

Segmentación de Contornos Celulares utilizando Estimadores Fractales

Adrián Salvatelli¹ José Luis Caropressi² Claudio Delrieux³
María Fernanda Izaguirre⁴ Víctor H. Casco⁴

¹ Depto. de Bioingeniería — Grupo Inteligencia Artificial — Facultad de Ingeniería, Bioingeniería — UNER, Ruta 11, K.10, Oro Verde, Entre Ríos, adrian.salvatelli@gmail.com (Becado año 2006- PROACUM, UNER)

² Depto. de Matemática e Informática — Facultad de Ingeniería, Bioingeniería UNER, Ruta 11, K.10, Oro Verde, Entre Ríos — Depto. de Informática, Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas — UNL Paraje El Pozo, Santa Fe — caropres@fich1.unl.edu.ar (Becado año 2006- PROACUM, UNER).

³ Depto. Ing. Eléctrica y Computadoras, UNS — Av. Alem 1253, (8000) Bahía Blanca — claudio@acm.org (Parcialmente financiado por SECyT-UNS)

⁴ Laboratorio de Microscopía — Facultad de Ingeniería Bioingeniería — UNER vcasco@bioingenieria.edu.ar (Parcialmente financiado por PID: 6082-1)

Resumen

La segmentación en imágenes biológicas es de importancia crucial para la determinación de descriptores que permitan, entre otras cosas, elaborar modelos de diversos procesos biológicos, cotejar parámetros en dichos modelos, y proponer o rebatir teorías. Sin embargo, el proceso de segmentación de la información necesaria para el cómputo de los descriptores es casi siempre un proceso asistido, dado que la calidad de las imágenes que se pueden generar con la tecnología actual de microscopía clásica, adolecen de defectos que impiden el uso adecuado de técnicas de segmentación autónoma.

En este trabajo se propone el uso de la dimensión fractal box (FBD) como descriptor local, para la segmentación de imágenes de microscopía de la piel de embriones de anfibios en las que, usando técnicas de inmunofluorescencia, se ha marcado E-Cadherina, una molécula de adhesión celular, expresada en membranas celulares y responsable de la adhesión dependiente de Ca^{2+} . El propósito del presente trabajo fue elaborar un *workflow* de procesamiento para ser aplicado sin supervisión a un grupo no determinado de imágenes de la misma naturaleza, de las que se intenta extraer la información requerida para los propósitos de caracterización y eventual cuantificación.

1. Introducción

Las modernas técnicas morfológicas de Biología Celular y Molecular tratan de comprender las complejas funciones celulares y las interacciones de las células con su entorno.

Para lograr esto, es importante poder describir los patrones de localización a nivel sub-celular de las distintas moléculas implicadas. Desde principios de la década del '70 la microscopía de fluorescencia ha sido una de las herramientas más poderosas para localizar moléculas en el interior de cualquier tipo de célula [4].

Sin embargo, en la mayoría de los casos cuando las imágenes corresponden a especímenes gruesos u organismos teñidos *in toto* (es decir, en forma completa), se ven degradadas. Estas imágenes obtenidas mediante microscopía de seccionamiento óptico de fluorescencia, presentan diversas dificultades a la hora de implementar un algoritmo automático de detección de características de forma y patrones en las células. Entre ellas se pueden mencionar, ruido multiplicativo, aditivo, desenfoques ópticos, variación en el espesor del espécimen, ruido electrónico de digitalización, etc.

En este trabajo mostramos un *workflow* de procesamiento, basado en el análisis de la dimensión fractal Box local. Utilizamos, como espécimen, imágenes de embriones de *Bufo arenarum*, en las cuales se han marcado moléculas de adhesión celular por técnicas de inmunofluorescencia. Estas imágenes poseen todos los defectos mencionados más arriba. Los resultados aquí presentados se muestran satisfactorios, dado que el procesamiento conserva las intensidades, disminuye la información en baja frecuencia y no amplifica en altas frecuencias en estas imágenes. Esto permite la ulterior aplicación de algoritmos de reconocimiento geométrico para determinar la geometría de membranas celulares, y poder validar los modelos biológicos estudiados.

