

Clasificación morfológica usando descriptores elementales en imágenes digitales de muestras de HUVEC

Morphological classification using elemental descriptors in digital images of HUVEC samples

Miriela Escobedo Nicot^{1*}, Silena Herold García¹, Ligia Ferreira Gomez², Camila Machado³, Elisângela Monteiro Pereira⁴, Wilkie Delgado Font¹

Resumen El análisis de la deformación celular en muestras biológicas constituye una herramienta importante para el estudio de algunas enfermedades o procesos asociados a enfermedades en el ser humano. Es por ello que en este trabajo nos centramos en la posibilidad de obtener de forma automatizada, una clasificación morfológica celular en imágenes de culturas *in vitro* 2D de células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC) para estudio de la angiogénesis usando muestras control y otras tratadas con β_2 GPI. Se realizó la clasificación supervisada de las células en tres clases: circulares, deformadas alargadas (elongadas) y deformadas poco alargadas (otras deformaciones) usando los coeficientes de formas elíptico (ESF) y circular (CSF), lo que permitió identificar formas celulares relevantes para la evaluación de este proceso. Todos los algoritmos fueron implementados en Plataforma Matlab®. Para comparar los resultados obtenidos entre las muestras control y las tratadas, se calcularon los intervalos confidenciales para cada una de las clases con un nivel de confiabilidad del 95 %.

Abstract The analysis of cellular deformation in biological samples is an important tool for the study of some diseases or processes associated to diseases in the human being. For that reason in this paper we focused in obtain an automatic morphological classification of cells in images of 2D cultures of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) for angiogenesis studies using control samples and other with β_2 GPI. The supervised classification of cells was performed in three classes: circular, deformed elongated (elongated) and deformed slightly elongated (other deformations), using the elliptical shape coefficient (ESF) and circular shape coefficient (CSF), allowing the identification of cell shapes that express morphological elements that are relevant for the assessment of the angiogenesis process. All algorithms were implemented in Matlab® platform. To compare the results obtained between the control and treated samples, the confidential intervals were calculated for each of the classes with a reliability level of 95 %.

Palabras Clave

Clasificación de formas — Angiogénesis — HUVEC

¹ Departamento de Computación, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. miri@uo.edu.cu, silena@uo.edu.cu, wilkie@uo.edu.cu

² Departamento de Análisis Clínicos y Toxicológicos, Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil. Ifgomes@usp.br

³ Departamento de Fisiopatologia Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. camilamachado@usp.br

⁴ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Brasil. elimonteiro@gmail.com

* Autor para Correspondencia

Introducción

En la actualidad las imágenes digitales juegan un rol sumamente importante en muchos campos de la ciencia, por lo que la búsqueda continua de métodos para realizar el procesamiento de estas imágenes, se ha convertido en una temática ampliamente estudiada en los últimos años debido a la relevan-

cia que tiene la extracción de datos de interés en las ciencias en las que se aplique. El análisis de imágenes digitales incluye varios pasos entre los que se encuentran: la adquisición de la imagen a través de un dispositivo óptico, el pre procesamiento de la misma para eliminar imperfecciones que pueden aparecer durante el proceso de captura, la segmentación de los objetos presentes en la imagen y el estudio de las características que se

obtienen a partir de la segmentación realizada, lo que permite llegar a conclusiones (de carácter cualitativas o cuantitativas) sobre dichos objetos en la imagen.

Dentro del análisis de características, el estudio automatizado de objetos según su forma reviste gran importancia en la actualidad, y está ampliamente difundido en una gran variedad de entornos en la vida humana. Este puede considerarse especialmente necesario en aquellos entornos que ofrezcan mayor dificultad para el ser humano en cuanto a poder lograr resultados confiables y abarcadores, como pueden ser aquellos relacionados con el análisis en imágenes de muestras microscópicas, debido al gran esfuerzo que supone para un especialista el permanecer, a veces durante horas, observando en el microscopio los campos visuales para emitir un criterio cuantificable. En estos casos el cansancio, la posición, la dificultad del propio medio de observación, e incluso la variabilidad de criterios entre especialistas, inciden en la calidad de los resultados obtenidos y provocan que el esfuerzo sea realmente elevado para garantizar la veracidad de los mismos.

