

# Morphological And Statistical Analysis Of Biomaterials With Applications In Tissue Engineering By Means Of Microscopy Image Processing

R. C. Marsal, M. S. Sánchez, A. V. Lluch and D. Moratal, *Member, IEEE*

**Abstract**— This work presents the software implementation of a tissue engineering image analysis tool through the study of several biomaterials by means of different microscopy techniques (optical, scanning electron, and atomic force microscopy). A broad vision concerning the morphological features extraction from the images is presented. With this tool, different quantitative information has been extracted from the microscopy image analysis of these biomaterials, as the number of objects, their mean size and the area they cover. Morphological characteristics, as the roundness or the porosity have been also obtained. All these quantitative information has permitted an statistical analysis over the obtained results.

**Keywords**— Morphological characteristics extraction, microscopy image analysis, digital image processing, quantification.

## I. INTRODUCCIÓN

UN MICROSCOPIO es un instrumento destinado a observar objetos extremadamente diminutos, haciendo perceptible lo que no lo es a simple vista. Existen diferentes tipos de microscopios, siendo cada uno de ellos adecuado para un determinado tipo de captación de imágenes. Los principales tipos de microscopía empleados en el campo de la ingeniería de biomateriales son: la microscopía de sonda de barrido, siendo la de fuerza atómica la más importante, y que se basa en la interacción local entre una punta y la superficie de una muestra; la microscopía electrónica cuyo fundamento es la captación de electrones generados por un cañón electrónico que atraviesan la muestra y la microscopía óptica basada en lentes ópticas, siendo la microscopía de fluorescencia que basa su funcionamiento en el comportamiento de los llamados fluorocromos la más ampliamente utilizada en ingeniería tisular.

De las imágenes obtenidas a partir de estas técnicas se suele realizar un análisis básicamente cualitativo y manual. Me-

dante la introducción del procesado digital de imagen es posible automatizar este análisis de tal forma que sea posible realizar un estudio cuantitativo y estadístico de las muestras bajo estudio. Para ello se ha implementado una herramienta-*software* que permite un análisis cuantitativo de imágenes digitales de microscopía, extrayendo las características morfológicas más destacables y realizando posteriormente un análisis estadístico de las mismas.

Existen distintos artículos en los que se describen procesos de cuantificación, algoritmos, y herramientas *software* de procesado de imagen aplicadas al estudio de materiales [1] o de biología [2], pero, hasta donde nosotros sabemos, ninguna herramienta específica para el campo de los biomateriales. También existen estudios que hablan del manejo de grandes volúmenes de datos provenientes de imágenes de microscopía [3], pero se hecha en falta el tratamiento digital de imagen y un análisis cuantitativo de las mismas.

El propósito de éste artículo es, precisamente, describir todos los pasos que se requieren para la implementación de una herramienta de análisis estadístico y extracción de características morfológicas de imágenes de microscopía, proporcionando así una cuantificación objetiva de las mismas, con la consiguiente reducción de la variabilidad de las medidas debida al observador.

## II. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS EXISTENTES Y TIPOS DE IMÁGENES UTILIZADAS

Existen varias herramientas comerciales y métodos de visualización de datos de imagen que van desde células hasta organismos [4] pero ninguna de ellas está específicamente diseñada para la extracción de características morfológicas de imágenes de microscopía de biomateriales.

Para la implementación de la herramienta-*software* se han utilizado distintos tipos de imágenes de microscopía. Todas éstas han sido captadas y utilizadas para el diseño, caracterización de propiedades y evaluación biológica de los biomateriales. A su vez, cada una de estas imágenes ha sido obtenida mediante la utilización de un determinado tipo de microscopio.

### A. Imágenes de microscopía óptica

En microscopía óptica hemos trabajado con dos tipos de imágenes obtenidas con técnicas distintas: imágenes de mi-

El trabajo que aquí se presenta fue merecedor del Premio Bancaja-Universitat Politècnica de València en su XI edición al mejor Proyecto Fin de Carrera en la Escuela Politécnica Superior de Gandía de la Universitat Politècnica de València (Valencia, España).

R. C. Marsal, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, España, racarma3@aaa.upv.es

M. S. Sánchez, Universitat Politècnica de València, Valencia, España, masalsan@fis.upv.es

A. V. Lluch, Universitat Politècnica de València, Valencia, España, avalles@ter.upv.es

D. Moratal, Universitat Politècnica de València, Valencia, España, dmoratal@eln.upv.es

microscopía de fluorescencia, basadas en las propiedades de los fluorocromos, e imágenes de microscopía óptica con tinción de hematoxilina. En el caso de la microscopía de fluorescencia, tenemos dos tipologías de imagen, obtenidas a partir de la misma muestra utilizando distintas técnicas de tinción para segmentar el citoesqueleto y los núcleos de los condrocitos. La primera tipología trata de imágenes de condrocitos obtenidas mediante técnicas de inmunofluorescencia para marcar el citoesqueleto de actina (Fig. 1a). Para la segunda tipología tenemos imágenes obtenidas mediante una tinción fluorescente de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) que marca únicamente los núcleos (Fig. 1b). Estas imágenes son fotografías realizadas a través de una cámara digital acoplada a un microscopio de fluorescencia. En la siguiente tipología, las imágenes corresponden a condrocitos y han sido obtenidas mediante una tinción de hematoxilina (Fig. 1c). Para obtener las imágenes digitales, también se ha utilizado una cámara digital acoplada a cada uno de los microscopios.

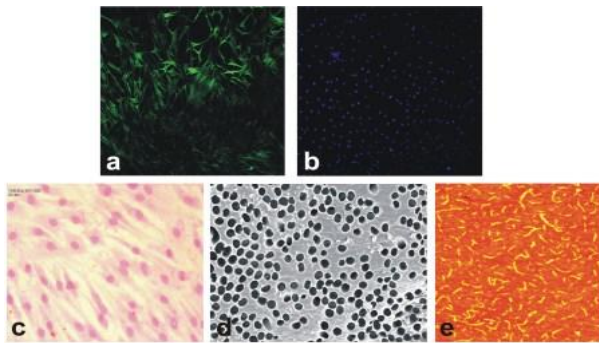


Figura 1. Imágenes del citoesqueleto de actina (a) y de los núcleos (b) de condrocitos captadas mediante Microscopio de Fluorescencia. (c) Imagen de condrocitos captada mediante Microscopio Óptico. (d) Imagen de canales de *scaffolds* captada mediante Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). (e) Imagen de proteínas (laminina) adsorbidas sobre un sustrato polimérico captada mediante AFM.

