calculados son similares.

H₁ = No todos los volúmenes calculados son similares.

Tabla 1 Valores para Análisis de Varianza para Distancia D = 200

Imagen	Volumen		
	Distancia D = 30	Distancia D = 20	Distancia D = 10
00	126.399	125.367	125.44
01	108.81	107.402	106.686
02	99.8518	100.362	99.949
FeN-0_1Ac-01	174.583	169.485	169.758
FeN-0Ac-01	206.933	205.976	204.843
FeN-1_1Ac-01	158.76	160.264	160.831
FeN-2_1Ac-01	182.143	182.065	183.179
FeN-9_7Ac-01	160.694	161.515	160.85



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

FeN-16_1Ac-01	161.397	161.046	160.87
FeN-16_1Ac-02	152.431	153.857	154.384

Con los datos de la Tabla 1, el valor calculado para F_{Prueba} es igual a 0.00075 . Por otra parte, teniendo en cuenta un valor de $\alpha = 0.05$ y calculando los grados de libertad (2 para el numerador, y 27 para el denominador) el valor de F_{Tabla} es igual a 3.35, resultando que $F_{Prueba} < F_{Tabla}$. Por lo tanto se concluye que no existe variación importante entre los volúmenes calculados.

IV. Conclusiones

El desarrollo de un estimador de volumen partiendo de imágenes bidimensionales, haciendo uso de herramientas computacionales y de métodos estereológicos, genera un aporte relevante en la automatización y mejoramiento de procesos de análisis de información, tales como el análisis de imágenes microscópicas.

Por otra parte, dentro de la etapa de Cálculo del Área, y de acuerdo a la adaptabilidad del método, se hizo relevante determinar la dirección del eje de muestreo (Horizontal o Vertical) ya que la posición de éste impactaría directamente en la “cantidad” de contenido a analizar, es decir, si la posición del eje de muestreo no fuera la óptima, al hacer la división de secciones, cabría la posibilidad de omitir regiones de interés dentro de la imagen y por ende disminuir la fiabilidad de la estimación de volumen. También, dentro de la etapa de Cálculo del Área, en la determinación de la distancia entre secciones (distancia T) y de la distancia entre puntos (distancia D) del método de Conteo de Puntos, fue necesario llevar a cabo pruebas con diferentes distancias para captar la



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

variabilidad o diferencia entre estimaciones de volumen, y así sugerir la óptima combinación de distancias. Esto permitió determinar que el valor de las distancias a utilizar depende esencialmente del tamaño de la imagen; sin embargo, se sugiere tomar en cuenta que la distancia T no debe ser mayor al 35% del tamaño de la imagen, y que la distancia D no debe ser mayor al 2% del tamaño de la imagen.

Las estimaciones resultantes de la aplicación de la metodología y los resultados obtenidos del Análisis de Varianza sugieren que el uso del estimador de volumen a partir de imágenes microscópicas bidimensionales es confiable, esto debido a que la diferencia entre resultados es despreciable y por ende existe un valor al cual se converge.

V. Bibliografía.

(Coronado, y otros, 2010) **CORONADO, C., ARRIAGA, O., ZAVANDO, D., DEL SOL, M., & SUAZO G., I. (2010). ESTIMACIÓN DEL VOLUMEN ORBITARIO MEDIANTE IMÁGENES DE TC Y EL PRINCIPIO DE CAVALIERI. REVISTA CHILENA DE RADIOLOGÍA , 16 (2), 59-63.**

(Fernández-Viadero, y otros, 2008) **Fernández-Viadero, C., González-Mandly, A., Verduga, R., Crespo, D., & Cruz-Orive, L. M. (2008). La Estereología como Herramienta de Cuantificación del Volumen y la Atrofia Cortical en el Cerebro del Anciano con Demencia. Revista Española de Geriatria y Gerontología , 32-43.**

(Jia-Yann, Kun-Ju, & Yung-Sheng, 2012) **Jia-Yann, H., Kun-Ju, L., & Yung-Sheng, C. (2012). Fully Automated Computer-aided Volume Estimation System. ELSEVIER - Computer in Biology and Medicine , 1341-1352.**