En la práctica existen infinidad de casos donde se tratan situaciones de clasificación de objetos detectados en imágenes digitales según su forma. Por ejemplo en medicina, algunas enfermedades o determinados procesos fisiológicos, causan deformaciones celulares que pueden ser identificadas y procesadas para emitir diagnósticos y sugerir tratamientos adecuados. En este trabajo haremos referencia a la angiogénesis, donde la forma de las células endoteliales se puede correlacionar con los procesos de migración y proliferación celular y formación de estructuras tubulares.

La angiogénesis es el proceso que permite la formación de nuevos capilares a partir de vasos pre-existentes en el cuerpo y que envuelve una secuencia compleja de eventos mediados por moléculas de señalización para el crecimiento, la migración y la diferenciación celular [1]. Su estudio reviste gran importancia pues es un proceso estrechamente relacionado a un gran número de eventos patológicos, que incluyen la transición de la fase de crecimiento vascular inofensivo a la potencialmente fatal del tumor.

En los últimos años se han realizado diversas investigaciones dirigidas a la automatización del análisis de la angiogénesis en imágenes digitales de cultivos *in vitro* de células endoteliales, específicamente para el estudio de los procesos de migración, proliferación y formación de estructuras en forma de tubos. En ([2], [3], [4], [5], [6], [7], [8], [9]) pueden encontrarse algunos ejemplos, con los que se demuestra la factibilidad de desarrollar un estudio automatizado en este tipo de imágenes. Otros estudios han centrado su atención en la valoración de efectos producidos por variados tipos de intervención de carácter pro o anti-angiogénico a partir del análisis cuantitativo de la angiogénesis en ensayos *in vitro*. En este sentido se han realizado investigaciones desde el punto de vista computacional dirigidas al estudio de la actividad de varios compuestos en ([10], [11], [12]). También se tienen otras aproximaciones que emplean el análisis morfológico de las células endoteliales en este tipo de muestras para el estudio

de la angiogénesis ([13], [14], [15], [16]).

En estas investigaciones lo más común es hacer el análisis de la angiogénesis a partir de la cuantificación del área de regiones individuales o de grupos de células, del análisis de la dirección del crecimiento celular o de las estructuras con formas de tubos capilares que se forman en el proceso a partir de delimitar su longitud y tamaño. Pero cuando se analiza el comportamiento celular desde etapas tempranas (a partir de las 24 h de incubación) entonces resulta idóneo realizar un análisis morfológico que permita hacer una diferenciación donde se expresen los diferentes niveles de deformación celular. El análisis en etapas tempranas puede proporcionar información que indique la conducta de las células ante el estímulo a que están siendo expuestas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se propone realizar un análisis morfológico cuantitativo de HUVECs bajo la influencia de la β_2 GPI, presentes en imágenes digitales de culturas 2D *in vitro*. La β_2 GPI es una proteína a la cual se le ha atribuido propiedades de carácter anti-angiogénicas en determinados ambientes experimentales ([17], [18]). La diferenciación celular se propone estudiarla en tres clases: circulares, deformadas alargadas (elongadas) y deformadas poco alargadas (otras deformaciones). Desde el punto de vista computacional no se tiene referencia de que este proceso haya sido estudiado de esta forma. Esta clasificación permite determinar formas que expresan elementos morfológicos relevantes para la evaluación del proceso de la angiogénesis, como por ejemplo: formación de prolongamientos celulares, pérdida de la simetría radial, apareamiento de la simetría axial o de formas triangulares, variaciones de tamaño, entre otras.

Las muestras valoradas fueron obtenidas a las 24 horas de incubación para permitir el estudio de forma precoz. Se emplearon como características morfológicas el coeficiente elíptico (ESF) y el coeficiente de circularidad (CSF) [19], que han demostrado buen desempeño al ser empleados con anterioridad en estudios con células que adoptan formas semejantes a las definidas en esta investigación [20].