### B. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Estas imágenes son de *scaffolds* (andamiajes para regeneración tisular) constituidos mediante canales (poros). Se obtienen directamente de una sección del *scaffold* mediante un microscopio electrónico de barrido y no necesitan de ninguna tinción ya que en esta técnica de microscopía no se utilizan fotones si no electrones (Fig. 1d).

### C. Imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM)

Este último tipo consiste en imágenes de proteínas (laminina) adsorbidas sobre un sustrato polimérico. La imagen es una representación en colores de la magnitud desfase en la punta de la sonda del microscopio AFM que va ‘palpando’ la muestra mientras vibra a una determinada frecuencia. Dependiendo de las propiedades viscoelásticas de lo que la punta toque, la fase de la vibración cambia y se representa en un código de colores (Fig. 1e). En esta técnica tampoco se utiliza tinción.

## III. MÉTODOS

Todos los algoritmos implementados han sido programados

bajo entorno MATLAB (The Mathworks, Inc., Natick, MA), conformando una herramienta-*software* final con una interfaz gráfica de usuario [5] que permite una interacción amigable e intuitiva con el usuario final.

### A. Procesado de imágenes de microscopía óptica

Partimos de las imágenes expuestas en el punto II-A convertidas a escala de grises. Para las imágenes correspondientes a los núcleos, primeramente se realiza un preprocesado consistente en el incremento del contraste de la imagen mediante un realzado por procesado del punto, para ampliar su rango dinámico y facilitar su posterior umbralización [6]. A continuación se necesita separar los núcleos del fondo. Para ello se segmentan las imágenes utilizando una umbralización simple basada en el método de Otsu [7], que minimiza la varianza intraclase. Para elegir el umbral, este método únicamente utiliza los momentos acumulados del histograma de niveles de gris de orden cero y uno. Una vez realizada la segmentación se obtiene una imagen binarizada de los núcleos. Para eliminar el ruido, se realiza un filtrado de los objetos basándonos en su área y se descartan aquellas agrupaciones de píxeles detectadas, con un área inferior a la media.

Tras obtener una imagen sin ruido, utilizamos el operador morfológico de cierre [6] (dilatación seguida de erosión) haciendo uso de un elemento estructural de forma octogonal. Al realizar estas dos operaciones seguidas y el mismo número de veces conseguimos mantener el tamaño de los objetos y rellenar los huecos que existen en el interior de éstos. Una vez segmentados los núcleos se contabilizan. Para ello se recorren los píxeles de la imagen de izquierda a derecha y de arriba a abajo, comprobando en cada píxel la conexión con los vecinos. Si no existe conexión, significa que el píxel pertenece a un nuevo objeto y se contabiliza como tal. Una vez recorridos todos los píxeles ya conocemos el número de objetos.

Para las imágenes de citoesqueletos de actina, las etapas de preprocesado y segmentación son idénticas que para el caso descrito anteriormente. Después de dichas etapas, obtenemos las imágenes de citoesqueletos listas para el cálculo de la superficie que ocupan éstos. Para obtener este parámetro calculamos el número de píxeles que pertenecen al citoesqueleto (basta sumar todos los píxeles con valor 1 de la imagen, dado que ésta ha sido ya binarizada en el paso anterior), tras lo cual calculamos el porcentaje de superficie que ocupan los citoesqueletos en cada imagen.

Una vez procesadas las imágenes correspondientes a los núcleos y las correspondientes a los citoesqueletos por separado, es posible combinar ambas de tal forma que se pueda calcular el área media ocupada por cada célula. El área media que ocupa cada célula se calcula como la división de la superficie total ocupada por el citoesqueleto entre el número de núcleos de cada imagen. A la hora de representar las imágenes resultantes, se pueden visualizar los núcleos y los citoesqueletos mediante colores básicos distintos.

Para las imágenes de microscopía óptica con tinción de hematoxilina se necesita una umbralización multinivel ya que se deben separar los núcleos del citoplasma y éste del sustra-

to. En este tipo de imágenes podemos distinguir tres colores: uno corresponde al sustrato, otro a los citoplasmas y otro a los núcleos. Convertimos las imágenes del RGB al espacio de color  $L^*a^*b^*$  el cual nos permite cuantificar las diferencias que se distinguen a simple vista. El espacio de color  $L^*a^*b^*$  se deriva del CIE XYZ. El  $L^*a^*b^*$  consiste en una componente de luminosidad ' $L^*$ ' o capa de brillo, una componente, o capa, de crominancia ' $a^*$ ', que indica en que lugar del eje rojo-verde se encuentra el color y otra componente de crominancia ' $b^*$ ', que indica la posición del color en el eje azul-amarillo. Toda la información de color está en las capas ' $a^*$ ' y ' $b^*$ '. En este espacio se puede medir la diferencia entre dos colores utilizando la distancia Euclídea. Por otro lado, la acción de agrupar es una manera de separar objetos, el método de agrupación *K-Means* [8] trata cada objeto como si tuviese una posición en el espacio. Este método encuentra particiones de modo que objetos dentro de la misma zona o cluster estén, entre ellos, lo más cerca posible y lo más alejados posible respecto de objetos de otros clusters. El método *K-Means* requiere que se especifique el número de clusters necesario y la distancia para cuantificar como de cerca o de lejos están dos objetos entre si. En nuestro caso los objetos serán píxeles con valores ' $a^*$ ' y ' $b^*$ '. Y necesitaremos tres clusters uno para los núcleos, otro para los citoplasmas y otro para el sustrato. El *K-Means* etiqueta cada objeto de la imagen de entrada con un índice que corresponde al cluster al que pertenece el objeto (Fig. 2). En este punto ya podemos separar los objetos según el cluster al que pertenezcan. Por tanto tendremos tres imágenes una con los núcleos, otra con los citoplasmas y otra con el sustrato. Este método tiene otra ventaja y es la de segmentar objetos que pertenezcan al mismo cluster pero que tengan distinta luminosidad. Como se ha explicado, sólo seleccionamos los objetos según sus valores ' $a^*$ ' y ' $b^*$ ', que son sólo componentes de color. Es posible, que en un cluster tengamos objetos más oscuros y más claros que nos interese segmentar. Para separarlos, únicamente tendremos que obtener la componente ' $L^*$ ' de éstos y crear una imagen en escala de grises. A continuación, podemos segmentar la imagen utilizando, por ejemplo, el método de Otsu [2].

