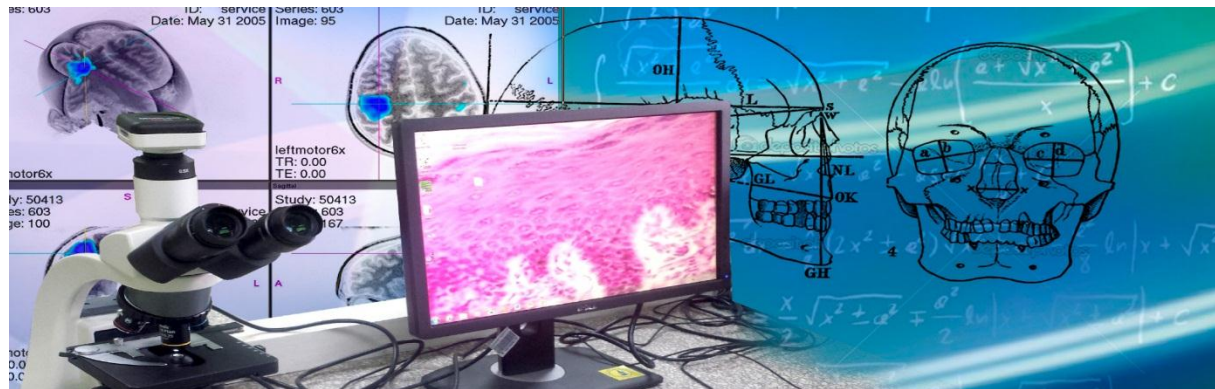


Densitometría Óptica con el empleo de ImageJ.

Dr. C. Pedro Augusto Díaz Rojas.



Universidad de Ciencias Médicas de Holguín

ANÁLISIS DE IMÁGENES

¿Qué es el análisis de imágenes?

En su acepción más amplia, el término hace referencia a un conjunto de técnicas destinadas a obtener datos relativos a un sistema objeto de estudio a partir de imágenes de dicho sistema. Los datos de interés suelen ser casi siempre numéricos.

ANÁLISIS DE IMÁGENES

En **Anatomía Patológica**, en **Histología**, en **Imagenología**, en **Neurociencias**, el término se aplica a un conjunto de técnicas con fines tan diversos como medir el perímetro de una neurona o la longitud de su árbol dendrítico (**Morfometría**), determinar la presencia de una determinada molécula en el tejido nervioso (**Densitometría**), estimar el número de neuronas en un determinado núcleo cerebral (**Estereología**), o producir una reconstrucción tridimensional de dicho núcleo (**Reconstrucción 3D**).

LA MORFOMETRÍA

Es la ciencia de la medición que se encarga de aportar información cuantitativa sobre la forma y composición de los objetos de estudio, a través de diversas técnicas.

LA MORFOMETRÍA PLANA

La Morfometría Plana es la parte de la Morfometría que se encarga de un conjunto de técnicas que aportan información cuantitativa sobre la forma de los objetos de estudio en dos dimensiones.

Se divide en:

- Morfometría multivariada.**
- Morfometría geométrica.**

LA ESTEREOLOGÍA

Es la parte de la Morfometría que brinda información referida a la estructura tridimensional de un objeto a partir de su imagen bidimensional.

LA RECONSTRUCCIÓN 3D

Es la parte de la Morfometría que permite a través de un grupo de datos cuantitativos obtenidos de forma mixta aplicar técnicas especiales para reconstruir la forma original de un objeto.

LA DENSITOMETRÍA

Es la parte de la Morfometría que permite a través de las propiedades ópticas de moléculas y otros componentes reconocer su presencia, su composición química y cuantificar su abundancia.

LA DENSITOMETRÍA ÓPTICA

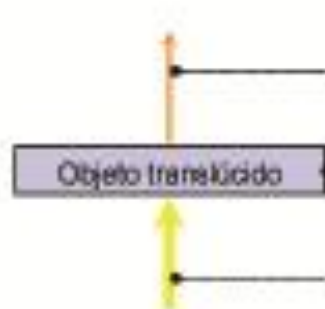
Permite medir la cantidad de luz que absorbe un material. Se basa en medir la **densidad óptica** en cada región de una imagen observada, al microscopio, al Rx, a la TAC, al US, entre otras.

¿QUÉ ES LA DENSIDAD ÓPTICA (D)?

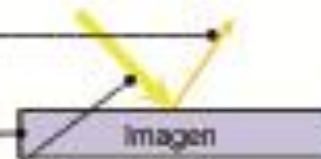
Se define como el logaritmo del cociente entre la intensidad de luz que incide sobre una imagen o una película translúcida (I_i) y la intensidad de luz que se refleja desde la imagen o que se transmite a través de dicha película (intensidad emergente). También se denomina absorbancia óptica (A).

¿QUÉ ES LA DENSIDAD ÓPTICA (D)?

Absorción por transmisión



Absorción por reflexión



Luz emergente.
Su intensidad (I_e) es igual o menor
que la de la luz incidente.

Objeto que absorbe luz por
transmisión (izquierda) o por
reflexión (derecha).

Luz incidente. Su intensidad es I_i .

$$\text{Transmitancia } (T) = \frac{\text{Intensidad de la luz emergente, } I_e}{\text{Intensidad de la luz incidente, } I_i}$$

$$\text{Opacidad } (O) = \frac{1}{T} = \frac{\text{Intensidad de la luz incidente, } I_i}{\text{Intensidad de la luz emergente, } I_e}$$

$$\text{Densidad óptica, } D = \log_{10}(\text{Opacidad})$$

¿CÓMO SE MIDE LA DENSIDAD (D)?

Se mide mediante un **densitómetro**. Existen dos tipos de densitómetros: de **transmisión y de reflexión**.

Los de reflexión se utilizan para medir la densidad óptica de una imagen impresa (por ejemplo, una fotografía convencional).

Los de transmisión, se utilizan para medir la densidad óptica de una película fotográfica en positivo (una radiografía, por ejemplo).

TIPOS DE DENSITÓMETROS

Densitómetro de reflexión



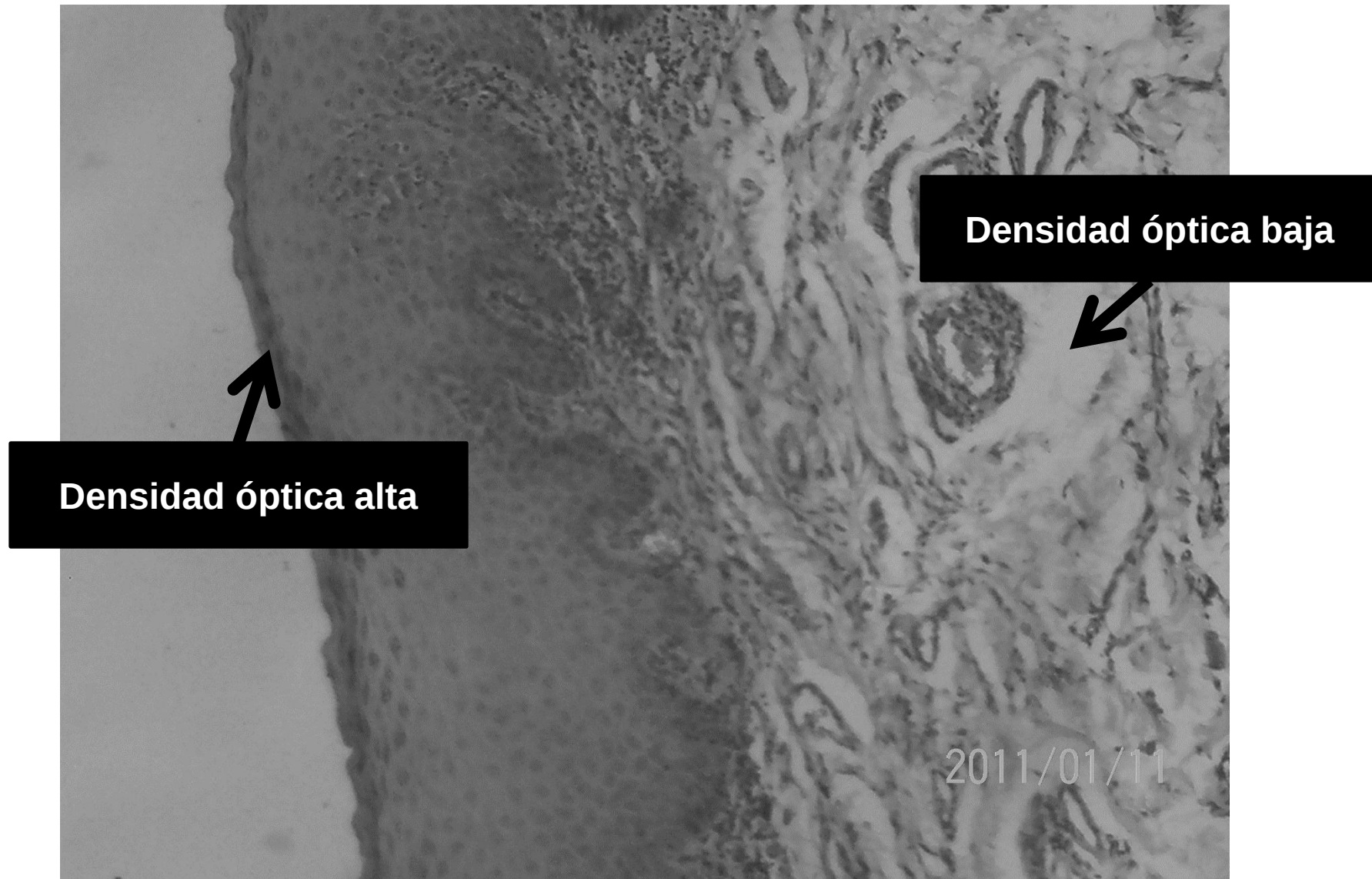
Densitómetro de transmisión



TIPOS DE DENSITÓMETROS

Los densitómetros funcionan haciendo incidir un haz de luz con una intensidad conocida sobre la imagen o la película fotográfica y midiendo la cantidad de luz reflejada o transmitida por la imagen. La medición es rápida y directa.

INTENSIDAD DE LA DENSIDAD ÓPTICA



DENSITOMETRÍA BASADA EN IMÁGENES DIGITALES

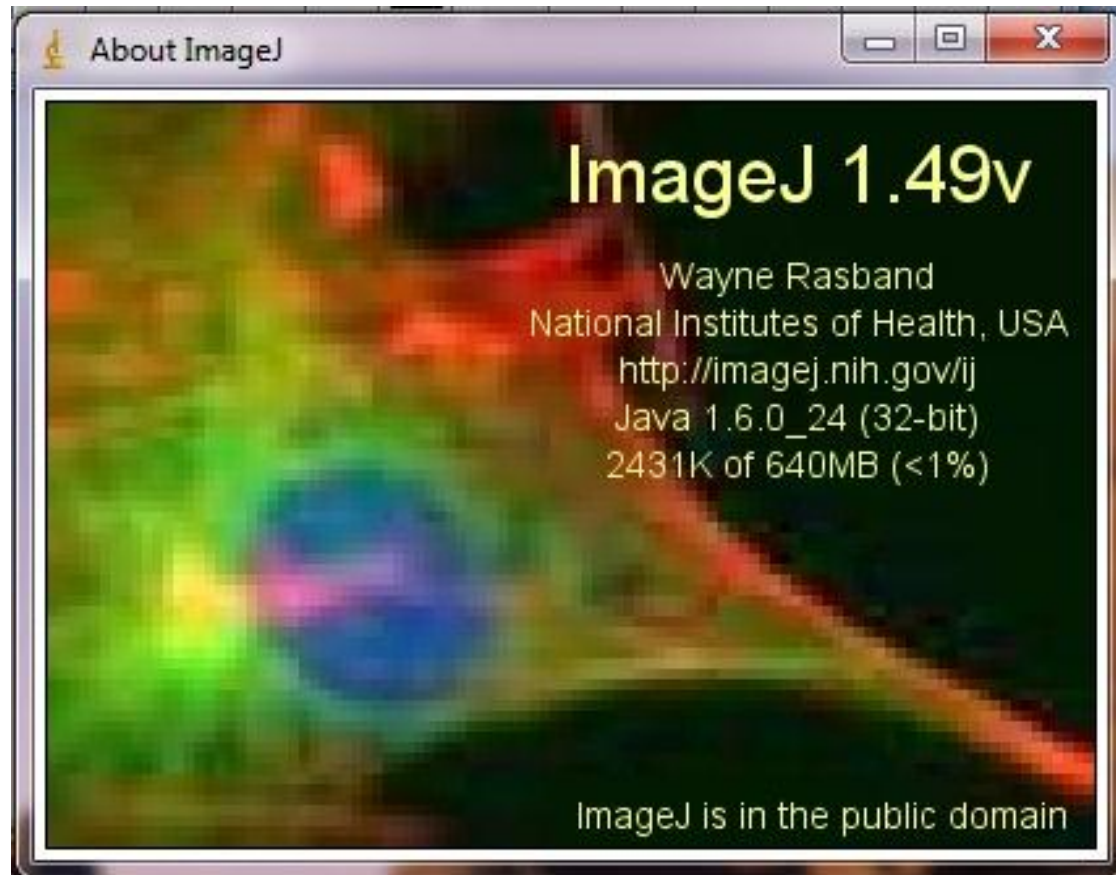
Al utilizar una cámara digital, la densidad óptica de la preparación puede estimarse indirectamente a partir del **nivel de gris o del color** de la imagen digital resultante.

En una preparación histológica, la densidad óptica no es homogénea. Por tanto, muchas veces es necesario estimar la densidad óptica de pequeñas regiones de la imagen (neuronas, por ejemplo).

