

PLATAFORMA ABIERTA PARA EL PROCESAMIENTO Y GESTIÓN DE IMÁGENES BIOMÉDICAS

Carlos Platero[†]

[†]Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Industrial (UPM), c/ Ronda de Valencia, 3, 28012 Madrid
cplater@fais.upm.es

Kristof Verbiest[†], Alejandro Úbeda^{††}, Ángeles Trillo^{††}, Jaime Gosálvez^{†††}, Javier Bartolomé^{††††}

^{††}Servicio de Bioelectromagnetismo – Investigación, Hospital Ramón y Cajal, 28034 Madrid

^{†††}Facultad de Biología (UAM), Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049 Madrid

^{††††}Fundación para las Hepatitis Virales, c/ Guzmán el Bueno, 72, 28015 Madrid

kristof_verbiest@hotmail.com, alejandro.ubeda@hrc.es, angeles.trillo@hrc.es, jaime.gosalvez@uam.es,
feh@tdi.es

Resumen

El análisis de imágenes biomédicas es cada vez más importante tanto para la investigación en las Ciencias de la Salud como en la generación de diagnósticos. Actualmente existen programas comerciales específicos para el procesamiento de estas imágenes. Sin embargo, su gran capacidad es mermada a consecuencia de la falta de adecuación a la problemática concreta. Por otro lado, las nuevas técnicas de marcaje biológico están abriendo nuevos caminos en el tratamiento de las imágenes. Además, las nuevas tendencias biomédicas tratan de englobar las plataformas de procesamiento de imágenes con opciones de telepatología.

Palabras Clave: Procesamiento de imágenes biomédicas. Telepatología.

1 INTRODUCCIÓN

Si bien el 70% de las imágenes médicas son todavía radiografías, cada vez hay un mayor incremento en todos los ámbitos de las Ciencias de la Salud del uso de imágenes digitales para un posterior tratamiento y almacenamiento: radiografías digitales, tomografías, resonancias magnéticas, ultrasonido, medicina nuclear y angiografía de sustracción digital, entre otras, que ocupan el 30% restante[8][12].

Cada vez más los profesionales de la salud necesitan de un lado herramientas de análisis de imágenes que ayuden a automatizar las tareas de investigación y diagnóstico y de otro requieren de una corporación que sea capaz de gestionar los recursos instrumentales e informáticos a su alcance.

Desde los años 70 ha habido un aumento del uso de las técnicas de la Visión Artificial en el análisis de imágenes biomédicas. Y desde entonces han aparecido múltiples paquetes informáticos en apoyo de estas demandas. Sin embargo, el éxito no ha sido el esperado, en parte porque los profesionales de la Salud, se sienten extraños ante un paquete de manipulación de imágenes. Y de otro lado, por que en términos generales estos software por si mismos no resuelven el problema específico.

Se puede afirmar que resulta extraordinariamente difícil el diseño de una plataforma general de análisis de imágenes biomédicas. Más bien, la filosofía de trabajo es realizar grupos de librerías capaces de resolver problemas bien definidos. El diseño debe ser una plataforma abierta por un lado y de otro que pueda resolver la problemática circunscrita a un ámbito de trabajo.

La cooperación entre diversos departamentos de investigación de hospitales y de universidades de la Comunidad de Madrid, los ha llevado ante unas problemáticas determinadas, donde uno de los elementos comunes ha sido el análisis de imágenes biomédicas. Esta colaboración pretende, en uno de sus objetivos, el desarrollo de técnicas de procesamiento de imágenes y la compartición de los recursos de instrumentación de forma distribuida a través de la red.

Bajo todas estas ideas, el grupo de Visión Artificial de la EUITI-UPM está diseñando una plataforma que sea capaz de ofrecer por un lado el procesamiento de imágenes, en donde sea fácil ir añadiendo nuevos algoritmos y que se adecuen a las problemáticas concretas abordadas, y, de otro, que pueda integrarse dentro del estándar DICOM (*Digital Imaging and Communications in Medicine*) [10][16], capaz de gestionar el almacenamiento de las imágenes y permita realizar tareas de telepatología.

