

Práctica 7

Análisis de imagen utilizando herramientas morfológicas

Curso 2024– 2025

En esta práctica se pretende familiarizar al estudiante con las herramientas avanzadas de procesamiento morfológico de imagen en entorno MATLAB. Para ello se trabajará con la imagen ‘I_celulas.bmp’, imagen en escala de grises (uint8) procedente de un microscopio y que al cargar almacenaremos en la variable ‘I_celulas’.

En esta práctica se aplicarán herramientas avanzadas de segmentación y morfología matemática para realizar el conteo de células de forma automática, a la vez que se delimitan sus fronteras. Se trata de una aplicación útil en la monitorización de la velocidad de reproducción de células vivas, siendo una alternativa al proceso de conteo por inspección visual. Tenga en cuenta la dificultad de segmentar todas las células, especialmente si los núcleos aparecen superpuestos en la imagen.

Para conocer el funcionamiento de los comandos utilizados en este guión, utilice la ayuda de MATLAB. Tenga en cuenta que a lo largo de la práctica puede utilizar las instrucciones `clear all` y `close all` para evitar posibles interferencias con otras variables o ventanas.

Para realizar el diseño del sistema, se sugiere seguir los siguientes pasos:

1. *Preprocesado*

Utilice la instrucción `imread` para leer en MATLAB la imagen ‘I_celulas.bmp’. Realice un filtrado de la imagen aplicando un filtro alternado secuencial (ASF3) open-close con un EE plano que corresponda a un disco. Utilice tres discos de tamaño creciente (de radio 1, radio 2 y radio 3). Anote la secuencia de instrucciones utilizada y visualice la secuencia de imágenes obtenida tras aplicar cada una de las etapas del ASF3. Denotaremos a la variable que almacena la imagen resultante como ‘I_ASF3’. Justifique si los resultados obtenidos se corresponden con los esperados por la teoría.

2. *Segmentación por watershed*

Para realizar la segmentación haremos uso de la técnica *watershed* con marcadores, utilizando un marcador por célula y otro marcador externo para el fondo. En la literatura técnica, la técnica de *watershed* se suele considerar un esquema de segmentación morfológico, razón por la que la consideraremos en esta práctica.

a. Obtención de los marcadores de célula

Puesto que el marcador de cada célula debe ser interno a la misma, se considerará como marcador la parte interna “oscura” de la célula. Para su extracción siga el siguiente proceso y comente cada uno de los resultados:

- i. Obtenga el negativo de ‘I_ASF3’ mediante la función `imcomplement`. Guarde esta imagen complementaria en la variable ‘I_NEG’.
- ii. Erosione ‘I_NEG’ con un EE plano correspondiente a un disco de radio 9 mediante la función ‘`imerode`’. Para ello, cree un elemento estructurante con el comando ‘`strel`’. Guarde el resultado en la variable ‘I_marker’ y visualícelo.
- iii. Realice la reconstrucción morfológica de I_NEG utilizando como marcador ‘I_marker’ mediante la función ‘`imreconstruct`’. Guarde el resultado en la variable ‘I_reconstruct’ y visualícelo.
- iv. Obtenga una imagen binaria donde los píxeles de primer plano indiquen los máximos regionales de ‘I_reconstruct’. Emplee para ello la función ‘`imregionalmax`’. Guarde el resultado en la variable ‘I_max_reg’ y visualícelo.

De la comparación visual entre la imagen de células original (‘I_celulas’) y la imagen ‘I_max_reg’, se observa que no todos los máximos regionales obtenidos son útiles para el conteo de células. A simple vista, ¿qué grupos de píxeles indicadores de máximos habría que eliminar? Haga uso del comando `imclearborder` para conseguirlo. Visualice la imagen resultante y anote la instrucción utilizada. Denomine ‘I_max_reg2’ a la variable que almacena la imagen resultante.