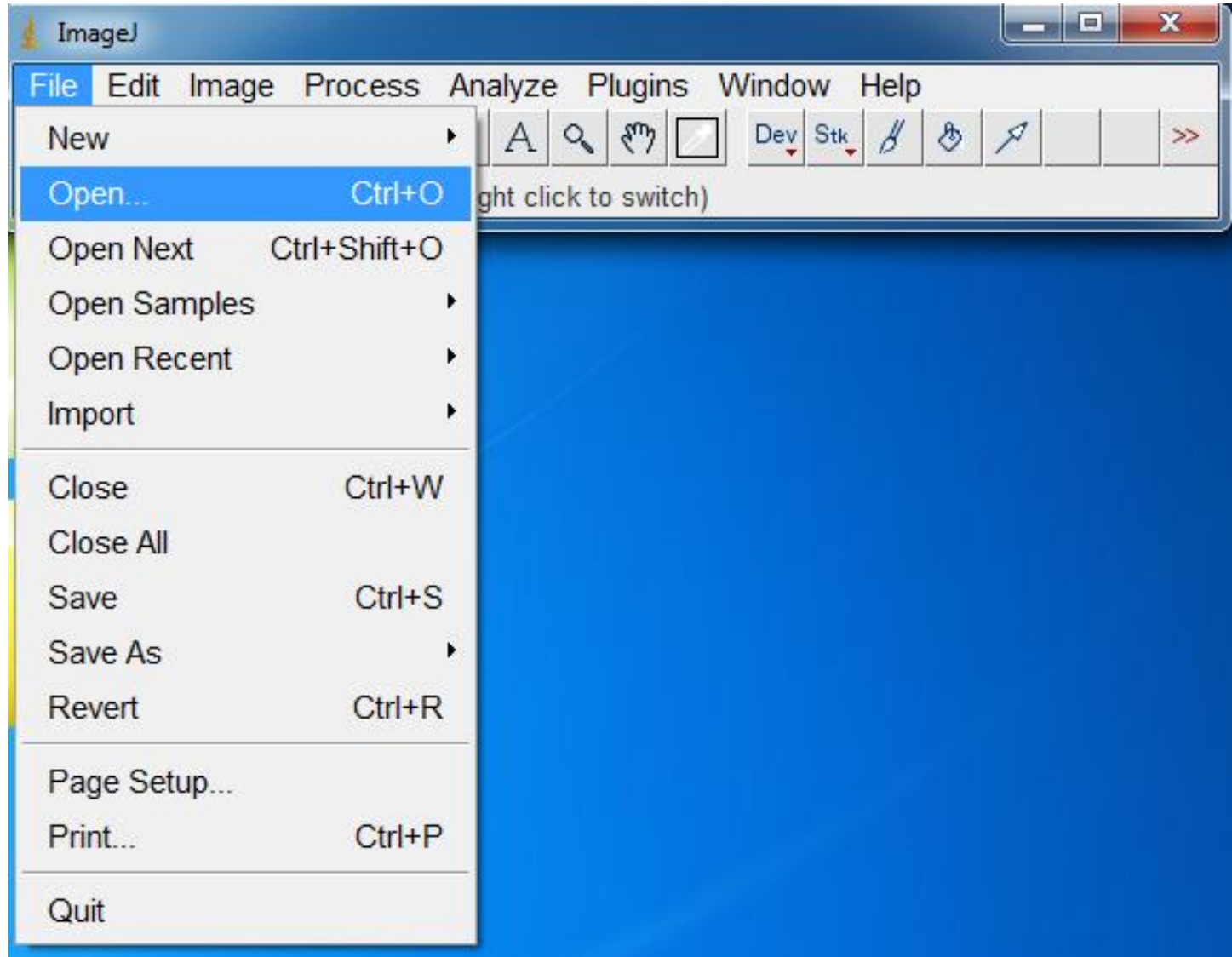
DENSITOMETRÍA BASADA EN IMÁGENES DIGITALES

La densidad óptica de una región de la preparación puede estimarse indirectamente a partir de su imagen digital midiendo el nivel de gris medio en dicha región.

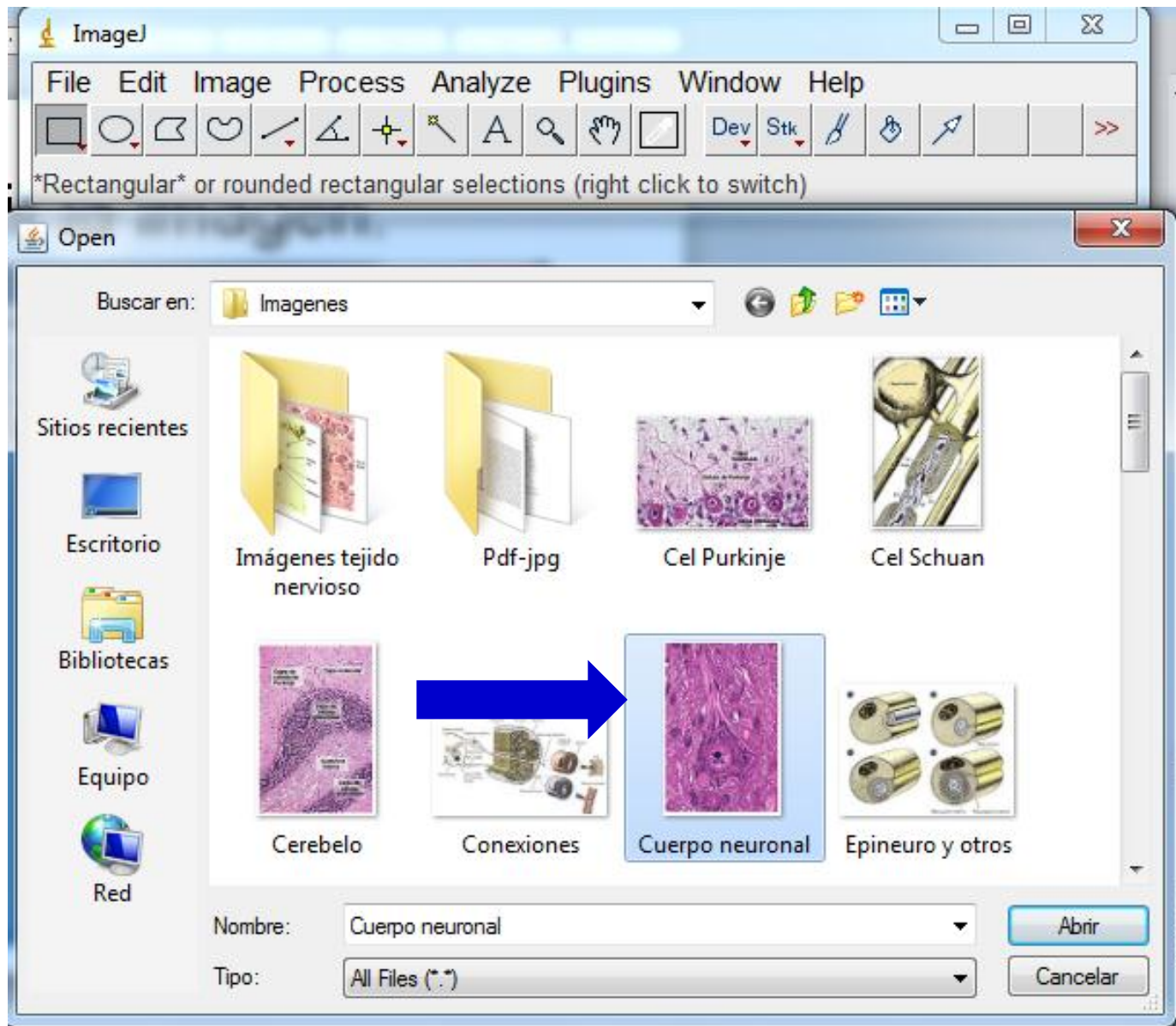
LA DENSIDAD ÓPTICA CON ImageJ



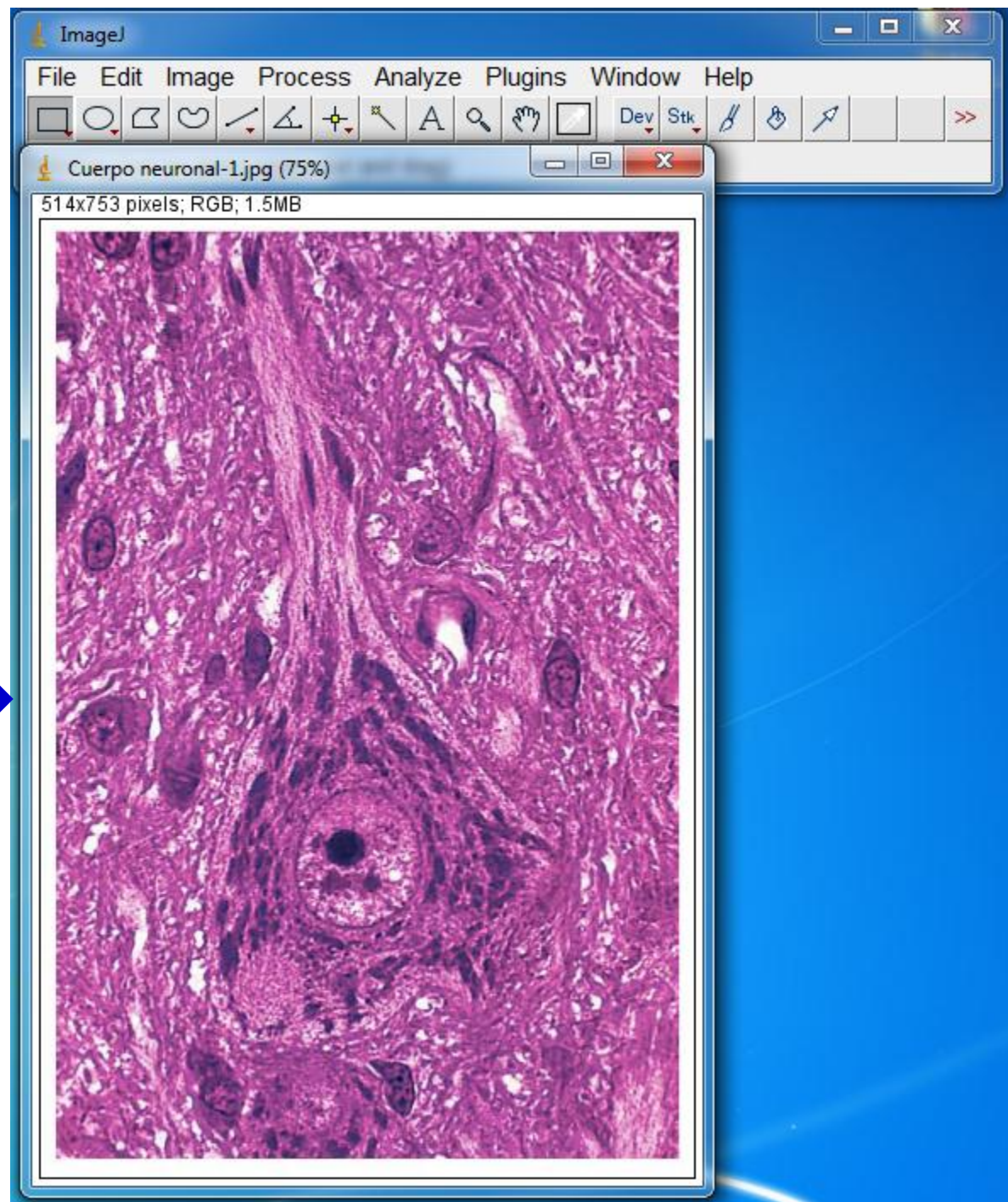
1. Abrir la carpeta donde están las imágenes