2 PROCESAMIENTO DE IMÁGENES BIOMÉDICAS

La Visión artificial está siendo aplicada en diferentes ámbitos de la biomedicina. Hay dos principales ramas: la asistencia al médico en la elaboración de los diagnósticos sobre los pacientes, y, la aceleración de las investigaciones en las Ciencias de la Salud. Cuando es empleada para la diagnosis de los pacientes, suelen emplearse técnicas comunes de la Visión artificial. La aplicación más simple sería un sistema que realizase las imágenes provenientes de un scanner o de un microscopio, de forma que permitiese facilitar la interpretación física de los procesos biológicos. Estructuras más complejas embeben sistemas expertos junto con algoritmos de Visión para la generación de diagnósticos automáticos. En cuanto a las áreas de investigación, las aplicaciones van desde el realce de imágenes hasta la reconstrucción tridimensional de objetos biológicos.

Si bien el procesamiento de imágenes biomédicas recibe de todo el conocimiento emanado por el desarrollo de la Visión Artificial durante casi un siglo, ésta tiene algunas características peculiares que han hecho que los investigadores especializados en esta área se hayan dedicado a temas muy específicos del tratamiento de imágenes. Una de las constantes ha sido el diseño de algoritmos para el realce de imágenes. En primer lugar, para mejorar la comprensión de la imagen por parte del usuario y en segundo lugar, con el propósito de aplicar posteriormente técnicas de segmentación[9][13]. La segunda característica viene dada por la fragilidad de las técnicas de segmentación, donde los éxitos suelen ser parciales ya que los objetos biológicos están intrincados y las escenas, en términos generales, suelen ser extraordinariamente complejas[1][3]. No obstante, se puede afirmar que la mayoría de las aplicaciones desarrolladas para el procesamiento de imágenes biomédicas suelen emplear la combinación de operaciones tradicionales tanto lineales como no lineales [11][2][7] [5].

Sin duda, las aplicaciones sobre el tratamiento de imágenes biomédicas son múltiples y variadas. Con el propósito de centrar la exposición, se va a presentar a continuación cuáles han sido las problemáticas impulsoras que han incitado al diseño de una plataforma abierta para el procesamiento de imágenes biomédicas:

- Los métodos avanzados en inmunocitoquímica hacen posible crear marcajes específicos que muestran la presencia, la forma y la distribución de proteínas, enzimas, neurotransmisores,

receptores de membrana, etc., en células y tejidos [14][17][6].

- Sondas de ADN con marcado fluorescente permiten conocer tanto el daño genético como determinar secuencias del genoma humano, ya que al hibridar éstas dentro de un cromosoma, el resultado es una emisión de irradiación dentro del espectro visible. Su intensidad es proporcional al número de hibridaciones realizadas.
- El nivel vírico de las células puede ser determinada por la relación entre un gen patrón y los virus depositados en ella. Ambos tipos son marcados por fluorocromos de diferentes niveles de longitud de onda dentro del espectro visible.

La solución, no sólo a estos casos sino también a otros futuros, ha sido una plataforma abierta sobre NT capaz de diseñar y ejecutar algoritmos para el procesamiento de este tipo de imágenes, así como la posibilidad de integrarse dentro del estándar DICOM. En definitiva, una aglomeración de librerías de procesamiento de imágenes sobre entorno gráfico para la ejecución de algoritmos, así como la posibilidad de programación y depuración visual de nuevos procedimientos.

La flexibilidad de una plataforma de este tipo debe darse en dos direcciones. Se debe tanto posibilitar la programación visual, lo cual hace la mayoría de los paquetes, como también tener abiertas las librerías de C++ para ampliar el rango de ofertas de procesamiento, lo que en general no suele ser dado al ser los paquetes comerciales de carácter corporativo.

Por otro lado, la plataforma de cara al usuario debe presentar un interfaz de usuario sencillo e intuitivo, capaz de resolver el problema propuesto. Sin más botonera que la propia elección del algoritmo específico y su inmediata ejecución, sin ajuste de parámetros ni otras opciones que disperse y diluya el universo de la problemática.

Por todo ello, se pasa a continuación a presentar los primeros problemas que se han resuelto.

