

Artigo Original

Recebido em 28/07/2004 e aceito em 13/04/2005

Segmentación de biopsias de médula ósea mediante filtros morfológicos y rotulación de regiones homogéneas

Segmentation of bone marrow biopsies by morphological filters and labeling of flat zones

Pastore, Juan Ignacio

Laboratorio de Procesos y Medición de Señales
e-mail: jpastore@fi.mdp.edu.ar

Moler, Emilce

Laboratorio de Procesos y Medición de Señales

Meschino, Gustavo

Laboratorio de Bioingeniería
Facultad de Ingeniería
Universidad Nacional de Mar del Plata
Juan B. Justo 4302
B7608FDQ Mar del Plata, Argentina

Resumen

Este trabajo presenta un método semi-automático de detección de tejidos en biopsias de médula ósea utilizando técnicas de Procesamiento Digital de Imágenes. Las técnicas utilizadas combinan filtrados morfológicos y detección de regiones homogéneas, con el fin de realizar un cálculo preciso de la celularidad medular. Los informes anátomo-patológicos de estos cortes histológicos entregan resultados porcentuales de la celularidad medular, indicando la presencia de trabéculas, células adiposas y hematopoyéticas. Dichos porcentajes permiten evaluar la presencia y/o el grado de algún desorden metabólico, estableciendo comparaciones entre los valores normales y los patológicos. Generalmente, estas mediciones se realizan por simple inspección visual. El método propuesto permite calcular el porcentaje de trabéculas, células adiposas y hematopoyéticas. La identificación de trabéculas se basa en la aplicación de Filtros Morfológicos Alternativos Secuenciales por Reconstrucción y rotulación de regiones homogéneas. Todo el proceso es implementado en lenguaje MatLab® 6.5 con una interfase visual que permite operar el sistema sin ser experto en Procesamiento de Imágenes. El método fue probado con 26 imágenes de biopsias de médula ósea que presentan distribuciones variadas de trabéculas. Se presenta un análisis comparativo entre los resultados obtenidos con el método propuesto y los calculados por dos patólogos especialistas donde la diferencia entre ambas estimaciones es menor al 12%, mientras que las diferencias entre ellos llegan a ser hasta de 20%. Tanto los resultados visuales como los numéricos indican que el método es altamente eficiente para esta aplicación.

Palabras-Clave: Filtros morfológicos secuenciales, Médula ósea, Segmentación

Abstract

This work presents a method for semi-automatic detection of different types of tissues in bone marrow biopsies using techniques of Digital Image Processing. The techniques are based on combinations of morphological filtering and flat zones detection, to perform an exact calculation of the medullar cellularity. The anatomic and pathologic reports of the histological cuts give results expressed in percentages, indicating the presence of trabeculae, hematopoietic and fatty cells. This allows evaluating the existence or grade of some metabolic disorder, comparing normal values with pathologic ones. Generally, quantifications are carried out by simple visual inspection. The proposed method allows calculating the percentage

of trabeculae, hematopoietic and fatty cells. The identification of trabecular structures is achieved by the application of Alternating Sequential morphological Filters by reconstruction (ASFs) and labeling of flat zones. The whole process is implemented on MatLab® 6.5 with a guide user interface that allows operation without Image Processing acknowledgement. Methods were tested with 26 images of bone marrow biopsies presenting varied distributions of cellularity and trabeculae topography, presenting varied distributions of cellularity and trabeculae topography. The results were compared to others obtained by visual inspection by two expert pathologists, and differences of less than 12 % were observed, while differences up to 20% were observed between results given by experts. The visual and numerical results indicate that this method is highly efficient for this application.

Keywords: Alternating sequential morphological filters, Bone marrow, Segmentation.

Extended Abstract

Introduction

This work presents a method for semi-automatic detection of different types of tissues in bone marrow biopsies, in order to calculate the percentage of each type of tissue cell area regarding to the whole area. The techniques are based on combinations of morphological filtering and flat zones detection, to perform an exact calculation of the medullar cellularity.