2. Seleccionar la imagen.



3. Cargar la imagen.



4. Transformar en imagen de 8-bit. O sea en tonos de grises (256 tonos).

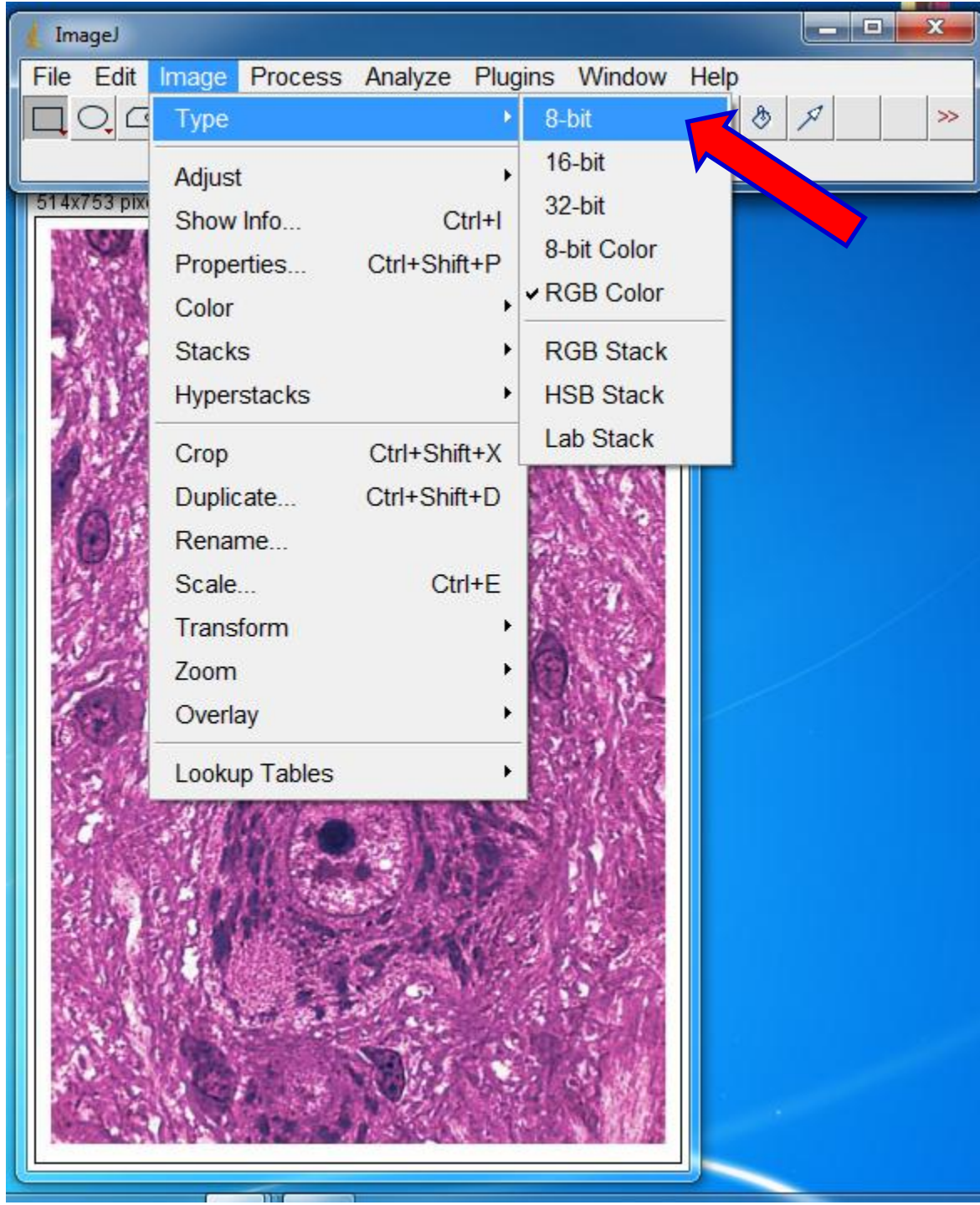
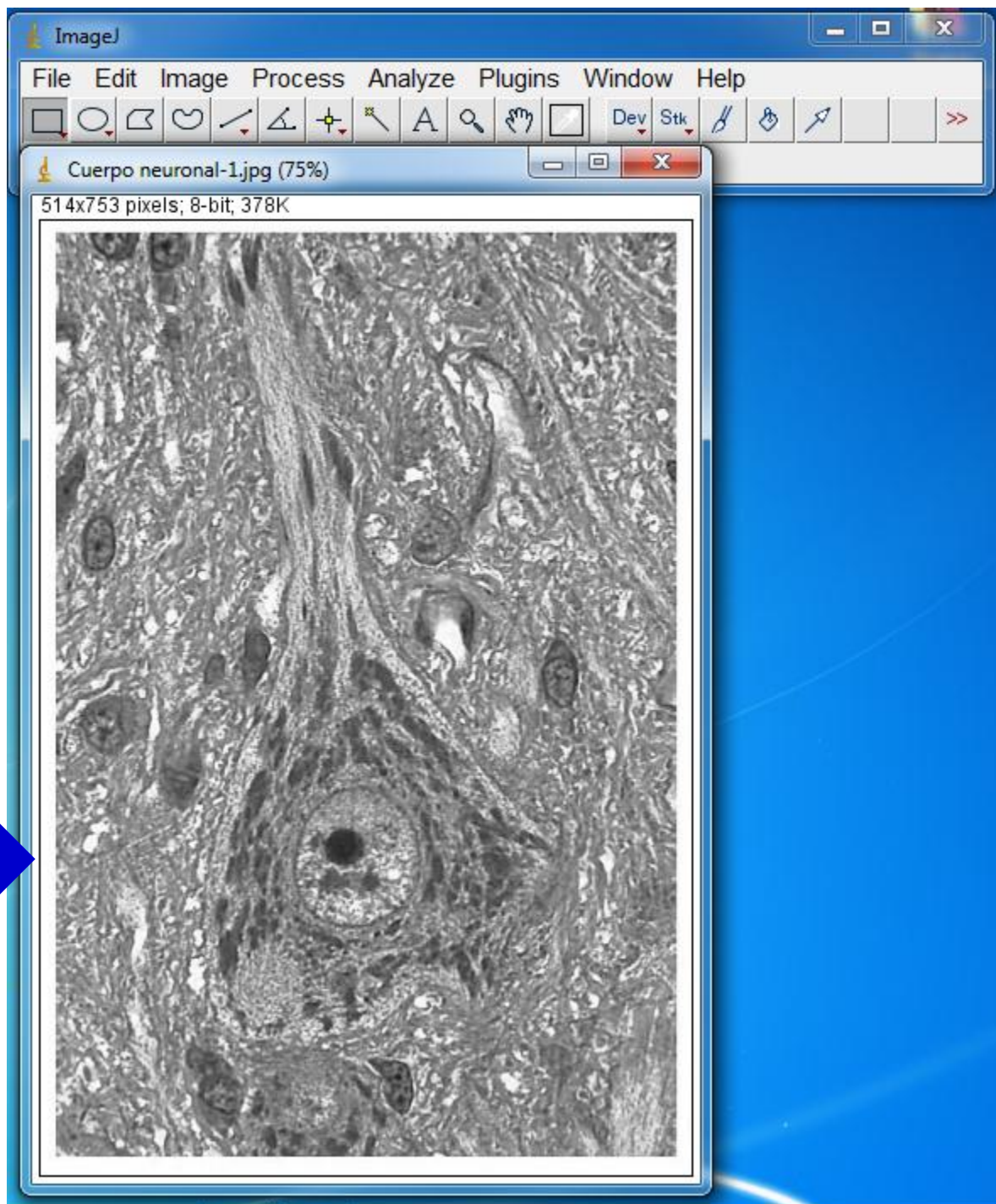
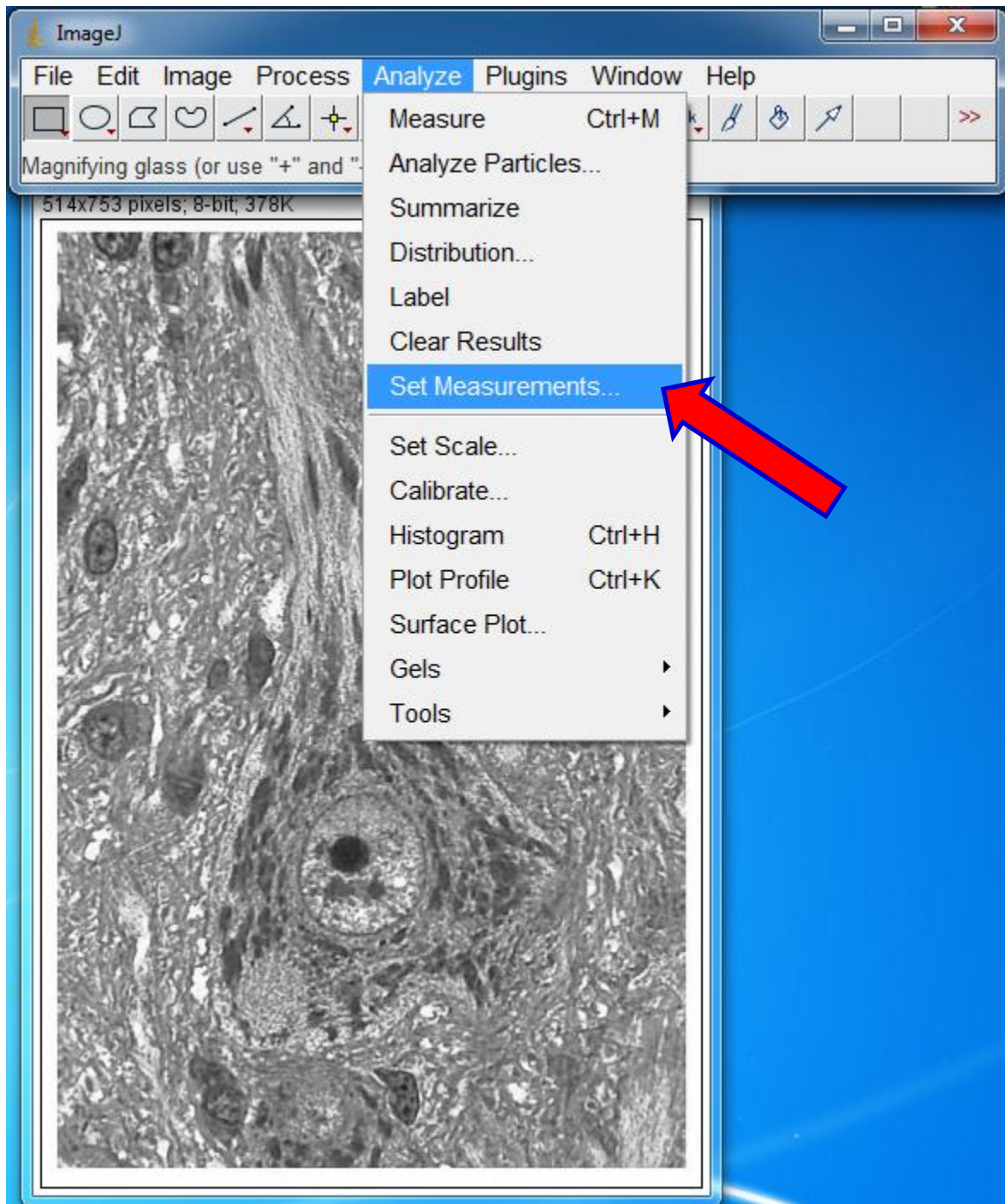


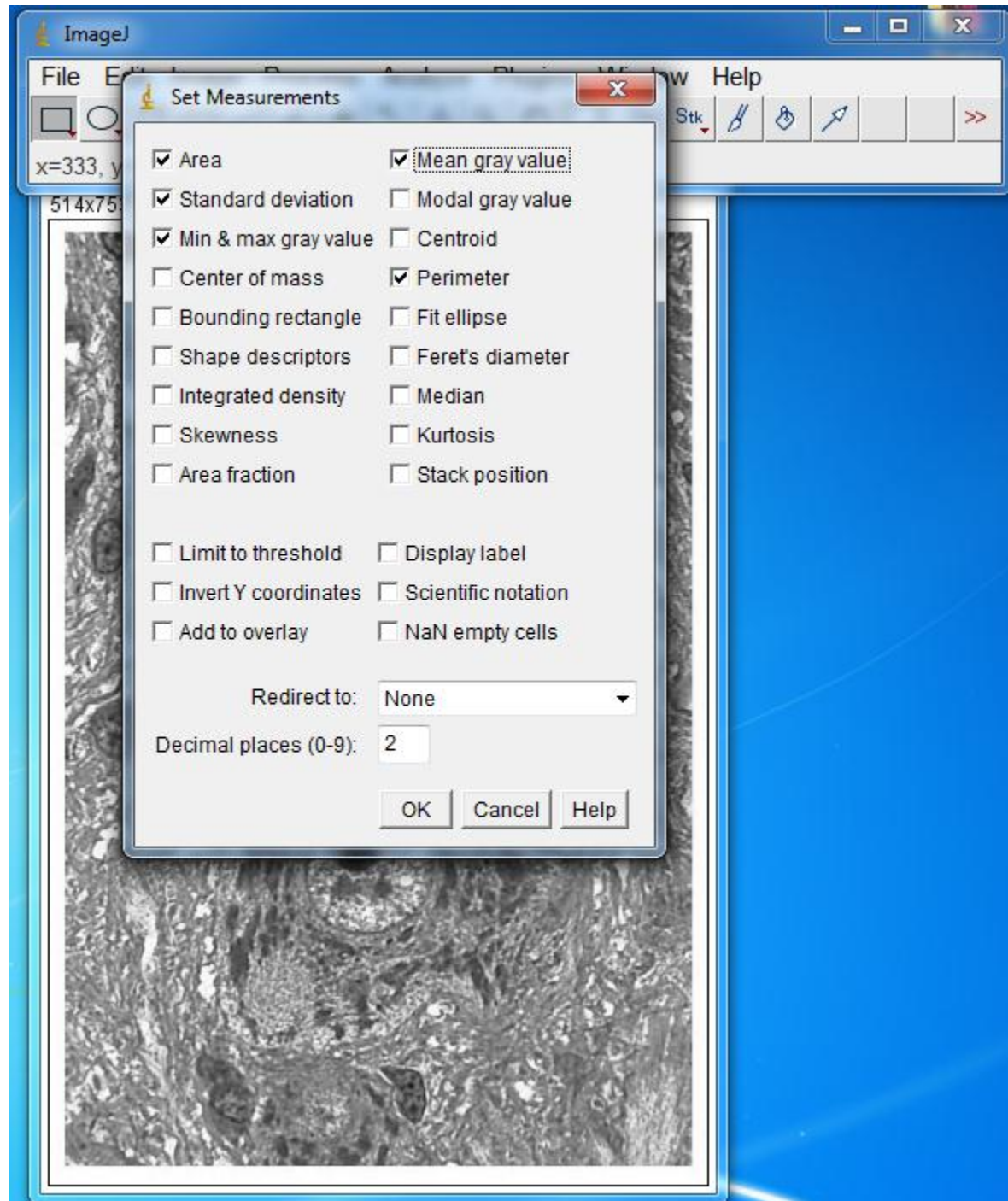
Imagen
transformada
8-bit.



