

RECONSTRUCCIÓN 3D DE IMÁGENES MULTIMODALES PARA EVALUAR LA DISTRIBUCIÓN VOLUMÉTRICA DE BIOSENSORES DE FOLATO

Julián Ramírez-Nava¹, Leticia Santos-Cuevas², e Isaac Chairez³

¹ Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Edo. De México

² Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, Edo. De México

³ Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Ciudad de México

Resumen— El objetivo de este estudio fue caracterizar la distribución volumétrica *in-vivo* de tres biosensores de folato mediante el uso de diferentes modalidades de imagen (rayos X, fluorescencia, luminiscencia Cerenkov e imagen radioisotópica) a través del desarrollo de un algoritmo de reconstrucción tridimensional. El sistema de imagen preclínica y multimodal *in vivo* Xtreme (BVX), junto al sistema de rotación de muestras (MARS), fueron utilizados para adquirir imágenes bidimensionales que fueron procesadas para obtener la reconstrucción tridimensional. Se adquirieron imágenes de ratones a diferentes tiempos (distribución del biosensor) en las 4 distintas modalidades. La transformada inversa de Radon y la retroproyección filtrada fueron las técnicas utilizadas para la reconstrucción. El algoritmo desarrollado en Matlab fue capaz de calcular los perfiles volumétricos de tres biosensores de folato en los tumores y riñones de los ratones. No se detectaron diferencias significativas en las cuantificaciones volumétricas entre técnicas de medición estándar y la propuesta en este estudio.

Palabra clave— Reconstrucción tridimensional, transformada inversa de Radon, imagen *in-vivo*, biosensores de folato.

I. INTRODUCCION

La imagen molecular se puede definir como la representación visual, caracterización y cuantificación de algunos procesos biológicos celulares y subcelulares [1]. La información en imagen molecular se obtiene mediante el uso de biosensores dirigidos a blancos biológicos específicos. El biosensor emite una señal detectable que permite adquirir una imagen, ya que son marcados por ejemplo con radionúclidos gamma o emisores de positrones, fluoróforos, etc.

El ácido fólico y la bombesina son moléculas cuyos receptores celulares se encuentran sobre-expresados en cáncer de mama. Por lo que, utilizados como biosensores permiten obtener imágenes *in vivo* de la actividad tumoral.

Los sistemas de imagen multimodal combinan las fortalezas de diferentes tipos de adquisición de imagen para producir plataformas híbridas con características superiores a las de cualquiera de sus componentes individuales. Un ejemplo de los sistemas de imagen multimodal, es el *in vivo* Xtreme (BVX) de la empresa Bruker [2,3]. Dicho equipo junto con el accesorio de rotación MARS (Multimodal Animal Rotation System, por sus siglas en inglés) que permite obtener imágenes bidimensionales en las modalidades de rayos X, fluorescencia, luminiscencia e imagen radioisotópica de especies pequeñas con tecnología instrumental óptica.

El objetivo de este estudio fue desarrollar un algoritmo basado en la retroproyección filtrada y en la transformada

inversa de Radon de imágenes 2D adquiridas a diferentes proyecciones con el sistema BVX/MARS para realizar reconstrucciones tridimensionales a partir de fusiones geométricas de imágenes. Las imágenes reconstruidas fueron utilizadas para evaluar la distribución volumétrica *in vivo* de 3 biosensores de folato. En particular, el método de reconstrucción fue aplicado para medir la captación de los biosensores en riñones y tumor. La correlación de las modalidades de rayos X, fluorescencia, luminiscencia Cerenkov e imagen radioisotópica adquiridas con el BVX/MARS permitió caracterizar la captación y distribución de los biosensores *in vivo*.

II. METODOLOGIA

Modelo animal: Se utilizaron ratones (20-24 g) BALB/c, atímicos nu/nu con tumores inducidos de la línea celular de cáncer de mama humano T47D. Los ratones se anestesiaron con una mezcla de isoflurano al 2 % en oxígeno al 100%. Se les administró vía intravenosa el medio de contraste (imagen de rayos X) Xenetix 350, la formulación de ^{99m}Tc-Folato-Bombesina (imagen radioisotópica), ¹⁷⁷Lu-Folato-Bombesina (imagen de luminiscencia Cerenkov), y FolateRSense™ 680 (imagen de fluorescencia).

