

Proceso digital de imágenes microscópicas

Ángel Martínez Nistal, Andrés Sampredo.

Servicio de Proceso de Imágenes.
Universidad de Oviedo.

1. Introducción

La cuantificación de objetos presentes en imágenes microscópicas es una tarea a la que investigadores de diversos campos de la ciencia se han de enfrentar habitualmente. Así, el médico o biólogo puede precisar conocer el tamaño y número de células presentes en un determinado tejido, el geólogo es posible que necesite determinar el tamaño de grano y porcentajes de los constituyentes mineralógicos de una roca, al metalógrafo le pueden interesar caracterizar las relaciones espaciales y orientaciones de los componentes de una aleación, etc. Muchas veces esta labor de cuantificación se realiza de modo manual, estando sujeta la validez de los resultados a la fatiga del operador que la realiza. Sin embargo reconocer, contar y medir tamaño, forma, posición, densidad y otro tipo de propiedades similares de determinados objetos presentes en una imagen, es algo que, actualmente, está al alcance de cualquier ordenador personal complementado con un “hardware” y “software” específico, realizando estas tareas de un modo mucho más rápido, preciso y reproducible.

Por otra parte el ojo humano es mucho más exacto que el ordenador en las tareas de reconocimiento de objetos, basado en imágenes incompletas, borrosas o no convencionales dado que cuenta con una experiencia previa y unos conocimientos adquiridos que le sirven para dicha interpretación. No obstante las técnicas del proceso digital de imágenes pueden ayudar a dicha interpretación mediante la mejora y realce de dichas imágenes.

El proceso de imágenes por ordenador comenzó a mediados de los años 60 en los laboratorios de la NASA, donde se utilizó el ordenador para corregir distorsiones presentes en las imágenes enviadas por los satélites artificiales. Hacia principios de los años 70 comenzaron a comercializarse los primeros analizadores de imágenes

orientados al estudio y cuantificación de imágenes microscópicas, no siendo hasta mediados de los años 80 cuando, con el abaratamiento de los costes en los ordenadores y el incremento de potencia de los mismos se produjo la eclosión de los sistemas de proceso de imágenes. Hoy en día existe una amplia oferta de equipos y programas de proceso y análisis de imágenes (Jarvis L.R. 1988), desde ordenadores personales a potentes estaciones de trabajo, desde programas generales de análisis de imágenes a programas específicos que cubren un gran rango de aplicaciones.

2. Fundamentos del proceso digital de imágenes

Desde un punto de vista físico, una imagen puede considerarse como un objeto plano cuya intensidad luminosa y color puede variar de un punto a otro. Si se trata de imágenes monocromas (blanco y negro), se pueden representar como una función continua $f(x,y)$ donde (x,y) son sus coordenadas y el valor de f es proporcional a la intensidad luminosa (nivel de gris) en ese punto.

Para obtener una imagen que pueda ser tratada por el ordenador es preciso someter la función $f(x,y)$ a un proceso de discretización tanto en las coordenadas como en la intensidad; a este proceso se le denomina digitalización.

La digitalización consiste en la descomposición de la imagen en una matriz de $M \times M$ puntos, donde cada uno tiene un valor proporcional a su nivel de gris. Dado que este valor puede ser cualquiera dentro de un rango continuo, es preciso dividir dicho rango en una serie de k intervalos, de forma que el nivel de gris de cada punto sea asignado a uno de los valores que representa dicho intervalo. Los modernos sistemas de proceso digital de imágenes suelen ser capaces de discriminar 256 niveles de gris.

Por consiguiente una “imagen digital”, es una imagen $f(x,y)$ que ha sido discretizada en sus coordenadas espaciales y en su intensidad luminosa.

Cada elemento en que se divide la imagen recibe el nombre de “pixel” (picture element).

El número de niveles de gris y las dimensiones de la matriz (numero de filas por número de columnas) nos condicionan la capacidad de resolución de la imagen digital.

En el caso de imágenes en color la intensidad puede considerarse como un vector tridimensional cuyas componentes son las intensidades en las tres bandas espectrales: rojo, verde y azul. Hablándose en este caso de una imagen multibanda, puesto que la información de la imagen color se desglosa en tres imágenes correspondientes a cada una de las bandas del espectro visible.

3. Equipamiento de proceso digital de imágenes

Todo sistema de proceso de imágenes consta de (Figura 1):

a) *Sistema para adquisición de la imagen.* Normalmente se trata de cámaras de TV en blanco y negro o color.

