

Herramienta para la segmentación de estructuras óseas de embriones de ave *in ovo* en imágenes de CT

C. García-Villalba¹, E. Balaban², M. Desco^{1,3}, J.J. Vaquero³

¹ Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid

² Behavioral Neurosciences Program, McGill University, Montreal, Canadá

³ Departamento de Bioingeniería e Ingeniería Aeroespacial, Universidad Carlos III, Madrid

juanjose.vaquero@uc3m.es

Resumen

Se presenta un método para la segmentación de estructuras óseas de embriones de ave in ovo en imágenes de CT. La cuantificación del volumen de las distintas estructuras segmentadas puede ser útil como medida del desarrollo del embrión dentro del huevo. Se ha validado para un amplio conjunto de imágenes de embriones de diferentes días de incubación.

1. Introducción

En estudios de desarrollo del sistema neurológico central de aves en estado embrionario, la determinación de la verdadera edad biológica es determinante para poder datar adecuadamente los distintos eventos bajo estudio. Sin embargo, es bien sabido que el día y hora de la puesta del huevo no puede utilizarse como referencia temporal dado que existen mecanismos de sincronización del proceso de incubación que fuerzan la eclosión de los polluelos de forma prácticamente sincrónica a pesar de que su puesta pueda diferir en uno o varios días [1].

Es por esto que se hace necesario el desarrollo de un sistema de datación no invasivo que permita determinar con precisión la edad (con resolución de horas) del embrión *in ovo* bajo estudio. Las técnicas de imagen preclínica no invasivas abren una ventana a la posibilidad de explorar el embrión sin apenas perturbar su desarrollo. Una técnica para el estadiaje basada en la imagen de tomografía de rayos X computarizada es la cuantificación del volumen de determinadas estructuras óseas.

Sin embargo, la imagen resultante de un CT hecha a un embrión en un huevo presenta serios problemas a la hora de analizarla, como por ejemplo el bajo contraste entre el tejido no óseo y el tejido óseo todavía no calcificado, o el gran efecto de endurecimiento del haz y de “cupping” que introduce la cáscara del huevo, bastante opaca en el rango de las energías de los rayos X que se utilizan.

En este trabajo presentamos una técnica de segmentación de estructuras óseas de embriones de ave *in ovo* en imágenes de CT que solventan estos problemas y proporciona resultados fiables.

2. Material y Métodos

El método propuesto consta de dos partes. La primera se ha implementado en el lenguaje de programación IDL (Interface Data Language) y se ha integrado en la plataforma “Multimodality Work Station” (MMWKS) [2]. MMWKS es una interfaz de adquisición, reconstrucción, visualización y análisis de imagen médica, específicamente diseñada para estudios de animales de laboratorio, que permite integrar fácilmente la información proveniente de distintas modalidades. La segunda parte del método se ha desarrollado mediante un conjunto de macros en ImageJ [3].

Las imágenes que se han utilizado en este trabajo se han adquirido en un tomógrafo computarizado diseñado en el propio laboratorio, que es una evolución del subsistema CT de un equipo híbrido PET-CT comercial [4] (ARGUS CT, SEDECAL Medical Systems, Madrid). La adquisición se ha realizado a 50 kV y a 240 μ A. El resultado de la adquisición es un conjunto de 360 proyecciones de 518x518x568 píxeles un tamaño de píxel de 123.22 μ m.

2.1. Descripción del método

El método implementado consta de dos etapas, la primera que preprocesa la imagen para la segmentación, y la segunda que realiza la segmentación y obtiene los volúmenes de las estructuras.

1. Filtrado de las imágenes.

Las imágenes CT de embriones de ave pueden presentar un artefacto conocido como “cupping” [5], que consiste en un oscurecimiento mayor en el centro del huevo que disminuye conforme se acerca a la cáscara. Este efecto puede cuantificarse en la imagen reconstruida mediante perfiles (Figura 1). Partiendo de estos perfiles, se ha realizado un filtrado de las imágenes que elimina el mencionado gradiente, separando perfectamente la cáscara del interior del huevo que es la zona a segmentar y que deberá estar libre de artefactos.

