

# Segmentación de la Membrana Basal Capilar Glomerular en Imágenes Digitales para el Cálculo del Espesor Medio

Marcela Ochoa Mancipe<sup>1</sup> y Marcela Hernández Hoyos<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Maestría en Ciencias Biomédicas, Universidad de los Andes – Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

[bm8amf@gmail.com](mailto:bm8amf@gmail.com)

<sup>2</sup> Grupo Imagine, Grupo de Ingeniería Biomédica, Departamento de Ingeniería de Sistemas y Computación, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

[marc-her@uniandes.edu.co](mailto:marc-her@uniandes.edu.co)

**Resumen.** Este artículo presenta un nuevo algoritmo semiautomático para la segmentación y medición del espesor de la membrana basal capilar glomerular (MBCG). Esta medida es fundamental en el diagnóstico de la enfermedad renal, ya que provee información sobre su origen, su pronóstico y su progresión. La segmentación se inicia con la extracción del eje de la membrana de la sección a medir. El eje se construye por la predicción y adición de nuevos puntos identificados mediante el análisis local de características fotométricas de la imagen (intensidad y gradiente relativo), evaluadas radialmente a partir del centro de una ventana circular. En una segunda etapa, los contornos de la membrana son detectados mediante la búsqueda de diferencias máximas de intensidad y de gradientes máximos en direcciones perpendiculares a la línea central de la membrana. Finalmente, teniendo como base los puntos de los contornos se realiza la medición de los espesores locales y se realiza el cálculo del espesor medio. Los estudios se realizaron en microfotografías electrónicas digitales de 3 pacientes. Por las pruebas realizadas se determinó que el algoritmo presenta una menor variabilidad inter e intra observador, comparado con las técnicas tradicionales de medición de la MBCG.

**Palabras clave:** Segmentación de la membrana basal, medición del espesor, procesamiento de microfotografías electrónicas, MET.

## 1 Introducción

El diagnóstico actual de la enfermedad renal se hace por medio del análisis de biopsias. La microscopía electrónica permite la identificación de diferentes etapas de la enfermedad mediante el análisis ultraestructural de la membrana basal capilar glomerular (MBCG). Un grupo significativo de patologías se diagnostica con la medición del espesor de dicha membrana, comparándolo con la medida normal reportada.

En rutina clínica se emplean imágenes analógicas o digitales y herramientas interactivas para determinar el espesor de la MBCG. Los métodos tradicionales implican la inversión de gran cantidad de tiempo de los patólogos, dificultan el proceso de medición y están sujetos a una alta variabilidad intra e inter-observador [1,2]. Por ejemplo, la metodología manual emplea una guía patrón en forma de cruz para realizar la medición directamente sobre la pantalla de observación del microscopio electrónico de transmisión (MET). El espesor se mide por la coincidencia de la guía con los bordes de la membrana a través del cambio de aumento en el MET [3]. En el método de intersección ortogonal se sobrepone una cuadrícula a la imagen y se realizan mediciones manuales del espesor de la MBCG. La medición se realiza en los sitios donde la cuadrícula intercepta los bordes de la membrana [4,5]. Algunos laboratorios de patología emplean plataformas de dominio público y programas comerciales en la recolección interactiva de medidas [6].

En nuestro conocimiento, existe actualmente un solo trabajo reportado en la literatura que utiliza el procesamiento de imágenes para el análisis de la MBCG [7] basado en un algoritmo de crecimiento de regiones. Este trabajo emplea ventanas de análisis de suavidad, uniformidad, diferencia y continuidad en la intensidad de los píxeles, características que determinan posición, orientación y espesor estimado de la membrana.