La metodología propuesta plantea dos etapas en el estudio: una primera etapa donde se utilizan del total de imágenes un subconjunto de ellas para determinar la efectividad de la realización del proceso de detección y clasificación celular teniendo en cuenta el criterio del especialista y una segunda etapa donde, considerando la validez del proceso demostrada en la primera etapa, se emplea este método para obtener un criterio numérico sobre la deformación existente en las células presentes en el resto de las imágenes. La comparación de los parámetros obtenidos para las muestras control y las tratadas fue desarrollada calculando los intervalos confidenciales para cada una de las clases con un nivel de confiabilidad del 95 %.

1. Métodos

Las diferentes etapas desarrolladas pueden resumirse como sigue:

- Preparación de las muestras y captura de las imágenes.

- Segmentación usando el método de umbralización.
- Evaluación del área celular.
- Clasificación usando los coeficientes elementales *ESF* y *CSF*.
- Conteo de las células.

Todos los algoritmos usados fueron implementados en plataforma Matlab®.

Después de adquirida la imagen es segmentada usando el método de umbralización. El estudio fue realizado considerando el campo de observación del microscopio completo. Luego de la segmentación el ruido que después de segmentada la imagen aún se mantiene presente, es eliminado usando operaciones morfológicas de apertura y cierre [21]. Fueron consideradas regiones válidas para clasificar morfológicamente aquellas que presentaron un área mayor que la mitad del área promedio de todos los objetos segmentados en la imagen y menor que el doble de la misma, con el objetivo de descartar regiones que contengan solapamientos de células o se correspondan con las regiones muy pequeñas no pertenecientes a células.

Para determinar la morfología celular usando los coeficientes *ESF* y *CSF*, se emplearon los valores determinados en [22]. Aunque hay que destacar que se realizó un ajuste del umbral usado para el coeficiente *CSF* lo cual garantizó una mayor robustez en cuanto a la diferenciación de las células circulares y las deformadas poco alargadas. Los valores son definidos de la siguiente forma:

- Si $ESF < 0,5$ la célula es deformada alargada o elongada.
- Si $ESF > 0,5$ y $CSF < 0,9$ la célula es deformada poco alargada o con otra deformación.
- Si $ESF > 0,5$ y $CSF > 0,9$ la célula es circular.

Algunas de las etapas principales del trabajo son mostradas en la Figura 1.

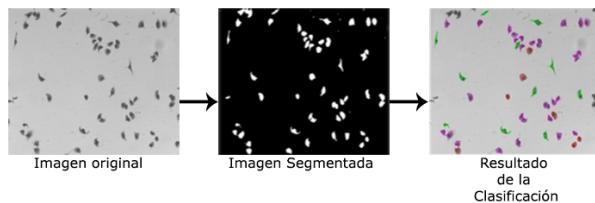


Figura 1. Flujo de trabajo del proceso.

1.1 Segmentación

El primer paso a seguir para realizar el análisis de estructuras de interés presentes en una imagen digital es la segmentación de las mismas. La segmentación es el proceso que subdivide una imagen en sus partes constituyentes

u objetos, y es uno de los elementos fundamentales en el estudio automatizado de imágenes, debido a que es en esta etapa donde se extraen los objetos de interés de una imagen para realizar análisis posteriores, que incluyen descripción y reconocimiento de características [23].

En este trabajo considerando que existe una buena diferenciación entre los objetos de interés (HUVEC) y el fondo, es decir, los valores de intensidad de los objetos están fuera del rango de los valores de intensidad del fondo, las imágenes fueron segmentadas usando un método de segmentación por umbralización, el cual hace una clasificación de la imagen en dos clases de píxeles. Sea $f(x,y)$ una imagen, tal que los píxeles pertenecientes a los objetos y al fondo tienen valores de intensidad agrupados en dos modos dominantes. La imagen umbralizada $g(x,y)$ queda definida de la siguiente forma:

$$g(x,y) = \begin{cases} 1 & \text{si } f(x,y) \geq T, \\ 0 & \text{si } f(x,y) < T. \end{cases} \quad (1)$$

Donde T es el valor de umbral definido.