3 PROBLEMAS BIOMÉDICOS A RESOLVER MEDIANTE EL PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

3.1 DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE ASTROCITOS.

A partir de la colaboración entre el servicio de Bioelectromagnetismo del departamento de Investigación del hospital Ramón y Cajal de la

Comunidad de Madrid y la EUITI-UPM, se presentó la problemática de analizar e identificar las respuestas biológicas de las células stem neuronales, CSN, en ausencia y presencia de factores de crecimiento. Estas neuronas tienen la capacidad de dividirse durante periodos indefinidos en cultivo y dan lugar a células neuronales especializadas: astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. Por tanto, la identificación y cuantificación de factores implicados en la regulación de acontecimientos que resultan en la especialización celular neural es un objetivo prioritario. El objetivo último de los estudios es la aplicación de estos conocimientos al desarrollo de estrategias de terapia por regeneración nerviosa para daños originados por traumatismos o por enfermedades neurodegenerativas [15][4].

Con este propósito se requiere de métodos de análisis y procesamiento de imágenes adaptados a las nuevas metodologías de investigación biomédica, con el objeto de realizar una evaluación objetiva, en términos cuantitativos y cualitativos, de los factores de señalización celular citados arriba. Sin embargo, los sistemas biológicos y los métodos de detección que hoy se emplean presentan un elevado grado de complejidad. Las células stem, que crecen formando una intrincada red compuesta por distintas especies celulares, cada una de las cuales ha de ser identificada por su específico patrón de marcaje, constituyen un fiel exponente de dicha complejidad. Debido a esto, los paquetes de software para análisis de imágenes que ofrece el mercado actual son demasiado genéricos para aplicarlos a nuevos modelos experimentales con un grado aceptable de rendimiento y precisión. En consecuencia, el diseño *ad hoc* de sistemas de software capaces de procesar datos biológicos adaptándose específicamente a la valoración mediante técnicas experimentales de reciente desarrollo y a las características de nuevos sistemas biológicos, las CSN en el presente caso, representa un avance fundamental en la investigación biomédica. En el presente se ha desarrollado un software para la valoración de la respuesta celular a través de la detección, cuantificación y distribución, en imágenes digitalizadas, de señales fluorescentes que revelan la presencia de diferentes proteínas implicadas en la citodiferenciación de células stem neuronales.

El problema de análisis de imágenes parte de dos conjuntos: en el primer grupo se representan los núcleos de las células, mientras en el segundo son mostradas los citoplasmas etiquetados. Sin embargo, dependiendo de los experimentos el primer grupo puede mostrar diferencias secundarias y de color; en cambio, en el segundo grupo, las formas son similares aunque pueden variar el tinte biológico. No obstante, la filosofía del procesamiento es la misma: determinar cuáles son los núcleos cuyos citoplasmas han sido excitados para la definición del ratio entre la

población de astrositos respecto al resto de células especializadas.

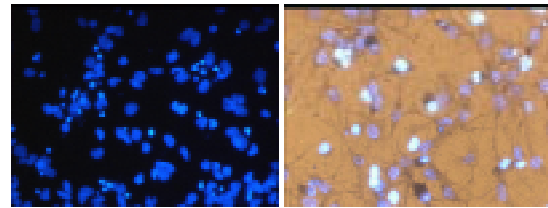


Figura 1: Tipos de núcleos de células. A) Grupo I, B) Grupo II.

Los núcleos tienen forma ovalada y compacta y con un color uniforme, encontrándose éstos en diferentes tipos de fondo. Aunque en su visualización parezcan similares, sin embargo, la falta de iluminación uniforme en el escenario hace que el contraste y el brillo varíe de una zona a otra. A esto hay que añadir la presencia de células muertas o en diferentes estadios de crecimiento de las células, por lo que todo ello dificulta el aislamiento de los núcleos. Por lo que se procede a la búsqueda del canal o canales de color o combinación de éstos que facilite las tareas de procesado y segmentación, posteriormente se pasa a la eliminación de las “células muertas”, paso que en términos generales resulta fácil, pues suelen tener un alto nivel de intensidad y un menor tamaño, ya que su desarrollo quedó paralizado tiempo atrás. Una vez preprocesada la imagen, se suele pasar a una aplicación de ecualización del histograma para seguidamente dividir la tarea de búsqueda de los núcleos más brillantes y de mayor contraste con el fondo de un lado, y por el otro, de las de menor contraste. Operaciones de detección de borde, aritméticas y morfológicas son empleadas para la segmentación de los núcleos. Varios algoritmos han sido ensayados y depurados, quedando como parte residente de la plataforma en su globalidad.

Respecto al grupo de los citoplasmas, éstas son más homogéneas que el anterior conjunto.