Por el contrario, existen múltiples técnicas empleadas en la segmentación de estructuras tubulares como los vasos sanguíneos [8] que presentan geometrías afines (contornos paralelos) a la MBCG. La mayor parte de estos trabajos realizan una extracción preliminar del eje de la estructura, seguida de una detección de contornos, que es base para la medición de su espesor. El proceso de esqueletización puede consistir en adelgazamientos sucesivos de la imagen umbralizada [9] o en la detección de líneas de cresta en las imágenes modeladas como hipersuperficies [10]. Otros trabajos emplean filtros direccionales para detectar la orientación del eje [11] y criterios de vecindad, adición, convergencia, divergencia, exclusión y/o cambio, para realizar la unión evolutiva de nodos que conforman la línea central [12].

Algunos autores han propuesto técnicas para la segmentación total de objetos tubulares. Estos se dividen en dos etapas: caracterización de segmentos ó nodos y unión evolutiva. Las coordenadas del punto central y de los contornos, el espesor local de la estructura y la dirección de avance, son algunas de las características que identifican a los nodos o elementos conexos. La unión de los segmentos se realiza teniendo en cuenta parámetros como la función de costo mínimo y diferentes criterios morfológicos [13]. En otros casos la predicción-estimación de los segmentos se realiza teniendo en cuenta criterios tales como: el umbral local de la estructura, los cambios en el vector y los valores propios de la matriz de inercia y el gradiente direccional de la imagen [14,15].

El método propuesto en este artículo ha sido inspirado por los diversos métodos de medición de la MBCG y de detección de estructuras tubulares. Se trata de un algoritmo semi-automático con obtención previa del eje central.

## 2 Método

El algoritmo propuesto realiza la medición y el cálculo del espesor de la MBCG en sectores delimitados por el usuario que definen adecuadamente la membrana. Esta selección es necesaria dadas las características de discontinuidad e irregularidad de esta estructura. El proceso iterativo de segmentación comienza con la identificación de la región a medir. Esto se realiza por medio de puntos al inicio y final de la sección en estudio. Un tercer punto establece la dirección inicial de progreso de la segmentación. La construcción del eje se hace mediante la detección y adición iterativa de nuevos píxeles. Este proceso se realiza calculando la intensidad y gradiente relativo en dirección radial a partir del centro de una ventana circular. La ventana se modifica en dimensión y ubicación hasta que se halle centrada dentro de la membrana y su tamaño se ajuste al diámetro local de la misma. En estas condiciones, el pixel central de la ventana se considera un nuevo punto del eje. Teniendo en cuenta la orientación local de la MBCG, se desplaza la ventana. A continuación, se extraen los contornos de la membrana. Estos son detectados mediante la búsqueda de diferencias máximas de intensidad y gradientes máximos en direcciones localmente perpendiculares al eje. Finalmente, se realiza la medición de los espesores locales y el cálculo del espesor medio de la membrana.

### 2.1 Extracción del Eje

La extracción del eje o línea central de la membrana basal se realiza con la localización de puntos centrados en el interior de la membrana. Este proceso se desarrolla utilizando una ventana circular de análisis. A partir del centro de la ventana se trazan líneas radiales (llamadas también rayos de análisis), sobre las cuales se calculan la intensidad promedio y el gradiente relativo para la detección de los píxeles de los bordes de la MBCG. Cuando la ventana identifica dos contornos diametralmente opuestos, su centro es considerado por el algoritmo como un nuevo punto del eje. En caso contrario, el punto central es reubicado, la extensión de los rayos se incrementa y la búsqueda de contornos se reinicia. Si un pixel es reconocido como perteneciente a la línea central, se almacenan sus coordenadas y se desplaza la ventana en dirección local de la membrana. Este proceso continua iterativamente (Fig. 1) hasta detectar una distancia mínima entre el último punto del eje y el punto final dado por el usuario.