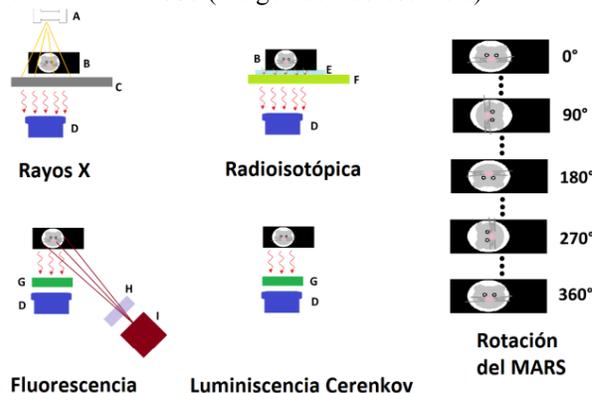


Fig. 1. Elementos del BVX con los que se adquieren las imágenes de 4 diferentes modalidades

Adquisición de las imágenes: Todas las imágenes fueron adquiridas con el sistema BVX y el accesorio MARS (Fig.1) después de la administración de los biosensores y medio de contraste a diferentes tiempos del tratamiento.

Los parámetros utilizados en las imágenes de rayos X fueron: energía de 45 kVp, corriente de 497 μ A, filtro de aluminio de 0.8 mm. El tiempo de exposición fue de 10 segundos, binning de 1 x 1, campo de visión (FOV) de 12.5 cm, cubriendo 0-360° con pasos de 2° (181 imágenes).

- Las imágenes radioisotópicas fueron adquiridas con la pantalla de fósforo ultra-delgada y uniforme, tiempo de exposición de 3 minutos, binning de 4x4, FOV de 12,5 cm y pasos de 20° (19 imágenes). Un colimador de hoyos paralelos se utilizó para reducir el efecto de la radiación dispersa.
- Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con un tiempo de exposición de 2 segundos; el binning de 4x4, FOV de 12,5 cm y pasos de 15° (25 imágenes). Las longitudes de onda de excitación y emisión del FolateRSense™ 680 fueron 690 y 750 nm, respectivamente.
- En el caso de las imágenes de luminiscencia Cerenkov el tiempo de exposición fue de 5 minutos, el binning de 4x4, el FOV de 12.5 y pasos de 30° (13 imágenes).

Algoritmo de reconstrucción tridimensional:

Un algoritmo basado en la transformada inversa de Radon y la retroproyección filtrada se desarrolló para reconstruir tridimensionalmente el objeto detectado a partir de las proyecciones de las imágenes adquiridas. El algoritmo computacional fue programado en Matlab R2013a. Los pasos generales del algoritmo de reconstrucción se describen a continuación:

Las imágenes de las diferentes modalidades se exportaron en archivos con extensiones TIFF con la finalidad de realizar su lectura. Posteriormente se aplicó una operación de re-escalamiento para que todas las imágenes se redujeran al tamaño de 512 x 512 píxeles. Con las imágenes originales de cada adquisición se construyó una matriz tridimensional que fue utilizada en la instrumentación de la transformada Radon. Considerando qué para cada modalidad, la adquisición de las imágenes en todos los ángulos (0-360° con pasos de 1°) no es viable debido al tiempo de procesamiento interno del BVX, se consideró tomar la mayor cantidad de imágenes originales por modalidad y se calcularon imágenes virtuales a través de un algoritmo de interpolación entre imágenes.

Los valores de intensidad de píxel correspondiente a un tipo de tejido o una actividad en particular se caracterizaron para cada modalidad de imagen con el fin de discernir entre ellos en la imagen reconstruida.