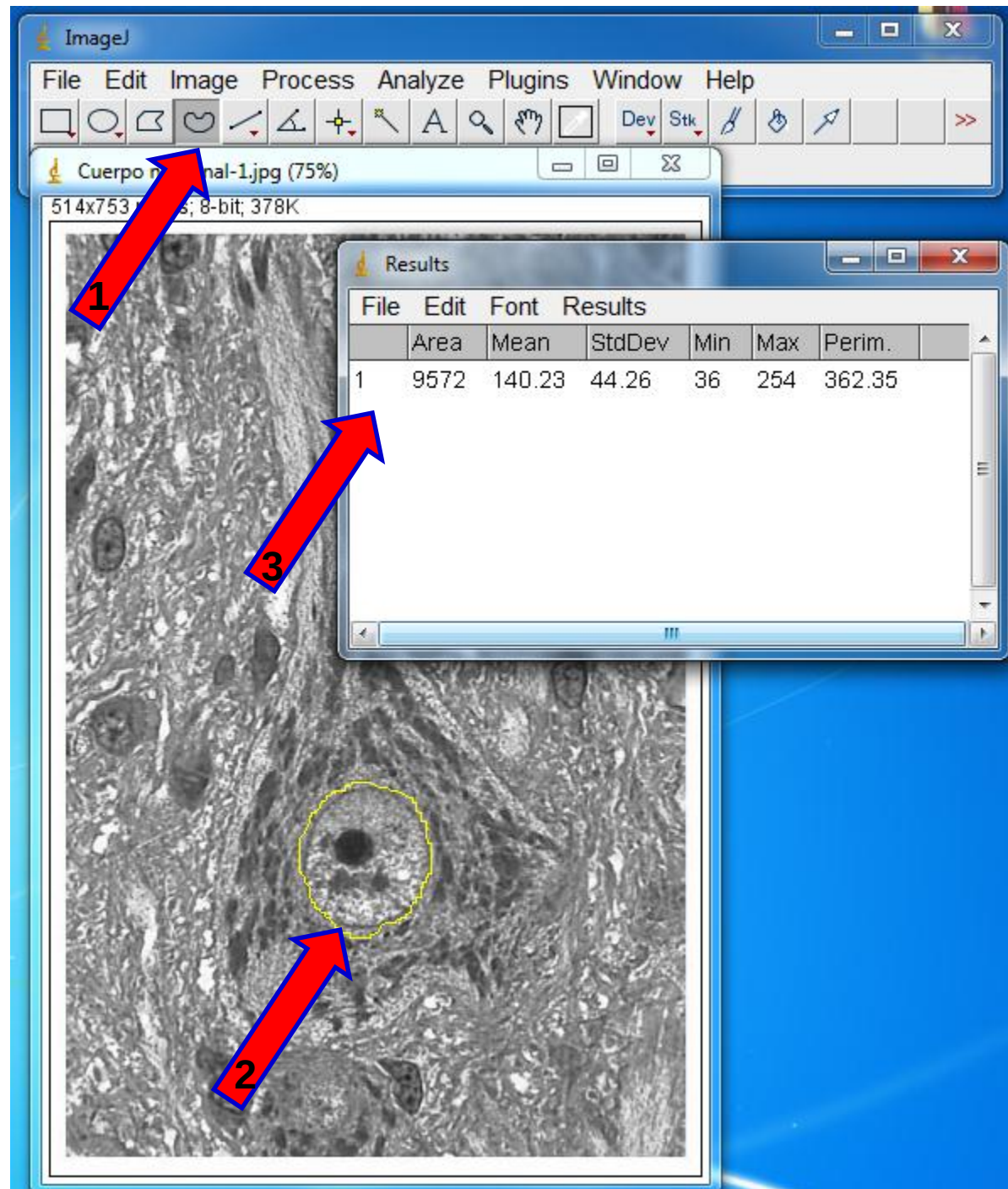
5. Seleccionar
el set de
mediciones.



6. Seleccionar las opciones de análisis de grises (las que están marcadas).



7. Procedemos a medir con la opción manos libres (1), contorneando el núcleo (2). Con control M abrimos el archivo de medidas (3).

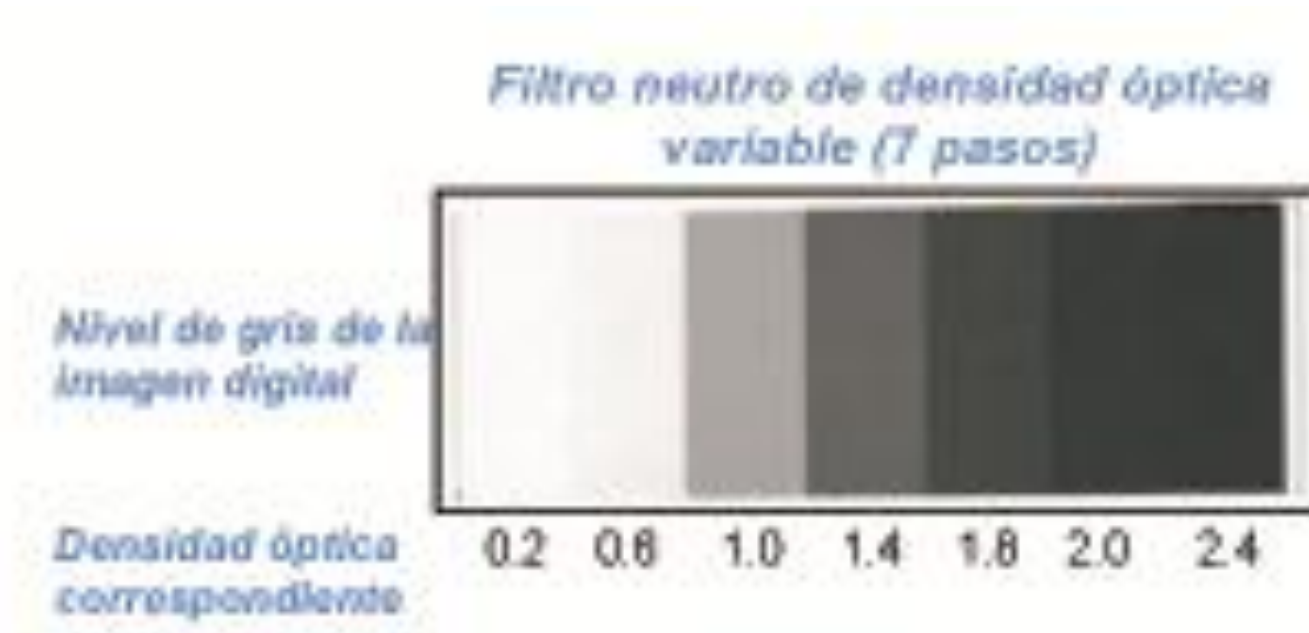


CALIBRACIÓN EN DENSITOMETRÍA ÓPTICA

Calibrar consiste en establecer una correspondencia entre los valores de gris de la imagen digital y sus valores correspondientes de densidad óptica (en unidades de densidad óptica).

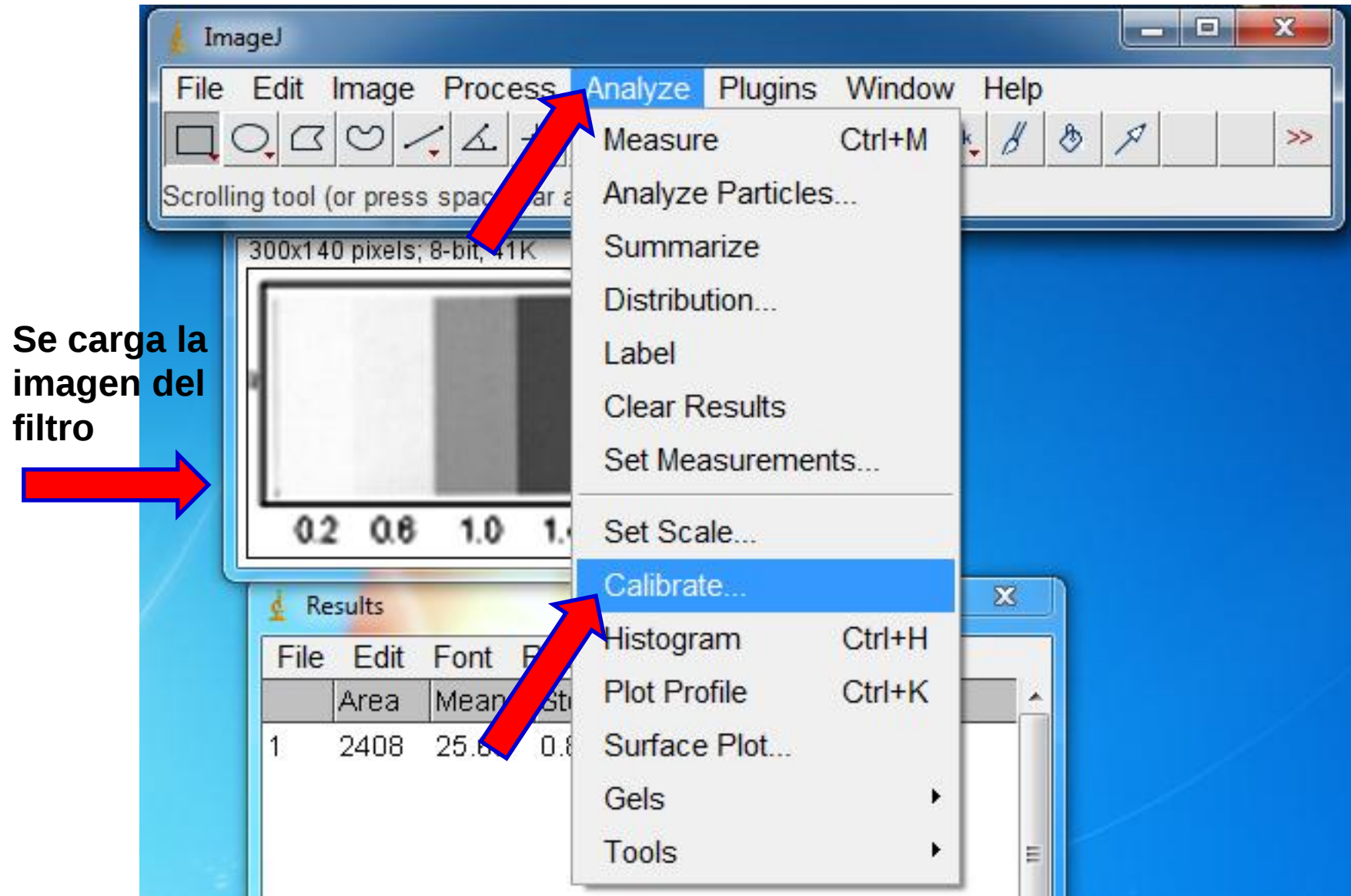
Para calibrar los niveles de gris de una imagen de fotomicroscopía digital es necesario disponer de un filtro neutro de densidad óptica variable.

FILTRO DE CALIBRACIÓN EN DENSITOMETRÍA ÓPTICA



CALIBRACIÓN CON IMAGEN DE FILTRO

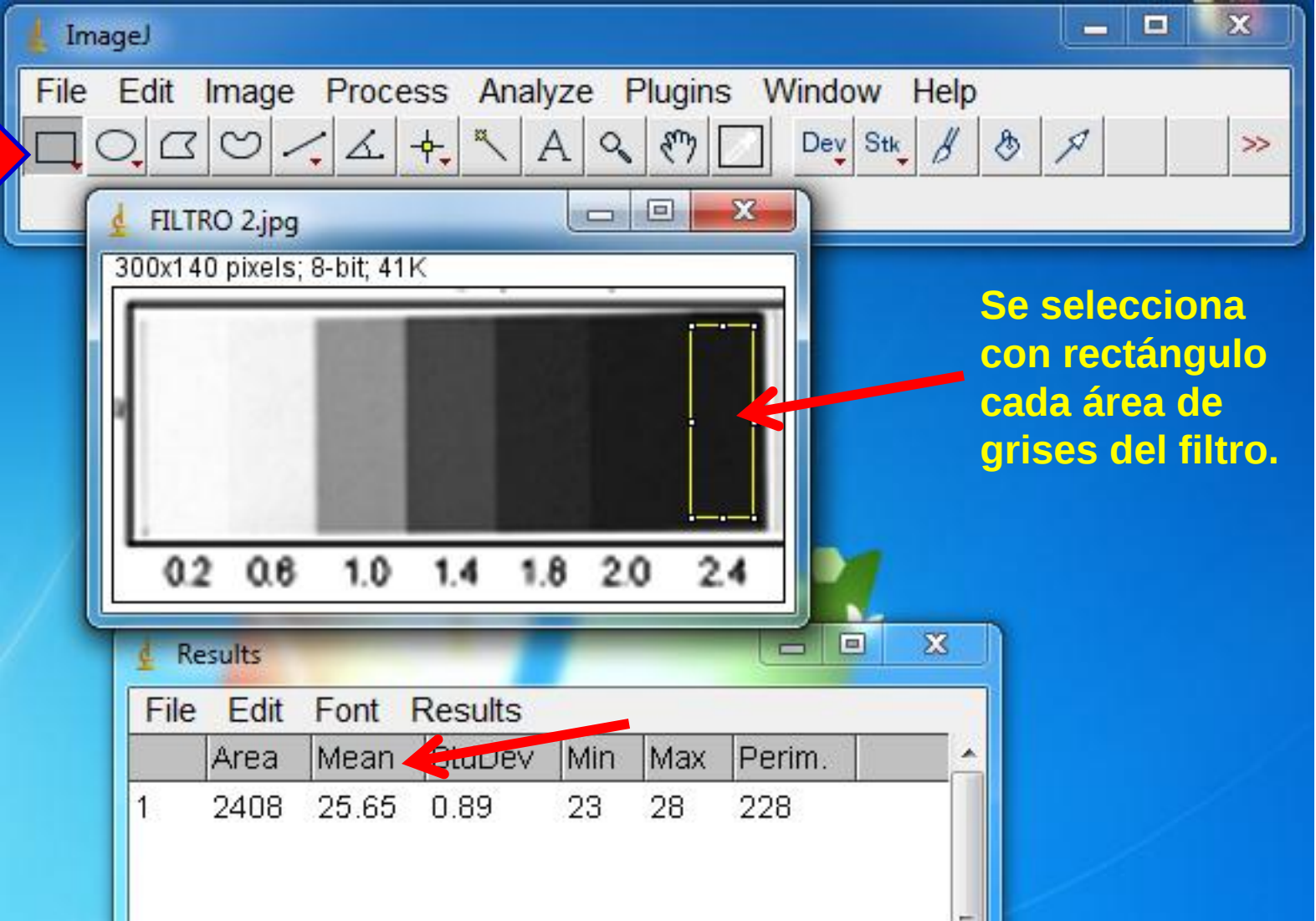
2. Abrir menú de calibración.