ESQUEMA BÁSICO DE UN SISTEMA DE PROCESO DIGITAL DE IMÁGENES

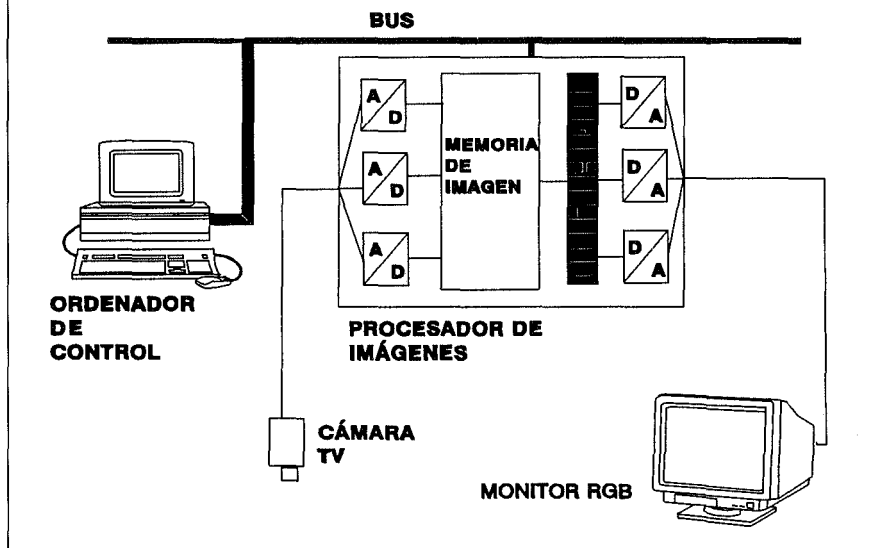


Ilustración 1. Esquema de un sistema de proceso digital de imágenes

b) *Procesador de imágenes o tarjeta digitalizadora de vídeo.* Se encarga de la digitalización de las imágenes, su almacenamiento en memoria y su visualización mediante el monitor apropiado.

c) *Ordenador de control.* Contiene los programas de proceso de imágenes y se encarga de su ejecución.

A estos elementos básicos se suelen añadir una serie de periféricos como pueden ser: impresoras térmicas o vídeo-impresoras, para la obtención de copias en papel de las imágenes procesadas, tableros digitalizadores o ratones para dibujar y modificar las imágenes de forma interactiva, etc.

4. Secuencia de tareas en proceso digital de imágenes

La cuantificación de determinados objetos presentes en una imagen exige la realización de una serie de procesos previos, sobre la imagen original, con el fin de que el ordenador sea capaz de reconocer de un modo preciso los objetos a medir. Estas tareas pueden agruparse en los siguientes apartados (Figura 2):

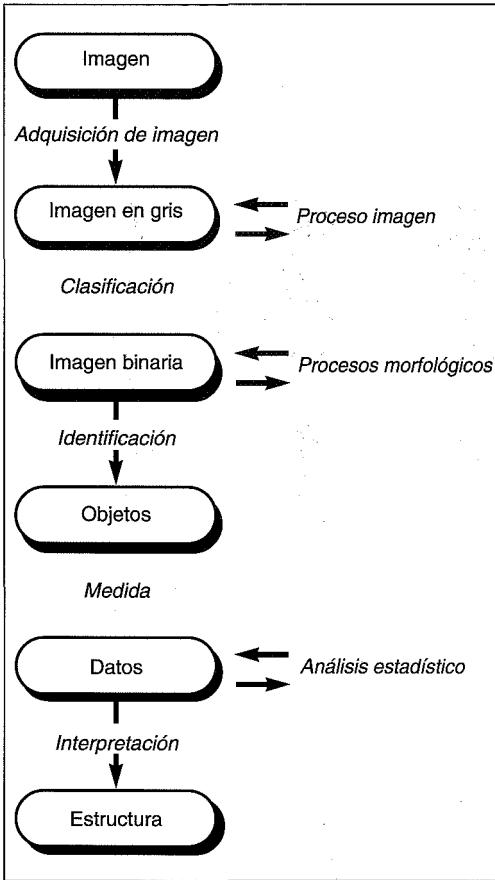


Ilustración 2. Principales tareas en análisis de imágenes microscópicas según Russ J. C. 1990

4.1 Digitalización.

Paso de imágenes continuas a forma discreta, teniendo en cuenta que la imagen digital no pierda resolución con respecto a la imagen original. En la resolución intervienen las dimensiones de la imagen (resolución espacial) (Figura 3) y el número de niveles de gris (resolución cromática).

Las dimensiones de las imágenes digitales suelen ser potencias de 2 y su tamaño varía en función de las capacidades del sistema empleado, siendo las más comunes: 256x256, 512x512 y 1024x1024 puntos. Por lo general se utiliza un octeto para almacenar cada pixel, por lo que las intensidades de las imágenes se cuantifican en 256 niveles (8 bits). Según estos tamaños una imagen digital con 256 niveles de gris y una dimensión de 256 x 256 puntos, ocupa 64 Kb de memoria, la misma imagen con una dimensión de 512 x 512 puntos ocupa 256 Kb y si se trata de una imagen de 1024 x 1024 ocupa 1 Mb de memoria. Esta misma ima-

gen en color (3 bandas) necesita 3Mb de memoria para ser almacenada. Por consiguiente las imágenes digitales exigen disponer de gran capacidad de almacenamiento y de algoritmos rápidos para procesar gran número de información en cortos períodos de tiempo.

4.2 Proceso de imágenes.

Comprende una serie de operaciones cuyo origen es una imagen gris y cuyo resultado es otra imagen gris. El valor del pixel en la imagen de salida puede ser función del valor que tenía en la imagen de entrada, de los valores de sus vecinos o del valor de todos los puntos de la imagen de entrada.