Los elementos que conforman la ventana de análisis asociada al  $i$ -ésimo punto del eje son (Fig. 2): su centro  $c_i$ , su radio  $\rho_i$  y el conjunto  $P_i$  de puntos que conforman la circunferencia, con las siguientes propiedades:

$$c_i = (r_i, s_i) \in \mathbf{R}^2 \quad (1)$$

$$P_i = \{ \mathbf{p}_\theta^i \}, \theta \in [0, 360] \quad (2)$$

$$\mathbf{p}_\theta^i = (r_i + \rho_i \cos(\theta), s_i + \rho_i \sin(\theta)) \quad (3)$$

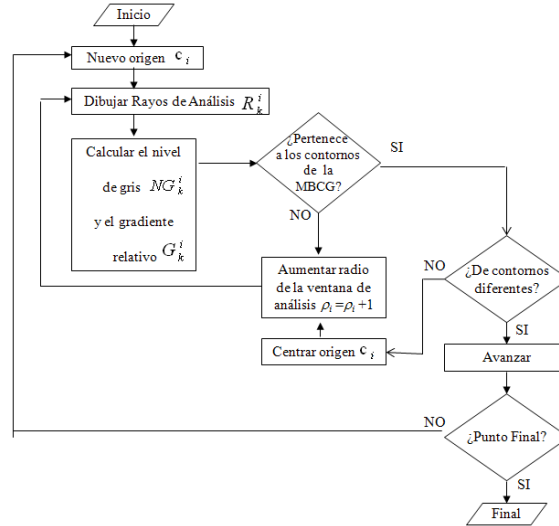


Fig. 1. Diagrama de Flujo Extracción del Eje Central MBCG.

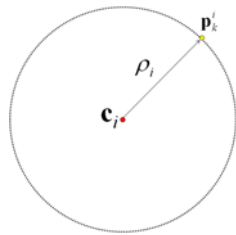


Fig. 2. Ventana circular de análisis.



Fig. 3. Diferenciación de los bordes de la membrana basal capilar glomerular.

El proceso arranca en el punto inicial dado por el usuario  $c_0$ , que corresponde al pixel central de la primera ventana de análisis. Este pixel es el origen de los rayos de análisis  $R_k^i$  que se trazan hasta cada punto  $p_k^i$  de la circunferencia  $P_i$ . En total se trazan  $n=360$  rayos (uno cada grado) de longitud  $\rho_i$ , definidos de la siguiente manera:

$$R_k^i = \{r_\theta^j\}, 0 \leq j \leq \rho_i, \theta \in [0, 360] \tag{4}$$

$$r_k^j = (r_i + j \cos(k), s_i + j \sen(k)), 0 \leq k \leq n-1, n=360 \tag{5}$$

Para determinar la pertenencia de un pixel a un contorno de la MBCG, en cada rayo  $R_k^i$  se evalúan dos características sobre este: su perfil de intensidad ( $NG_k^i$ ) y su gradiente relativo ( $G_k^i$ ).  $NG_k^i$  es definido como el conjunto de niveles de gris de los puntos que conforman el rayo, mientras que  $G_k^i$  es el valor absoluto de la diferencia de intensidades entre el primer punto del rayo (punto central de la ventana) y el último punto del mismo:

$$NG_k^i = \{g_k^0, \dots, g_k^j, \dots, g_k^{\rho_i}\}, 0 \leq j \leq \rho_i \tag{6}$$

$$G_k^i = |g_k^{\rho_i} - g_k^0| \tag{7}$$

El algoritmo determina que un pixel  $\mathbf{p}_k^i$  pertenece a un contorno de la membrana basal si:

1. Su nivel de gris  $g_k^i$  es menor que el promedio de intensidades  $\overline{NG_k^i}$  de los puntos del rayo  $R_k^i$  al que pertenece y,
2. Su gradiente relativo  $G_k^i$  es superior al gradiente máximo permitido ( $G_{MAX}$ ), es decir a la diferencia máxima entre los niveles de gris del contorno de la MBCG y los niveles de gris en su interior.