En la siguiente Sección se describe en detalle el método de la dimensión fractal box, y el uso de estimadores locales de la dimensión fractal para segmentación. En la Sección 3 se elabora el *workflow* completo de procesamiento autónomo. En la Sección 4 se muestran los resultados obtenidos, y en la Sección final se discuten las conclusiones y el trabajo futuro a desarrollar.

2. Estimación local de la dimensión fractal *box*

En imágenes, así como en otros conjuntos cuya función característica es no determinística, existe una relación directa entre la dimensión fractal y el coeficiente de autocorrelación de la función [7, 5]. Esta relación justifica la posibilidad de estimar la dimensión fractal en este tipo de conjuntos por métodos estadísticos que extienden a las definiciones clásicas de fractalidad como por ejemplo la dimensión de Hausdorff (o de autosimilitud).

Un conjunto acotado A en un espacio es *autosimilar* si se puede mostrar que A es la unión de N_r copias distintas (no solapadas) de sí mismo, escalada por encima o por debajo de un radio r . En este caso, la dimensión fractal DF de A está dada por la relación:

$$D = \lim_{r \rightarrow 0} \frac{\log(N_r)}{\log(1/r)} \quad (1)$$

El concepto de autosimilitud puede ser utilizado para estimar la dimensión fractal de un conjunto arbitrario. Existen diversos métodos para calcular esta estimación, la mayoría de los cuales se aplican a imágenes previamente binarizadas. La ecuación 1, es la base de la estimación de la dimensión fractal. La dimensión box se basa en medir el conjunto a evaluar sobre una grilla de resolución y posición variable.

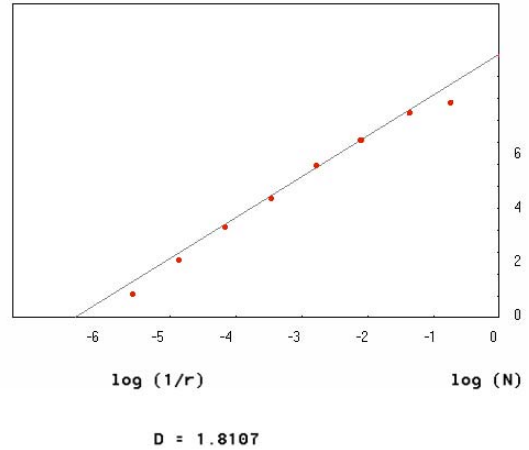


Figura 1: Ejemplo de la estimación de la dimensión fractal de una imagen: (a) Una imagen de entrada, y (b) la recta de cuadrados mínimos.

En este caso N_r está determinada de la siguiente manera: dada una imagen de $M \times M$ pixels, se hace una partición de $s \times s$ donde $M/2 \geq s > 1$ y $s \in \mathbb{Z}$. Luego el radio es $r = s/M$. Se considera la imagen binarizada. En particular, el umbral de binarización se ajusta automáticamente por estimadores Bayesianos. Luego, el espacio (x, y) está particionado en una grilla cuya celdas son de lado s . Si algún pixel de A cae sobre una celda de la grilla, se considera que dicha celda contribuye a N_r . Sumando todas las contribuciones sobre la grilla se obtiene el valor N_r para dicha partición. N_r se calcula para diferentes valores de r en posiciones distintas. Luego, la dimensión fractal D se estima como la pendiente de la recta de cuadrados mínimos que ajusta $\log(N_r)$ vs. $\log(\frac{1}{r})$ (ver Fig. 1) [8].

Para poder establecer estimaciones locales de D debería poderse encontrar una correlación a lo largo de varios órdenes de magnitud de s , lo cual no siempre es posible. Por dicha razón, cuando se dispone de pocos valores, los valores de D obtenidos se toman como provisorios. Éstos pueden ser utilizados en forma local como estimadores en una imagen para su segmentación, tomando una sub-imagen centrada en el pixel a estimar. Sub-imágenes de mayor tamaño producen mejores estimaciones, pero con un costo computacional mucho mayor. En este trabajo tomamos grillas de hasta 7×7 pixels como buena relación de compromiso, lo cual mostró experimentalmente ser adecuado para nuestros objetivos.