The anatomic and pathologic reports of the histological cuts give results expressed in percentages, indicating the presence of trabeculae, hematopoietic and fatty cells. This allows evaluating the existence or grade of some metabolic disorder, comparing normal values with pathologic ones. Generally, quantifications are carried out by simple visual inspection.

The identification of trabecular structures is achieved by the application of Alternating Sequential morphological Filters by reconstruction (ASFs) and labeling of flat zones.

Material and Methods

Trabeculae identification is based on the application of ASFs and labeling of flat zones.

The images were obtained from bone marrow biopsies. They were chosen among normal samples and bone marrow biopsies that showed osteoporotic syndromes and osteomyeloesclerosis disorders. Twenty-six biopsies were used, presenting varied distributions of cellularity and trabeculae topography.

The proposed method for tissue detection is:

Step 1: Elimination of undesirable zones by means of morphological filtering using ASFs.

Step 2: Trabeculae identification by labeling of flat zones of the image and edge extraction. A value k is empirically chosen to determine the k -connected regions.

Step 3: Detection of fatty and hematopoietic cells. Fat is easily separable because it is represented by high grey values. Segmentation is achieved by thresholding with an appropriate selection of the threshold.

Step 4: Visualization and percents calculation. An image is shown with different gray levels for the different tissues (white for fat, light gray for hematopoietic tissue and black for trabeculae). The quantities of each one are shown in percent referred to the total quantity of pixels.

The whole process is implemented on MatLab® 6.5 with a guide user interface that allows operation without Image Processing acknowledgement.

Results

Some figures are presented showing the results of application of this computer-assisted technique. The results were compared to others obtained by visual inspection by two expert pathologists, and differences of less than 12 % were observed.

The visual and numerical results indicate that this method is highly efficient for this application.

Conclusions

A low computational cost algorithm is presented which produces highly satisfactory results on tissue quantification. The method was shown to be faster and more reproducible than conventional ones, like region growing, edge detection, split and merging.

An algorithm was presented that allows improving the efficiency considerably in the trabeculae recognition that presents a microscopic image of a biopsy, regarding the segmentation achieved by means of other techniques of Digital Image Processing.

Trabeculae segmentation on bone marrow biopsies is a complex process, since they present diffuse areas that hinder the task of objects extraction.

The segmentation through standard techniques in this type of images does not give satisfactory results. Once optimized the parameters for a certain image type, an efficient segmentation of similar images can be achieved. It would facilitate the professional's work, diminishing the subjectivity of the analysis.

Until the moment the method was developed in MatLab® 6.5. However, after carry out the necessary tests and to receive the opinions of the experts, developing in any platform will be achieved.

Introducción

Los informes de biopsias de médula ósea entregan resultados porcentuales de la presencia de trabéculas, células adiposas y hematopoyéticas. Dichos porcentajes se toman como criterio genérico mediante el cual se pueden determinar, entre otros factores, diversos desórdenes metabólicos (Rubin, 1992). Sin embargo, no es un problema sencillo realizar una correcta identificación de la estructura trabecular, dado que los niveles de gris que la representan son muy similares a los de las regiones de celularidad (Frisch, 1985).

Por lo tanto, es de interés contar con una herramienta que, a través de técnicas de Procesamiento Digital de Imágenes (PDI), contribuya a la cuantificación de las estructuras presentes, para realizar cálculos posteriores (Bullough *et al.*, 1990).

Uno de los campos de mayor interés dentro del PDI es el de la segmentación de una imagen en los diferentes objetos que la componen (González y Woods, 1992). Se experimentó con técnicas de segmentación tradicionales como detección de bordes y crecimiento de regiones (Monga, 1987) obteniéndose resultados aceptables sólo cuando se combinaron con otras técnicas como las de texturas y Morfología Matemática que ayudan a determinar el valor del umbral para la finalización del proceso de crecimiento de la región (Meschino y Moler, 2002, 2004; Vincent y Dougherty, 1994). Los tiempos computacionales que involucran estas técnicas son altos.

Para solucionar estas dificultades, en este trabajo se propone aplicar en una primera etapa Filtros Alternativos Secuenciales (ASFs, Alternating Sequential Filters) de cerradura y apertura por Reconstrucción de Morfología Matemática (Mukhopadhyay y Chanda, 2003).