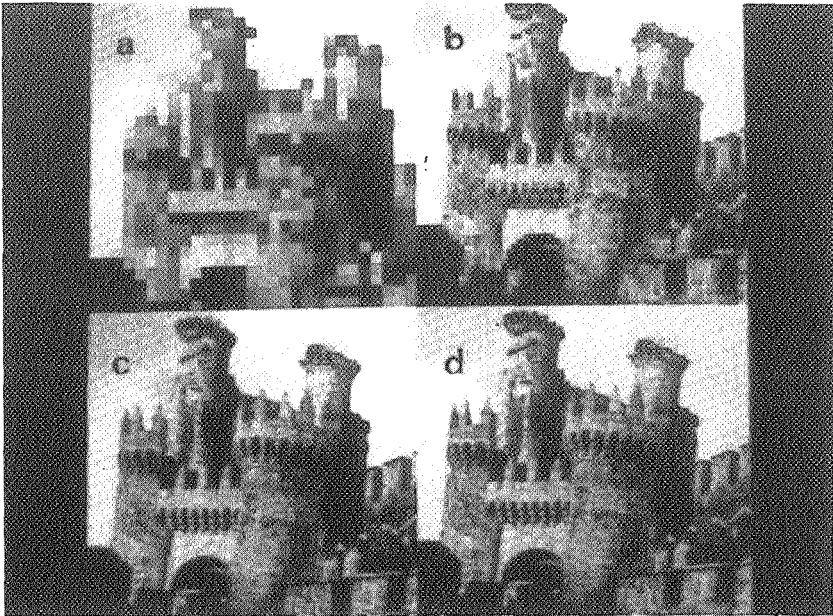


Ilustración 3. Ejemplo de las diferentes resoluciones obtenidas según el número de pixels de la imagen. Las sucesivas imágenes tienen: a) 32, b) 64, c) 128 y d) 256 pixels de lado

Según González & Wintz (1977), el objetivo de estas técnicas es procesar una imagen de tal modo que la resultante sea más adecuada que la imagen original para una aplicación específica. El término “específico” es importante porque establece que el valor de la imagen resultante está en función del problema que se trata. Así, un método que es útil para realizar un determinado tipo de imágenes puede no serlo para otras.

Las funciones de este grupo se engloban en tres grandes apartados:

Operaciones puntuales. El valor de un pixel en la imagen de salida depende del valor de ese mismo pixel en la original. Dentro de éstas tenemos las denominadas transformaciones de histograma como son: el realce, la linearización y el escalado.

Imágenes poco contrastadas, cuyo rango de niveles de gris es escaso, se pueden mejorar realizando una expansión de su histograma de niveles de gris (Ilustr. 4).

Operaciones locales. El valor del pixel en la imagen de salida es función del de sus vecinos más próximos y del suyo propio en la imagen original. Se suelen presentar como convoluciones de matrices alrededor del pixel tratado. El objetivo de estos procesos es modificar las imágenes para mejorar su calidad o resaltar aspectos de las mismas que nos interesan. Comprende filtros de realce y suavizamiento como: paso bajo, paso alto, mediana, laplaciano, gradiente, gaussiano, etc (Figura 5).

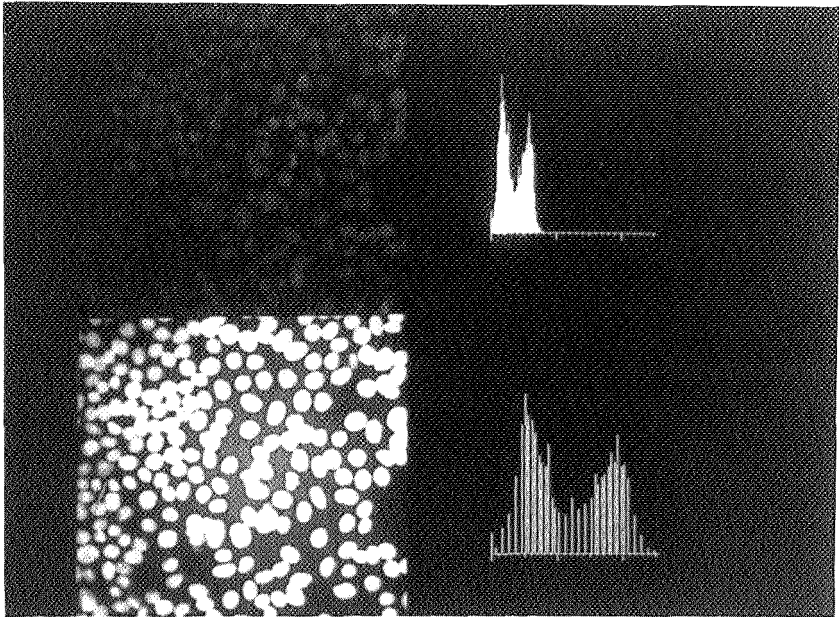


Ilustración 4. Imagen poco contrastada e imagen resultante de expansión de su histograma

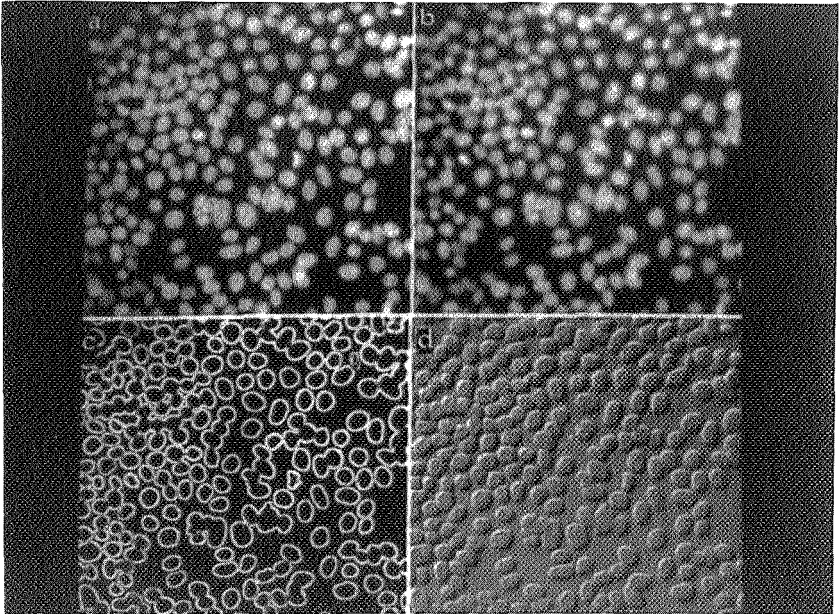


Ilustración 5. Imagen original y resultantes de aplicar varios tipos de filtros. a) original, b) paso bajo, c) gradiente (Sobel), d) pseudo plástico

Paso Bajo. Sirve para uniformizar zonas de imagen. Se basa en tomar para cada pixel los valores de sus x vecinos, según la ventana de trabajo definida, (9 en el caso de una ventana de 3×3 pixels) y realizar el cálculo de la media de sus valores de gris. Este valor medio se asigna al pixel central en la imagen de salida.