Si la figura y el fondo en una imagen tienen diferentes distribuciones estadísticas, tendrán diferentes dimensiones fractales, y sería posible segmentarlas de una manera adecuada, mucho mejor de lo que ocurre con la segmentación basada en la umbralización de la luminancia. En la Fig. 3a representamos la dimensión box por medio de niveles de gris (donde la dimensión 0 se corresponde con negro y la dimensión 2 con blanco). En la Fig. 3b se muestra el histograma de las frecuencias relativas de la dimensión box, junto con los tres criterios de elección de valor umbral (Euclídeo, Bayesiano, y distancia mínima). En la Fig. 3c se muestra la imagen segmentada utilizando como valor umbral el discriminante Bayesiano de la dimensión Box.

En imágenes en las cuales la detección de fronteras con operadores de convolución es inaplicable (con ruido multiplicativo, desenfoque, movimiento, etc.), esta estrategia au-

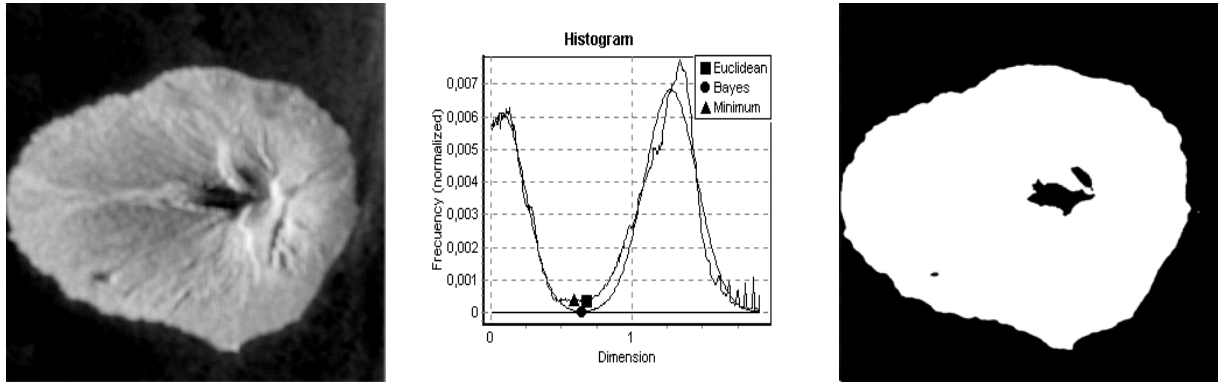


Figura 2: (a) Dimensión box local D en la imagen de la Fig. 1a (representada como niveles de gris), (b) histograma de D y los valores de umbralización, y (c), umbralización utilizando clasificación Bayesiana de D .

tomática de segmentación es segura y robusta (ver [2]). Cuando el histograma no es bimodal, sin embargo, es necesario recurrir a un análisis más refinado. Puede seguir suponiéndose que el histograma se puede modelar con la superposición de dos Gaussianas, pero la metodología para encontrar los estimadores de las mismas es un poco más elaborado. En particular, un histograma unimodal con un sesgo hacia uno de sus lados puede considerarse como la superposición de dos Gaussianas simétricas lo suficientemente próximas como para que no exista un mínimo local entre sus medias. Por ejemplo, si el histograma está sesgado hacia la derecha, puede asumirse que del máximo hacia la izquierda domina la Gaussiana debida al valor más bajo de la dimensión box, y dicha Gaussiana puede encontrarse por ajuste de una versión simetrizada de este tramo del histograma. La segunda Gaussiana se encuentra por ajuste de la resta entre el histograma total y la primera Gaussiana. Este caso está ejemplificado en la Fig. 3.