Si bien la clase de Filtros Alternativos (Dougherty, 1992), constituidos por aperturas y cierres morfológicos, ha demostrado ser útil en aplicaciones de filtrado de imágenes debido a que los objetos de una imagen de tamaño menor al elemento estructurante son eliminados, la forma original queda distorsionada. Esta nueva clase de filtros morfológicos secuenciales presenta la ventaja de filtrar los objetos deseados sin alterar la forma original, lo que produce menor distorsión en la imagen (Serra y Vincent, 1992; Vincent, 1993).

Los ASFs por Reconstrucción consisten en una iteración de operaciones de aperturas y cierres por Reconstrucción con elementos estructurantes de tamaño creciente, siendo necesario utilizar un segundo elemento estructurante para la operación Reconstrucción. De esta manera se mantienen las regiones conectadas de la imagen que describen detalles significativos.

Posteriormente se identifican las estructuras trabeculares presentes en las biopsias, mediante el método de rotulación de regiones homogéneas (Desencierre Ferrandière *et al.*, 1997), evitando utilizar la técnica de crecimiento de regiones.

Las células adiposas se detectan aplicando la técnica de umbralamiento (Russ, 1995). Posteriormente se procede a la visualización de los resultados y cálculo de porcentajes.

Es de interés en estos casos contar con una interfase gráfica que permita a profesionales no relacionados directamente con las técnicas computacionales operar con el sistema implementado.

En las secciones siguientes se describen las principales características de las técnicas de PDI utilizadas y el método propuesto que permite la segmentación esperada. Se presenta también una posible interfase y se dan algunas especificaciones para su utilización.

Técnicas de PDI

Una imagen en niveles de gris es una función definida en un subconjunto de Z^2 en $[0, \dots, N-1]$, donde N es un número entero positivo perteneciente a $[1, 256]$. En el desarrollo de este trabajo f denotará una imagen en niveles de gris.

A continuación se presentan las principales definiciones de interés para el método propuesto.

Operadores Morfológicos

Apertura morfológica de la imagen f por el elemento estructurante b :

$$\gamma_b(f) = \delta_b(\varepsilon_b(f)) \quad (01)$$

Cerradura morfológica de la imagen f por el elemento estructurante b :

$$\Phi_b(f) = \varepsilon_b(\delta_b(f)) \quad (02)$$

siendo δ y ε las operaciones dilatación y erosión para imágenes en niveles de gris respectivamente (Serra, 1982).

Apertura por Reconstrucción de la imagen f :

$$\gamma_{bdil, bc}^{rec}(f) = \gamma_{bc, g}(f) \quad (03)$$

donde $g = \varepsilon_{b_{ero}}(f)$.

Se reconstruye la imagen f por la función marcador g , mediante un número infinito de iteraciones recursivas, hasta la idempotencia de la dilatación de g condicionada a f .

Cerradura por reconstrucción de la imagen f :

$$\Phi_{bdil, bc}^{rec}(f) = \Phi_{bc, g}(f) \quad (04)$$

donde $g = \delta_{bdil}(f)$.

Se reconstruye la imagen f por la función marcador g , mediante un número infinito de iteraciones recursivas, hasta la idempotencia de la erosión de g condicionada a f .

Gradiente Morfológico (Gradm) de la imagen f :

$$Gradm(f) = \delta_b(f) - \varepsilon_b(f) \quad (05)$$

Filtros Secuenciales Alternativos (ASFs) por Reconstrucción

Consisten en la repetición de operaciones de aperturas y cierres por reconstrucción con elementos estructurantes de tamaño creciente, interviniendo un segundo elemento estructurante usado en la reconstrucción.