Filtros de Gradiente. Se utilizan diversos operadores de gradiente. Supongamos la siguiente ventana de 3×3 pixels:

a	b	c
d	e	f
g	h	i

El filtro denominado Sobel, consiste en asignar al valor central de la ventana, el valor obtenido por la siguiente fórmula:

$$G_{\text{Sobel}} = \text{Abs} \{ (a + 2b + c) - (g + 2h + i) \} + \text{Abs} \{ (a + 2d + g) - (c + 2f + i) \} \quad (1)$$

Otro tipo de filtro es el denominado Roberts, cuya fórmula es la siguiente:

$$G_{\text{Roberts}} = \text{Max} [\text{Abs} \{ a - e \}, \text{Abs} \{ b - d \}] \quad (2)$$

Operaciones globales. El valor del pixel resultante es función del valor de todos los pixels de la imagen original. La aplicación típica es el cálculo de la transformada de Fourier utilizada para pasar la imagen del dominio espacial al dominio de frecuencias.

Una descripción detallada de las transformaciones de histograma, filtros y transformada de Fourier puede encontrarse en las principales monografías sobre proceso de imágenes: González & Wintz (1977), Rosenfeld & Kak (1981).

4.3 Clasificación y extracción de características.

Es el proceso por el cual los pixels pertenecientes a una imagen son divididos en clases, normalmente dos: objetos de interés y fondo. Objetos de interés pueden ser núcleos en imágenes histológicas, áreas de fibrosis en tejido hepático, vainas de mielina en axones nerviosos, etc.

Un método sencillo de clasificación es el denominado “thresholding”. Se utiliza para convertir una imagen de niveles de gris en una imagen binaria. Cada

pixel es clasificado como ON blanco (valor 255) o OFF negro (valor 0) dependiendo de si su nivel de gris excede o no un valor umbral. La selección del umbral se realiza a partir de un estudio del histograma de niveles de gris de la imagen. Si tenemos una preparación con unos núcleos que presentan un valor de gris claro sobre un fondo oscuro y visualizamos el histograma de distribución de niveles de gris de dicha imagen se observa como dicho histograma es claramente bimodal con dos picos bien diferenciados, el primero corresponde al fondo y el segundo a los núcleos (Figura 6). En este caso el proceso de clasificación consistirá en tomar como umbral el valle entre ambos picos y dar el valor 255 a los pixels con un valor superior al umbral dejando con el valor 0 los restantes (Figura 7).

La clasificación puede realizarse de modo interactivo visualizando como queda la imagen según varía el valor del umbral, o de modo automático, donde el ordenador determina el valor de los umbrales de segmentación siguiendo diversos criterios (Rosenfeld, 1979, Russ & Russ, 1988).

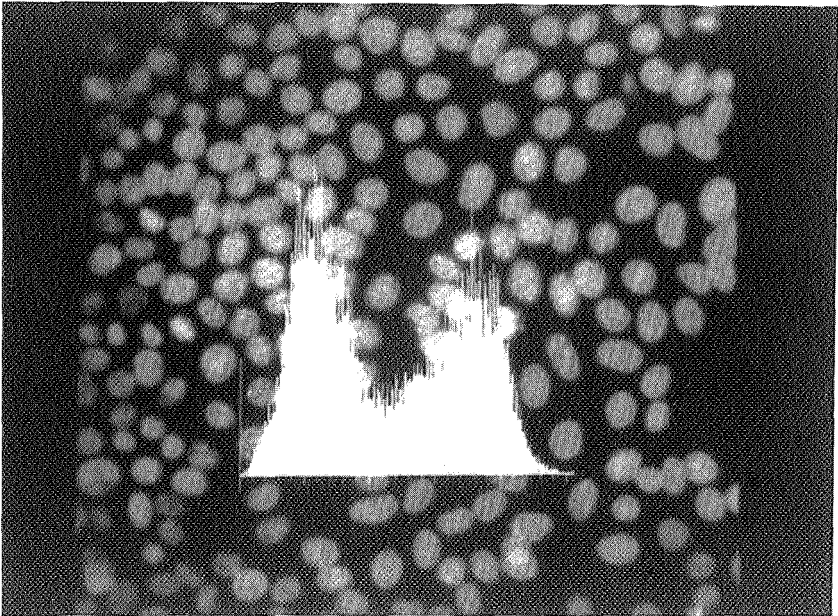


Ilustración 6. Imagen de niveles de gris de núcleos celulares y su correspondiente histograma

4.4. Proceso de imagen binaria.

La imagen binaria resultante del proceso de discriminación anterior puede que no represente perfectamente los objetos de interés debido a problemas inherentes en la imagen original, como objetos que se tocan, o problemas del propio proceso de las imágenes, por ejemplo, pequeñas áreas mal clasificadas. Con el fin