Una vez ya segmentadas las imágenes, se procede a eliminar el ruido de las mismas y a rellenar los huecos existentes, tal y como se ha descrito anteriormente. Llegados a este punto sólo nos queda contabilizar el número de núcleos en la imagen correspondiente, calcular el área total que ocupan las células en cada imagen, y el área media de cada célula. Todo esto se realiza de manera análoga a la descrita en el procesamiento de imágenes de fluorescencia ya que en este momento tenemos pares de imágenes núcleos-citoplasma al igual que teníamos en las imágenes de microscopía de fluorescencia.

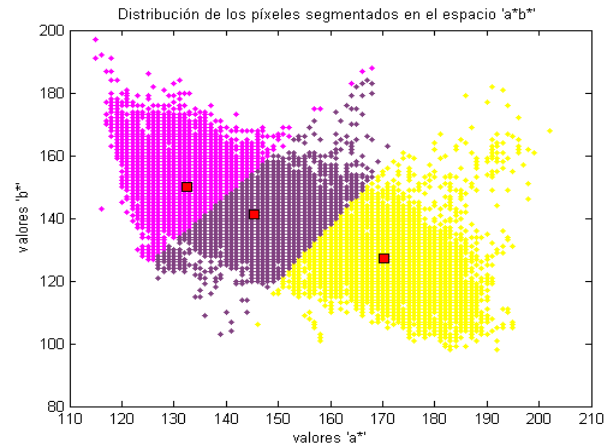


Figura 2. Imagen de la distribución de los píxeles segmentados en el espacio ' $a^*b^*$ ' utilizando el método *K-Means*. Los tres cuadrados rojos indican el centro de cada cluster.

### B. Procesado de imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM):

En este apartado partimos de las imágenes expuestas en el apartado II-B transformadas a escala de grises. En estas imágenes no ajustamos el contraste ya que se diferencian claramente los poros. Si aumentásemos el rango dinámico, por ejemplo, ecualizando el histograma, se amplificaría el ruido contenido en la imagen y posibles imperfecciones del material nos darían problemas a la hora de binarizar (se podrían confundir con poros). En la binarización de estas imágenes, también utilizamos el método de Otsu [7] ya descrito anteriormente. Para la eliminación del ruido y el relleno de los huecos, se utilizan los procedimientos descritos más arriba. Finalmente, en esta etapa, se procede a etiquetar [9] los poros, recorriendo los píxeles de la imagen de izquierda a derecha y de arriba abajo y comprobando en cada píxel la conexión con los vecinos ya etiquetados. Cada vez que se encuentra un objeto nuevo se le da una nueva etiqueta y en caso de encontrar un mismo objeto con dos etiquetas, se añade una equivalencia en una tabla de equivalencias. Finalmente se realiza una pasada para corregir los objetos etiquetados varias veces. A continuación, se eliminan los objetos que no nos interesan antes de realizar el cálculo de diámetros, de tamaños, el recuento y la porosidad. A la hora de calcular los diámetros debemos eliminar los poros que estén unidos o posibles objetos que no sean verdaderamente poros. Si no se eliminan, introducirán falsas medidas en el promedio de los diámetros de los poros. Esta criba la realizamos en base al parámetro "compacidad" que nos da información sobre la forma de los objetos. La compacidad nos da una idea de lo redondeado que es un objeto. Objetos con forma parecida al círculo tienen una compacidad cercana a 1. La compacidad es ajena al tamaño y se calcula según (1):

$$C = \frac{4\pi A}{P^2} \quad (1)$$

siendo  $A$  el área del objeto y  $p$  su perímetro.

Para el cálculo del perímetro debemos detectar cuales son los píxeles que pertenecen al borde de cada objeto. Para esto buscamos un punto perteneciente a dicho borde y a continuación buscamos cual es el siguiente punto del borde y lo marcamos y así sucesivamente hasta marcar todos los píxeles pertenecientes al borde. Este proceso se conoce como “algoritmo de seguimiento de borde” [10]. A continuación aproximamos el perímetro a partir de los bordes. Para esto se calculan los vectores directores del borde y después sus módulos para, acto seguido, sumarlos. Así obtenemos el perímetro de cada objeto [10]. Después del cálculo del perímetro, se calcula el área sumando el número de píxeles que tiene cada objeto. Una vez obtenido el perímetro y el área de cada objeto ya estamos en disposición de calcular la compacidad con (1). Mediante las compacidades, se pueden discriminar los objetos que no cumplan con el valor deseado. En nuestro caso se han suprimido los objetos con una compacidad menor de 0.7, consiguiendo así eliminar poros unidos, imperfecciones del material poroso y la barra de escala. A continuación, se ha calculado el diámetro de los poros a partir de las áreas, mediante aproximación a la circunferencia, utilizando (2):

$$A = \pi \cdot r^2 \quad (2)$$

siendo  $A$  el área de la circunferencia (en nuestro caso del poro) y  $r$  su radio. También se ha realizado el promedio de los diámetros de todos los poros y la desviación típica utilizando (3) y (4) respectivamente.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (3)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (4)$$

siendo  $x_i$  los distintos valores de los diámetros,  $\bar{x}$  la media y  $n$  el número de objetos etiquetados. Para calcular el tamaño de los poros creamos un vector de la misma longitud que el número de objetos etiquetados (sin barra de escala ni poros dobles) y almacenamos el número de píxeles que contiene cada objeto. A partir de este vector calcularemos la media utilizando (3), siendo ahora  $x_i$  los distintos valores del vector de tamaños y  $n$  el número de objetos etiquetados. Y también la desviación típica con la (4), siendo ahora  $x_i$  los distintos valores del vector de tamaños,  $\bar{x}$  la media y  $n$  el número de objetos etiquetados. Para el recuento de poros se ha utilizado, de nuevo, el algoritmo de etiquetado [9]. En este caso no hemos eliminado los poros dobles para intentar acercarnos lo más posible al número real de poros que hay en la imagen. Llegados a este punto calculamos la porosidad de cada imagen, para ello únicamente habrá que contabilizar todos los

píxeles a 1, de la imagen sin barra de escala, pero con los poros dobles (influyen en la porosidad), y a continuación dividir el resultado por el número total de píxeles de la imagen.