Formalmente se define:

el filtro secuencial "OC" (opening - closing) (n iteraciones) como:

$$nb, bc - \gamma_{nb, bc}^{rec} \Phi_{nb, bc}^{rec}(f) = \gamma_{nb, bc}^{rec} (\Phi_{nb, bc}^{rec} (\gamma_{(n-1)b, bc}^{rec} (\Phi_{(n-1)b, bc}^{rec} (\dots \gamma_{b, bc}^{rec} (\Phi_{b, bc}^{rec}(f)))))) \quad (06)$$

el filtro secuencial "CO" (closing - opening) (n iteraciones) como:

$$nb, bc - \Phi_{nb, bc}^{rec} \gamma_{nb, bc}^{rec}(f) = \Phi_{nb, bc}^{rec} (\gamma_{nb, bc}^{rec} (\Phi_{(n-1)b, bc}^{rec} (\gamma_{(n-1)b, bc}^{rec} (\dots \Phi_{b, bc}^{rec} (\gamma_{b, bc}^{rec}(f)))))) \quad (07)$$

donde n es un número entero positivo que representa el factor de escala del elemento estructurante b :

$$nb = \underbrace{\delta_b(\delta_b \dots (\delta_b(b)))}_{(n-1) \text{ veces}}$$

Convencionalmente $nb = \{(0,0)\}$ para $n = 0$.

Región conectada y homogénea

Una *región conectada* del dominio de la imagen, es una región en la cual todos los píxeles tienen el mismo nivel de gris. Y una *región k -conectada* es una región en la cual la diferencia de niveles de gris entre dos píxeles vecinos, en valor absoluto, es menor o igual que k .

Una *región homogénea* de una imagen f en el punto p perteneciente al dominio de la imagen es la mayor región conectada que contiene a p donde f es constante.

Observación: un píxel cuyo nivel de gris es diferente de los niveles de gris de todos sus vecinos es en sí mismo una región homogénea.

Materiales y Métodos

Las imágenes se obtuvieron a partir de biopsias de médula ósea. Fueron elegidas muestras normales y biopsias compatibles con osteopenias y osteomieloesclerosis.

El material fue procesado con las siguientes especificaciones:

- Las muestras se fijaron en líquido de Bouin durante 24 hs. (ó 48 hs., según los casos), procediendo a su descalcificación y a su inclusión en parafina.
- Los cortes histológicos fueron realizados en un microtomo rotativo con un espesor de 4 μ m.
- Las tinciones histológicas utilizadas fueron: Hematoxilina-Eosina, como técnica de rutina, coloraciones para Fibras Reticulares (reticulina de Gomori), coloraciones para hierro (Perls) y coloración de Giemsa.

Para este trabajo se estudiaron veintiséis (26) imágenes. Éstas se obtuvieron de un Microscopio Óptico Medilux-12 con un objetivo 4X Plano 4X, N.A. 0.10 digitalizadas a través de una cámara color CCD Hitachi KP-C550. Esta cámara tiene una dimensión eficaz de 682 (H) \times 492 (V) píxeles y un rango de longitud de onda de 400 a 700 nm. Soporta una resolución de video de 430 líneas, suficientes para capturar imágenes de las biopsias de 640 \times 480 píxeles en una PC. Después de seleccionar el área de interés en el microscopio se adquiere una única imagen en cada caso.

Las imágenes fueron almacenadas en Mapa de bits y convertidas a escala de grises de 8 bits.

Método propuesto

El método propuesto para la detección de tejidos presenta los siguientes pasos: eliminación de objetos no deseados por medio de un filtrado morfológico; extracción de trabéculas; detección de tejido adiposo y hematopoyético; visualización y cálculo de porcentajes. A continuación se explica cada uno, indicando además la forma de operar con la interfase gráfica, que se muestra en la Figura 1.

- Paso 1: Filtrado de la imagen mediante Filtros Secuenciales Alternativos por Reconstrucción. Se aplica el filtro secuencial "CO", con elemento estructurante, creciente, el cual permite homogenizar las zonas a detectar sin que éstas sufran deformaciones. Para este trabajo se utilizó un estructurante en cruz de 3 \times 3 píxeles.
- Paso 2: Rotulación de las regiones homogéneas de la imagen y extracción de contornos. En la interfase visual se sugiere un valor k (obtenido en forma empírica) para determinar las regiones k -conectadas. Este valor puede ser variado en forma interactiva por el usuario en caso de no obtener

resultados satisfactorios. Se visualizan con colores diferenciales las distintas regiones homogéneas. Se aplica la técnica de gradiente morfológico para la extracción de bordes de las trabéculas.