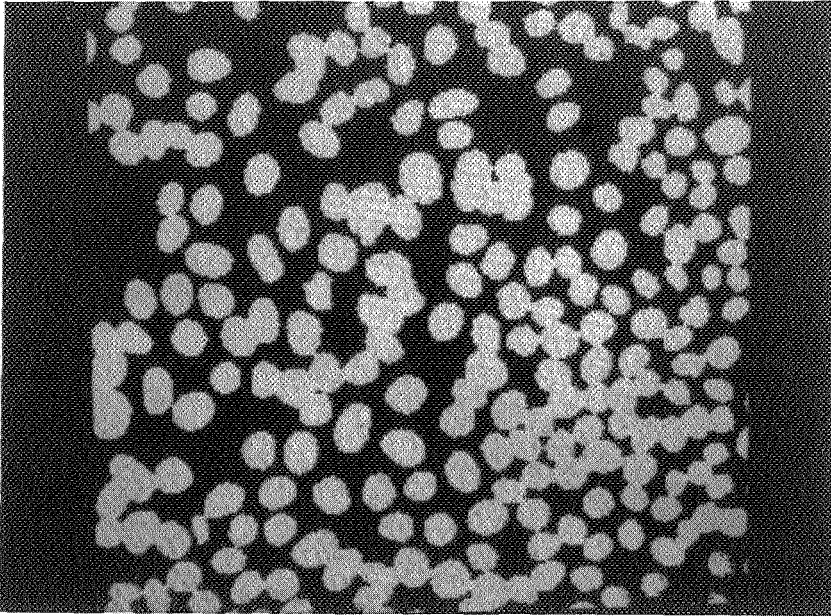


Ilustración 7. Imagen clasificada de la ilustración 6.

de solucionar estos problemas se pueden aplicar distintos operadores morfológicos para: separar zonas, cribar áreas de determinados tamaños, erosionar o dilatar regiones, mirar conectividades, extraer bordes, etc.

Dos de las operaciones morfológicas más utilizadas en análisis de imágenes son la erosión y la dilatación. La primera consiste en examinar cada pixel y cambiarlo de ON a OFF si alguno de sus vecinos está en OFF. Normalmente se utilizan como vecinos los ocho que rodean al pixel examinado, aunque para algunas aplicaciones se pueden utilizar conectividades de 4 vecinos (los 2 verticales y los 2 horizontales) e incluso conectividades de 2 vecinos (los verticales o los horizontales). La dilatación es el proceso inverso, consiste en cambiar los píxeles de OFF a ON si alguno de sus vecinos esta ON. Al resultado de una erosión más una dilatación se le denomina apertura (“opening”). El nombre proviene de la tendencia de esta secuencia de operaciones a separar (abrir) puentes de unión entre objetos próximos o a abrir cavidades próximas al borde. La operación opuesta (dilatación más erosión) es denominada cierre (“closing”) y puede usarse para conectar objetos muy próximos o para rellenar pequeños huecos (Figura 8). En Serra J. (1982, 1988) se puede encontrar una completa descripción sobre estas y otras técnicas de morfología matemática.

El “thinning” o adelgazamiento es otro tipo de operación morfológica, consistente en obtener la línea media o eje de un objeto. Este tipo de procedimiento reduce los objetos a un conjunto de líneas sin perderse la conectividad del objeto origi-

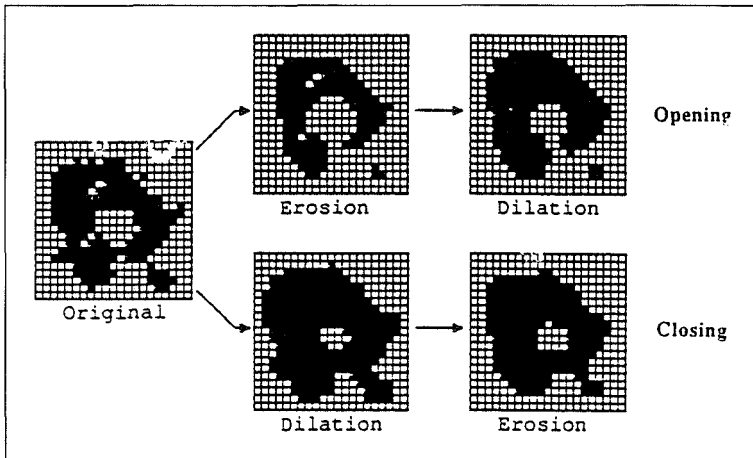


Ilustración 8. Operaciones de apertura ("opening") y cierre ("closing").

nal (Montoto L. 1981). Resulta de gran utilidad su aplicación al estudio de longitudes y orientaciones de estructuras alargadas, por ejemplo dendritas neuronales.

4.5 Cuantificación.

Una vez que las imágenes binarias muestran de una forma individualizada los objetos que deseamos cuantificar, se procederá a su identificación y medida. Los parámetros a medir se pueden clasificar en:

Morfométricos. Aquellos que cuantifican tamaño, forma, orientación y relaciones espaciales de los objetos.

Densitométricos. Cuantifican nivel de gris o parámetros derivados del nivel de gris (transmitancia, densidad óptica, etc).

PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS.

Dentro de estos podemos distinguir entre parámetros morfométricos globales, aquellos que se aplican a una determinada estructura pero sin distinguir detalles de como se organizan sus componentes, y parámetros objeto, que cuantifican tamaño y forma de cada objeto considerado individualmente.