### C. Procesado de Imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM):

Partiendo de las imágenes del apartado II-C, se pasan a escala de grises y se ajusta el contraste, tal y como se ha comentado anteriormente, con el fin de facilitar su posterior binarización, que realizaremos del mismo modo que en las anteriores imágenes, al igual que la eliminación del ruido. Cabe destacar que en estas imágenes los objetos no presentan huecos en su interior al realizar la binarización, por tanto, no es necesario aplicar el procedimiento de rellenado de huecos. Seguidamente vamos a cuantificar los objetos del mismo modo que en el tipo de imágenes anterior. El siguiente paso, consiste en crear un vector con el mismo número de casillas que el número total de proteínas y almacenar el número de píxeles que contiene cada una, pudiendo calcular fácilmente su media y su desviación típica. También se ha calculado la superficie total que ocupan las proteínas, a través del número de píxeles de valor 1 con respecto al total de la imagen. Para el cálculo del grosor de las proteínas, se ha utilizado el método de la transformada en distancia que consiste en hallar la distancia desde cada píxel correspondiente a esqueleto [11] de la proteína hasta el contorno [11] de proteína más próximo, es decir, la distancia mínima esqueleto-contorno (Fig. 3). La técnica de transformada en distancia [12] está basada en una esqueletonización de cada objeto [11], y promediado de las distancias mínimas entre el esqueleto y el contorno. Como se puede apreciar en la Fig. 3, para llevar a cabo la medida del grosor de las proteínas se necesita el esqueleto y el contorno de cada proteína. En la Fig. 4 se puede observar el resultado de la detección del contorno y el esqueleto para una determinada imagen.

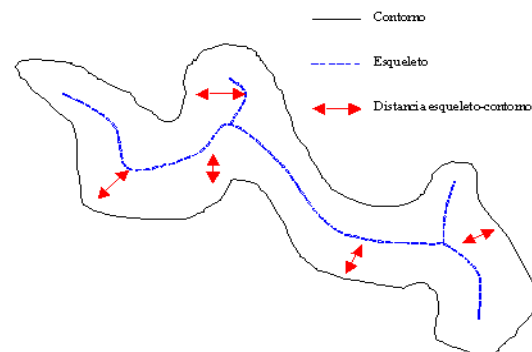


Figura 3. Iconograma de ejemplo de la medida del grosor de las proteínas. Mediante la transformada en distancia, se mide la distancia mínima entre cada píxel del esqueleto y el contorno, teniendo así una medida equivalente a la mitad del grosor local.

Para obtener el esqueleto de las proteínas se utiliza el operador morfológico “esqueletonización” [11]. Este operador pone a 0 píxeles de tal forma que un objeto sin agujeros se convierte en un trazo mínimamente conectado (de un píxel de ancho) equidistante de los bordes del objeto. Tiene la ventaja de ser un proceso reversible, i.e. a partir del esqueleto se puede reconstruir el objeto.

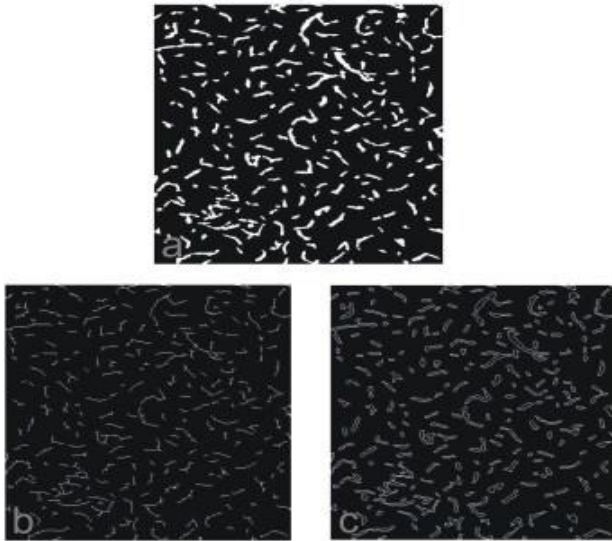


Figura 4. Imagen binarizada de proteínas (a) e imagen en la que se ha detectado el esqueleto de las proteínas (b) y su contorno (c).

A continuación utilizamos el algoritmo del seguimiento de borde, descrito anteriormente, para obtener los contornos de las proteínas. Aplicando la transformada en distancia sobre la imagen de contornos y multiplicando el resultado por el esqueleto de la imagen original, obtenemos la mínima distancia desde cada punto del esqueleto al borde de la proteína. Como el esqueleto transcurre por el eje de la proteína, se concluye que la distancia mínima hallada para cada punto del esqueleto, corresponde a la mitad del grosor local para el píxel correspondiente. Para hallar el grosor de las proteínas, aplicaremos (5):

$$Grosor = \frac{\sum_{p \in Sk} 2 \cdot d_{\min}}{Sk} \quad (5)$$

siendo  $d_{\min}$  la distancia mínima desde un píxel del esqueleto al borde de la proteína,  $p$  cualquier píxel perteneciente al esqueleto y  $Sk$  el esqueleto. De esta forma se creará un vector con los valores del grosor de todas las proteínas, pudiendo calcular ya fácilmente su media y su desviación típica. En el estudio de las proteínas realizado, se necesita conocer si las células están dispuestas de manera redondeada o alargada (Fig. 5). Para observar esta característica se recurrirá al parámetro “elongación” [10]. Este parámetro relaciona los lados de la caja de área mínima que encierra a un objeto (Bounding Box) según (6):

$$Elongación = \frac{LadoGrande}{LadoPequeño} \quad (6)$$

siendo  $LadoGrande$  el lado más grande de la caja y  $LadoPequeño$  el lado pequeño.

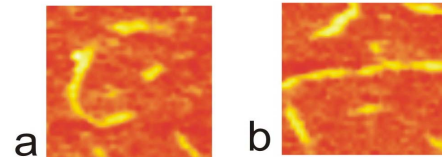


Figura 5. Proteínas con disposición redondeada (a) y alargada (b).