- Paso 3: Detección de tejido adiposo y hematopoyético. Se procede una vez concluida la detección de trabéculas. El tejido adiposo es fácilmente distinguible, ya que está representado por valores de gris altos. Su segmentación se logra aplicando la técnica de umbralamiento, con la elección de un adecuado valor de umbral mínimo de intensidad. Previamente se habrá asignado a las regiones de trabéculas anteriormente segmentadas el valor de gris 0, lo que las excluye de ser confundidas con el tejido adiposo. La elección del valor del umbral se realiza en forma interactiva. Las regiones no identificadas hasta este paso del método serán consideradas tejido hematopoyético.
- Paso 4: Visualización y cálculo de porcentajes. Se muestra una imagen con diferentes intensidades de gris para los diferentes tejidos (blanco para el tejido adiposo, gris medio para el hematopoyético y negro para las trabéculas), y se visualizan las cantidades halladas de cada uno de ellos, expresadas en porcentaje de píxeles de cada región referidos a la cantidad total de píxeles.

Método de cálculo del error

Los errores entre dos criterios A y B (por ejemplo entre

ambos patólogos, o entre el promedio de sus estimaciones y el método propuesto) se definieron según la siguiente expresión:

$$Error\% = \frac{|T_A - T_B| + |G_A - G_B| + |C_A - C_B|}{300} \times 100\% \quad (08)$$

donde $T_{(x)}$, $G_{(x)}$ y $C_{(x)}$ son los porcentajes de trabéculas, tejido adiposo y hematopoyético respectivamente según el criterio (X), y se refiere el error al peor caso que podría aparecer.

Se calculó la diferencia porcentual entre los valores dados por los expertos (EP %) y el promedio de las diferencias entre los resultados de cada experto y el obtenido con el método propuesto (EM%).

Interfase gráfica

En todo método interactivo es fundamental contar con un *software* que permita fácilmente ir probando la elección de los diferentes parámetros, e ir corrigiendo elecciones erróneas de los mismos. En este caso la interfase gráfica se ha diseñado en esta etapa utilizando la herramienta "Guide" que incluye la versión 6.5 de MatLab®.

Primeramente debe abrirse la imagen que quiere analizarse. Se dispone a este fin de un botón "Abrir Imagen". Luego de cargar la imagen se procede automáticamente a la aplicación de los filtros morfológicos que permitirán la selección de las zonas de interés.

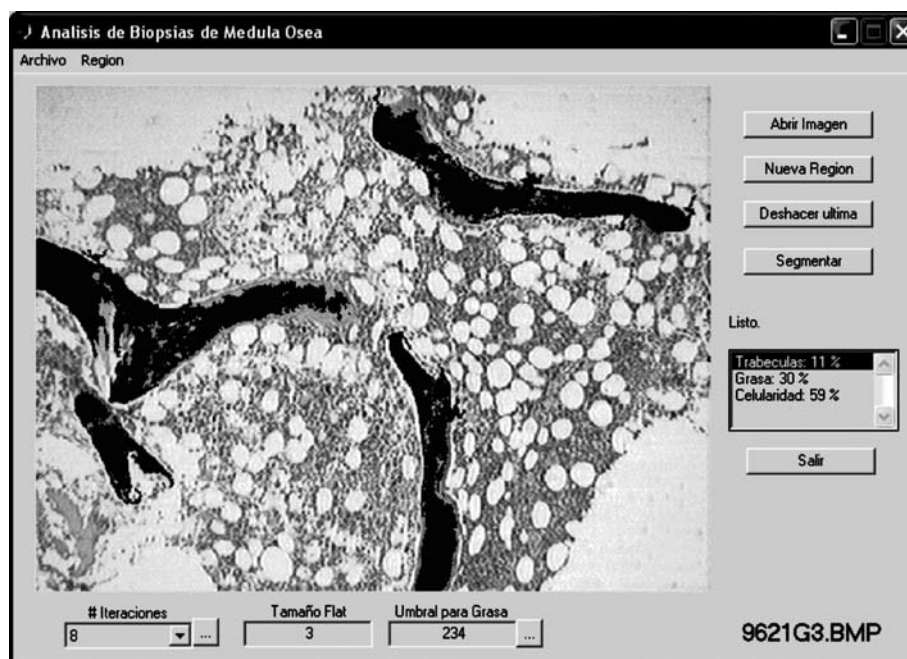


Figura 1. Interfase gráfica del algoritmo desarrollado. **Figure 1.** Graphic user interface for the developed algorithm.