En caso de que ningún pixel  $\mathbf{p}_k^i$  sea considerado como perteneciente a un contorno de la membrana, la longitud de los rayos  $R_k^i$  aumenta ( $\rho_i = \rho_i + 1$ ) hasta detectar al menos un punto de alguno de los contornos (izquierdo o derecho) de la MBCG (Fig. 3). Cuando un pixel  $\mathbf{p}_k^i$  es identificado como perteneciente a uno de los contornos de la MBCG, se corrobora la detección de otro punto que integre el contorno opuesto. Para esto, el punto central  $\mathbf{c}_i$  se desplaza en dirección opuesta al punto detectado (Fig. 4), se incrementa el radio de los rayos y se reanuda el proceso hasta encontrar dos o más píxeles pertenecientes a cada uno de los contornos de la membrana.

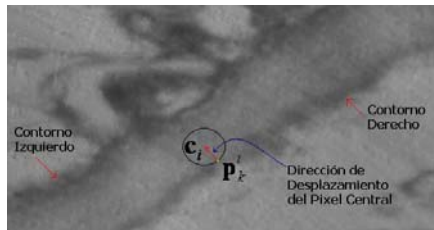


Fig. 4. Reubicación del pixel central.

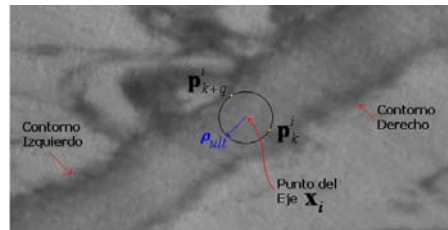


Fig. 5. Condición de pertenencia al eje MBCG.

Un punto es adicionado al eje de la MBCG si corresponde al pixel central  $\mathbf{c}_i$  de la ventana de análisis para la cual dos puntos  $\mathbf{p}_k^i$  forman parte de distintos contornos de la membrana (Fig. 5). De esta manera, el eje de la membrana se representa por el conjunto de  $m$  puntos  $X = \{\mathbf{x}_0, \dots, \mathbf{x}_i, \dots, \mathbf{x}_{m-1}\}$ , donde  $\mathbf{x}_i = (x_i, y_i) \in \mathbf{R}^2$ .

Al adicionar un nuevo punto  $\mathbf{x}_i$  al eje, la ventana de análisis es desplazada a lo largo de la orientación local de la membrana  $\alpha_i$ . Las coordenadas del centro de esta nueva  $\mathbf{c}_{i+1}$  son definidas de la siguiente manera:

$$\mathbf{c}_{i+1} = (x_i + \delta \cos \alpha_i, y_i + \delta \sin \alpha_i) \tag{8}$$

$$\delta = v\rho_{ult} \tag{9}$$

Donde  $\delta$  es una constante que determina el paso de avance;  $v$  es el porcentaje de avance ( $0.1 < v < 0.5$ );  $\rho_{ult}$  es la longitud de los rayos cuando el pixel  $c_i$  es considerado como un punto del eje y  $\alpha_i$  es el ángulo con respecto a la horizontal que forma el segmento de recta trazado entre dos puntos consecutivos del eje. En la primera iteración del algoritmo,  $\alpha_i$  es el ángulo con respecto a la horizontal que forma el segmento de recta trazado entre el primer punto del eje  $\mathbf{x}_0$  y el punto dirección dado interactivamente por el usuario.

Centrada en  $c_{i+1}$  se abre una nueva ventana de análisis de radio  $\rho_{i+1} = w\rho_{ult}$  ( $w = 0.5$ ) y se continúa iterativamente la extracción de la línea central. Al adicionar un nuevo punto al eje, se calcula su distancia al punto final que el usuario estableció. Si esta supera un umbral, el algoritmo se detiene y el eje se considera extraído en su totalidad.