Un objeto totalmente circular tendrá un valor de la elongación muy cercano a 1 y un objeto alargado tendrá un valor muy alejado. Se creará un vector con los valores de la elongación para su posterior representación en forma de histograma. En el caso del cálculo de la longitud de las proteínas de extremo a extremo utilizaremos el operador morfológico “Thin” [10]. Este operador pone a 0 píxeles de tal forma que un objeto se transforma en un trazo mínimamente conectado (de un píxel de ancho) equidistante de sus extremos más próximos. Una vez tenemos sólo un trazo representando a cada proteína se calcula la longitud como la suma de todos los píxeles del trazo. Utilizando este proceso se obtendría la longitud en caso de que la proteína estuviese totalmente alargada. Nuevamente guardamos todos los valores en un vector a partir del cual obtendremos la media utilizando (3), siendo ahora,  $x_i$  los distintos valores del vector de longitudes y  $n$  el número de objetos etiquetados. Y también la desviación típica con (4), siendo ahora  $x_i$  los distintos valores del vector de longitudes,  $\bar{x}$  la media y  $n$  el número de objetos etiquetados.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A continuación se presentan los resultados del desarrollo de la herramienta-software para el análisis de las imágenes digitales de microscopía. Esta herramienta se compone de cuatro módulos cada uno de ellos enfocado al análisis de una determinada tipología de imagen. Se han realizado con una interfaz gráfica de usuario para facilitar su manejo.

Todos los módulos tienen una serie de características comunes que realizan la misma función. Las características comunes son:

- **Visor de imágenes:** En él se visualizan todas las imágenes, tanto las originales como las intermedias obtenidas al procesar las primeras.
- **Visor de la ruta (path) y el nombre de la imagen que se visualiza:** Nos muestra el nombre completo, es decir, toda la ruta desde donde se encuentra la imagen mostrada en el visor de imágenes y su nombre.
- **Carga de imágenes:** Todos los módulos nos permiten cargar múltiples imágenes para su procesamiento. Esto es de gran utilidad ya que se puede cargar una serie completa de imágenes y procesarlas automáticamente, obteniendo los resultados y las imágenes intermedias de cada una de ellas. Gracias a esto no se pierde tiempo en labores tediosas y repetitivas.
- **Lista de selección de imágenes:** Nos permite seleccionar la

imagen a mostrar en el visor. En el caso del procesado de pares de imágenes encontramos dos listas, una para cada tipo de imagen. No se encuentra en el “Módulo de análisis de imágenes de microscopía óptica con tinción de hematoxilina” ya que éste sólo procesa una imagen cada vez.

- **Guardar imagen visualizada:** Guarda la imagen que se muestra en el visor. Esto es muy útil, por ejemplo, para la utilización de las imágenes intermedias en otras herramientas.
- **Guardar datos:** Nos permite guardar los datos obtenidos de la cuantificación en un fichero de texto ASCII plano para su posterior análisis con cualquier herramienta estadística o también para la exportación a hojas de cálculo.
- **Herramienta de escala:** En caso de tener imágenes con barra de escala, nos permite aplicar esta escala al procesado con el fin de obtener información cuantitativa absoluta. La herramienta consta de un cursor con el que se selecciona la longitud de la barra, un cuadro de texto editable para introducir el valor y un menú desplegable con las distintas unidades métricas, desde metros hasta picómetros.
- **Sección de visualización:** Aquí encontramos todos los controles para visualizar las distintas imágenes, originales e intermedias.
- **Sección de resultados:** Es en esta sección donde se muestran los resultados asociados a la imagen que se está visualizando. También encontramos aquí la opción de guardar los datos.

A continuación se presentan cada uno de los módulos que conforman la herramienta-*software* desarrollada y que engloba todos los algoritmos descritos anteriormente.

#### A. Módulos de análisis de imágenes de microscopía óptica

Se han implementado dos módulos independientes, uno para cada tipo de imagen.

##### A.1) Módulo de análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia (Fig. 6):

Este módulo tiene todas las características anteriormente descritas más la posibilidad de procesar únicamente imágenes de núcleos, de citoplasma o pares de imágenes núcleo-citoplasma. También ofrece la posibilidad de colorear la binarización de cada tipo de imagen.

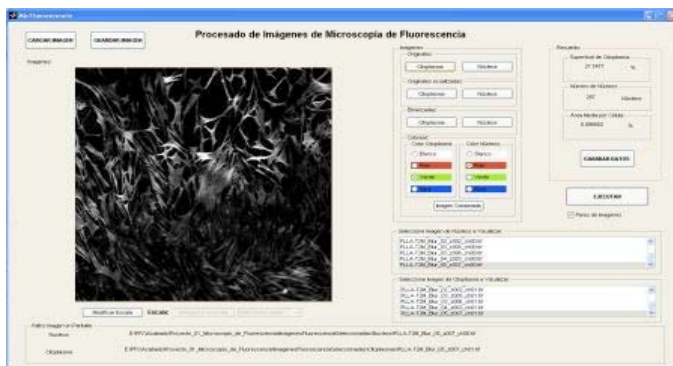


Figura 6. Módulo de análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia.

Partimos de la imagen de la Fig. 7a, de la cual hemos obtenido la imagen de la Fig. 7b con el contraste ajustado. Vemos que el método utilizado es bueno ya que se ve una mejora del contraste (comparar Fig. 7a y 7b). Aún habiendo ajustado el contraste hay una zona de la imagen en la que no se diferencia bien el contenido. Este problema se tendría que corregir en la aplicación de la técnica de tinción o en la fase de adquisición.

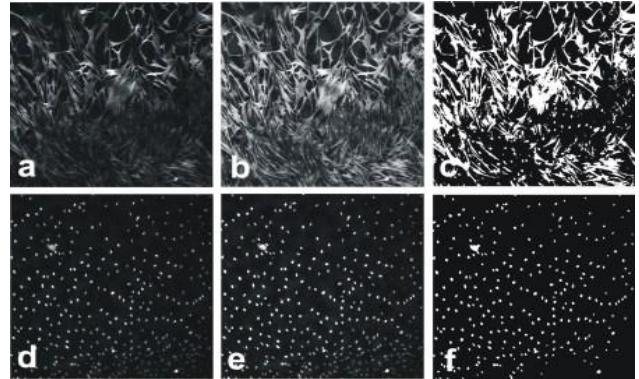


Figura 7. Imagen de citoesqueletos de actina de condrocitos en escala de grises (a), con contraste ajustado (b) binarizada (c), núcleos de condrocitos en escala de grises (d), con contraste ajustado (e), binarizada (f).