Pueden visualizarse las salidas de los distintos filtros según la cantidad de iteraciones para observar *a priori* las distintas posibilidades de segmentación y elegirse una de ellas. Al seleccionar el botón de “Nueva Región” se podrá seleccionar con el *mouse* una trabécula, e inmediatamente se presentará el resultado de la segmentación obtenida para esa región. De quedar conforme, se procede de igual manera para las demás trabéculas. De lo contrario puede deshacerse lo obtenido a través del botón “Deshacer”.

Una vez obtenidas adecuadamente las trabéculas, puede seleccionarse el umbral para la detección de tejido adiposo, que dispone de un cuadro de texto para ingresarlo, a la vez que con un botón puede verse para cada umbral las regiones que se identificarán como tejido adiposo.

Cuando el umbral elegido es satisfactorio, se pulsa el botón “Segmentar”, que entrega las imágenes de los tejidos separados y muestra los porcentajes que la imagen contiene de cada uno de ellos.

Resultados

A continuación se entregan los resultados que se obtuvieron luego de aplicar el algoritmo presentado.

La Figura 2 muestra la segmentación obtenida para cuatro imágenes de las procesadas. En las imágenes originales se han recuadrado zonas conflictivas para realizar la segmentación y que el algoritmo propuesto lo soluciona satisfactoriamente. Las áreas contenidas en los recuadros presentan zonas difusas entre celularidad y trabéculas que se resuelven positivamente.

Los resultados finales fueron comparados con la segmentación manual que realizan dos patólogos expertos. En la Tabla 1 se muestran a modo de ejemplo los resultados que ellos entregaron para algunas de las imágenes, los valores obtenidos aplicando el método presentado, la diferencia porcentual entre los expertos (EP%) y el promedio entre las diferencias de cada experto y el método propuesto (EM%).

Así se concluye que el método disminuye en la mayoría de los casos la incertidumbre en los valores que dan los expertos en el análisis visual de las imágenes.

Discusión

Si bien el filtrado morfológico es una técnica adecuada para eliminar detalles finos y hacer que las estructuras trabeculares sean más homogéneas, la elección de los elementos estructurantes en cada transformación requiere un cuidadoso análisis previo. Para este trabajo se sugiere un elemento estructurante en forma de cruz de tamaño inicial 3×3 píxeles, que surge de experimentos previamente efectuados. Otros parámetros del método propuesto, como el valor de k que determina las zonas k -conectadas toman un valor por defecto (hallado en forma empírica), pero la interfaz gráfica permite al usuario variarlo interactivamente en caso de no obtener resultados satisfactorios.

Con la utilización del método de rotulación de regiones homogéneas se solucionan los dos principales problemas de los algoritmos de crecimiento de regiones: la selección de las semillas iniciales de las regiones de interés y la elección de propiedades