3. El *workflow* de procesamiento

En esta sección describimos la aplicación de la segmentación por medio de descriptores fractales en los embriones de *Bufo arenarum*. Los mismos, en estadio 19 [3], fueron sometidos al siguiente protocolo: primero fueron fijados en Carnoy, lavados en PBS 1X a temperatura ambiente y luego tratados con Triton X-100 (SIGMA) 0.1 % en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron incubados en suero normal de cabra 1:20 por 35 minutos seguido de la incubación con el anticuerpo primario monoclonal anti-E-cadherina (hecho en rata; Transduction Laboratories, Lexington USA) 1:50 at 37°C por 75 minutos. Después de la incubación, los embriones fueron lavados en PBS 1X e incubados con el anticuerpo secundario (IgG-FITC, SIGMA) 1:64 a temperatura ambiente por 105 minutos y luego con PBS 1X; finalmente, las muestras fueron montadas en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories) para prevenir el decaimiento de la fluorescencia.

Las imágenes de este espécimen presentan una serie de problemas que se describen a continuación. En primer lugar, este tejido tiene un espesor variable, lo que hace que a simple vista no se encuentre el espécimen totalmente enfocado, con zonas desenfocadas en las que se verifica cierta pérdida de información. A medida que se desplaza en profun-

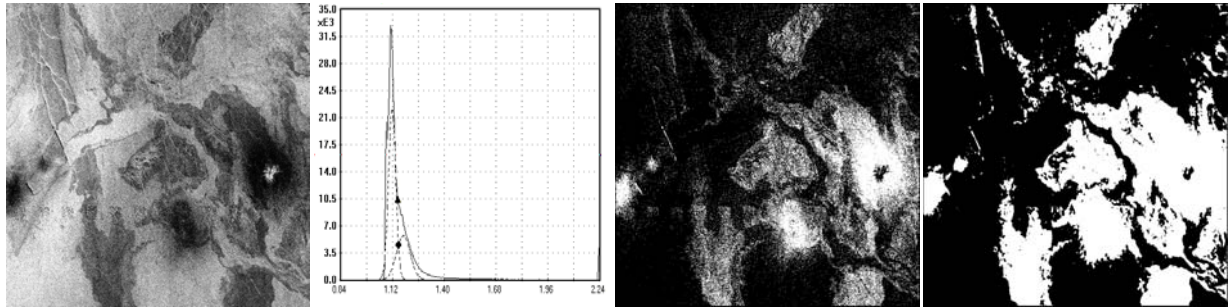


Figura 3: (a) Imagen de prueba, (b) histograma de su dimensión box (unimodal), (c) segmentación por luminancia, y (d) segmentación por dimensión box (en ambos casos utilizando discriminante Bayesiano).

didad en dicho espécimen, las imágenes obtenidas de cada sección óptica presentan zonas enfocadas y desenfocadas que cambian de posición a lo largo de la serie. Hay que tener en cuenta, además, que dichas imágenes se han adquirido con aumentos de 40X y 100X, lo cual hace que las condiciones iniciales para cualquier tipo de procesamiento cambien sustancialmente. Como se aprecia en la Fig. 4, las imágenes de 40X acentúan aún más el desenfoco y la pérdida de información.

Por otra parte, estas imágenes presentan ruido aditivo y de digitalización introducidos por el sistema electrónico de toma de imágenes, y ruido multiplicativo producto de la autofluorescencia de las células epiteliales. El fluoróforo unido a la molécula de adhesión celular (E-Cadherina), en cierta medida también se fija a la sustancia que se encuentra dentro de la célula y por ende, crea múltiples fuentes de luz que se interfieren mutuamente, produciendo este particular ruido que se observa en las imágenes de la Fig. 4. En dichas imágenes también se observa que presentan cambios de intensidad y contraste debido a la no uniformidad en la fijación del fluoróforo, y también debido a que a medida que pasa el tiempo desde la primera toma de imágenes a la última, el fluoróforo decae en su emisión de luz. Además, como era de esperar, se evidencia iluminación no uniforme debido a la falta de uniformidad del espesor del tejido.