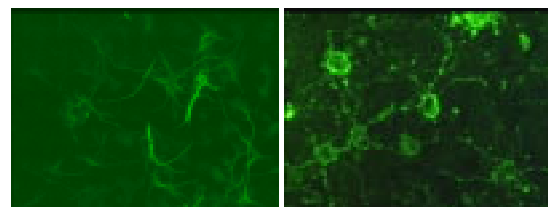


Figura 2: Citoplasmas correspondientes a los núcleos de las células de la figura 1. a) Grupo I, b) Grupo II.

El procesamiento trata de localizar por un lado las áreas de influencia marcadas biológicamente, mediante operaciones de ecualización y morfología, al que se acompaña en paralelo con el recorrido de las terminaciones mediante detecciones de borde. Estas últimas áreas detectadas deben ser eliminadas

de las zonas de influencia, pues de lo contrario se etiquetarían núcleos, cuyos citoplasmas no les corresponden. Finalmente, los resultados de la fase de detección de los núcleos de las células y de las prolongaciones de los citoplasmas son emparejados, de forma que sólo los núcleos cuyas terminaciones hayan sido etiquetados deben ser seleccionadas. El resultado final es el número de núcleos seleccionados respecto a la población total. Una mayor profundización de los algoritmos puede se visto en [18].

Una comparación entre los resultados de los algoritmos respecto a dos expertos del hospital han sido realizadas. La tabla 1 muestra las conclusiones preliminares; un conjunto de imágenes fueron inspeccionadas por dos expertos y cuyos resultados fueron fusionados por la media. Estos valores son confrontados por los datos por el programa.

Conjunto tipo	% astrocitos evaluado por dos expertos	% astrocitos detectado por el programa
1	35	31
2	45	42
3	71	64
4	96	100
TOTAL TIEMPO	28 minutos	segundo

Tabla 1: Comparación del emparejamiento entre los expertos y el programa

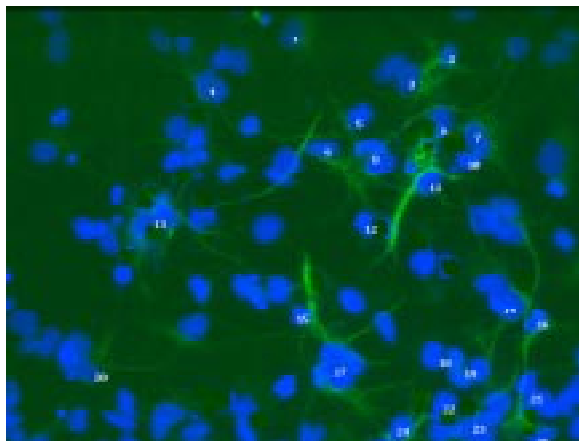


Figura 3: Astrocitos seleccionados por el programa, cuyas imágenes fuentes han sido presentadas en las figuras 1a y 2a

3.2 DAÑO GENÉTICO Y SECUENCIA DE ADN.

Esta plataforma ha permitido ampliar los lazos de colaboración con otras instituciones de las Ciencias

de Salud. Así por ejemplo, se han implementado algoritmos que midan el daño genético en la células para el departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). La problemática en este caso consiste en averiguar cuál es el nivel de roturas de la secuencia de ADN mediante la interpretación de la información visual dada por el microscopio.

Como es sabido, las células de cualquier organismo evolucionado tiene su información genética almacenada en una estructura celular llamada núcleo. El componente mayoritario del núcleo es la cromatina (ADN y proteínas). La información genética está cifrada para cada organismo en su ADN. Por lo tanto, cualquier alteración en esta molécula puede producir una degeneración de esa información, lo que puede tener consecuencias fatales para el organismo que las sufre. Por esa razón, la evaluación del cambio genético que se produce por mutación (daño genético) es un parámetro que siempre se ha de considerar y evaluar. Las radiaciones ionizantes se consideran uno de los mutágenos tradicionales por excelencia. Entre las múltiples alteraciones que éstas pueden producir se encuentran las roturas de doble cadena en la molécula de ADN. Por lo tanto, cualquier método encaminado a detectar y cuantificar el número de roturas de doble cadena que se producen en la molécula de ADN tras ser sometidos los núcleos celulares a radiación ionizante supondrán un avance en el control del daño provocado por estos agentes mutagénicos. El método diseñado por la UAM consiste en visualizar la cantidad creciente de marcado fluorescente que se produce en los núcleos celulares a medida que aumenta la cantidad de radiación que recibe la célula. Básicamente el método utiliza las roturas de cadena doble inducidas en el ADN para desnaturalizarlo (provocar ADN de cadena sencilla) e hibridar sondas de ADN con marcado fluorescente. A más dobles roturas provocadas por radiación, se puede producir más ADN de cadena sencilla por desnaturalización y puede hibridar más sonda marcada. La cuantificación del aumento de fluorescencia utilizando análisis de imagen permite asignar valores numéricos a los incrementos que se visualizan en el microscopio.