CALIBRACIÓN CON IMAGEN DE FILTRO

1. Determinación de la media de grises según densidad.

Rectángulo



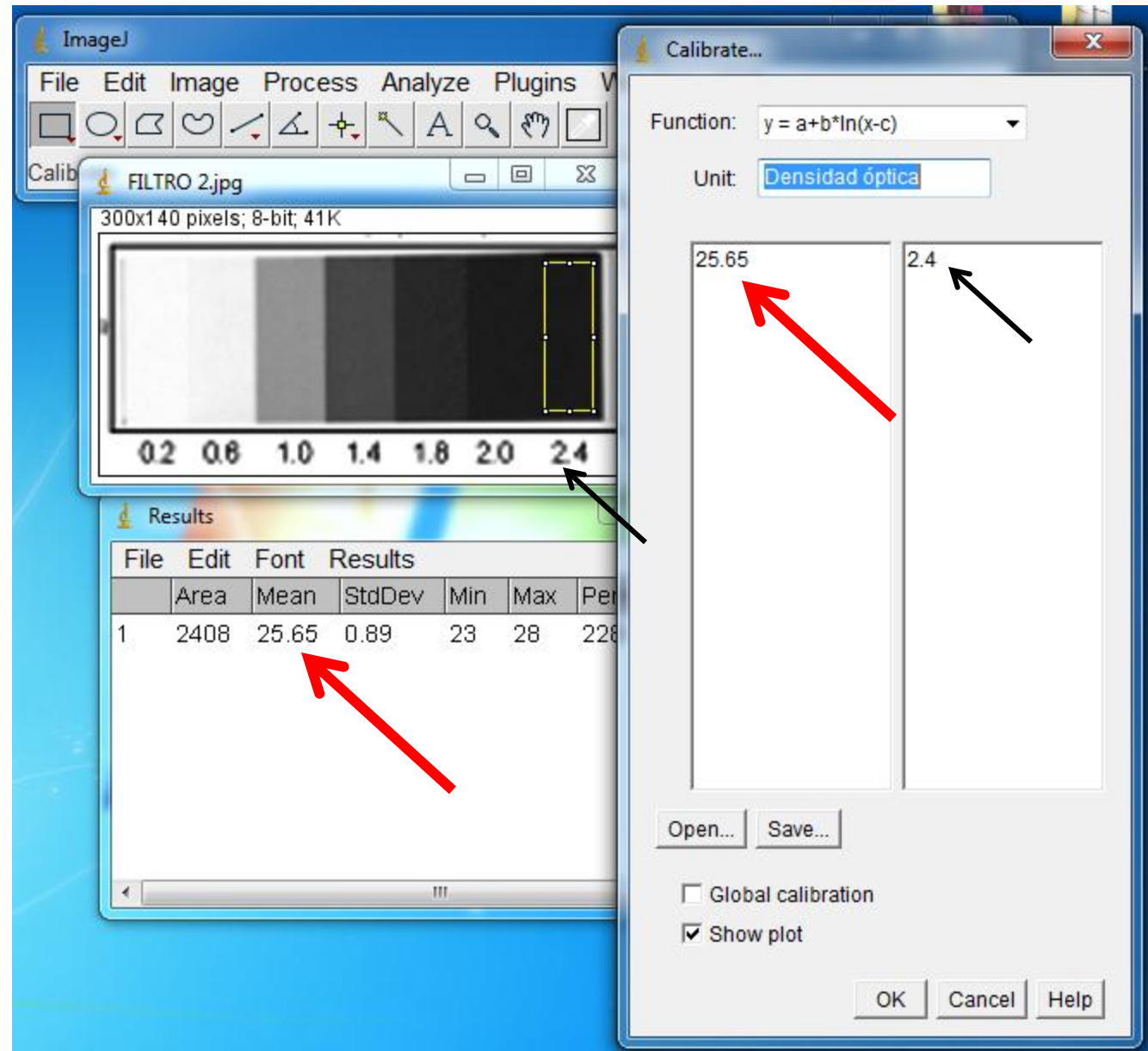
The screenshot shows the ImageJ interface. The main window displays a calibration filter image titled 'FILTRO 2.jpg' with dimensions 300x140 pixels, 8-bit, and 41K. The filter consists of a series of vertical bars of varying gray intensities, labeled with density values: 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.0, and 2.4. A red rectangle is drawn over the rightmost bar (density 2.4). A red arrow points from the 'Rectángulo' label to the rectangle tool icon in the toolbar. Another red arrow points from the text 'Se selecciona con rectángulo cada área de grises del filtro.' to the selected region. Below the filter image, the 'Results' window is open, showing a table with the following data:

	Area	Mean	StdDev	Min	Max	Perim.
1	2408	25.65	0.89	23	28	228

Se selecciona con rectángulo cada área de grises del filtro.

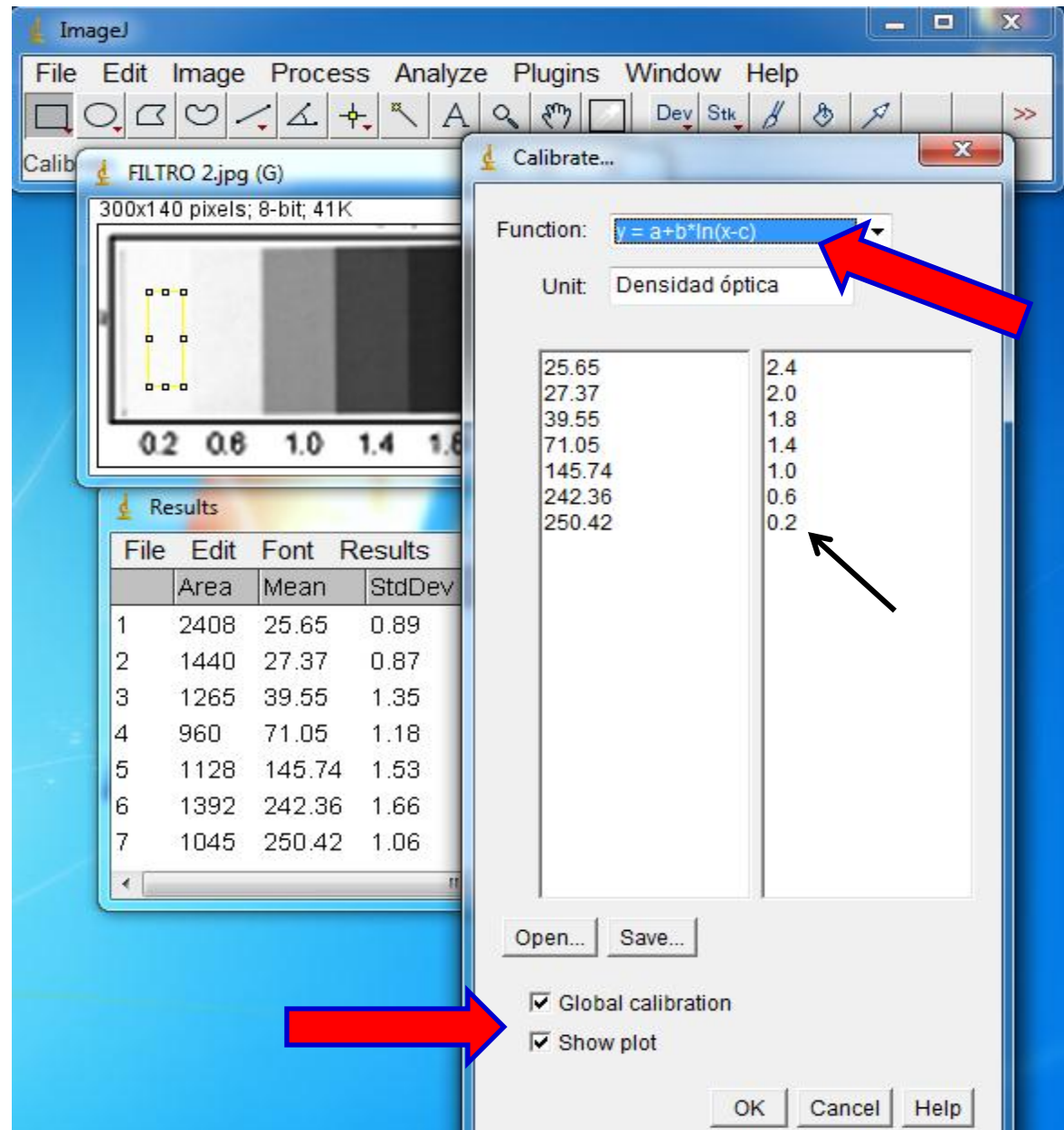
CALIBRACIÓN CON IMAGEN DE FILTRO

3. Introducimos los valores de la densidad que aparecen en el filtro.



CALIBRACIÓN CON IMAGEN DE FILTRO

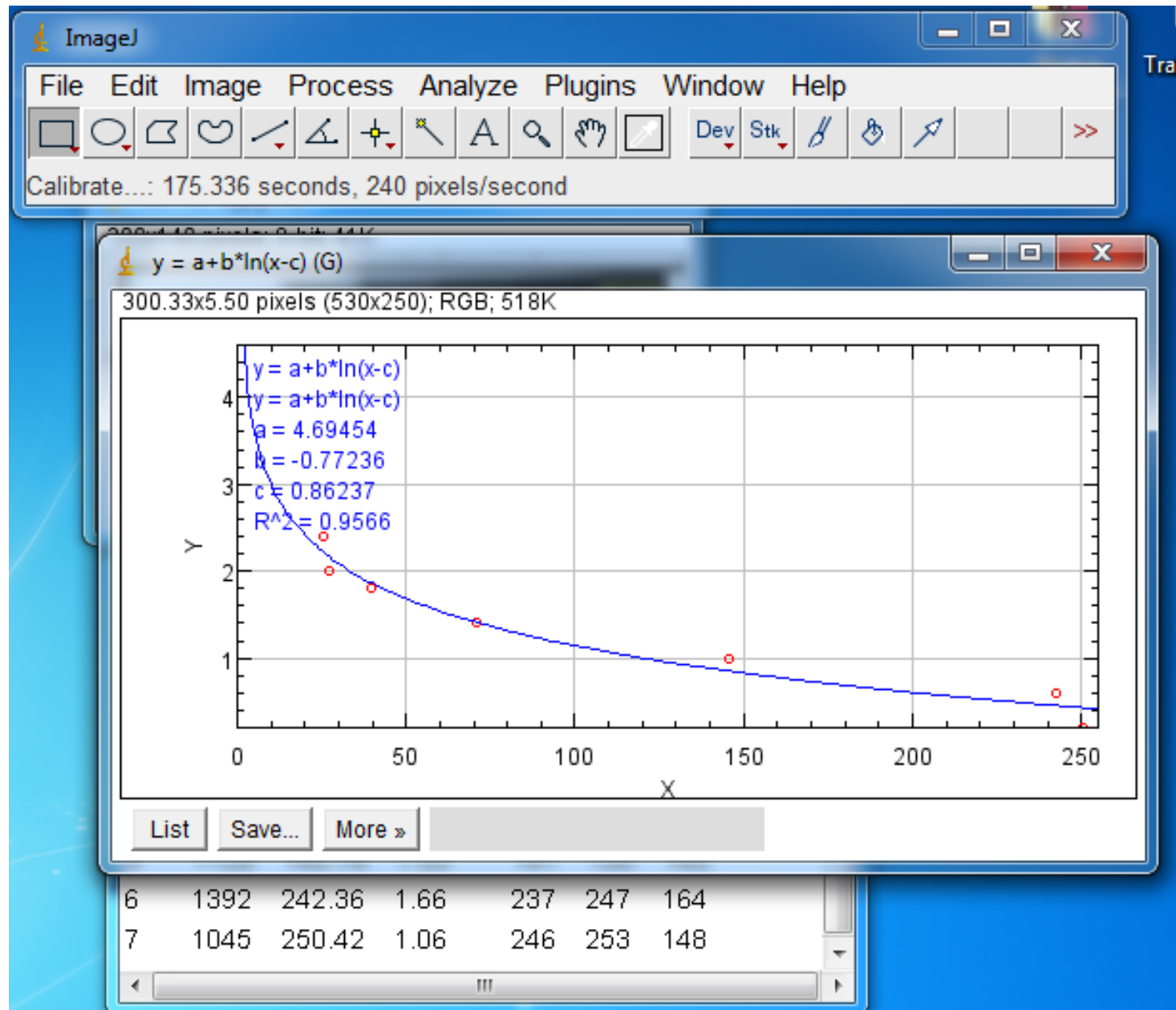
4. Con todos los valores. Luego seleccionar arriba la ecuación de cálculo y marcar las dos opciones inferiores (flechas rojas).