Parámetros globales:

Porcentaje en volumen. Porcentaje de un determinado componente en la imagen.

$$V_v = \frac{\sum \text{pixels (fase)}}{\sum \text{pixels (totales)}} \quad (3)$$

Superficie específica. Superficie de un determinado componente de la imagen por unidad de volumen. Para una sección plana de muestra el valor de la superficie específica viene dado por:

$$S_v = \frac{4 \sum B_i (obj)}{\pi \sum A_i (ref)} \tag{4}$$

Donde:

$B_i (obj)$ = Longitud de los bordes de un componente.

$A_i (ref)$ = Area de referencia.

Afinidad. Define las relaciones de vecindad entre componentes. Para su aplicación es necesario discriminar y cuantificar las zonas de contacto entre los diferentes componentes presentes en la imagen.

Parámetros objeto:

Área. Se calcula a partir de la imagen binaria contando el número de pixels que forman cada objeto y multiplicándolo por la resolución del pixel.

$$AREA = scalx \times sxaly \times NPIX \tag{5}$$

Perímetro. Se obtiene a partir de las coordenadas del borde de cada grano mediante la fórmula:

$$p = \sum v + \sum h + \sum d \times \sqrt{2} \tag{6}$$

Donde:

v= segmento en vertical.

h= segmento en horizontal.

d= segmento en diagonal.

Perímetro convexo. Se define como la longitud de una línea convexa que circunscribe el objeto a medir. Para su cuantificación se calcula la longitud de un polígono definido por 64 vectores. Por rotación, los ejes cartesianos X e Y de la imagen se convierten en X' Y', pudiendo tomarse las coordenadas máxima y mínima del objeto en X' Y'. Si se realizan 32 rotaciones se obtendrán 64 puntos que definirán los extremos de un polígono que se aproxima al perímetro convexo del objeto (Figura 9). Calculando el perímetro de dicho polígono se obtendrá un valor aproximado al perímetro convexo del objeto.

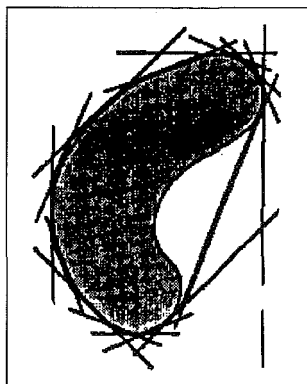


Ilustración 9. Perímetro convexo de una partícula obtenido uniendo los puntos de las coordenadas máxima y mínima en x e y al rotar los ejes cartesianos (J. C. Russ 1990)

Diámetros. Otros parámetros relacionados con el tamaño de grano son sus diámetros máximo y mínimo. Para la obtención de ambos, se calculan los valores de los Ferets en 32 direcciones diferentes. Si $P(i,j,l)$ es la proyección del pixel (i,j) en los ejes de coordenadas con dirección l , entonces

$$DP(l) = \text{MAX} [P(i,j,l)]_{ij} - \text{MIN} [P(i,j,l)]_{ij} \quad (7)$$

es el Feret del objeto para la dirección l .

Siendo:

$$D_{\text{MAX}} = \text{MAX} [DP(l)]_{l=1 \dots 32} \quad (8)$$

$$D_{\text{MIN}} = \text{MIN} [DP(l)]_{l=1 \dots 32} \quad (9)$$

Si el objeto tiene una dirección máxima que no se ha alineado con los ángulos de rotación que hemos elegido, entonces D_{MAX} calculado es menor que el D_{MAX} verdadero. Según Russ (1990) para un cálculo del diámetro máximo obtenido mediante 8 rotaciones el error es del 2%, mientras que si utilizamos 16 rotaciones éste se reduce al 0,5 %. Sin embargo, según la forma del objeto, D_{MIN} puede ser excepcionalmente largo (caso de objetos largos y estrechos).

A partir de las coordenadas máxima y mínima que definen el diámetro máximo es posible calcular el ángulo que forma con la horizontal, lo que dará idea de la orientación que toman los objetos más elongados.

Existen una gran variedad de parámetros para describir la forma de un objeto, entre otros se utilizan los siguientes:

Forma Circular. Probablemente es el más usado, se basa en relacionar su superficie con la de un círculo de igual área.

$$FC = \frac{S. \text{ Polígono}}{S. \text{ círculo}} = \frac{S}{\pi \frac{P^2}{4\pi^2}} = \frac{4\pi S}{P^2} \quad (10)$$

P = Perímetro de la región ; S = superficie.

Donde FC es igual a 1 para un círculo y tiende a 0 para zonas menos circulares.

Elongación. Su valor viene definido por la fórmula:

$$E = \frac{D_{\min}}{D_{\max}} \quad (11)$$

E es igual a 1 para un objeto equidimensional y tiende a 0 para objetos aciculares.

Forma Rugosa. Este parámetro también denominado convexidad relaciona el perímetro convexo del objeto con su perímetro total.

$$FR = \frac{P_{\text{convexo}}}{P_{\text{total}}} \quad (12)$$

Parámetros densitométricos.

En ocasiones lo que se desea cuantificar no es el tamaño o forma de los objetos sino otro tipo de propiedades como puede ser el valor de gris medio de cada objeto y a partir de éste deducir otro tipo de parámetros como pueden ser la densidad óptica (DO), y la densidad óptica integrada (DOI), según las fórmulas siguientes:

$$DO = -\log_{10} \left(\frac{\text{inten. transmitida}}{\text{inten. incidente}} \right) \quad (13)$$

$$DO = -\log_{10} \left(\frac{\text{grismax (255)}}{\text{nivel de gris}} \right) \quad (14)$$

$$DOI = DO \times \text{area} \quad (15)$$

Si previamente hemos calibrado el aparato con una serie de patrones de densidades que queremos medir, podremos tener la equivalencia entre los niveles de gris y nuestras unidades densitométricas.