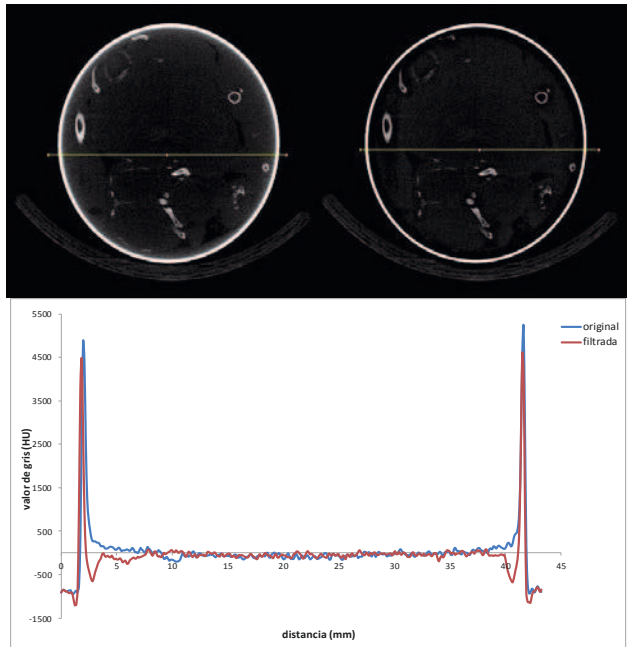


Figura 1. Arriba, imágenes CT original y filtrada con el mismo nivel de ventana, respectivamente. Debajo, se pueden ver superpuestos los correspondientes perfiles donde se puede ver la eliminación del cupping de la cáscara.

2. Extracción de las estructuras de interés.

Este paso consiste en la orientación y extracción de la cabeza y la columna vertebral. Previamente, es necesario mejorar la visualización de estas estructuras eliminando la cáscara de la imagen. Para ello se han utilizado los métodos de crecimiento de semilla y umbralización que incluye la MMWKS. Una vez que se ha eliminado la cáscara, se realiza la orientación mediante una herramienta que calcula los ángulos de rotación a partir de ejes principales de la cabeza dibujados por el usuario sobre la imagen.

A continuación, y con objeto de disminuir los requerimientos de memoria dado que se trata de imágenes de gran tamaño y resolución (290MB típico), se ha desarrollado otra herramienta que permite extraer la zona de interés (cabeza y columna vertebral) dentro de un elipsoide (Figura 2). El procedimiento consiste en dibujar los tres ejes del elipsoide sobre la imagen en dos vistas (sagital y coronal), de manera que se incluya todo el volumen de interés. Con esas coordenadas, se calcula la ecuación del elipsoide y se recorta la imagen previamente orientada.

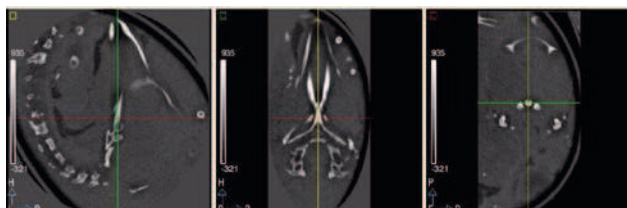


Figura 2. Imagen CT de embrión de ave correctamente orientada y recortada.

De esta forma, se obtiene una imagen más pequeña que ya se puede segmentar sin problemas de memoria.

3. Segmentación manual de la cabeza y la columna vertebral.

En esta etapa se realiza una segmentación manual para eliminar de la imagen aquellos huesos que no pertenezcan a la cabeza o a la columna vertebral. Esta es una segmentación laxa que no requiere de una gran precisión, sino que más bien permite acotar el área en el que se encuentran las estructuras de interés, dado que dentro del huevo los embriones adoptan posturas muy diferentes de forma que en las imágenes tomográficas hay una variación casuística de entrelazado de estructuras. El resultado de esta segmentación se guarda junto con una máscara que enmarca toda la región (Figura 3), ya que luego ambas se utilizarán en el método de segmentación propuesto.