1.2 Descriptores elementales de formas

Entre los descriptores más elementales para el análisis de formas están el coeficiente de forma circular (*CSF* por sus siglas en inglés) y el coeficiente de forma elíptico (*ESF* por sus siglas en inglés) [19], los cuales se basan en características geométricas de los objetos. El valor de *ESF* expresa la elongación del objeto, mientras que el valor de *CSF* expresa que tan cercano se encuentra el objeto a una forma circular. Si el objeto es perfectamente circular ambos descriptores toman el valor 1. Si A y P representan el área y perímetro del objeto respectivamente, entonces ambos valores pueden ser obtenidos de la siguiente forma:

$$CSF = \frac{4\pi A}{P^2}. \quad (2)$$

$$ESF = \frac{E_{me}}{E_{ma}}, \quad (3)$$

Donde:

- E_{me} representa la abscisa menor del objeto.
- E_{ma} representa la abscisa mayor del objeto.

1.3 Preparación de las muestras

Los estudios fueron conducidos con subfracciones del proceso de purificación que son ricas en monómeros de β_2 GPI purificada, obtenidas por elución de la columna de Heparina Sefarosa después de filtración por membranas de acetato de celulosa, con poros de diámetro $0,22 \mu\text{m}$ para eliminar la contaminación bacteriana y dilución en medio de cultura sin suero.

Las células endoteliales en la concentración de 2×10^4 células/ml, fueron colocadas en medio de cultivo RPMI 1640¹ suplementado con suero fetal bovino a 10% en placas de 24

¹Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute.

pozos, sobre cubreobjetos de vidrio con 13 mm de diámetro, previamente esterilizados en autoclave. En cada pozo fue adicionado una concentración igual a 30 µg/ml de la proteína y la incubación fue interrumpida a las 24 h. Las células adheridas a los cubreobjetos de vidrio fueron teñidas con una mezcla de Hematoxilina y Azul de Metileno utilizada en laboratorios de Hematología (May-Grunwald-Giemsa), para un resultado de patrón suave con buena transparencia citoplasmática.

1.4 Captura de las imágenes

Fueron obtenidas imágenes de distintos campos a partir de 4 muestras de HUVEC, usando una cámara Point Grey (GS3-U3-1455M) con objetivo de aumento de 3,2×. Para cada lámina, que incluyen tres pozos de cultivo, fueron capturadas entre 17 y 22 imágenes de campos secuenciales sobre un diámetro determinado en la muestra, con una resolución de 1384 × 1036 píxeles. Las imágenes utilizadas se dividieron en dos grupos, un grupo no tratado con la β_2 GPI, denominado grupo control y un grupo tratado con la β_2 GPI. En total fueron procesadas un conjunto de 222 imágenes, distribuidas en 87 imágenes obtenidas de las muestras control y 94 imágenes obtenidas de las muestras tratadas con β_2 GPI.

1.5 Descripción de los experimentos

El análisis de los resultados obtenidos fue dividido en dos etapas, encargadas de:

1. Verificar la efectividad de la detección de células como resultado del proceso de segmentación y verificar la efectividad de realizar una clasificación supervisada en este tipo de imágenes, tomando una parte del total de las imágenes del conjunto.
2. Realizar la clasificación para todo el conjunto de imágenes restantes y el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Para validar la efectividad en la detección de células en las imágenes, se aplicó el siguiente funcional de calidad:

$$\phi(p) = \frac{OBC}{OBC + OMC + OAC}, \quad (4)$$

donde:

- *OBC*: representa la cantidad de células bien detectadas en el proceso de detección *p*.
- *OMC*: cantidad de regiones pertenecientes a células no detectadas.
- *OAC*: cantidad de células mal detectadas.