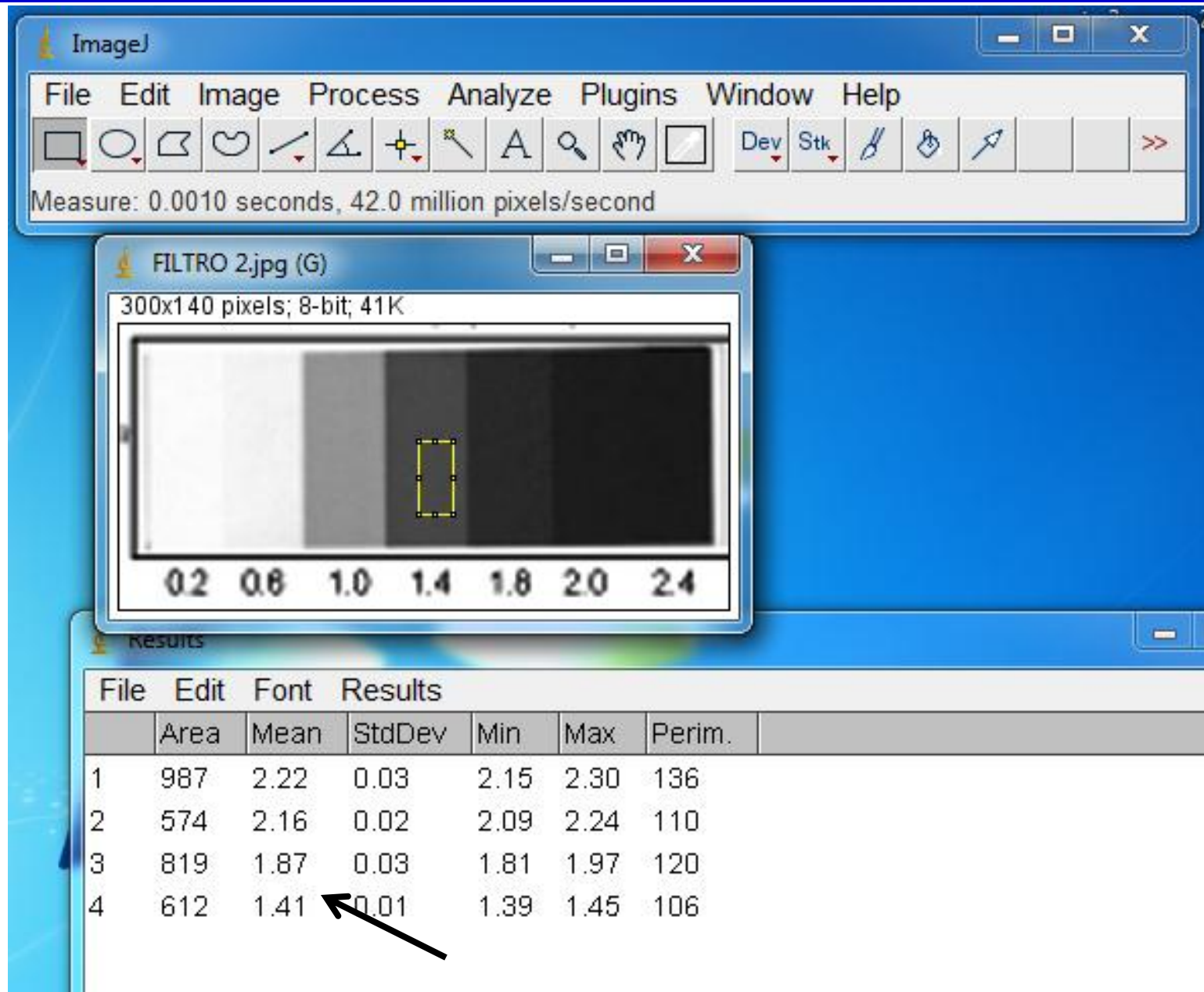
CALIBRACIÓN CON IMAGEN DE FILTRO

5. Curva de calibración.

Resultado que muestra que la calibración con el filtro ha sido segura.



MIDIENDO DENSIDAD ÓPTICA



CONCEPTOS BÁSICOS

El sistema microscopio/cámara digital empleado para medir el nivel de gris de la región de interés no mide la relación entre la intensidad de la luz emergente y la incidente en la preparación histológica. Por tanto, no mide la densidad óptica de la preparación.

CONCEPTOS BÁSICOS

Aunque el nivel de gris medio obtenido depende de la densidad óptica, también depende de la **intensidad de la iluminación** y de la **configuración de la cámara digital** (p.ej., de la apertura).

Los resultados obtenidos dependen de la **iluminación del microscopio**, del **objetivo utilizado**, y de la **configuración de la cámara**.

REGLAS PARA LOGRAR CALIDAD EN LA MEDICIÓN

- **Utilizar siempre el mismo equipo de medida y análisis.**
- **Fijar y anotar las condiciones de iluminación del microscopio.**
- **Fijar y anotar las condiciones ópticas del microscopio (objetivos, filtros, condensadores).**
- **Fijar y anotar la configuración de la cámara (ganancia, desplazamiento, apertura).**

REGLAS PARA LOGRAR CALIDAD EN LA MEDICIÓN

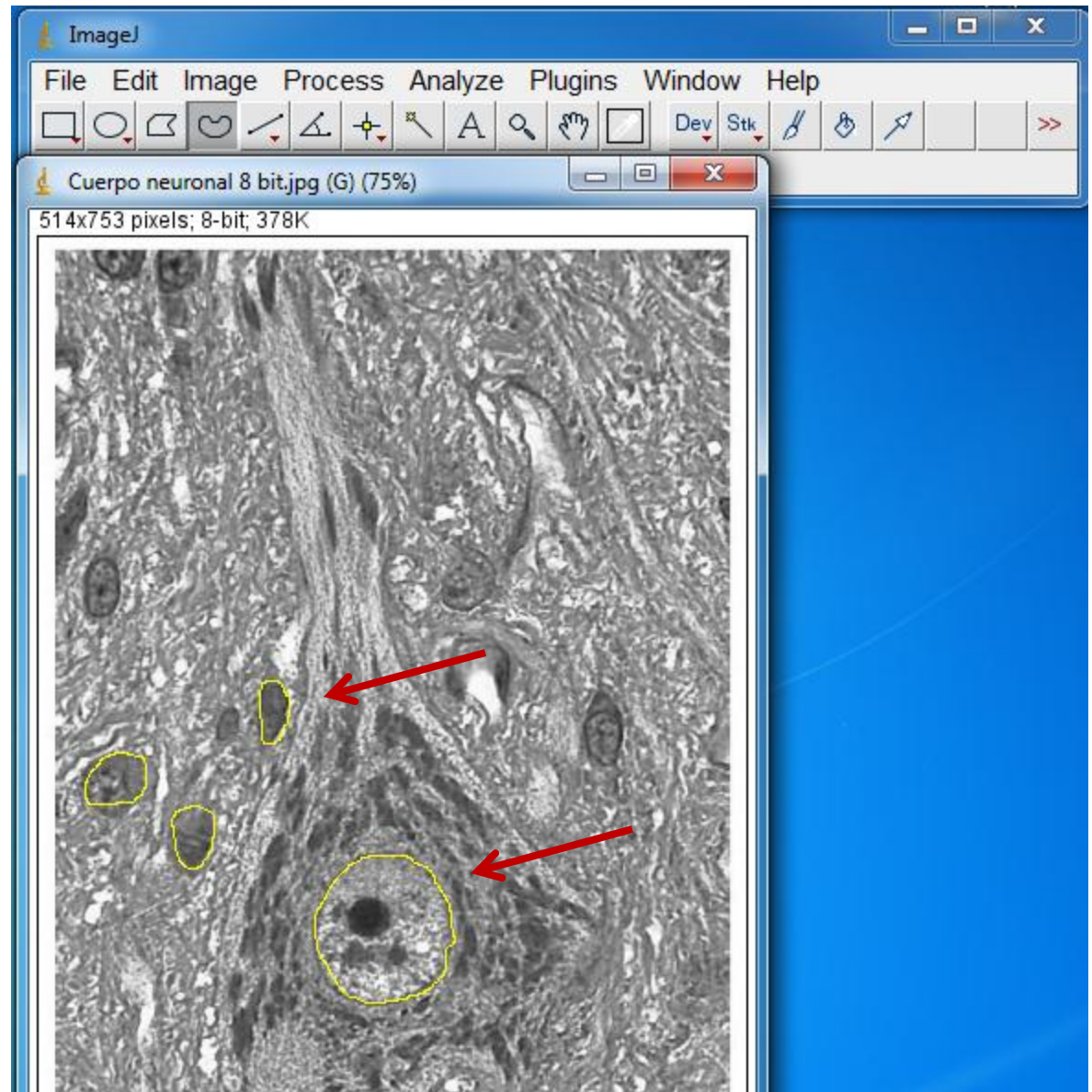
- **Fijar y anotar la configuración del software de captura.**
- **Utilizar idénticas condiciones en sucesivas sesiones de captura de imágenes.**
- **Comprobar que para una misma preparación el nivel de gris obtenido es idéntico en sesiones de captura distintas.**

REGLAS PARA LOGRAR CALIDAD EN LA MEDICIÓN

- **Garantice la calidad de las técnicas histológicas y de captación de imágenes.**
- **Conserve un patrón de comparación en imagen digital de la preparación objeto de estudio.**

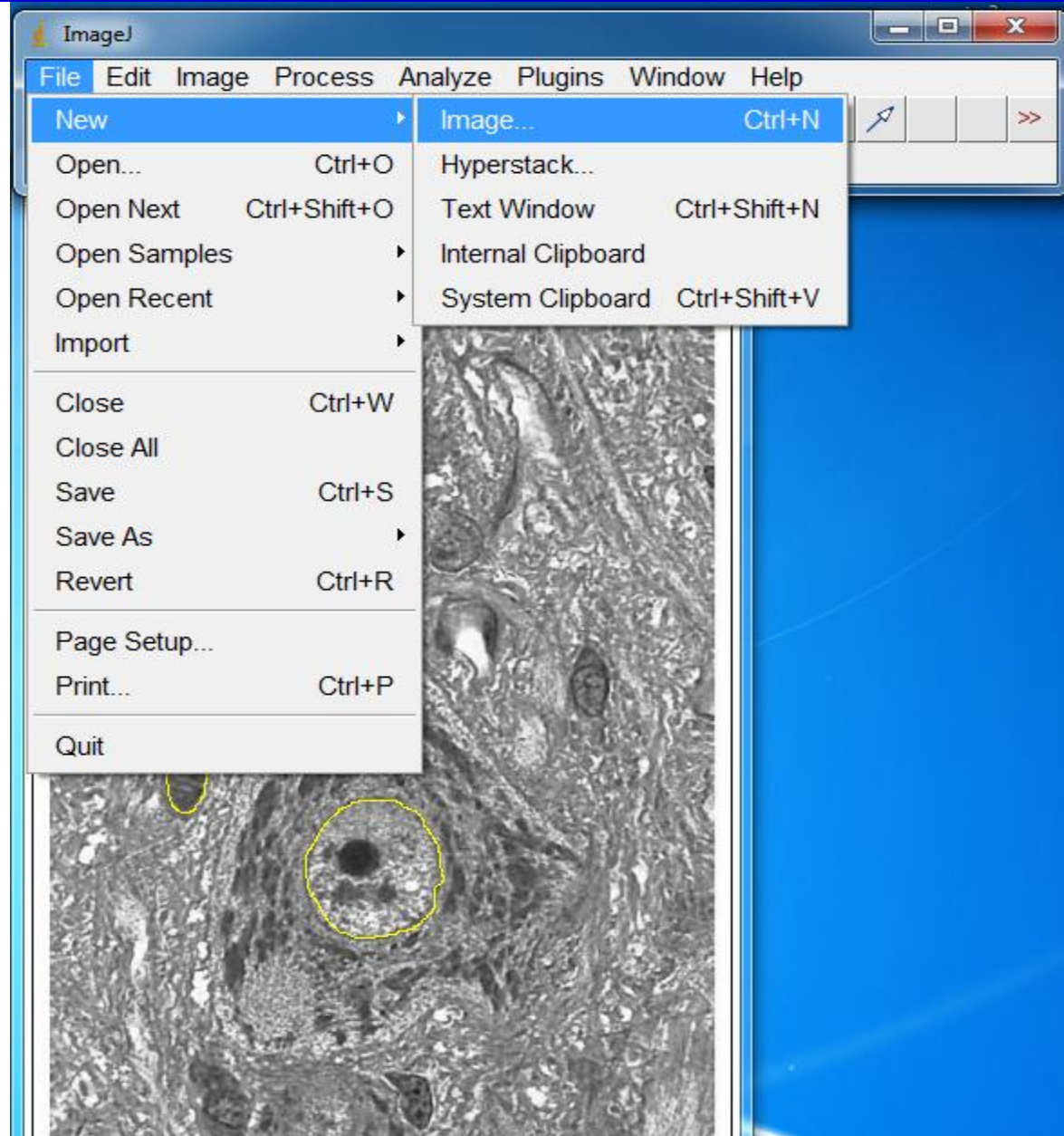
ANALISIS INDEPENDIENTE

Contornee los
elementos
manteniendo
oprimido la
tecla
mayúscula.
Al finalizar
vaya a Edit y
marque Copy
(Control C).