En este caso, la problemática del procesamiento de imágenes consiste en normalizar la información visual y comparar posteriormente el tamaño de los núcleos. La primera operación se debe a que el fondo de las imágenes queda ruidoso a consecuencia del marcaje fluorescente. De otro lado, cualquier operación de comparación entre dos imágenes sobre un mismo núcleo requiere de una eliminación previa del ruido. El análisis del histograma y la sustracción del ruido sobre la imagen fuente resolverá la primera parte. La segmentación y decantación del núcleo es

sencillo. Las operaciones de etiquetamiento y determinación de área y masa concluirán la definición del ratio entre las propiedades del núcleo con y sin radiación ionizante.

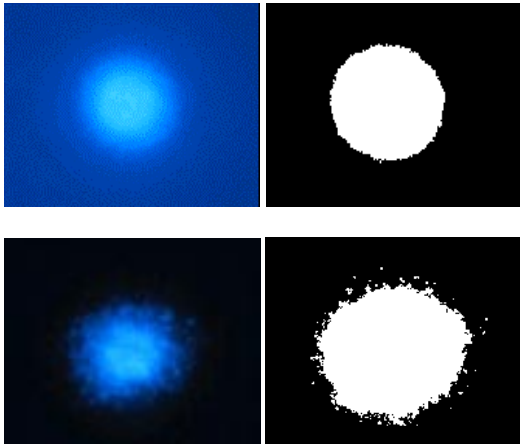


Figura 4: Núcleo de célula con 0 gray y 10 gray; imágenes sin normalizar e imágenes procesadas y segmentadas.

Por razones similares al anterior caso, el método propuesto para conocer algunas secuencias del genoma humano consiste en emplear sondas de ADN con marcado fluorescente, ionizar los cromosomas y observar si existe hibridación. El análisis en la imagen se configura de manera que la hibridación de la doble cadena tiene una irradiación de diferente color al cromosoma. Su intensidad y área indica la presencia de dicha secuencia y también la cuantía de este segmento dentro del cromosoma. El planteamiento del procesamiento de imágenes también requiere de una normalización, de una fase de segmentación por color y una extracción de características.

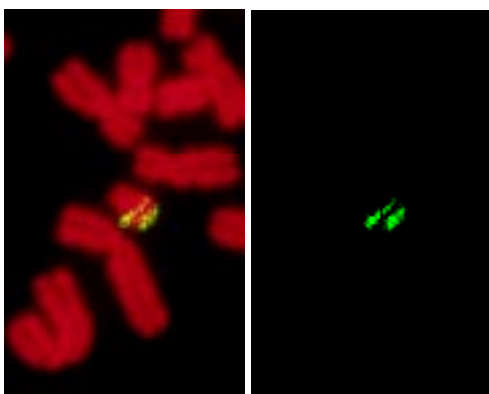


Figura 5: Cromosomas y secuencia de ADN detectada

3.3 CUANTIFICACIÓN DEL NIVEL VÍRICO EN LAS CÉLULAS.

La carga vírica de una célula a otra varía; en cambio, las células expresan genes con niveles basales similares entre las distintas células, como por ejemplo, la beta actina. Si se marca los virus con fluorocromo de un color (verde) y la expresión basal de un gen determinado (beta-actina) en otro color (rojo), se puede derivar la carga de virus real que soporta una célula conocida la carga real de beta actina de esa célula. Con el análisis de imágenes se puede calcular el nivel de fluorescencia roja indicativa de copias de beta actina y el nivel de fluorescencia verde representativa de los virus, por tanto, se puede determinar el nivel de carga vírica que soporta la célula, ya que mientras la beta actina debe ser constante en la célula, los virus pueden variar.