- Esqueleto: En las imágenes de rayos X se aplicó un ajuste previo de los valores de intensidad a través de la regulación de contraste para conseguir un realce y mejora en las regiones de hueso [4]. Con esto, el contraste de las imágenes de salida aumentó en al menos 88.07%. Posteriormente, para mejorar los bordes de los huesos del ratón se aplicó un filtro de “afilado” a cada imagen [5]. Entonces, se creó y aplicó una máscara que permitiera recuperar toda la información correspondiente a huesos en cada proyección.
- Tumores: Debido a la variabilidad morfológica del tumor, estas regiones de interés (ROI) no se calcularon automáticamente. Para este propósito, se dibujaron máscaras binarias utilizando el proceso de dibujo a mano alzada. A continuación, cada máscara dibujada se aplicó a cada una de las proyecciones, dejando sólo las zonas tumorales.

- Riñones: Teniendo en cuenta su ubicación espacial y los tejidos circundantes, se creó una máscara binaria automática por cada proyección. Las máscaras binarias se superpusieron a las imágenes de rayos X, dejando sólo el área de los riñones.
- Captación/ Actividad de los biosensores: Se realizó un ajuste preliminar de la intensidad de imagen. Para observar solo las regiones de captación de los biosensores, se realizó una apertura morfológica en escala de grises, después, se aplicó una máscara binaria creada automáticamente y esta se superpuso a las imágenes de fluorescencia, luminiscencia Cerenkov y las imágenes radioisotópicas.

De todo el conjunto de imágenes procesadas (reales y virtuales), se tomó la misma fila de cada imagen a cada ángulo de adquisición y se creó una nueva matriz. Este proceso se repitió para cada fila en todas las imágenes para formar una nueva serie de matrices tridimensionales. A cada matriz nueva, se le aplicó la transformada inversa de Radon a través del algoritmo de retroproyección filtrada [6]. Como resultado, se obtuvieron los cortes axiales del volumen tridimensional a ser reconstruido. Posteriormente, se logró visualizar el volumen reconstruido a través de la implementación de isosuperficies

Fusión tridimensional y cuantificación volumétrica

La fusión tridimensional de las reconstrucciones se basó en la superposición de los valores obtenidos en las matrices de reconstrucción y la modificación del parámetro alpha. Dicho parámetro es específico en cada objeto gráfico y puede tomar valores entre 0 y 1, donde 0 representa la transparencia total del objeto y el 1 despliega al objeto con su intensidad total.

Una vez delimitado el volumen a estudiar, el algoritmo realizó la cuenta de los vóxeles que aportaban información a dicho volumen. Posteriormente, el algoritmo multiplicó el número de vóxeles por las dimensiones de éstos. En el caso de los objetos reconstruidos, las dimensiones de cada vóxel fueron de 0.181 mm x 0.181 mm x 0.201 mm. Se realizó la cuantificación volumétrica de los tumores de los ratones estudiados, adicionalmente, se utilizaron (1) y (2) como referencia en la evaluación de los volúmenes tumorales obtenidos por el algoritmo de reconstrucción propuesto [7].

$$\pi / 6 \times L \times W \times H \quad (1)$$

$$0.5 \times L \times W \times H \quad (2)$$

donde L es el largo, H el alto y W el ancho del tumor.

Cálculo del porcentaje de captación volumétrica en riñones y tumor

Con (3), se obtuvo el porcentaje de captación volumétrica (%CV) de los biosensores en los tumores (%CVT) y riñones (%CVR) de los ratones. Este se calculó dividiendo el volumen de la absorción de cada biosensor (VAB) entre los volúmenes totales de la estructura (VTE) bajo análisis.

$$\%CV = \frac{VAB}{VTE} \times 100 \quad (3)$$

Cuantificación de Actividad

Corrección por atenuación: Se calculó un factor de corrección por atenuación (AF). Para ello, se emplearon diferentes tubos con actividades conocidas de ^{99m}Tc (1.5-12 MBq/200 μl , n=3) y dos arreglos experimentales diferentes. En el primero, se colocó al ratón entre la fuente de ^{99m}Tc y la cámara CCD. En el segundo, se utilizó la misma fuente radiactiva pero no se colocó al ratón dentro de la cámara rotatoria del MARS. La actividad de cada muestra (con y sin ratón) se cuantificó a 0° , 90° , 180° , 270° y 360° . El factor de atenuación (4) se calculó como el cociente de la intensidad total sin el ratón (IWOM), dividido por la intensidad total incluyendo al ratón (IWM).