Después de la fase de segmentación, que incluye la eliminación de ruido y el relleno de huecos, obtenemos la imagen a partir de la cual se realizará el cálculo de la superficie ocupada por los citoesqueletos de actina (Fig. 7c). En este caso, la superficie ocupada es del 27.75%. A continuación tenemos la imagen de los núcleos antes de aplicar el preprocesado y después. Al igual que antes se observa una notoria mejora del contraste (Fig. 7d y 7e). El recuento de los núcleos se realiza a partir de la imagen de la Fig. 7f. Esta imagen se obtiene después de la segmentación. El recuento de núcleos nos da un valor de 287 núcleos. En caso de no haber eliminado completamente el ruido, en la fase de recuento se puede confundir píxeles aislados con núcleos, pero como se observa en la Fig. 7f el ruido se ha eliminado por completo eliminando toda posible fuente de error. Por último tenemos la imagen combinada (Fig. 8) de los núcleos y los citoesqueletos. Obtenemos de esta imagen la superficie media por célula, siendo ésta del 0.09 %. En la Fig. 8 se observa la imagen combinada y coloreada núcleos-citoesqueletos que facilita su visualización.

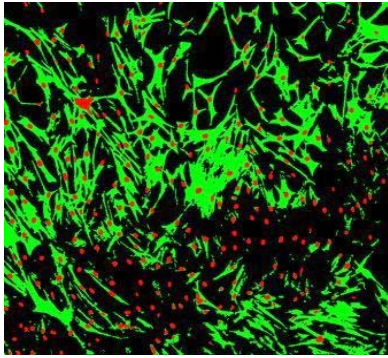


Figura 8. Imagen combinada y coloreada de núcleos y citoesqueletos.

**A.2) Módulo de análisis de imágenes de microscopía óptica con tinción de hematoxilina (Fig. 9):**

Este módulo tiene todas las características anteriormente descritas.

Una vez segmentada la imagen (Fig. 10) se calcula el número de núcleos (55 en este caso), la superficie total ocupada en la imagen por las células (48.67%) y el área media que ocupa cada célula (0.88%).

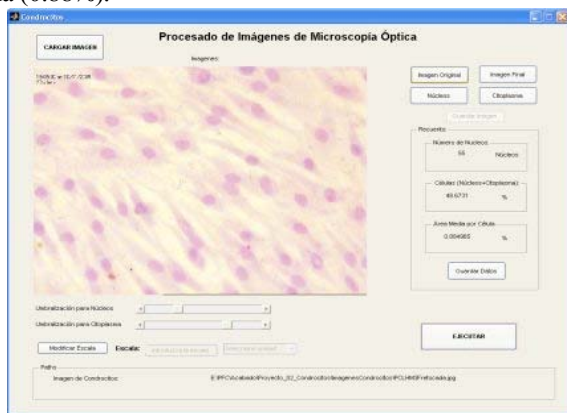


Figura 9. Módulo de análisis de imágenes de microscopía óptica.

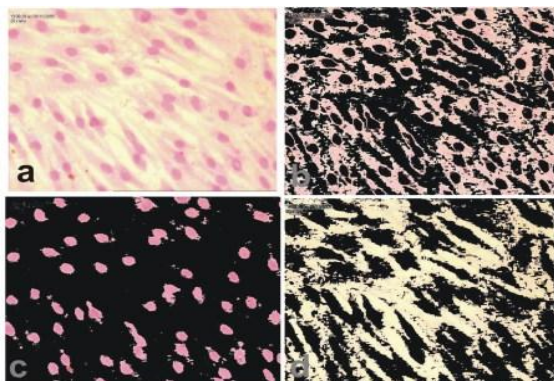


Figura 10. Imagen original a partir de la cual se realiza el método *K-Means Clustering* de segmentación de color (a) y de los citoplasmas (b), núcleos (c) y sustrato de los condrocitos segmentados mediante este método.

**B. Módulo de análisis de imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) (Fig. 11):**

En este módulo encontramos todas las características anteriormente descritas y además otras opciones de representación de parámetros como pueden ser los histogramas de tamaño y diámetro de los poros. En el procesado de la imagen de poros se ha modificado la escala en función de la información proporcionada por la barra de escala.

Partimos de la imagen representada en la Fig. 12a. En esta imagen no hace falta ajustar el contraste debido a que los poros se diferencian claramente. De la Fig. 12b obtenemos la porosidad. Se observa que para el cálculo de este parámetro se ha eliminado la barra de escala que es la que interferiría en el cálculo de la porosidad. El valor de la porosidad es de 4254,31  $\mu\text{m}^2$ . A continuación se separan los poros dobles y se realiza el recuento. En este caso tenemos 80 poros (Fig. 12c). Al separar los poros dobles se modifica la forma de todos los poros, por esto no se utiliza esta imagen para calcular el diámetro medio ni el tamaño medio, pero esto, por el contrario, mejora el recuento. La siguiente imagen sólo contiene los poros representativos de la muestra (Fig. 12d), habiéndose eliminado los poros dobles y todos los elementos que nos interferían en el cálculo del tamaño medio y diámetro de los poros. El resultado del tamaño es de  $54.00 \pm 14.29 \mu\text{m}$  (media  $\pm$  desviación típica) y el de diámetro es de  $8.19 \pm 1.29 \mu\text{m}$ . Los datos obtenidos se presentan en forma de histograma (Fig. 13). Este módulo nos permite un completo análisis de las imágenes procesadas. Los histogramas proporcionan una rápida idea de las características de las imágenes agilizando así la revisión de los datos.

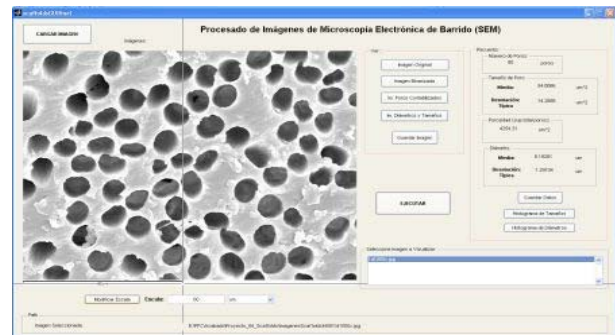


Figura 11. Módulo de análisis de imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM), resultados con escala modificada.