El tratamiento de imágenes empezará con una normalización, por las mismas razones que ya fueron comentadas en 3.2. Posteriormente, se selecciona los canales rojo y verde, lo que permite una fácil detección de la beta actina y de los virus, aunque habrá de operar morfológicamente para que sólo se mida señal que esté inscrita en la célula.

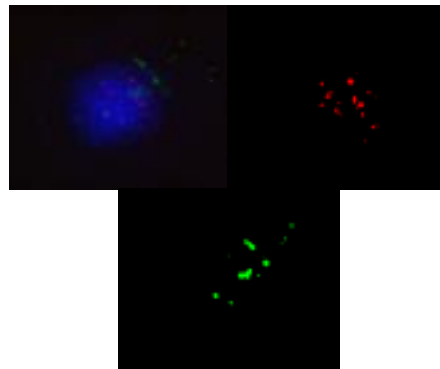


Figura 6: Célula, detección del gen patrón y del virus

Otra de las propuestas fue para la Fundación para las Hepatitis Virales cuantificar y extraer las características del tamaño de los virus que hay en cada célula. Igualmente que en el caso anterior, el algoritmo empleado para este problema utiliza procedimientos de selección del canal, ecualización del histograma, morfología y operaciones lógicas.

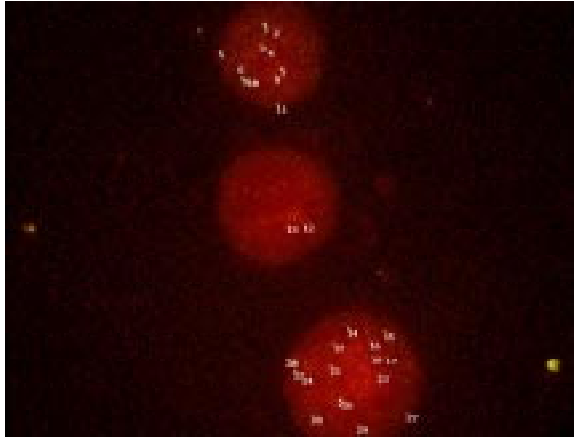


Figura 7: Medidas de los virus en las células

4 CONECTIVIDAD BIOMÉDICA

Justamente de estas múltiples colaboraciones ha nacido la exigencia de tener la posibilidad de conectividad entre todos estos centros a través de INTERNET. Y con un doble propósito, el de compartir los recursos de instrumental biomédico, y, a la vez, tener capacidad para poder realizar diagnósticos cooperantes mediante telepatología.

Para este propósito se está trabajando en la incorporación de la plataforma a DICOM. Éste es un estándar que facilita la interoperatividad de imágenes médicas. Este conjunto de protocolos establece un procesamiento distribuido similar a CORBA[16]; donde al menos dos procesos en diferentes computadoras comparten la misma información. Generalmente, uno de estos procesos utiliza recursos del mismo sistema, estableciéndose con el resto de computadoras una relación cliente/servidor. DICOM se fundamenta en la combinación de TCP/IP con una extensión de aplicaciones de servicios del modelo OSI. Para acabar, el estándar define un número de clases de servicio. Éstas van desde las clases dedicadas al almacenamiento de imágenes hasta el conjunto de las verificación de servicios.

5 CONCLUSIONES

Se ha presentado una plataforma abierta sobre NT para el procesamiento de imágenes biomédicas y con la posibilidad de incorporar el estándar DICOM para la gestión de imágenes por INTERNET. Se han implementado las operaciones básicas de procesamiento punto a punto y de entornos de vecindad, así como de las operaciones de morfología y de etiquetamiento. Resulta sencillo la incorporación de nuevas operaciones de procesamiento. Además, se ha aprovechado la tecnología MMX para disminuir

los tiempos de computación. La herramienta permite diseñar y depurar algoritmos de procesamiento, al igual que la aplicación directa de estrategias de tratamiento anteriormente validadas.

La plataforma ha sido aplicada satisfactoriamente para la determinación de astrocitos en células diferenciadas, ha cuantificado el daño genético en la células y ha evaluado la presencia de una determinada secuencia de ADN. Igualmente, ha resuelto problemas de detección del nivel vírico en células.

La aplicación ha sido diseñada como plataforma abierta para la inserción de nuevos procedimientos en el procesamiento de imágenes biomédicas, tal que los conocimientos y objetivos de los expertos en las Ciencias de Salud sean fácilmente integrables por los especialistas del tratamiento de imágenes médicas. La diferencia respecto a los paquetes comerciales es la orientación del programa a la resolución de problemas concretos.