### 2.2 Identificación de Contornos y Cálculo del Espesor Medio

La identificación de los contornos de la MBCG se realiza localmente sobre cada uno de los puntos que conforman su eje. A partir de un punto  $\mathbf{x}_i$  del eje se trazan dos rayos opuestos  $L_i$  y  $D_i$ , en dirección perpendicular al segmento de recta existente entre  $\mathbf{x}_i$  y  $\mathbf{x}_{i+1}$  (Fig. 6). Cada uno de estos rayos sirve a la identificación de una pareja de puntos pertenecientes a los bordes opuestos de la membrana, mediante el estudio de sus perfiles de intensidad y sus gradientes relativos definidos de forma análoga a las ecuaciones 6 y 7. Es importante aclarar que en este proceso no se utilizan los puntos de la MBCG que permiten extraer el eje (sección 2.1) sino que se calculan nuevas parejas de puntos, ubicadas perpendicularmente al eje.

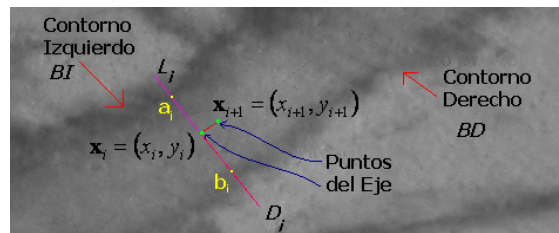


Fig. 6. Identificación de contornos de la membrana basal capilar glomerular.

La orientación  $\beta_i$  del segmento de recta entre  $\mathbf{x}_i$  y  $\mathbf{x}_{i+1}$  es:

$$\beta_i = \arctan \left( \frac{y_{i+1} - y_i}{x_{i+1} - x_i} \right) \tag{10}$$

Los rayos de análisis (de longitud  $\gamma$ ) son definidos por los siguientes conjuntos de puntos:

$$L_i = \{0^i, \dots, 1_j^i, \dots, 1_\gamma^i\}; 1_j^i = (x_i - j \text{sen } \beta_i, y_i + j \text{cos } \beta_i), 0 \leq j \leq \gamma \tag{11}$$

$$D_i = \{d_0^i, \dots, d_j^i, \dots, d_\gamma^i\}; I_j^i = (x_i + j \operatorname{sen} \beta_i, y_i - j \operatorname{cos} \beta_i), 0 \leq j \leq \gamma \quad (12)$$

Siguiendo el mismo principio explicado en la sección 2.1 (ecuaciones 6 y 7) la pertenencia de un pixel  $I_j^i$  ó  $d_j^i$  al contorno de la MBCG se determina si su nivel de gris es menor que el promedio de intensidades de los píxeles pertenecientes al rayo de análisis y su gradiente relativo supera al gradiente máximo permitido. Cuando en un rayo de análisis no se encuentra ningún pixel perteneciente al contorno de la MBCG, se reanuda el proceso a partir de la siguiente pareja de puntos consecutivos del eje.

Al final, cada uno de los bordes está definido por un conjunto finito de  $m$  puntos que identifican los contornos izquierdo  $BI$  y derecho  $BD$  de la MBCG.

$$BI = \{a_i, a_{i+1}, \dots, a_{m-1}\}; \quad (13)$$

$$BD = \{b_i, b_{i+1}, \dots, b_{m-1}\}; \quad (14)$$

La medición del espesor de la MBCG se realiza localmente sobre cada uno de los puntos que conforman su eje. El espesor local  $e_i$  en un punto  $\mathbf{x}_i$  del eje está definido como la distancia entre los puntos  $a_i$  y  $b_i$  y el espesor medio  $\mathbf{E}$  de la membrana basal es entonces:  $\mathbf{E} = \frac{\sum e_i}{m}$ .