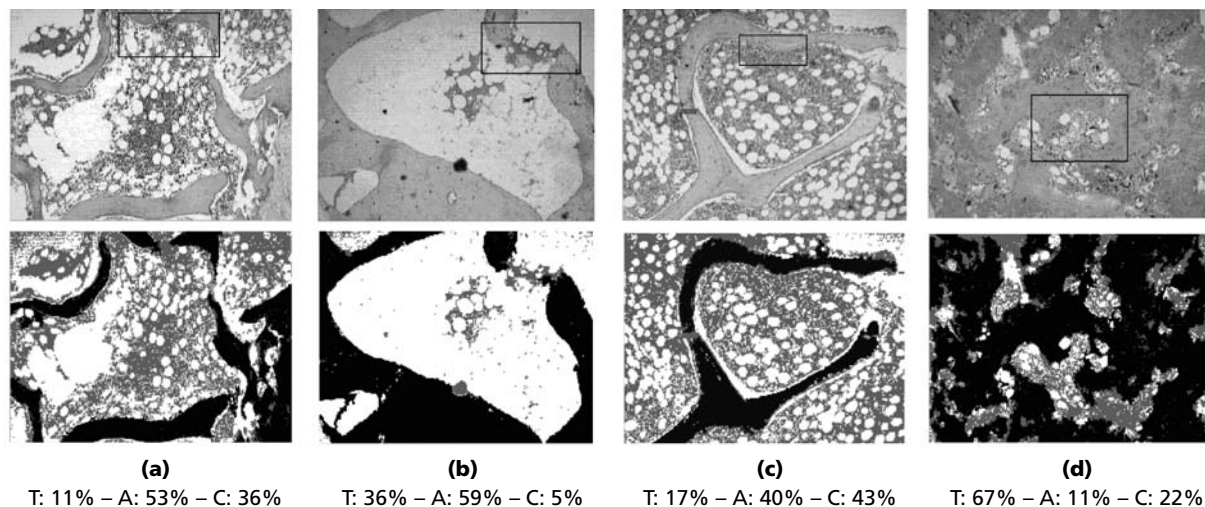


Figura 2. Imágenes originales y segmentaciones obtenidas. Se presentan los porcentajes hallados de Trabéculas (T), tejido Adiposo (A) y Celularidad (C). **Figure 2.** Original images and the corresponding segmentation obtained. The percentages of each type of tissue are presented: Trabeculae (T), Fat tissue (A) and Cellularity (C).

Tabla 1. Resultados numéricos Table 1. Numeric results

		Patólogo A	Patólogo B	Método propuesto	EP%	EM%
Imagen 1	Trabéculas	11	10	17	2%	6%
	Adiposo	87	90	80		
	Hematopoyético	2	0	3		
Imagen 2	Trabéculas	18	15	24	4%	6%
	Adiposo	79	85	73		
	Hematopoyético	3	0	3		
Imagen 3	Trabéculas	18	15	24	5%	7%
	Adiposo	77	85	71		
	Hematopoyético	5	0	5		
Imagen 4	Trabéculas	33	25	36	10%	6%
	Adiposo	60	75	59		
	Hematopoyético	7	0	5		
Imagen 5	Trabéculas	70	90	75	15%	8%
	Adiposo	5	8	5		
	Hematopoyético	25	2	20		
Imagen 6	Trabéculas	64	90	66	19%	12%
	Hematopoyético	6	9	2		
	Adiposo	30	1	32		
Imagen 7	Trabéculas	60	90	67	20%	11%
	Hematopoyético	8	5	11		
	Adiposo	32	5	22		
Imagen 8	Trabéculas	35	20	38	10%	10%
	Hematopoyético	35	35	39		
	Adiposo	30	45	23		
Imagen 9	Trabéculas	26	15	27	13%	7%
	Hematopoyético	54	45	51		
	Adiposo	20	40	22		
Imagen 10	Trabéculas	24	15	23	11%	5%
	Hematopoyético	52	45	52		
	Adiposo	24	40	25		
Imagen 11	Trabéculas	26	20	18	8%	9%
	Hematopoyético	53	65	51		
	Adiposo	21	15	31		
Imagen 12	Trabéculas	19	25	22	6%	3%
	Hematopoyético	47	50	47		
	Adiposo	34	25	31		
Imagen 13	Trabéculas	20	20	17	2%	7%
	Hematopoyético	57	60	51		
	Adiposo	23	20	32		
Imagen 14	Trabéculas	21	15	20	7%	5%
	Hematopoyético	39	50	50		
	Adiposo	40	35	30		
Imagen 15	Trabéculas	17	20	15	7%	7%
	Hematopoyético	41	30	46		
	Adiposo	42	50	39		
Imagen 16	Trabéculas	19	25	12	9%	8%
	Hematopoyético	27	35	39		
	Adiposo	54	40	49		
Promedios entre todas las imágenes					9,4%	7,3%

notables para incluir píxeles en las regiones durante el crecimiento.