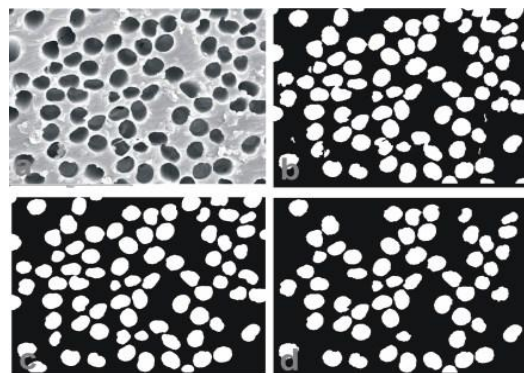


Figura 12. Imagen original de poros en escala de grises (a), binarizada de los poros

con escala eliminada (b), con los poros dobles separados, para contabilizar la cantidad de poros (c) y con poros extraños eliminados (d) para calcular los tamaños y el diámetro de cada poro.

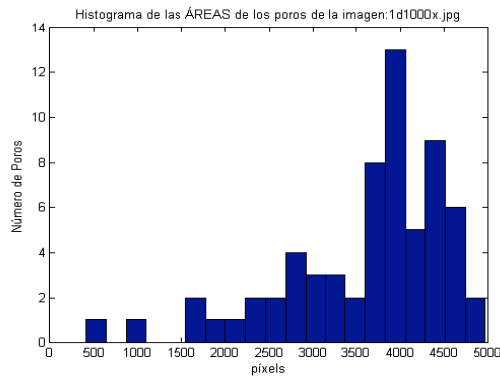


Figura 13. Histograma de tamaños de los poros.

### C. Módulo de análisis de imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) (Fig. 14):

Este módulo presenta todas las características descritas en las herramientas anteriores y además nos ofrece la posibilidad de visualizar los datos en forma de histograma.



Figura 14. Módulo de análisis de imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM).

Partimos de la imagen mostrada en la Fig. 15a, de la que, tras realizarse un ajuste de contraste, obtenemos la Fig. 15b. A continuación realizamos la segmentación y eliminamos el ruido obteniendo la imagen binarizada. En la Fig. 15c y 15d se puede ver la imagen con y sin ruido, respectivamente.

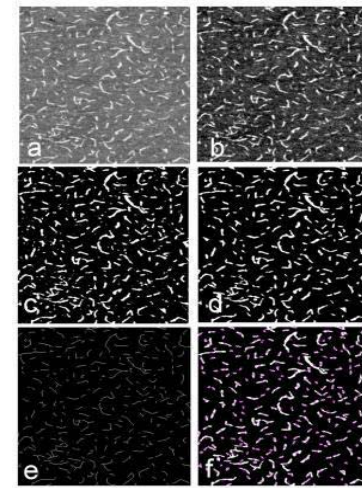


Figura 15. (a) Imagen original de proteínas en escala de grises. (b) Imagen de proteínas con el contraste ajustado. (c) Imagen de proteínas binarizada con ruido. (d) Imagen de proteínas binarizada con el ruido eliminado. (e) Imagen de proteínas procesada, a partir de la cual se calculan las longitudes de las proteínas. (f) Imagen de proteínas con el centro de masas, de cada una, marcado.

Posteriormente realizamos el recuento de proteínas, obteniendo 242. De esta imagen también obtenemos el área de las proteínas:  $115.94 \pm 104.32$  píxeles (media  $\pm$  desviación típica). También se obtiene de esta imagen la superficie total que ocupan las proteínas (3.61 %) así como su grosor. El grosor se ha calculado utilizando la transformada en distancia [12] y el resultado obtenido es de  $2.26 \pm 0.74$  píxeles. La distribución de grosores se representa en el histograma de la Fig. 16. A partir de la imagen de la Fig. 15d también se ha calculado la elongación de cada proteína con el fin de observar cuales tienen forma redondeada y cuales alargada. También se ha utilizado la Fig. 15e para calcular la longitud extremo a extremo de las proteínas. Este cálculo considera la longitud como si los píxeles estuviesen en línea recta. El valor obtenido para la longitud es de  $21.96 \pm 18.09$  píxeles (media  $\pm$  desviación típica). La Fig. 15f muestra la imagen binarizada con los centros de masas marcados. Esta imagen resulta útil para el análisis de la distribución espacial de cada proteína.

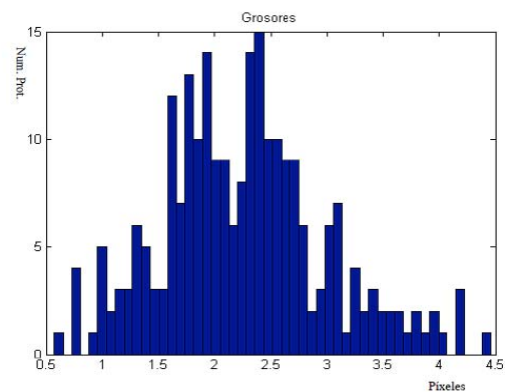


Figura 16. Histograma de los grosores de las proteínas.



## V. CONCLUSIONES

Con el presente artículo se ha presentado el desarrollo de una herramienta-software capaz de analizar distintos tipos de imágenes digitales de microscopía, para el diseño, caracterización de propiedades y evaluación biológica de biomateriales, poniendo en práctica un completo esquema para solucionar el problema del análisis y la extracción de características morfológicas de las imágenes de microscopía de biomateriales. La herramienta desarrollada tiene un sencillo funcionamiento y permite al usuario utilizarla de manera intuitiva. Además realiza un análisis cuantitativo de las imágenes de manera rápida y eficiente, implementando los principales algoritmos para la extracción de las características morfológicas de los objetos de las imágenes de microscopía. También se han implementado herramientas básicas que permiten un rápido análisis estadístico. Por último, destacar que la herramienta presentada en este trabajo, y los resultados obtenidos permitirán introducir un valor cuantitativo importante en el análisis de imagen y en los resultados que de las imágenes de microscopía de biomateriales se pueden extraer en su aplicación a la ingeniería tisular.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universitat Politècnica de València y a la empresa METIS Biomaterials, S.L. la cesión de las imágenes digitales de microscopía con las que se han realizado las pruebas de la herramienta-software.