Para llegar a la cuantificación es preciso contar con una imagen clasificada donde tengamos perfectamente identificados los objetos. En el caso de las cuantificaciones densitométricas la imagen clasificada se utiliza como máscara para extraer los valores de gris, de las zonas de interés, en la imagen original. En las medidas densitométricas es muy importante estandarizar las condiciones de tinción e iluminación de la muestra de tal forma que las variaciones en la densidad de la imagen sean debidas a las propias variaciones de densidad de la muestra y no a otros factores externos.

5. Aplicaciones

El grupo de trabajo en Proceso de Imágenes y Citometría de la Universidad de Oviedo ha puesto a punto diversas aplicaciones del PDI dirigidas fundamentalmente a la búsqueda de criterios objetivos y reproducibles en la Cuantificación Biomédica, presentándose a continuación alguna de ellas.

- Parámetros globales - Porcentaje en Volumen.

En función de su valor de gris, es posible discriminar un determinado componente y calcular el porcentaje que representa en la imagen. Se ha utilizado este parámetro para cuantificar el grado de fibrosis en la enfermedad hepática alcohólica (Sampedro et al, 1988) y en la cuantificación de algunas reacciones inmunohistoquímicas (Gonzalvo P., 1992).

En el caso de la fibrosis hepática, el porcentaje de positividad de la misma, estimada mediante tinción por rojo sirio, era del 28% en pacientes cirróticos frente al 12% en pacientes no cirróticos, resultando por tanto diferencias estadísticamente significativas. Este grado de fibrosis se correlaciona con el grado de presión portal independientemente del diagnóstico histológico.

En reacciones inmunohistoquímicas se ha aplicado en la cuantificación de la proliferación celular en cáncer de mama determinada por marcaje con Ki67. El número de células Ki67 positivas cuantificado por proceso digital de imágenes mostraba una correlación significativa con el grado de malignidad.

- Parámetros objeto.

Teniendo en cuenta las características morfológicas de las células se puede determinar el contorno nuclear definido por la existencia de la membrana nuclear o carioteca. Una vez clasificados e individualizados los núcleos de la imagen a estudiar, se procede a la cuantificación de una serie de parámetros. Parámetros morfométricos de cuantificación celular han sido utilizados en el estudio de las neoplasias intraepiteliales de cuello uterino (Orille, V. et al., 1993) y de laringe (Sampedro et al., 1994).

En estos trabajos se han relacionado los parámetros de: área nuclear, perímetro, diámetro y porcentaje en volumen de núcleos con la capacidad proliferativa del epitelio, mientras que la forma nuclear y la orientación de los núcleos se han relacionado con la capacidad madurativa del mismo (Figura 10).

En base a que los cambios en estas neoplasias intraepiteliales continuas suponen una alteración en el proceso normal de proliferación y maduración que podría formularse como índice de progresión a malignidad PM:

$$PM = \text{Maduración} / \text{proliferación}$$

Sustituyendo la maduración por el parámetro respectivo (Desviación standard de la orientación) y la proliferación por porcentaje en volumen de núcleos (nuclearidad) se formula el índice histométrico de progresión:

$$IHP = \text{SDorientación} / \text{nuclearidad}$$

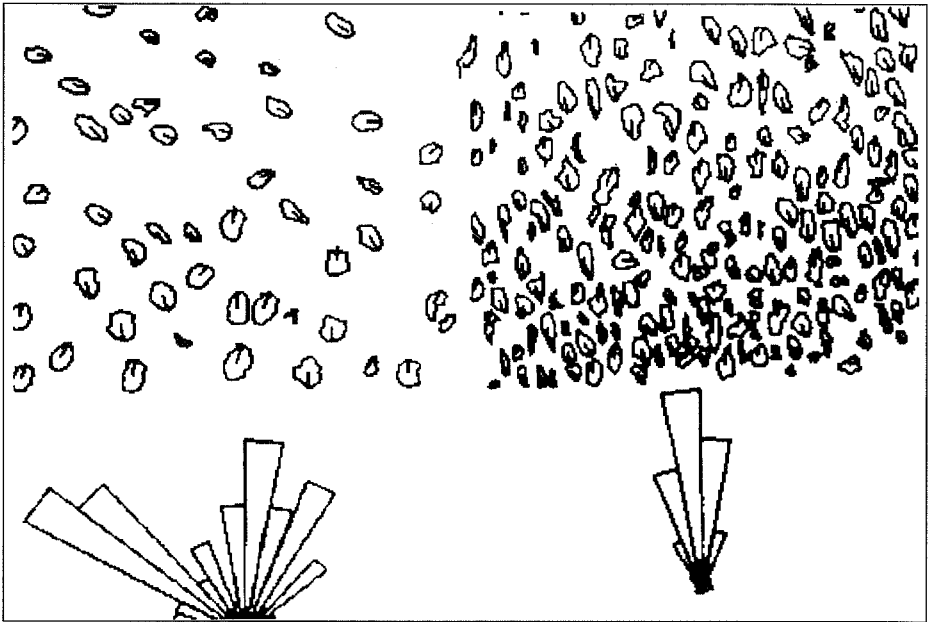


Ilustración 10. Nuclearidad y orientaciones preferentes de los núcleos correspondientes a diferentes grados de una neoplasia intraepitelial cervical CIN. Izd CIN I, dcha CIN III.