Un supuesto subyacente en el trabajo es que los tejidos presentes en la imagen sean únicamente trabecular, adiposo y hematopoyético. De no cumplirse éste, las regiones remanentes contendrán artefactos, estroma o edemas, pero este tipo de imágenes excederían el objeto del método aquí presentado y no constituyen el común de las imágenes que suelen disponerse.

Conclusiones

Se presentó un algoritmo que permite mejorar considerablemente la eficiencia en el reconocimiento de

trabéculas que presenta una imagen microscópica de una biopsia, respecto a la segmentación lograda mediante otras técnicas de PDI.

La segmentación de trabéculas en biopsias de médula ósea es un proceso complejo ya que ellas presentan zonas difusas que dificultan la tarea de extracción de objetos. Con el método propuesto, una vez optimizados los parámetros para un determinado tipo de imagen, se puede lograr una eficiente segmentación de imágenes similares, lo que facilitaría el trabajo del profesional, disminuyendo la subjetividad del análisis.

Hasta el momento el método se desarrolló en MatLab® 6.5. Sin embargo, luego de realizar las pruebas

necesarias y recibir las opiniones de los especialistas, se podrá desarrollar en la plataforma que se requiera. Por todo lo expuesto es que se propone el método enunciado como una contribución en la cuantificación de imágenes médicas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los especialistas: Dr. Ulises Zanetto y Dr. Fernando Pagani por su permanente asesoramiento y provisión de material histológico e instrumental.

Referencias

- Bullough, P.G., Bansal, M., DiCarlo, E.F. (1990), "The tissue diagnosis of metabolic bone disease. Role of histomorphometry", *The Orthopedic Clinics of North America*, v. 21, p. 65-79.
- Dougherty, E. (1992), *An Introduction to Morphological Image Processing*, Washington: SPIE.
- Desencierre Ferrandière, E., Marshall, S., Serra, J. (1997), "Application of the morphological geodesic reconstruction to image sequence analysis", *IEE Proceedings Vision, Image & Signal Processing*, v. 144, p. 339-344.
- Frisch, B. (1985), *Biopsy Pathology of Bone and Bone Marrow*, New York: Raven Press.
- Gonzalez, R., Woods, R. (1992), *Digital Image Processing*, USA: Addison – Wesley.
- Meschino G., Moler E. (2002), "Algoritmo de Crecimiento de Regiones con característicos de texturas: una aplicación en biopsias de médula ósea". *Proceedings del VIII Congreso Argentino de Ciencias de la Computación (Cacic 2002)*. Buenos Aires, 15-18 Octubre.
- Meschino G., Moler E. (2004), "Semi automated Image Segmentation of Bone Marrow Biopsies by Texture Features and Mathematical Morphology", *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, v. 26, p. 31-38.
- Monga, O. (1987), "An Optimal Region Growing Algorithm for Image Segmentation", *International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence*, v. 4, p. 351-375.
- Rubin, E., Farber, J. (1992), *Patología: Fundamentos*, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Mukhopadhyay, S., Chanda, B. (2003), "Multiscale Morphological Segmentation of Gray-Scale Images", *IEEE Transactions on Image Processing*, v. 12p. 533-549.
- Russ, J.C. (1995), *The Image Processing Handbook*, USA: CRC Press, p. 361-367.
- Serra, J. (1982), *Image Analysis and Mathematical Morphology*, Vol. I, London: Academic Press.
- Serra, J., Vincent, L. (1992), "An overview of morphological filtering", *IEEE Transactions on Circuits, Systems and Signal Processing*, v. 11, p. 47-108.
- Vincent, L. (1993), "Morphological grayscale reconstruction in image analysis: applications and efficient algorithms", *IEEE Transactions on Image Processing*, v. 2, p. 176-201.
- Vincent, L., Dougherty, E. (1994), "Morphological segmentation for textures and particles", In: *Digital Image Processing Methods*, New York: Marcel Dekker.