Referencias

- [1] Chakraborty, A., Stueb, J., James, S., (2000) "Deformable boundary finding influenced by region homogeneity", <http://noodle.med.yale.edu/alums/chakrab/pap1/pap1.html>
- [2] Demirkaya, O., Cothren, R.M., Vince D.G., Cornhill J.F., (1999) "Automated identification of stained cells in tissue sections using digital image analysis", *Anal-Quant-Cytol-Histol*, Apr, 21(2), pp. 93-102.
- [3] Glombitza, G., (2000) "Using illusory contour models as fuzzy operators", http://mbi.dkfz-heidelberg.de/mbi/research/illu_cont.html.
- [4] Keirstead, H.,S., Levine, J.M., Blakemore, W.F., (1998) "Response of the oligodendrocyte progenitor cell population (defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord", *Glia*, Feb, 22(2), pp. 161-70.
- [5] Kim, D., Gregory, C.W., Smith G.J., Mohler, J.L., (1999) "Immunohistochemical quantitation of androgen receptor expression using color video image analysis", *Cytometry*, Jan, 35(1), pp. 2-10.
- [6] Kraan, M.C., Haringman, J.J., Ahern, M.J., Breedveld, F.C., Smith, M.D., Tak, P.P., (2000) "Quantification of the cell infiltrate in synovial tissue by digital image analysis", *Rheumatology-Oxford*, Jan, 39(1), pp. 43-9.

- [7] Liu, S.C., Hu, Y., Sauter E.R., Clapper, M.L., Chen S.Y., Lanfranchi, H.E., Engstrom, P.F., Klein-Szanto, A.J., (1999) "Image analysis of p53 and cyclin D1 expression in premalignant lesions of the oral mucosa", *Anal-Quant-Cytol-Histol*, Apr, 21(2), pp. 166-73.
- [8] Maintz, J., Viergever, M., (1998) A survey of medical image registration, *Medical Image Analysis*, Volume 2, Issue 1.
- [9] Mukherjee, D., Chatterji, B.N., (1995) "Adaptive neighborhood extended contrast enhancement and its modifications", *Graphical Models and Image Processing*, May, 57(3), pp. 254-265.
- [10] National Electrical Manufacturers Association, (1998) Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM) Part 1: Introduction and Overview.
- [11] Nonlinear and Adaptive Techniques (NAT Project) in digital image processing, analysis and computer vision. Fundado por la Unión Europea (1994): <http://poseidon.csd.auth.gr/NAT/>.
- [12] Osborn, K., (2000), Medical Imaging on the internet, <http://www.tip.net.au/~kevosb/>.
- [13] Paranjape, R. B., Morrow, W. M., Rangayyan, R.M. (1992) "Adaptive-neighborhood histogram equalization for image enhancement", *Graphical Models and Image Processing*, May, 54(2), 259-267.
- [14] Phillips, T., Makoff, A., Murrison, E., Mimmack, M., Waldvogel, H., Faull, R., Rees, S., Emson, P., (1998) "Immunohistochemical localisation of mGluR7 protein in the rodent and human cerebellar cortex using subtype specific antibodies", *Brain-Res-Mol-Brain-Re*, Jun, 57(1), pp. 132-41.
- [15] Pincus, D.W., Goodman, R. R., Fraser, R.A., Nedergaard, M., Goldman, S., (1998) "Neural stem and progenitor cells: a strategy for gene therapy and brain repair", *Neurosurgery*, Apr, 42(4), pp. 858-67.
- [16] Revert, B., (1997) DICOM cook book, Philips Medical Systems Nederland.
- [17] Sangster, C.L., Galea, M.P., Fan, R., Morrison, W.A., Messina, A., (1999) "A method for processing fluorescent labelled tissue into methacrylate: a qualitative comparison of four tracers", *J-Neurosci-Methods*, Jul, 89(2), pp. 159-65.
- [18] Verbiest, K., Platero, C., (2000) Development of C++ software for analysis of digital images from cell cultures, Documento interno registrado GCII-FAIS-UPM@PFC049-00, 2000, http://www.fais.upm.es/spain/Investiga/GCII/personal/Kristoff/Gcii49_00.pdf