Para evaluar el desempeño en la clasificación se utilizaron un conjunto de imágenes clasificadas de antemano de forma manual por parte de los especialistas. Las mismas fueron segmentadas y clasificadas como se describió anteriormente. Para cada clase obtenida se determinaron los valores de sensibilidad, precisión y especificidad, medidas de calidad que son extraídas a partir de la matriz de confusión [24]. Estos valores pueden ser descritos de la siguiente forma:

- Sensibilidad (True Positive Rate (*TPR*) por sus siglas en inglés) es la proporción de objetos que están clasificados dentro de la clase C_i , de entre todos los objetos que realmente son de la clase C_i .
- Precisión (*P*) es la proporción de objetos que realmente tienen clase C_i de entre todos los objetos que se han clasificado dentro de la clase C_i .
- Especificidad (True Negative Rate (*TNR*) por sus siglas en inglés) es la proporción de objetos que han sido clasificados dentro de las otras clases diferentes a la clase C_i y que no pertenecen a la clase C_i .

En la segunda etapa se realizó la clasificación para todo el conjunto de imágenes restantes. Los resultados obtenidos fueron procesados usando el software STATISTICA, versión 10. Se consideró como valor representativo para el conjunto de imágenes que se corresponden a un pozo, el valor promedio de los parámetros medidos. Para la comparación de los resultados obtenidos entre las muestras control y las tratadas, se calcularon los intervalos confidenciales para cada una de las clases con un nivel de confiabilidad del 95 %.

2. Resultados y discusión

En la primera etapa fueron procesadas 40 imágenes (cerca del 18 % del total de imágenes), con un total de 1501 células. Los resultados obtenidos en la detección se muestran en la Tabla 1, alcanzándose un 95,07 % de efectividad en la detección. Todas las células presentes en las imágenes valoradas fueron detectadas, las regiones no pertenecientes a células detectadas se corresponden con artefactos que provienen de la forma de preparación de las muestras. El análisis realizado demostró que el proceso de detección de las regiones de interés (células) en las imágenes valoradas es eficiente ya que logra detectar de forma correcta la mayor cantidad de células posibles.

Cuadro 1. Resultados obtenidos con la detección de células.

OBC	OMC	OAC	(OBC+OAC)	$\phi(P)$
985	51	0	985	95,07

Como segundo paso de esta etapa se realizó el análisis de la clasificación comparando contra el criterio de los especialistas, los cuales se encargaron de clasificar manualmente teniendo en cuenta las clases ya descritas, las 1501 células presentes en las imágenes tomadas para control del proceso. La matriz de confusión del proceso de clasificación supervisada desarrollado en esta etapa y los resultados de las medidas obtenidas son mostrados en la Tabla 2, donde *C* se corresponde con la clase circular, *E* se corresponde con la clase elongada y *OD* con la clase de otras deformaciones.

Los valores obtenidos en el proceso de validación cruzada mostraron que los coeficientes elementales ESF y CSF presentaron un desempeño alto. La sensibilidad para las 3 clases

Cuadro 2. Resultados obtenidos con los coeficientes elementales.

Clase	C	E	OD	TPR	TNR	P
C	267	0	10	96,38	96,48	90,81
E	0	336	10	97,10	96,27	98,24
OD	27	6	845	96,24	96,78	97,68
Total				96,58	96,52	95,58

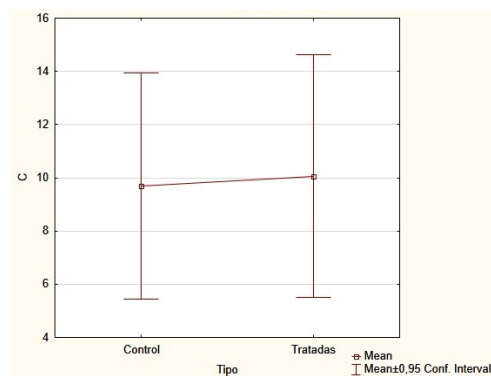
está por encima del 96 %. Ninguna célula circular fue clasificada como elongada y viceversa. En el caso de las células con otras deformaciones el desempeño fue el menor alcanzado, aunque la cantidad de errores en la clasificación se puede considerar mínima, cerca del 2 % de las células con otras deformaciones fueron clasificadas como circulares y elongadas, esto se debe a que hay células con otras deformaciones que pueden ser un poco más cercanas a los valores de circularidad, o de elongación.