Compare visualmente las imágenes ‘I_celulas’ e ‘I_max_reg2’. Observará que en ‘I_max_reg2’ aparecen marcadas regiones que no corresponden a células. Para eliminar estas regiones tendremos en cuenta que el nivel medio de intensidad de ‘I_celulas’ en las zonas de interés marcadas por ‘I_max_reg2’ es superior en las zonas a eliminar que en el interior de las células. Consideraremos 150 como el valor de intensidad umbral para determinar si el mínimo regional corresponde o no al interior de una célula. Para eliminar las regiones de ‘I_max_reg2’ que no cumplan esta restricción utilizaremos la siguiente secuencia de instrucciones:

```
I_max_reg3=I_max_reg2;
cc = bwlabel(I_max_reg2);
n_objetos = max(max(cc(:)))
stats = regionprops(cc,I_celulas, 'MeanIntensity');
for nob=1:n_objetos
    if stats(nob).MeanIntensity >= 150
        [r,c] = find(cc == nob);
        I_max_reg3(r,c)=0;
    end
end % for nob
```

Explique razonadamente qué hace cada una de las instrucciones anteriores. Visualice la nueva imagen ‘I_max_reg3’ y justifique las diferencias con ‘I_max_reg2’. Tenga en cuenta que las regiones de primer plano de ‘I_max_reg3’ actuarán como marcadores interiores en la segmentación por *watershed*.

Proponga un procedimiento para determinar automáticamente el número de células a partir de la imagen 'I_max_reg3'.

b. Obtención del marcador externo

Como marcador externo a las células (necesario para que haya una región asociada a los píxeles que no corresponden a células) utilizaremos las líneas de *watershed* obtenidas sobre la función distancia de 'I_max_reg3', previamente dilatada con un disco de radio 7. El objetivo de esta dilatación es evitar que los marcadores externos solapen con las zonas de la célula. Utilice la siguiente secuencia de instrucciones para obtener una aproximación a este marcador:

```
I_dilate = imdilate(logical(I_max_reg3),strel('disk',7));  
D = bwdist(I_dilate);  
DL = watershed(D);  
bgm = (DL == 0);
```

Explique el procedimiento utilizado. Para ello, haga uso de la ayuda de MATLAB y represente en 3D cada una de las variables obtenidas en una figura utilizando el comando `mesh`.

Adicionalmente, utilice las instrucciones

```
figure, imshow(imadd(255*uint8(bgm),I_celulas))
```

para representar en una nueva figura el marcador externo superpuesto a la imagen a segmentar.

- c. **Combine** en la misma imagen los **marcadores internos y el marcador externo**. Utilice para ello la instrucción

```
I_minimos = bgm | I_max_reg3;
```

- d. Puesto que aplicaremos la técnica de *watershed* sobre el **módulo del gradiente de la imagen original**, el siguiente paso es obtener la correspondiente variable asociada (variable que denominaremos 'I_celulas_grad'). Haga uso de las técnicas de filtrado lineal para obtener el módulo de la imagen gradiente conforme al filtro de Sobel. Para ello, utilice las funciones 'fspecial' e 'imfilter'. Tenga en cuenta el tipo de variables con las que trabaja y determine si es necesario realizar alguna conversión previa de tipo de variable para realizar las operaciones conducentes al módulo del gradiente. Visualice el módulo del gradiente obtenido.
- e. Como se indicó en las clases teóricas, puesto que la segmentación por *watershed* parte de los mínimos regionales de la imagen gradiente, el resultado puede conducir a sobresegmentación (*oversegmentation*). Esto se puede evitar reduciendo el número de mínimos regionales y forzando a que éstos sean los marcadores previamente extraídos. Por este motivo, el siguiente paso es imponer como únicos mínimos regionales las regiones de primer plano de 'I_minimos', obteniendo como resultado la imagen 'I_celulas_grad_mrk'. Este proceso se realiza a través del comando `imimposemin`.
- f. Aplique la técnica de segmentación por *watershed* a la imagen 'I_celulas_grad_mrk' y extraiga las líneas de *watershed*, representándolas como regiones de primer plano en la variable 'L_frontera'. Anote y justifique la secuencia de comandos utilizada.
- g. Por último, superponga la imagen 'L_frontera' a la imagen de partida empleando la función 'imadd'. Visualice la imagen resultante y coméntela.