$$AF = \frac{IWOM}{IWM} \quad (4)$$

Corrección por dispersión: Se utilizaron 9 tubos con diferentes actividades de ^{99m}Tc (actividades de 14-355 MBq/200 μl , n=5). Utilizando el sistema BVX, se adquirieron imágenes de cada tubo. Las imágenes radioisotópicas se ajustaron para observar solamente los píxeles con cuentas de radiación primaria y dispersa (Itot). El área de los píxeles correspondiente a los tubos con radiación primaria, se calculó a través del uso de una imagen de rayos X del tubo (Ia) y la creación de una máscara binaria (M1). La máscara 2 (M2) correspondiente a la contribución de radiación secundaria, se calculó como el complemento de M1. La imagen Iact, se obtuvo a través de la multiplicación directa (pixel por pixel) de Itot y M1. Un proceso similar se utilizó para obtener la imagen Idis, que corresponde a la aplicación de la máscara M2 sobre Itot. Como siguiente paso, se calculó la intensidad normalizada (intensidad / pixel) en cada imagen, la intensidad total por los píxeles de la imagen completa (INt), la intensidad normalizada debido a la actividad en el tubo (INa) y la intensidad normalizada debido a la dispersión (INd). A partir de esta información, la relación de [INt vs (INt- INd)] se analizó y se ajustó en una función que corrigió por dispersión de la radiación.

Calibración y cuantificación de actividad: Después de haber sido corregidas por atenuación y dispersión, las imágenes de los nueve tubos con diferentes actividades adquiridas por el BVX, se utilizaron como datos de entrada en el algoritmo de reconstrucción 3D. Con ellas se obtuvo el volumen de reconstrucción correspondiente a la actividad de los tubos y se calculó el valor medio del vóxel (valor en escala de grises) en cada caso. Con estos datos, se obtuvo el factor de calibración del sistema representado por el valor medio del vóxel (VMV) vs. actividad radiactiva (A) en MBq (Megabecquerles). Para calcular el %A (porcentaje de actividad radiactiva en cada órgano) se utilizó como 100% la A inicial administrada a cada ratón.

II. RESULTADOS

La Fig.2 muestra las imágenes de tres ratones diferentes y la captación de biosensor visualizado en cada modalidad de imagen.

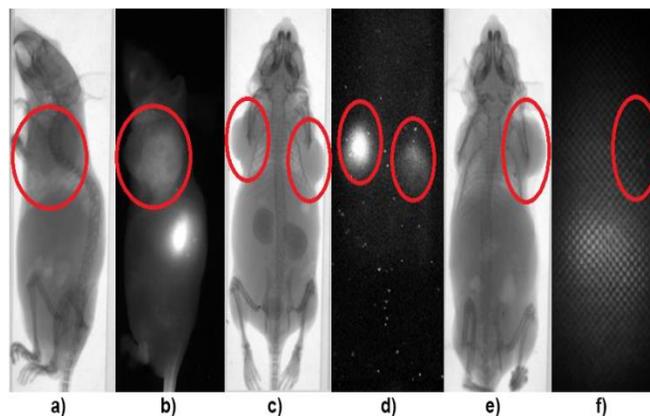


Fig. 2. Ejemplos de imágenes de ratones adquiridas en diferentes modalidades con el sistema XTREME; a,c,e) Imágenes de rayos X, b) imagen de fluorescencia d) imagen de luminiscencia Cerenkov f) imagen radioisotópica. Los círculos rojos muestran la ubicación de los tumores.

Los resultados del algoritmo de reconstrucción tridimensional mostró imágenes de las vistas 3D de las estructuras anatómicas representativas (esqueleto, tumores y riñón). Las imágenes fusionadas muestran una correspondencia anatómica adecuada (respecto a la imagen de rayos X) entre las regiones de captación de interés y la reconstrucción del esqueleto (Fig.3).