Todos estos defectos determinan que las metodologías clásicas de segmentación fracasen, en forma independiente o en conjunto. En la Fig. 5 se observa el resultado de aplicar detección de contornos a la imagen de la Fig. 4(a) luego de un filtrado de mediana (para eliminar la sobsegmentación por ruido) y también la detección de contornos por medio del operador Canny óptimo. Los resultados muestran claramente que un ulterior paso de reconocimiento geométrico para encontrar las moléculas de adhesión celular está destinado al fracaso. Por dicha razón, se propone aquí un *workflow* organizado en tres etapas: realce de características y estandarización de la imagen, segmentación por detección de contornos, y por último etiquetado y extracción de características. En esta Sección nos ocupamos específicamente de las dos primeras.

3.1. Realce de características y estandarización de la imagen

Dada la imposibilidad de detectar contornos en forma directa, es que el procesamiento debe partir de algún método que realce las características geométricas locales (específicamente aristas y vértices, que se corresponden con la membrana celular y las moléculas

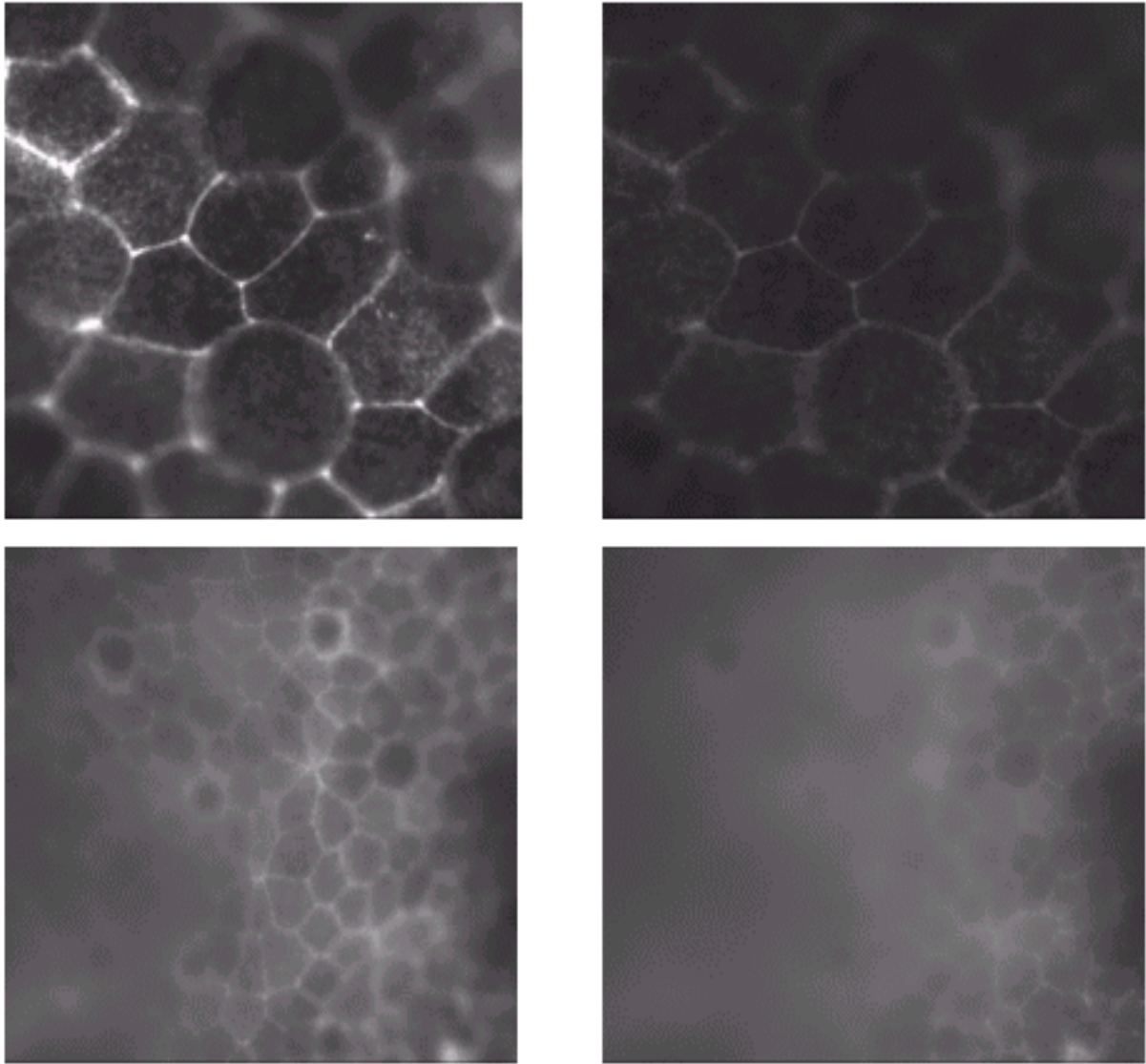


Figura 4: Imágenes de la piel de *Bufo arenarum* obtenidas por microscopía de fluorescencia de seccionamiento óptico. (a) Aumento 100x, primer corte de la serie. (b) Aumento 100x último corte de la serie. (c) Aumento 40X primer corte. (d) Aumento 40X último corte.