En la segunda etapa se realizó la clasificación para todo el conjunto de imágenes restantes. El análisis estadístico realizado es mostrado en la Figura 2. En el caso de las células circulares y elongadas como puede apreciarse en la Figura 2a y 2b, los intervalos confidenciales se solapan y la media de ambos cae en el intervalo confidencial del otro, por lo tanto se puede concluir que no hay diferencias significativas entre la cantidad de células circulares y elongadas para las muestras control y tratadas, con un nivel de confiabilidad del 95 %. En las células circulares se puede ver un ligero aumento en la media y en la dispersión en las muestras tratadas. En el caso de las células elongadas, hay una disminución en el valor de la media y los valores se concentran más en torno a esta en las muestras tratadas, se puede observar que en las muestras control la dispersión es mayor. Para las células con otras deformaciones, los intervalos confidenciales no se solapan (Figura 2c), lo que nos permite indicar que hay diferencias significativas entre las muestras control y las tratadas. Se puede apreciar que además que en las muestras tratadas hay una disminución en el valor de la media y un aumento en la dispersión, lo cual puede ser asociado a que en esta clase se contemplan todos los tipos de deformaciones celulares que existen en estas muestras que no llegan a ser propiamente células elongadas o circulares.

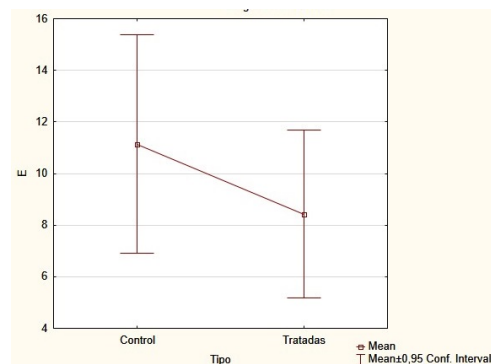
3. Conclusiones

En este trabajo se ha propuesto una metodología para obtener una clasificación morfológica automatizada de células presentes en imágenes digitales de muestras de culturas *in vitro* 2D de HUVEC, bajo la influencia de la β_2 GPI. El proceso permite obtener de forma rápida la cantidad de células circulares, elongadas y con otras deformaciones presentes en las imágenes tomadas a las 24 horas de tratamiento usando los coeficientes elementales del análisis de formas *ESF* y *CSF*.

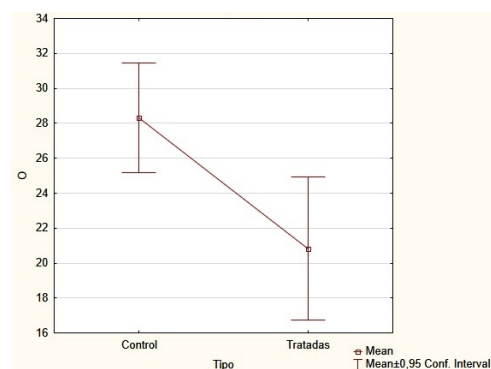
La metodología aplicada permite observar que en las muestras valoradas, se logró segmentar las células presentes con un 95,07 % de efectividad en la detección. En cuanto a la clasifi-



(a)



(b)



(c)

Figura 2. Comparación de las cantidades de células entre las muestras control y las tratadas. (a) Células circulares, (b) células elongadas y (c) células con otras deformaciones.

cación los resultados obtenidos en las muestras control con respecto a las muestras tratadas, evidenciaron que no existen diferencias significativas en las células circulares y elongadas, y si en las otras deformaciones.