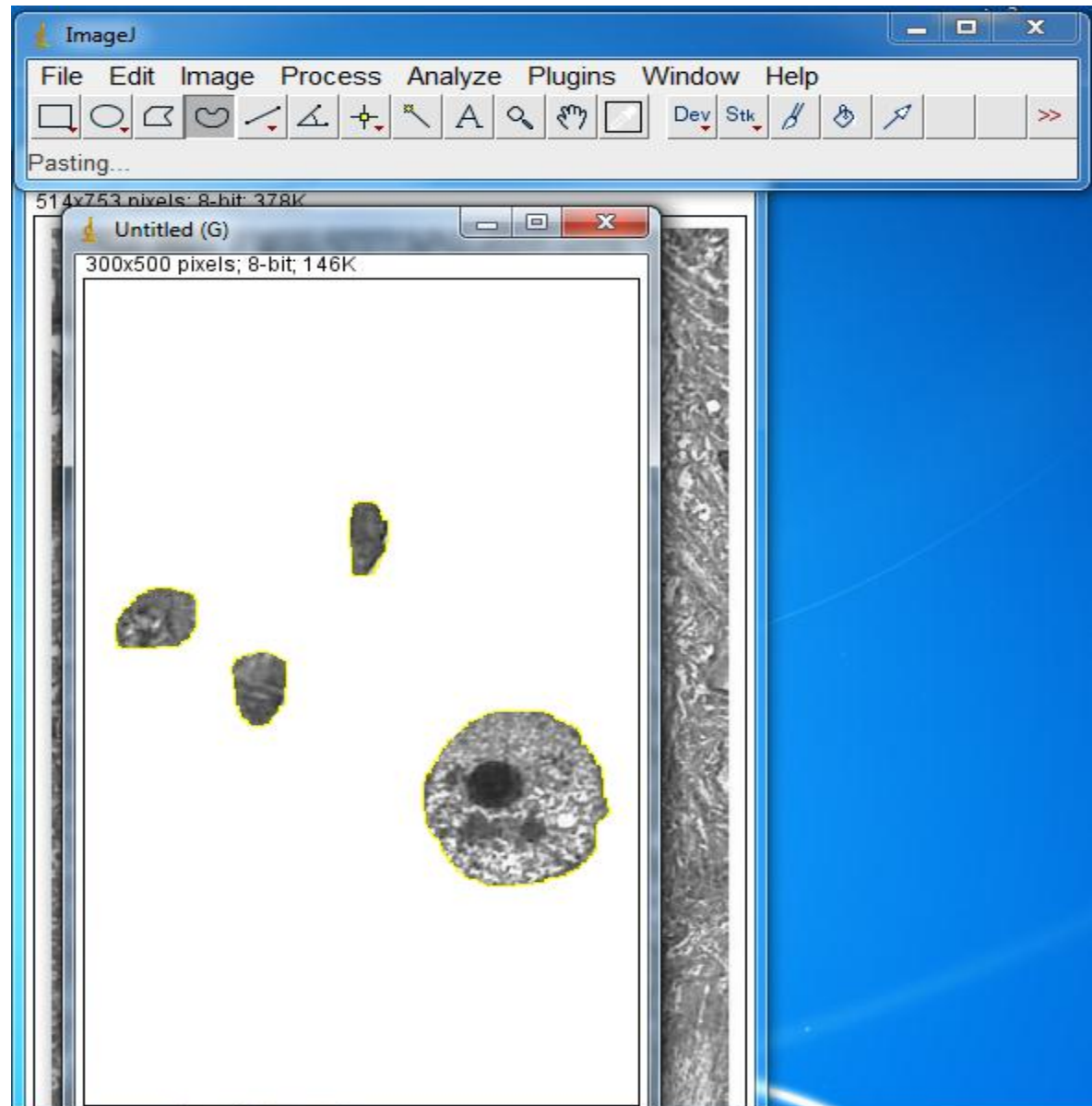
ANALISIS INDEPENDIENTE

Vaya a File,
seleccione
New y a
continuación
Image.
Acepte los
valores del
cuadro de
edición que
aparece.



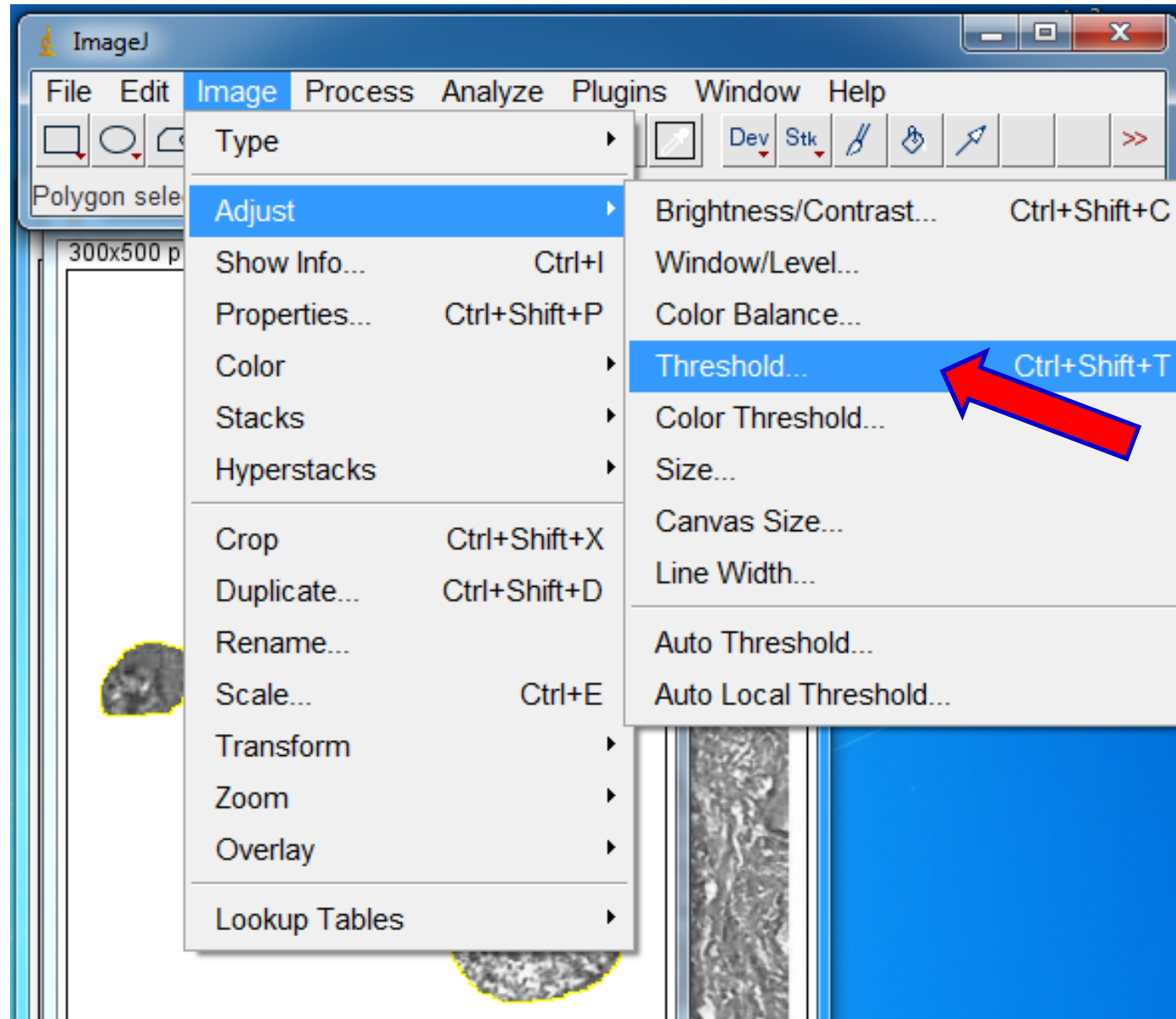
ANALISIS INDEPENDIENTE

Sobre la imagen en blanco vaya a Edit y marque Paste (Control V).



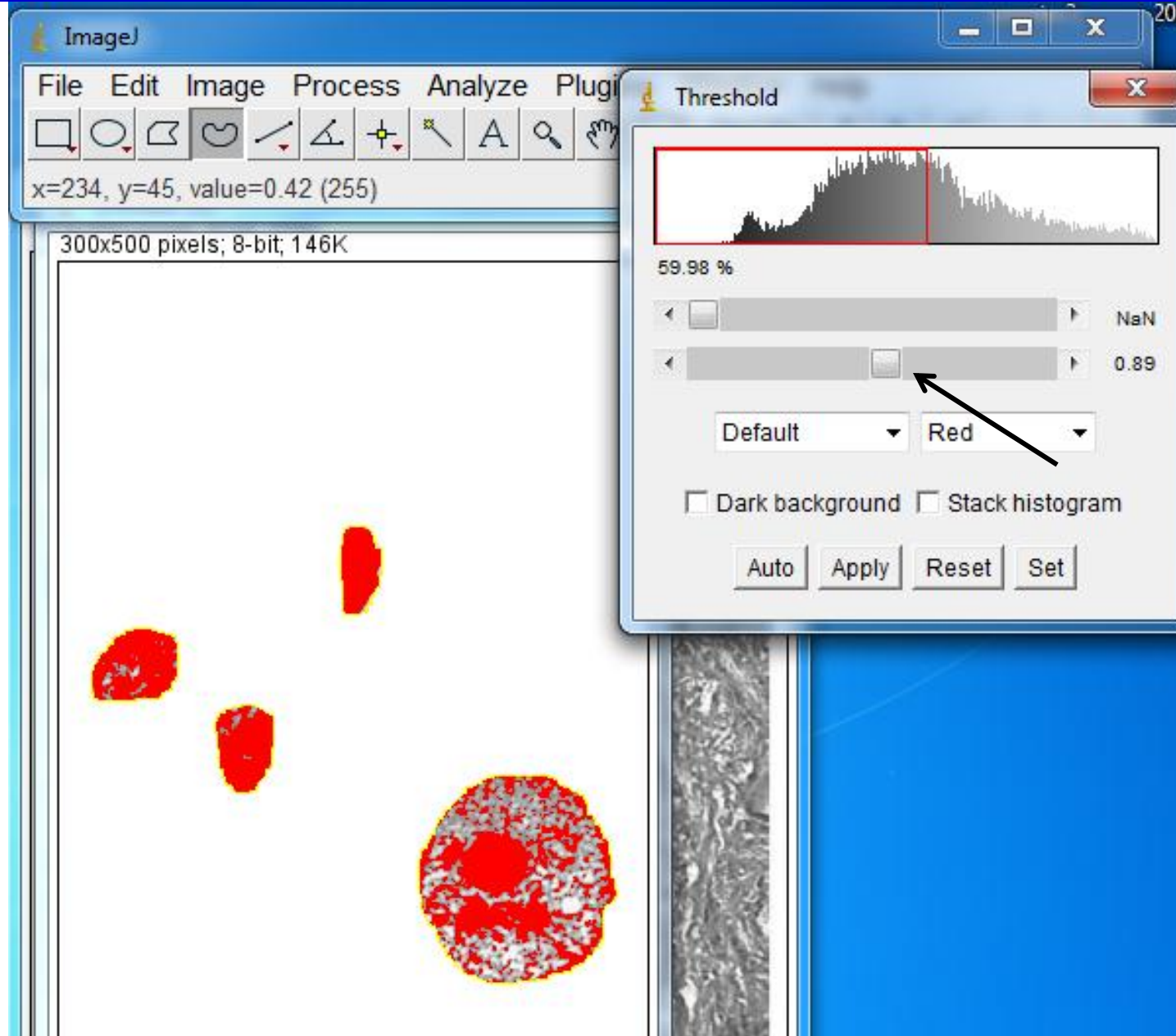
ANALISIS INDEPENDIENTE

Vaya a Image,
Adjust,
Threshold.

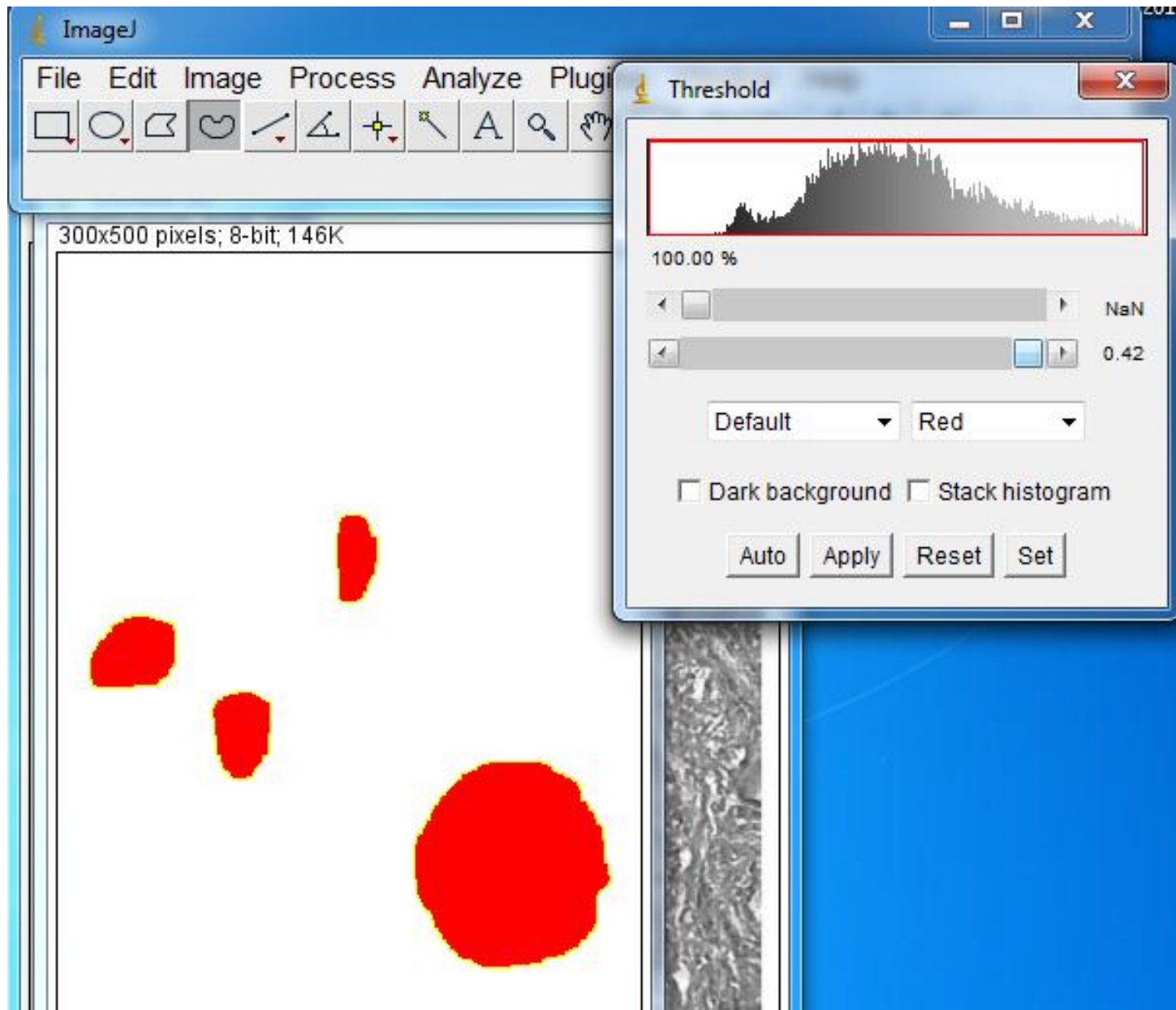


ANALISIS INDEPENDIENTE

Desplace el
marcador
inferior hasta
que todas las
figuras esten
en rojo total.