- Parámetros densitométricos.

Utilizando el microscopio óptico convencional la cromatina nuclear se observa como un mosaico de regiones entremezcladas de densidad óptica variable. Las regiones más densas se interpretan como cromatina agrupada o partículas cromatínicas mientras que el resto se toma como cromatina dispersa. Se han utilizado los siguientes parámetros para el análisis de la cromatina:

Distribución de niveles de gris en el núcleo. Se calcula el histograma de niveles de gris y sus valores estadísticos más significativos: Media, moda, máximo, mínimo, varianza y desviación típica.

Realización de un índice de distribución radial de la cromatina. Se consideran cinco coronas de igual espesor entre el centro y el borde externo del núcleo, calculándose el porcentaje de cromatina para cada corona, la distribución radial de la cromatina vendrá dada por:

$$FRAD = \sum_{i=1}^{i=5} \frac{C_i \times R_i}{C_t} \quad (16)$$

Siendo:

C_i = Número de píxeles con cromatina en la corona i

Ri = Radio de la corona i

Ct = Número total de pixels con cromatina en el núcleo

Este tipo de parámetros combinado con otros parámetros morfométricos similares a los descritos anteriormente han sido utilizados como estimadores del tiempo de supervivencia en estudios del melanoma cutáneo (Menéndez A., 1988).

Citometría de DNA.

La cuantificación del DNA nuclear por técnicas de citometría de imagen se realiza sobre muestras teñidas por una reacción nuclear de Feulgen. Este tipo de tinción es una reacción estequiométrica lo que quiere decir que, cuanto mayor sea la cantidad de DNA mayor es el grado de tinción del núcleo. Para calcular el contenido en DNA se calcula el valor de la densidad óptica integrada del núcleo según las formulas (14 y 15) descritas anteriormente, y se correlaciona el valor de DOI con un contenido determinado de DNA. La correlación se realiza a partir de una serie de células patrón cuyo contenido en DNA es conocido.

Los resultados obtenidos por cuantificación nuclear en términos de ploidía del DNA e índices de proliferación medidos por citometría de imagen han demostrado su validez en el diagnóstico clínico, existiendo una alta correlación con los datos obtenidos por citometría de flujo. La citometría de imagen, aunque es un método de análisis más lento, tiene la ventaja de permitir el control directo de la medición por parte del usuario, lo cual garantiza la calidad de las muestras analizadas.

Una amplia información sobre citometría de DNA aparece recogida en el libro: "DNA cytometry analysis" (Sampedro y Orfao, 1993).

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-González, R.C. & Wintz, P.(1977). Digital Image Processing. Adisson-Wesley.
- 2.-Gonzalvo, P.(1992). Cinética celular y su regulación en cáncer de mama. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.
- 3.-Jarvis, L.R.(1988). Microcomputer video image analysis. Journal of Microscopy; 150; 83-97.
- 4.-Levine, M.D.(1985). Vision in Man and Machine. McGraw-Hill. New York.
- 5.-Martínez-Nistal, A., Hardisson, D.A., Gonzalez, A., Barriuso, J. & Sampedro, A.(1993). Physical and instrumental bases of DNA image cytometry. En: Sampedro A. Orfao A. DNA cytometric analysis. Oviedo :Universidad de Oviedo, 25-52.
- 6.-Menéndez, A.(1988). Contribución de la cuantificación microscópica al estudio del comportamiento del melanoma cutáneo. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.
- 7.-Montoto, L.(1982). Digital Multi-Image Analysis: Application to the Quantification of Rock Microfractography. IBM J. Res. Develop. Vol. 26, pp. 735-745.
- 8.-Orille, V., Sampedro, A., Ferrer-Barriendos, J., Corral, N. & Martínez, A.(1993). Quantitative pathology of the cervical intraepithelial neoplasia. Eur. Jour. Gynaec. Oncol.; vol. XIV; pp. 491-500.
- 9.-Rosenfeld, A.(1979). Some experiments on variable thresholding. Pattern Recognition, Vol. 11, 191.
- 10.-Rosenfeld, A. & Kak, A.C.(1981). Digital Picture Processing. Vol.1 & Vol.2. Academic Press. London.
- 11.-Russ, J. C.(1990). Computer-Assisted Microscopy, The Measurement and Analysis of Images. Plenum Press, New York.
- 12.-Russ, J. C. & Russ, J.Ch.(1987). Automatic Discrimination of Features in Grey-Scale Images. Journal of Microscopy, Vol. 148, pp. 263-277.
- 13.-Salto, M., Morales, J., Corral, N., Carey, F.A. & Sampedro, A.(1993). DNA histogram interpretation in image cytometry. En: Sampedro A. Orfao A. DNA cytometric analysis. Oviedo: Universidad de Oviedo, 121-134.
- 14.-Sampedro, A., Riera, J.R., Bruguera, M., Corral, N., Junco, P. & Rodrigo, L.(1988). Analysis of the correlation between quantitative microscopy and portal pressure in alcoholic liver disease. Verb.Dtsch. Des. Path 72, 550.
- 15.-Sampedro, A. & Orfao, A.(1993). DNA cytometric analysis. Oviedo: Univ. de Oviedo.
- 16.-Sampedro, A., Alvarez, C., Suarez, C. & Martínez-Nistal, A. (1994). Quantitative pathology of the intraepithelial laryngeal neoplasia. Otolaringol. Head Neck Surg. 110.
- 17.-Serra, J.(1982, 1988). Image Analysis and Mathematical Morphology, Volume 1 y 2. Academic Press, London.