El estudio de la morfología de las células endoteliales es una importante herramienta debido a que la alteración en la estructura y en el crecimiento de estas células puede representar una respuesta positiva o negativa a un tratamiento o patología. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten afirmar que el análisis de las alteraciones morfológicas *in vitro* puede ser utilizada en culturas 2D precoces (24 horas) para la

cuantificación de fenómenos que usualmente son estudiados en culturas 3D a partir de 48 horas de incubación, lo cual permite que se simplifique la cuantificación y se reduzca el costo del análisis de la respuesta de proliferación asociada a efectos de sustancias anti-angiogénicas sobre las células endoteliales.

Agradecimientos

Este trabajo está soportado por las agencias de investigación brasileñas CAPES, FAPESP y CNPq a través de su proyecto PDJ 402601/2015-7, la Universidad de São Paulo y la Universidad Fluminense, ambas de Brasil y la Universidad de Oriente, Cuba. Agradecer al profesor Dr. C. Durvanei Augusto Maria, del Instituto Butantan, por las células endoteliales utilizadas en este trabajo. A los profesores Dr. C. Mikiya Muramatsu y Dr. C. Adriano Alencar, por ceder el microscopio y las instalaciones utilizadas para las medidas y al Dr. C. Diogo Soga por el montaje de la instalación usada para la captura de las imágenes, todos pertenecientes al Instituto de Física de la Universidad de São Paulo, Brasil. A la Dra. C. Larisa Zamora de la Universidad de Oriente por su colaboración en el análisis de los resultados.

Referencias

- [1] P. Carmeliet, "Angiogenesis in life, disease and medicine," *Nature*, vol. 438, no. 7070, pp. 932–936, 2005.
- [2] K. Peters, H. Schmidt, R. E. Unger, M. Otto, G. Kamp, and C. J. Kirkpatrick, "Software-supported image quantification of angiogenesis in an in vitro culture system: application to studies of biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 23, no. 16, pp. 3413–3419, 2002.
- [3] A. Niemisto, V. Dunmire, O. Yli-Harja, W. Zhang, and I. Shmulevich, "Robust quantification of in vitro angiogenesis through image analysis," *IEEE transactions on medical imaging*, vol. 24, no. 4, pp. 549–553, 2005.
- [4] A. F. Santos, A. B. Zaltsman, R. C. Martin, A. Kuzmin, Y. Alexandrov, E. P. Roquemore, R. A. Jessop, M. G. M. v. Erck, and J. H. Verheijen, "Angiogenesis: an improved in vitro biological system and automated image-based workflow to aid identification and characterization of angiogenesis and angiogenic modulators," *Assay and drug development technologies*, vol. 6, no. 5, pp. 693–710, 2008.
- [5] D. Guidolin, G. Albertin, and D. Ribatti, "Exploring in vitro angiogenesis by image analysis and mathematical modeling," *Microscopy: science, technology, applications and education*, vol. 2, pp. 876–884, 2010.
- [6] C. P. Khoo, K. Micklem, and S. M. Watt, "A comparison of methods for quantifying angiogenesis in the matrigel assay in vitro," *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 17, no. 9, pp. 895–906, 2011.
- [7] M.-L. Boizeau, P. Fons, L. Cousseins, J. Desjobert, D. Si-brac, C. Michaux, A.-L. Nestor, B. Gautret, K. Neil, C. Herbert, *et al.*, "Automated image analysis of in vitro angiogenesis assay," *Journal of laboratory automation*, p. 2211068213495204, 2013.
- [8] I. Valavanis, T. Goudas, M. Michailidou, I. Maglogianis, H. Loutrari, and A. Chatziioannou, "A novel image analysis methodology for the evaluation of angiogenesis in matrigel assays and screening of angiogenesis-modulating compounds," in *IFIP International Conference on Artificial Intelligence Applications and Innovations*, pp. 61–71, Springer, 2015.
- [9] C. Balsat, S. Blacher, N. Singolle, F. Kridelka, and A. Noël, "Image analysis characterization of the lymph/angiogenesis in experimental models and clinical studies," *Acta Stereologica*, 2015.
- [10] D. Guidolin, A. Vacca, G. Nussdorfer, and D. Ribatti, "A new image analysis method based on topological and fractal parameters to evaluate the angiostatic activity of docetaxel by using the matrigel assay in vitro," *Microvascular research*, vol. 67, no. 2, pp. 117–124, 2004.
- [11] S. M. Irvine, J. Cayzer, E. M. Todd, S. Lun, E. W. Floden, L. Negron, J. N. Fisher, S. G. Dempsey, A. Alexander, M. C. Hill, *et al.*, "Quantification of in vitro and in vivo angiogenesis stimulated by ovine forestomach matrix biomaterial," *Biomaterials*, vol. 32, no. 27, pp. 6351–6361, 2011.
- [12] P. Nowak-Sliwinska, A. Weiss, J. R. v. Beijnum, T. J. Wong, J.-P. Ballini, B. Lovisa, H. van den Bergh, and A. W. Griffioen, "Angiostatic kinase inhibitors to sustain photodynamic angio-occlusion," *Journal of cellular and molecular medicine*, vol. 16, no. 7, pp. 1553–1562, 2012.
- [13] M. S. Angulo, J. "Application of mathematical morphology to the quantification of in vitro endothelial cell organization into tubular-like structures," *Cellular and Molecular Biology*, vol. 53, no. 2, pp. 22–35, 2007.
- [14] C.-G. Roxana, H. Oualid, L. Anne, D. Agnès, and A. D. Claude, Verdie and, "Morphological analysis of tumor cell/endothelial cell interactions under shear flow," *Journal of biomechanics*, vol. 40, no. 2, pp. 335–344, 2007.
- [15] M.-C. Liu, H.-C. Shih, J.-G. Wu, T.-W. Weng, C.-Y. Wu, J.-C. Lu, and Y.-C. Tung, "Electrofluidic pressure sensor embedded microfluidic device: a study of endothelial cells under hydrostatic pressure and shear stress combinations," *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 9, pp. 1743–1753, 2013.
- [16] C. Machado, M. Escobedo, C. Nigro, V. Sara, P. Cas-sia, D. Augusto, F. Palacios, and L. Ferreira, "Digital image processing assessment of the differential in vitro antiangiogenic effects of dimeric and monomeric