## REFERENCIAS

- [1] A. Hussain, A. M. Muad, I. Ahmad, C. H. Azhari, "MATLAB based image analysis software for characterization of microstructure materials", Proceedings of the International Conference on Semiconductor Electronics, 2002, pp. 500 – 504.
- [2] A. E. Carpenter, T. R. Jones, M. R. Lamprocht, "CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes", Genome Biology 2006, 7:R100
- [3] J. Chao, P. Long, E. S. Ward, R. J. Ober, "Design and application of the Microscopy Image Analysis Tool", Engineering in Medicine and Biology Workshop, 2007 IEEE Dallas, pp. 94 – 97.
- [4] T. Walter, D. W. Shattuck, R. Baldock, M. E. Bastin, A. E. Carpenter, S. Duce, J. Ellenberg, A. Fraser, N. Hamilton, S. Pieper, M. A. Ragan, J. E. Schneider, P. Tomancak, J. K. Hériché, "Visualization of image data from cells to organisms.", Nat Methods. 2010 Mar;7(3 Suppl):S26-41.
- [5] P. Marchand, O.T. Holland, "Graphics and GUIs with MATLAB™", Ed. Chapman & Hall/CRC. 2002.
- [6] Q. Wu, F. A. Merchant, K. R. Castleman, "Microscope Image Processing", Ed. APR, 2008.
- [7] N. Otsu, "A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms", IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, vol. 9, no. 1, pp. 62-66, 1979.
- [8] T. Kanungo, D. M. Mount, N. S. Netanyahu, C. D. Platko, R. Silverman, A. Y. Wu, "An efficient k-means clustering algorithm", Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions, Jul.2002, vol.24, I.7, pp. 881 – 892.
- [9] R. M. Haralick, L. G. Shapiro, "Computer and Robot Vision", Ed. Addison-Wesley. 1992.
- [10] J. C. Russ, "The Image Processing Handbook", Ed. CRC Press, 2002.
- [11] J. Sekulska-Nalewajko, S. Jezewski, R. Ambroziak, M. Kuzahski, "Digital image processing methods in biological structure recognition - a short review", Perspective Technologies and Methods in MEMS Design, 2006. MEMSTECH 2006, pp. 61-64.
- [12] A. Alberich-Bayarri, L. Marti-Bonmati, R. Sanz-Requena, E. Belloch, D. Moratal, "In vivo trabecular bone morphologic and mechanical relationship using high-resolution 3-T MRI". AJR Am J Roentgenol, 2008, vol.191, no.3, pp. 721-726.
- [13] R. C. Gonzalez, R. W. Woods, S. L. Eddins, "Digital Image Processing using MATLAB™", Ed. Prentice Hall. 2004.



**Ramón Cardona Marsal** nació en Dénia (Alicante), España, en 1981. En el año 2008 recibió el título de Ingeniero Técnico de Telecomunicación por la Universitat Politècnica de València (España). En 2008 obtuvo el Premio Banca-Universitat Politècnica de València en su XI edición al mejor Proyecto Fin de Carrera en la Escuela Politécnica Superior de Gandía de la Universitat Politècnica de València. Actualmente es Investigador en el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabólica de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia, centrando su trabajo en el campo del procesado de imagen por resonancia magnética de tumores cerebrales.



**Manuel Salmerón Sánchez** nació en Cieza (Murcia), España, en 1973. En el año 1997 recibió el título de Ingeniero Industrial por la Universitat Politècnica de València (España) y en 2002 obtuvo el grado de Doctor por esta misma Universidad. Actualmente es profesor Titular de Universidad en el Departamento de Física Aplicada de la Universitat Politècnica de València (España) y miembro del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de esta misma Universidad. Su campo de interés está centrado en los fenómenos que tienen lugar en la interfase biológico/no-biológico, para modular la interacción célula-proteína-material en substratos de interés biomédico. El Dr. Salmerón-Sánchez ha sido premio extraordinario de doctorado (Valencia, 2003), y es autor o coautor de más de 60 artículos científicos.



**Ana Vallés Lluch** nació en Carlet (Valencia), España, en 1976. En el año 2001 recibió el título de Ingeniero Químico por la Universitat Politècnica de València (España) y en 2008 obtuvo el grado de Doctor (Doctorado Europeo) por esta misma Universidad. Tras una primera etapa en la que centró su línea investigadora en la síntesis y caracterización por análisis térmico de polímeros biodegradables, en el año 2005 reorientó su carrera investigadora hacia la Ingeniería Biomédica y en el año 2005 pasó a formar parte del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universitat Politècnica de València. Su campo de interés es la síntesis de materiales porosos (*scaffolds*) tanto biodegradables como bioestables para regeneración tisular, así como su caracterización fisicoquímica y mecánica. La Dra. Vallés ha sido ganadora de la VI Edición Internacional de los Premios a la Investigación en Odontología de la Fundación Vital Dent en su categoría de Investigación Básica, y es autora o coautora de 17 artículos científicos.



**David Moratal** nació en Gandía (Valencia), España, en 1976. En el año 2001 recibió el título de Ingeniero de Telecomunicación por la Universitat Politècnica de València (España) y el de Ingénieur Supélec por la École Supérieure d'Électricité (Francia). En 2006 obtuvo el grado de Doctor (Doctorado Europeo) por la Universitat Politècnica de València. Actualmente es profesor Titular de Universidad en el Departamento de Ingeniería Electrónica de la Universitat Politècnica de València (España) y desde el año 2008 es miembro del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de esta misma Universidad. Su campo de interés es el procesado y análisis de imágenes biomédicas así como el estudio de las distintas técnicas de adquisición y reconstrucción de imágenes médicas. El Dr. Moratal ha sido finalista en el Rosanna Degani Young Investigator Award organizado por el IEEE Computers in Cardiology (Memphis, TN, 2002). Es miembro del IEEE, ESMRMB, ISMRM y ADIRM, y es también autor o coautor de más de 30 artículos científicos y de varios libros y capítulos de libro.