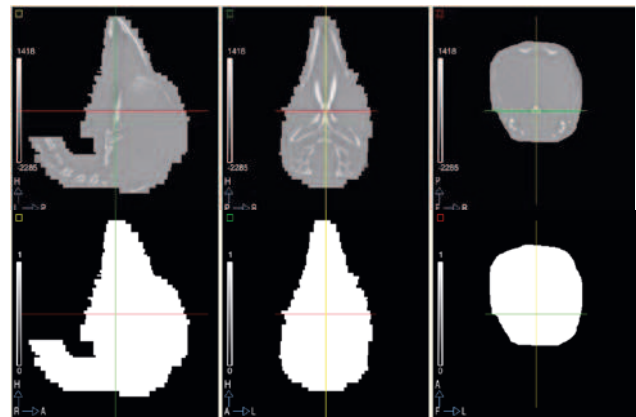


Figura 3. Imagen segmentada (arriba) y máscara (abajo) que incluyen sólo la cabeza y la columna vertebral.

En la segunda parte se lleva a cabo la segmentación de las estructuras de interés. Para ello, se han programado distintos macros en ImageJ que realizan las siguientes tareas:

1. Aplicación de un procedimiento de umbralización automático para obtener una máscara del esqueleto.

Este procedimiento analiza la forma del histograma de la imagen segmentada obtenida en el paso anterior para establecer el umbral para segmentar la imagen y generar una imagen binaria (Figura 4).



Figura 4. Máscara del esqueleto obtenida con el método automático de umbralización.

Aún cuando el sistema de imagen proporciona imágenes calibradas en unidades Hounsfield [6], los distintos grados de osificación de los embriones de diferentes edades impiden que se pueda determinar un umbral de segmentación genérico, y por eso es necesario adaptarlo sobre todas y cada una de los casos. Inevitablemente aparecerán estructuras aisladas que entren dentro del

rango de umbralización pero que no serán de interés. La aplicación permite limpiar manualmente estas estructuras aisladas y fácilmente identificables de la imagen binaria resultante del proceso de umbralización (Figura 4).

2. Segmentación de estructuras de la base del cráneo.

Este paso se realiza con una macroinstrucción que permite segmentar manualmente las estructuras específicas pertenecientes a la base del cráneo; también utiliza de forma interactiva las herramientas de edición proporcionadas por ImageJ. La aplicación muestra por pantalla mensajes (Figura 5) con los pasos que debe ir dando el usuario para conseguir la segmentación correcta.

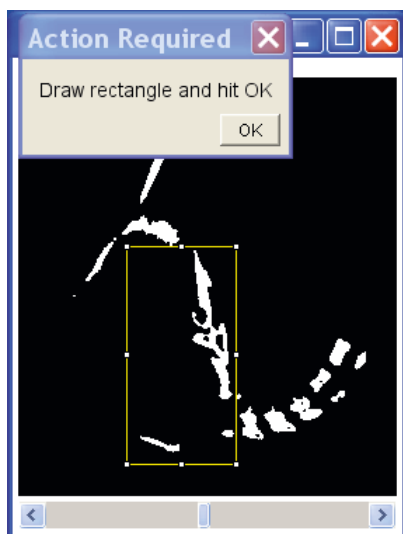


Figura 5. Captura de pantalla ejemplo de uno de los pasos que muestra la macro para guiar al usuario.

3. Segmentación del atlas, axis y tres primeras vértebras.

Esta segunda macroinstrucción es similar a la del paso anterior sólo que, en este caso, sirve para segmentar las estructuras de la columna vertebral. Una vez que se han obtenido las dos máscaras (Figura 6), estas se utilizarán para medir los volúmenes de las regiones de interés.

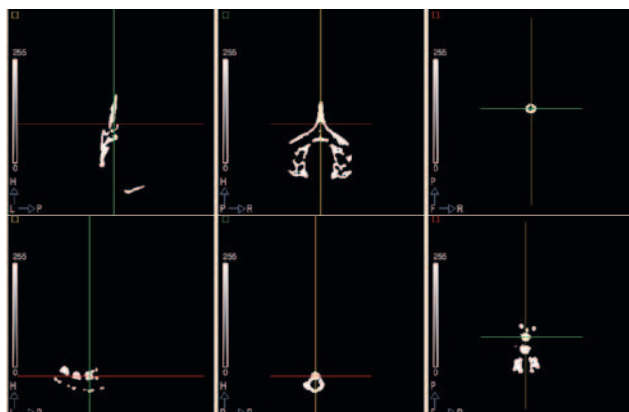


Figura 6. Máscaras de las estructuras de la base del cráneo (arriba) y de la columna vertebral (abajo) en vistas sagital, coronal y axial.