de adhesión celular, respectivamente). La aplicación de la DFB, en particular, resulta ser esencial para realzar las características geométricas, dado que los descriptores locales son bastante inmunes a los problemas que presentan estas imágenes, específicamente el ruido multiplicativo. En la Fig. 6 se observa la imagen resultante de aplicar DFB a la imagen de la Fig. 4(a) (representada como luminancias) junto con el histograma de distribución de la DF local. Se puede observar que este proceso ha logrado filtrar la zona con mayor ruido multiplicativo (zona en foco) sin alterar las características de bordes en las zonas originalmente desenfocadas, y además su histograma se aproxima a una distribución Gaussiana. Para este paso del proceso se ha determinado como parámetro de entrada (variable del *workflow*) el tamaño de la ventana de estimadores fractales locales, de manera que permita ser aplicado con flexibilidad en las diferentes imágenes producto de los distintos aumentos del microscopio. La ventana utilizada en nuestro caso es de 7x7.

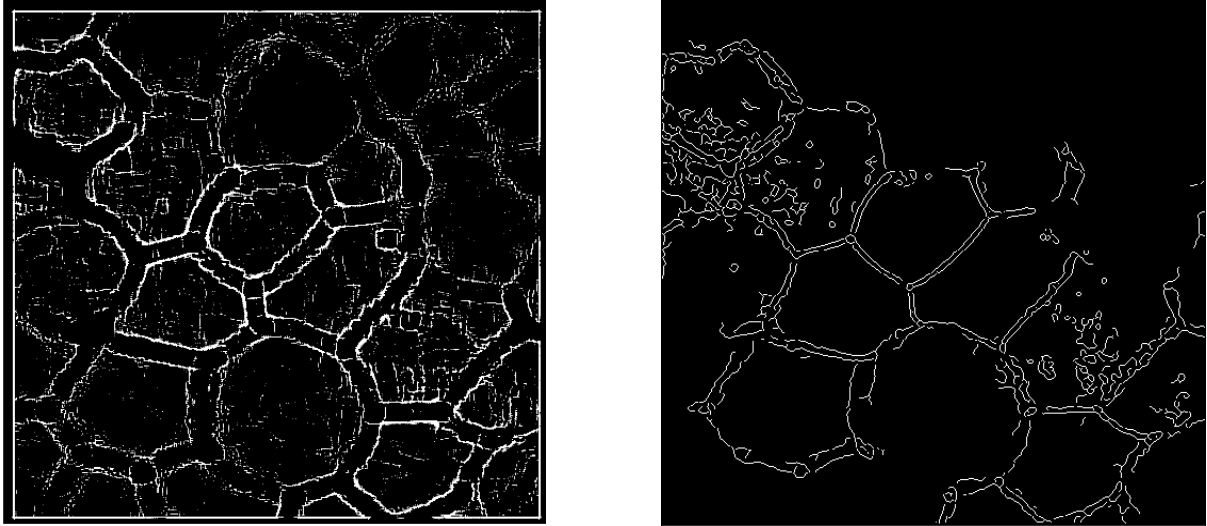


Figura 5: Detección de contornos en la imagen de la Fig. 4(a) (a) luego de un filtrado de mediana y (b) por medio del operador Canny óptimo.