- beta2-glycoprotein i,” *Journal of Cytology & Histology*, vol. 2013, 2013.
- [17] P. Yu, F. Passam, D. Yu, G. Denyer, and S. Krilis, “ β 2-glycoprotein i inhibits vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induced angiogenesis through its amino terminal domain,” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 6, no. 7, pp. 1215–1223, 2008.
- [18] H. Nakagawa, S. Yasuda, E. Matsuura, K. Kobayashi, M. Ieko, H. Kataoka, T. Horita, T. Atsumi, and T. Koike, “Nicked β 2-glycoprotein i binds angiostatin 4.5 (plasminogen kringle 1-5) and attenuates its antiangiogenic property,” *Blood*, vol. 114, no. 12, pp. 2553–2559, 2009.
- [19] L. A. Stoyan and H. Stoyan, *Fractals, Random Shapes and Point Fields*. John Wiley and Sons, 1995.
- [20] K. Fernández, S. Herold, A. Fernández, M. Escobedo, G. Coello, and P. Marrero, “Estudio morfológico en muestras de sangre periférica,” in *Proceedings of the V Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB’11*, vol. 33, pp. 543–546, IFMBE, 2013.
- [21] J. Serra and P. Soille, *Mathematical morphology and its applications to image processing*, vol. 2. Springer Science & Business Media, 2012.
- [22] S. Eom, S. Kim, V. Shin, and B. Ahn, “Leukocyte segmentation in blood smear images using region-based active contours,” in *Advanced Concepts for Intelligent Vision Systems*, pp. 867–876, Springer, 2006.
- [23] T. S. Yoo, *Insight into images: principles and practice for segmentation, registration, and image analysis*. AK Peters Ltd, 2004.
- [24] S. V. Stehman, “Selecting and interpreting measures of thematic classification accuracy,” *Remote Sensing of Environment*, vol. 62, no. 1, pp. 77–89, 1997.