### 3 Resultados

Se realizaron tres pruebas diferentes para la evaluación del algoritmo. La primera estableció la relación existente entre la longitud a medir y el paso de avance  $\delta$  de la ventana de segmentación del eje (9). Con la segunda se determinó el rango de aumentos de adquisición de las microfotografías. Finalmente, se compararon los resultados obtenidos al realizar mediciones con el algoritmo desarrollado, el método manual y el método de intersección ortogonal, descritos en la introducción.

En un proceso preliminar a las pruebas, utilizando 15 microfotografías de 3 pacientes, se determinó empíricamente que un píxel pertenece a un contorno de la membrana (criterio 2, sección 2.1) si supera en 10% el gradiente máximo permitido. Este gradiente se estableció como  $G_{MAX} = 5$  niveles de gris.

*Prueba 1.* En esta prueba se conservaron el punto inicial y la dirección dados por el usuario. Se cambió el punto final para aumentar la longitud estudiada. Para cada uno de los segmentos medidos se emplearon diferentes pasos de avance  $\delta$  de la ventana de segmentación. Se determinó que para obtener mejores segmentaciones en longitudes mayores de la MBCG, mayor debe ser el valor de  $\delta$ . Adicionalmente, se observó que algunos píxeles identificados como pertenecientes a la MBCG, se ubican fuera de sus contornos (Fig. 7). Por lo anterior, el espesor promedio se calcula con las medidas contenidas en un rango de dos desviaciones estándar a partir de la media.

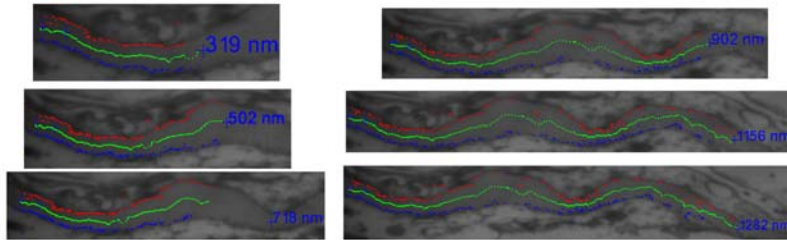


Fig. 7. Resultados Prueba 1.

*Prueba 2.* En esta prueba se midieron imágenes de un mismo paciente adquiridas a cinco aumentos diferentes (20000X, 25000X, 30000X, 35000X, 40000X). Para comparar las medidas obtenidas para cada aumento, se hizo un cuadro de análisis de medias (Fig. 8). En éste se observó la similitud de las mediciones en los tres primeros aumentos empleados. Los valores de los otros aumentos se ubicaron fuera de los límites de similitud. De lo anterior, se estableció el rango de aumentos de adquisición de las microfotografías como 20000X - 30000X. Adicionalmente, se realizó la prueba de igualdad de varianzas, con la que se corroboró la repetitibilidad del método al no encontrar diferencias significativas entre las medias (valor de  $p > 0.05$ ) (Tabla 1).

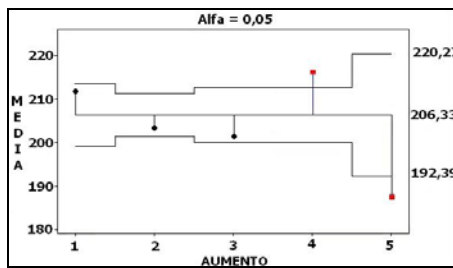


Fig. 8. Cuadro de análisis de medias. Aumentos 1: 20000X, 2: 25000X, 3: 30000X, 4: 35000X, 5: 40000X.