En la Tabla. 1, se muestran los cálculos de los volúmenes tumorales y los porcentajes de captación volumétrica de los biosensores en el tumor y riñones a las 24 hrs. Las comparaciones por un análisis de varianza (ANOVA $p < 0.05$) de cuantificación volumétrica entre el algoritmo y los métodos reportados no mostraron diferencia estadísticamente significativa, tampoco lo hicieron la comparación de los valores de porcentaje de captación volumétrica entre ratones de las mismas modalidades.

Corrección por atenuación: El factor de corrección por atenuación calculado fue de 3.42. Dicho factor, se utilizó para corregir la intensidad de la actividad de cuantificación en imágenes ratones de acuerdo a (5).

$$I_c = 3.42 \times I_o \quad (5)$$

Donde I_c representa la intensidad de pixel corregida e I_o corresponde a la intensidad de pixel sin corregir por atenuación.

Corrección por dispersión: La función de ajuste obtenida al estudiar la relación de [INt vs (INt- INd)] se ajustó a (6) con un $R^2=0.99$ (Coeficiente de correlación).

$$INt - INd = (0.89 \times INt) - 123.03 \quad (6)$$

Esta ecuación se utilizó en el algoritmo de cuantificación de actividad, para eliminar las cuentas en la región de interés debido al efecto de dispersión.

Calibración y cuantificación de actividad: El factor de calibración del sistema está definido por (7) que representa la relación entre A y VMV, con un $R^2=0.99$ (coeficiente de correlación). Esta función fue utilizada en el algoritmo de cuantificación para determinar A del biosensor marcado con ^{99m}Tc en los riñones y tumores de los ratones a partir de la reconstrucción de dichos órganos. En la tabla 2 se muestran los resultados de %A.

$$A(MBq) = (0.0135 * VMV) + 0.0646 \quad (7)$$

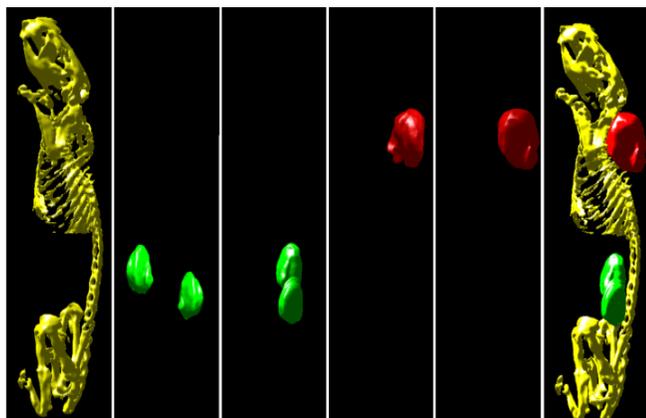


Fig. 3 Reconstrucción tridimensional del esqueleto, riñones y tumor de un ratón estudiado

Tabla.1 Cuantificación volumétrica tumoral del algoritmo de reconstrucción y el porcentaje de captación volumétrica de los biosensores (\bar{x} +DE, n=3)

BIOSENSOR	RATÓN	VT (cm3)	%CVT	%CVR
^{99m} Tc-Folato-Bombesina	1	2.80±0.13	18.63±1.39	73.35±0.24
	2	1.02±0.06	16.79±1.50	71.77±0.66
	3	2.64±0.24	14.00±1.58	68.05±0.11
FolateRSense TM 680	4	2.86±0.19	60.06±1.98	96.01±1.44
	5	2.03±0.13	52.71±0.71	94.19±1.33
	6	0.92±0.02	56.21±1.68	95.02±2.19
¹⁷⁷ Lu-Folato-Bombesina	7	0.56±0.04	14.36±0.96	34.08±2.77
	8	0.82±0.01	10.06±0.53	40.96±1.50
	9	0.16±0.01	12.27±0.97	40.96±1.50