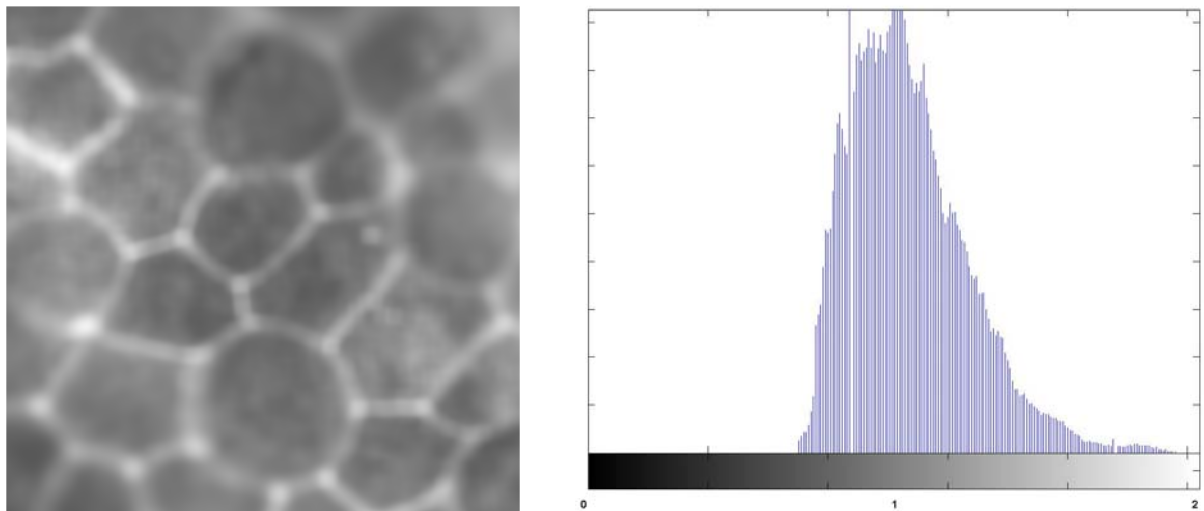


Figura 6: (a) Descriptores fractales locales en la imagen de la Fig. 4 representados como luminancia, y (b) el histograma de distribución de la DF local.

Para corregir la inhomogeneidad de iluminación que presentan estas imágenes, se aplica a continuación una ecualización adaptativa procesada en bloques locales de 32×32 . La misma consiste en sustraer el valor de la mínima luminancia en cada bloque a cada pixel del bloque, seguido de una ecualización. Este paso garantiza que los valores de luminancia sean uniformes, sin saturar ni bajar el rango dinámico de la imagen.

Para eliminar ruido aditivo que puede generar errores y sobresegmentación en las siguientes etapas, se implementó una batería de filtros adaptativos de Wiener de resoluciones crecientes (10×10 , 20×20 y 25×25), seguidos por un filtro de media de 20×20 . Todos estos parámetros se seleccionan al inicio de la aplicación del *workflow*. Los filtros de Wiener son adecuados en imágenes obtenidas por medios ópticos como las utilizadas en este trabajo, (tamaños mayores se aplican a imágenes de mayor aumento y viceversa). Por último se realiza un aumento de contraste utilizando operadores de gradiente morfológico