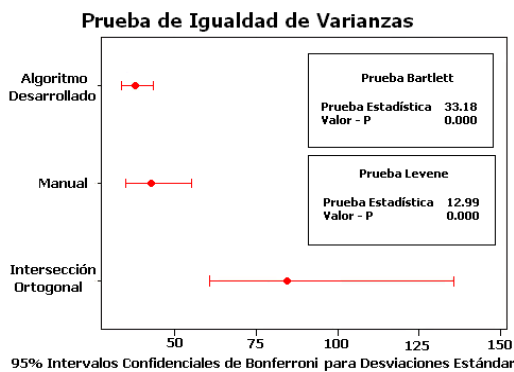


Fig. 9. Condición de pertenencia al eje MBCG

**Tabla 1.** Prueba de igualdad de varianzas de las medidas obtenidas con el algoritmo en diferentes aumentos.

Prueba de Igualdad de Varianzas MEDIDAS versus AUMENTO				
Intervalo de Confianza de Bonferroni del 95% para Desviaciones Estándar				
AUMENTO	MEDIDAS	Mínimo	StDev	Máximo
1	179	33,4026	37,9981	43,9329
2	310	36,6195	40,4371	45,0713
3	221	38,2923	43,0278	48,9876
4	204	36,1175	40,7685	46,6776
5	54	35,9761	45,0894	59,7026

Prueba de Bartlett (Distribución Normal)  
Valor  $p = 0,386$

Prueba de Levene (Cualquier Distribución Continua)  
Valor  $p = 0,102$

*Prueba 3.* Se realizó la prueba de igualdad de varianzas de las medidas obtenidas por tres diferentes métodos de medición del espesor de la MBCG. Los métodos

empleados fueron: el algoritmo desarrollado, el método manual y el de intersección ortogonal. Los resultados obtenidos (Fig. 9) indican una menor dependencia del usuario al emplear el algoritmo desarrollado. Esto corrobora la variabilidad inter e intra observador que reporta la literatura para las metodologías actualmente empleadas. Con esto, se verificó la conveniencia del desarrollo y el beneficio que ofrece al patólogo.

Adicionalmente, se estableció el grado de correlación entre las tres metodologías. Se realizó una ANOVA de las medidas obtenidas por los tres métodos. Esta prueba indicó que la probabilidad de que las 3 medidas sean iguales es nula ( $p = 0.00$ ), en este caso, el método de intersección ortogonal tiene una media distinta a las otras metodologías. Resultado que corrobora el entregado por la prueba de igualdad de varianzas, que indicó que no existe similitud entre las varianzas de los métodos evaluados ( $p < 0.05$ ).

La diferencia encontrada genera la necesidad de realizar pruebas comparativas con otros métodos utilizados internacionalmente y que no son empleados en el país. Además, ratifica la necesidad de establecer una metodología de medición para cada laboratorio. El conocimiento de las muestras recibidas y su rigurosa preparación permiten la obtención de imágenes con mayor contraste y nitidez, que permiten tener mejor resultados en la medición.

### 3 Conclusiones

En este trabajo se implementó un algoritmo que extrae el eje central, identifica los contornos de la MBCG y calcula el espesor promedio de la membrana basal. La segmentación de la estructura en análisis se logra con los criterios de detección empleados, diferencia en el nivel de gris y gradiente relativo.

Del análisis fotométrico de las microfotografías se observó que las estructuras adjuntas a la membrana tienen un nivel de gris muy similar a ésta. Además, se debe tener en cuenta que las características fotométricas se ven influenciadas por la tinción de la biopsia, el corte de la muestra y el contraste e iluminación establecidos para el microscopio. El empleo de un protocolo de adquisición de imágenes disminuye las diferencias y mejora la segmentación.

El algoritmo desarrollado presenta una mayor reproducibilidad y menor variabilidad inter e intra observador que los métodos de medición manual y de intersección ortogonal actualmente empleados en rutina clínica.

Con el algoritmo desarrollado se consiguen mediciones más precisas del espesor de la MBCG, se agiliza el proceso de análisis y se facilita el establecimiento del espesor de la membrana en diferentes condiciones diagnósticas, normales ó patológicas. Adicionalmente, se contribuye en el mejoramiento del proceso diagnóstico y en el desarrollo de investigaciones prospectivas y retrospectivas.