VT=Volumen tumoral ; %CVT=Porcentaje de captación volumétrica del tumor ; %CVR=Porcentaje de captación volumétrica de los riñones; \bar{x} =Valor promedio; DE=Desviación estándar

Tabla.2 Biodistribución en ratones con tumores T47D inducidos, después de la inyección de ^{99m}Tc-Folato-Bombesina, expresado como porcentaje de actividad inyectada por órgano (%A) (\bar{x} +DE, n=3)

Tejido	%A ± DE		
	0.5 h	2 h	24 h
Tumor	5.69±0.29	4.52±0.23	0.57±0.04
Riñones	22.23±5.21	17.66±4.14	1.21±0.05

%A= Porcentaje de actividad captada; \bar{x} =Valor promedio; DE=Desviación estándar

IV. DISCUSIÓN

El algoritmo de reconstrucción de imagen tridimensional desarrollado en este estudio se puede extrapolar fácilmente a diferentes tipos de adquisición de imágenes 2D. De hecho, se aplicó el mismo método en tres diferentes modalidades de imagen y no se detectaron diferencias significativas entre los

diversos métodos de cuantificación volumétrica. Esta flexibilidad mostrada por el algoritmo desarrollado en este estudio es una notable ventaja en comparación con los métodos de reconstrucción similares.

La superposición de las diferentes modalidades de reconstrucción de imagen fue también una novedad del algoritmo propuesto. El método de fusión de imágenes entre diferentes modalidades de este estudio puede resolver hasta cuatro diferentes modalidades como las incluidas en el sistema BVX. Esta capacidad del método confirma la posición anatómica de las regiones de interés y su relación con la captación funcional de biosensores. Las reconstrucciones de imágenes desarrolladas en este estudio pueden ser comparables a la que realizan otras plataformas tecnológicas. Esta condición de adaptabilidad también es útil porque la superposición de imágenes puede ejecutarse incluso con imágenes obtenidas de diferentes equipos pero con algoritmos de procesamiento similares.

V. CONCLUSIONES

Se desarrolló exitosamente un método integral para caracterizar la captación volumétrica tumoral de 3 diferentes biosensores de folato. Un conjunto de métodos de procesamiento de imagen (aumento de contraste, filtrado, etc.) mejoraron las imágenes originales. Las técnicas propuestas permitieron realizar correcciones por atenuación y dispersión de la radiación para obtener resultados más confiables en la cuantificación de las imágenes radioisotópicas.

La fusión de las imágenes reconstruidas resultantes, permitió la evaluación de la especificidad y la biodistribución de los tres biosensores.

Varias oportunidades de investigación surgen del método desarrollado en este estudio, como pueden ser: el modelado cinético de la distribución volumétrica de diferentes biosensores, la evaluación de la distribución volumétrica tumoral de más biosensores detectados por alguna modalidad de imagen del sistema BVX y la modificación de las técnicas de procesamiento de imágenes para mejorar la calidad de las imágenes reconstruidas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wang DS et al. Molecular Imaging: A Primer for Interventionalists and Imagers. J. Vasc. Interv. Radiol. 2006;17(9):1405-1423.
2. Chu Z, LaSance K, et al. In Vivo Optical Imaging of Brain Tumors and Arthritis Using Fluorescent SapC-DOPS Nanovesicles. J. Vis. Exp. 2014;12:1-7.
3. Bufkin K. et al. Multimodal Imaging Trials with Zebrafish Specimens. The Winthrop McNair Research Bulletin: Vol. 1, Article 3.
4. Hautière N, Tarel J-P, et al. Blind Contrast Enhancement Assessment by Gradient Ratioing At Visible Edges. Image Anal. Stereol. 2008;27:87-95.
5. Polesel A, Ramponi G, Mathews VJ. Image enhancement via adaptive unsharp masking. IEEE Trans. Image Process. 2000;9:505-10.
6. Kuo C, Coquoz O, Troy TL, Xu H, Rice BW. Three-dimensional reconstruction of in vivo bioluminescent sources based on multispectral imaging. J. Biomed. Opt. 2007;12:024007.
7. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. Cancer Chemother. Pharmacol. 24:148-54.