4. Cálculo de volúmenes

En este último paso del método propuesto se calculan los volúmenes de las regiones segmentadas a partir de las máscaras obtenidas en el apartado anterior y, además, el volumen total, obtenido de la máscara segmentada en el apartado 3 de la primera parte del proceso. Estos volúmenes se guardan en ficheros de texto que pueden ser importados por los programas de análisis estadístico.

3. Resultados y discusión

Para probar el método se han segmentado 53 imágenes de CT de embriones de ave de entre 15 y 20 días de incubación. En cada una de las imágenes se han medido los volúmenes de dos regiones: las estructuras de la base del cráneo y el atlas, axis y las tres primeras vértebras.

A modo de ejemplo, se muestran en la tabla 1 los resultados para un ave en la que se ha adquirido imagen en todos los días de incubación del estudio.

Estudio	Días de incubación	Volumen Basal (mm ³)	Volumen Vértebras (mm ³)
101	15,39	43,43	6,35
104	16,60	82,09	20,18
105	17,46	103,76	24,42
108	18,65	123,95	34,83
109	19,39	130,13	36,25

Tabla 1. Resultados obtenidos para una ave (10) en los últimos cinco días de incubación.

Como se observa en la tabla, el volumen medido aumenta conforme pasan los días, tanto para la base del cráneo como para las vértebras. Este resultado es coherente con lo que se esperaba obtener con este método.

El método propuesto mide el volumen de las estructuras de interés reduciendo el tiempo de procesado de cada imagen. Además, se elimina la dificultad que conlleva la segmentación manual ya que en la mayoría de los casos resulta prácticamente imposible de realizar debido a que en estas imágenes, sobre todo en aves muy jóvenes, se hace muy complicado distinguir estas estructuras y delimitarlas sin introducir errores sistemáticos por parte del usuario.

4. Conclusiones

Se ha desarrollado una herramienta para la segmentación de estructuras óseas de embriones de ave *in ovo* en imágenes CT, que se ha integrado con las utilidades disponibles en la plataforma MMWKS y con las de ImageJ. Los resultados obtenidos reducen el tiempo de procesado y proporcionan segmentaciones más fiables y reproducibles.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyectos CENIT AMIT, TEC 2008-06715-C02-1 y Red RECAVA) y por la Comunidad de Madrid y Fondos FEDER (programa ARTEMIS S2009DPI-1802).

Referencias

- [1] Hamburger V, Hamilton H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol*, vol 88, 1951, pp 49-92 (ISSN: 1058-8388).
- [2] Pascau J, Vaquero J, Soto M, Cacho R, Sánchez J, Santos A, Desco M. Multimodality workstation for small animal image visualization and analysis. *Molecular Imaging and Biology*, vol 8, sup 2, 2006, pp 97-8 (ISSN: 1536-1632).
- [3] Página web de ImageJ. <http://rsbweb.nih.gov/ij/> (Consultada Junio 2010).
- [4] Lage E, Vaquero JJ, Redondo S, Abella M, Tapias G, Desco M, Design and Development of a High Performance Micro-CT System for Small-Animal Imaging, 2006. *Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference (IEEE)*, vol 6, 2006, pp 3549-3552 (ISSN: 1082-3654).
- [5] Kak AC, Slaney M, Principles of Computerized Tomographic Imaging: IEEE Press, 1987 (ISBN: 0879421983).
- [6] JJ Vaquero, S Redondo, E Lage, M Abella, A Sisniega, G Tapias, ML Soto-Montenegro, M Desco. "Assessment of a New High-Performance Small-Animal X-Ray Tomograph". *IEEE T Nucl Sci*, vol 55, sup 3, 2008, pp 898-905 (ISSN: 0018-9499).