La organización de las microfotografías electrónicas digitales, las medidas del espesor de MBCG, y la información personal y diagnóstica del paciente en bancos de información, permite la revisión de diagnósticos médicos y el desarrollo de estudios acerca de diversas patologías renales.

**Agradecimientos.** Se expresa los agradecimientos al personal del Departamento de Patología de la Fundación Santa Fe de Bogotá, lugar de adquisición de las microfotografías estudiadas. Especialmente al Dr. Rafael Andrade, las Doctoras. Rocío López y Paula Esquinas. También, al Doctor Jaime Ruiz, de la Universidad del Rosario por su pertinente asesoría bioestadística y a la Doctora Nubia Aguilar por colaboración durante todo proceso.

## Referencias

1. Walker, P., Cavallo, T., Bonsib, S., et al. Practice guidelines for the renal biopsy. *Modern Pathology*. 17, 1555--1563 (2004).
2. Monserrat, A. J. and Lago, N. R.. Utilidad de las técnicas de microscopía electrónica en el diagnóstico de las glomerulopatías. *Rev. Nefrol. Diál. y Transpl.* 30, 25---29 (1991).
3. Esquinas, P., López, R., et al, Metodología simplificada para la medición del grosor de la membrana basal glomerular en biopsias renales utilizando microscopia electrónica de transmisión. 8th Inter American Congress of Electrón Microscopy. La Habana-Cuba. (2005).
4. Gundersen, H. J., Jensen, T. B. and Osterby, R. Distribution of membrane thickness determined by lineal analysis. *J Microsc.* 113, 27---43 (1978).
5. Carlson, E. C., Audette, J. L., et al. Ultrastructural morphometry of capillary basement membrane thickness in normal and transgenic diabetic mice. *The Anatomical Record Part A*. 271a, 332—334 (2003).
6. Mac-Moune Lai, F., Szeto, Ch. Ch., Choi, P., et al. Isolate diffuse thickening of glomerular capillary basement membrane: a renal lesion in prediabetes?. *Modern Pathology*. 17, 1506--1512 (2004).
7. Ong, S. H., Giam, S. T., Jayasooriah and Sinniah, R. Adaptive window-based tracking for the detection of membrane structures in kidney electron micrographs. *Machine vision and applications*. 6, 215--223 (1993).
8. Suri, J. S., Liu, K., Reden, L., and Laxminarayan, S. A review on MR vascular image processing: skeleton versus nonskeleton approaches: Part II. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*. 6, 338--350 (2002).
9. Van, R., Bitter, I. and Butman, J. A. Semi automatic spinal cord segmentation and quantification. *International Congress Series*. 1281, 224--229 (2005).
10. Guézic, A., Pennec, X. and Ayache, N. Medical image registration using geometric hashing. *IEEE Computational Sci. Eng., Special Issue on Geometric Hashing*. 4, 29-41 (1997).
11. Chaudhuri, S., Chatterjee, S., Katz, N., et al. Detection of blood vessels in retinal images using two-dimensional matched filters. *IEEE Transactions on Medical Imaging*. 8, 263--269 (1989).
12. Franck, A., Lavialle, O. and Baylou, P. A deformable and expansible tree for structure recovery. *International Conference on Image Processing ICIP 98*. 1, 241--245 (1998).
13. Haris, K., Efstratiadis, S. N., Maglaveras, N., et al. Coronary arterial tree extraction based on artery tracking and mathematical morphology. *Computers in Cardiology*. 25, 769--772 (1998).
14. Hernández Hoyos M., Serfaty J.M., Maghiar A., Mansard C., Orkisz M., Magnin I.E., Douek P.C. Evaluation of semi-automatic arterial stenosis quantification. *International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery*. 1(3), 167—175 (2006).
15. Carrillo J.F., Hernández Hoyos M., Dávila E.E., Orkisz M. Recursive tracking of vascular tree axes in 3D medical images. *International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery*. 1(6), 331—339 (2007).