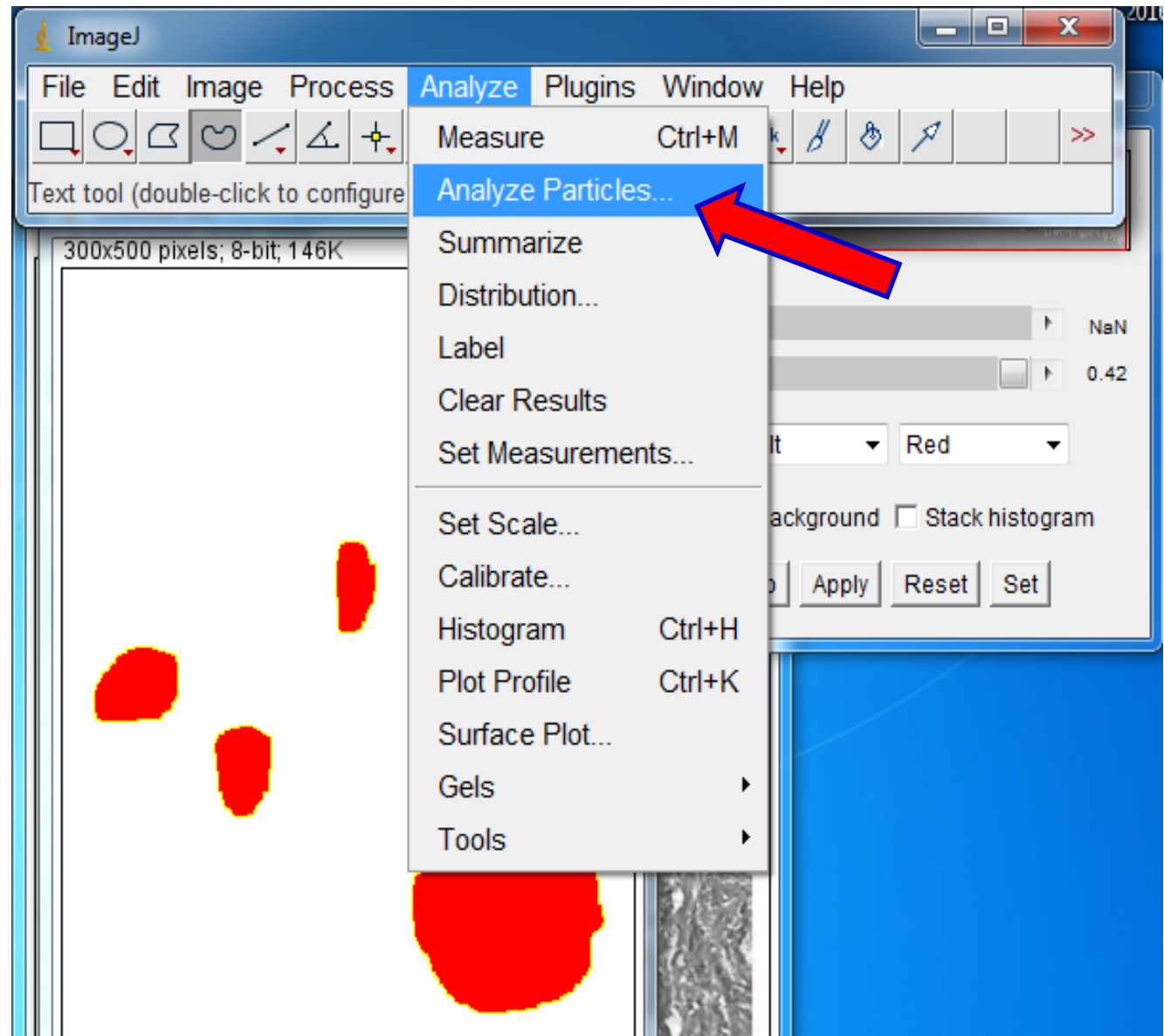


ANALISIS INDEPENDIENTE



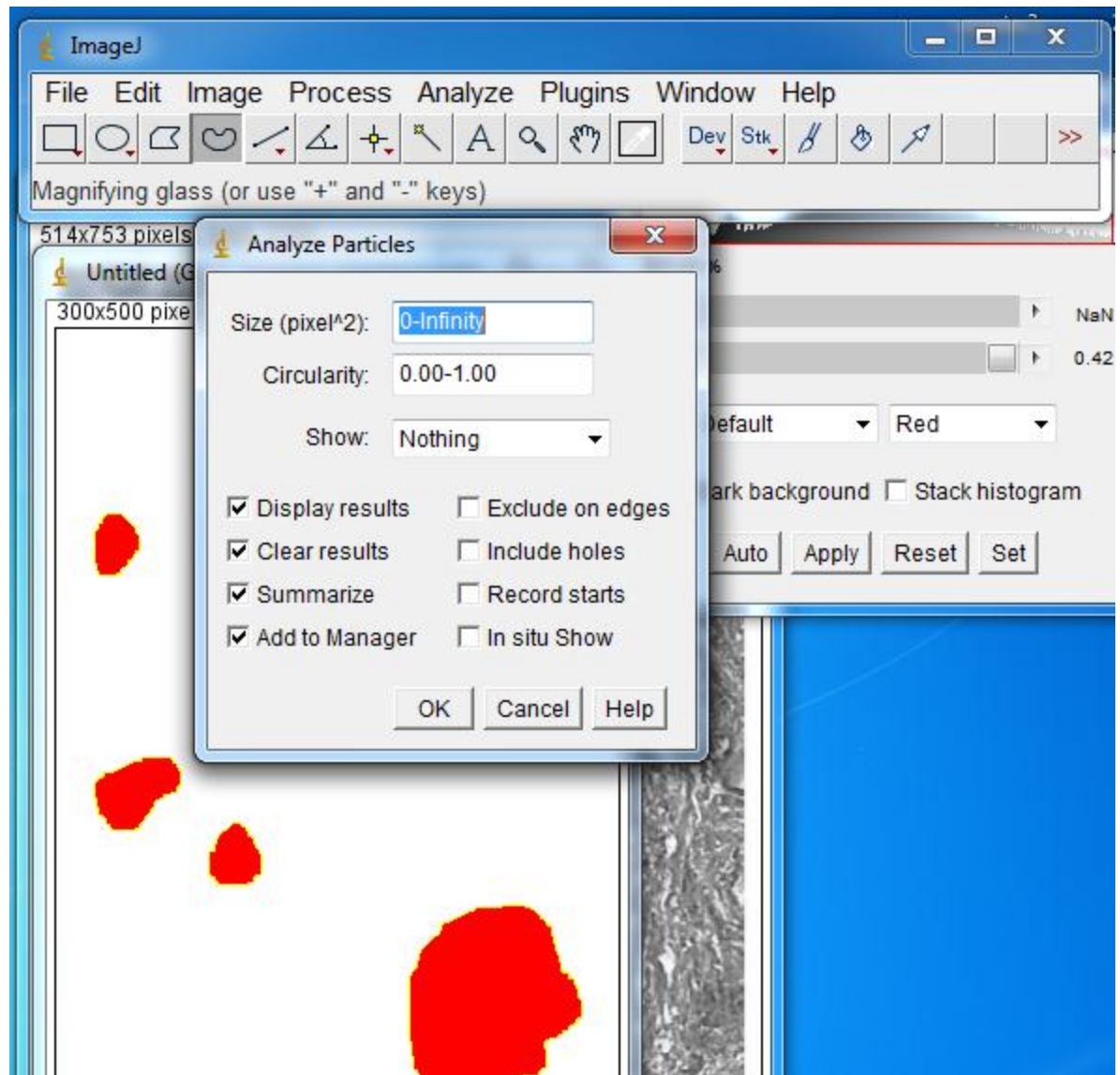
ANALISIS INDEPENDIENTE

Vaya a
Analyze y
seleccione
Analyze
Particles.



ANALISIS INDEPENDIENTE

Observe que es el menú de variables estén marcadas todas las de la izquierda. Mantenga las opciones por defecto del menú superior. Pulse Ok.

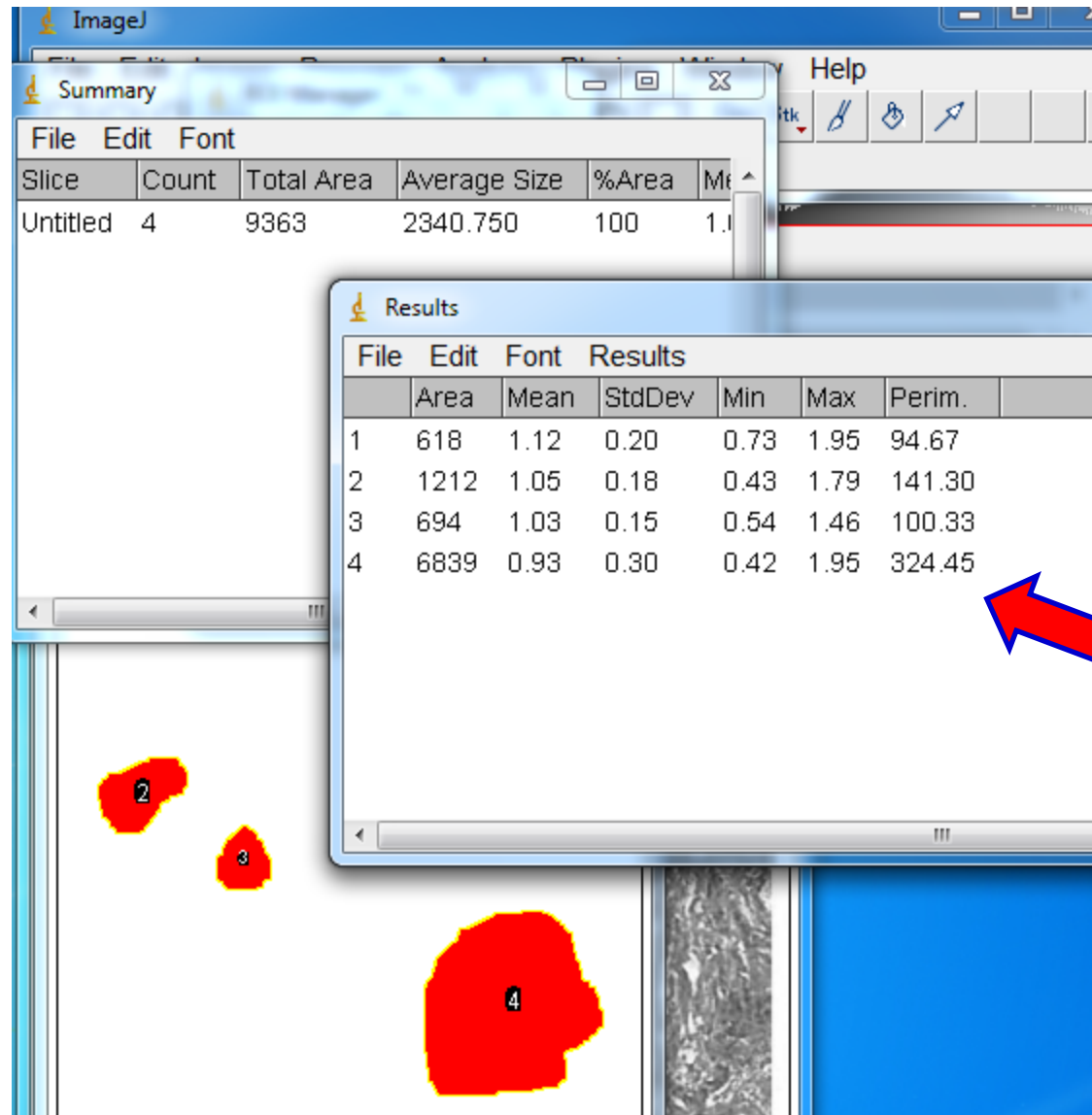


ANALISIS INDEPENDIENTE

Los resultados aparecerán de inmediato.

Puede guardar el archivo en formato .xls en la opción File.

A partir de aquí realizar los análisis que considere.



Densitometría Óptica con el empleo de ImageJ.

Dr. C. Pedro Augusto Díaz Rojas.