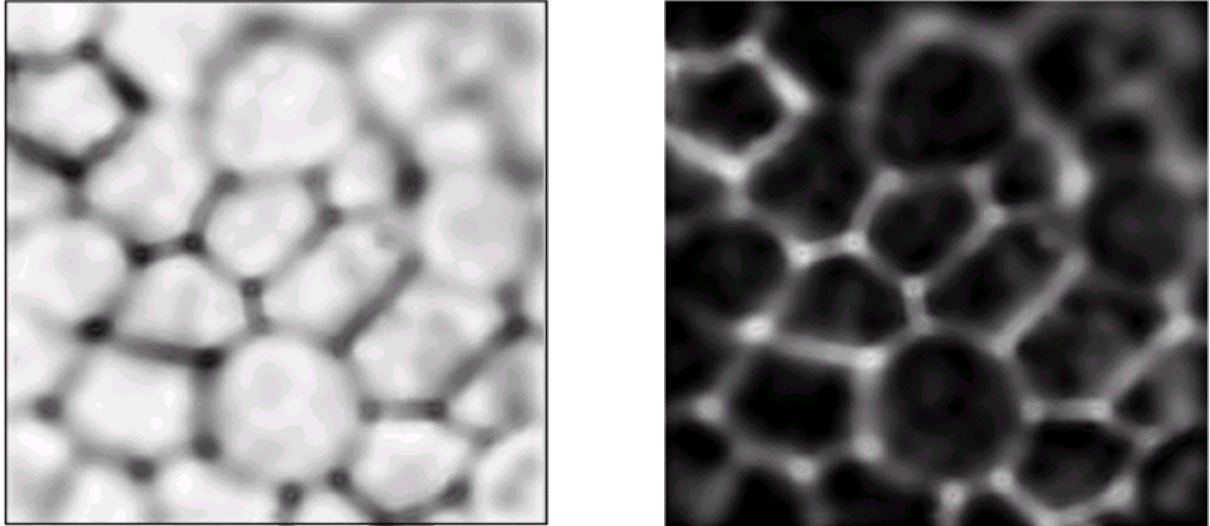


Figura 7: (a) Realce morfológico de la imagen en la Fig. 6(a), y (b) su complemento.

en tono de grises. La imagen realzada se obtiene sumándole el resultado de aplicar el operador Top Hat (imagen original menos imagen erosionada) y restándole el resultado de aplicar Bottom Hat (imagen dilatada menos imagen original). Se utilizó como elemento estructural un disco cuyo radio es parámetro de entrada del *workflow*. En la Fig. 7 puede verse el resultado de este procesamiento, al cual se le aplica complemento para facilitar la subsecuente detección de contornos.

3.2. Segmentación por detección de contornos

Como se ha mencionado previamente, la técnica que se pretende obtener debe ser automática. Por ende la segmentación tiene que valerse de métodos no supervisados. Además, se busca que la técnica utilizada sea capaz de encontrar la mayoría de los bordes en las imágenes en forma robusta, dado que los bordes de las imágenes son no uniformes, debido a que el desenfoque tampoco es uniforme. Entre las técnicas que cumplen con estas exigencias se encuentran los modelos de curvas deformables (snakes) [1], el crecimiento de regiones [9], y el watershed morfológico [6]. La técnica que mejores resultados ha brindado en nuestro estudio, por practicidad y costo computacional es la de watershed.

Como es bien conocido, el éxito de este proceso depende de la implantación de las marcas (*catchment basins*), con las cuales comienza el proceso. Ubicaciones erróneas en las marcas llevan a imágenes sub- o sobre- segmentadas. No hay que perder de vista que éstas a su vez dependen en gran medida del preprocesado de las imágenes. En nuestro caso se ha utilizado la transformación de mínimos extendidos, para ubicar las marcas. Esta transformación se basa en la identificación de mínimos regionales, que son componentes 8-conectados con el mismo valor de intensidad y en cuyo borde externo todos los píxeles tienen un valor de intensidad superior a la de los componentes. La cantidad máxima de componentes conectados, que identifica esta transformación, es otro de los parámetros de entrada del *workflow*. Obtenidas estas marcas, se adicionan a la imagen original, teniendo en cuenta que los máximos de las imágenes utilizadas, son los bordes a detectar. Estos bordes son encontrados aplicando la técnica de watershed morfológicos. En la Fig. 8

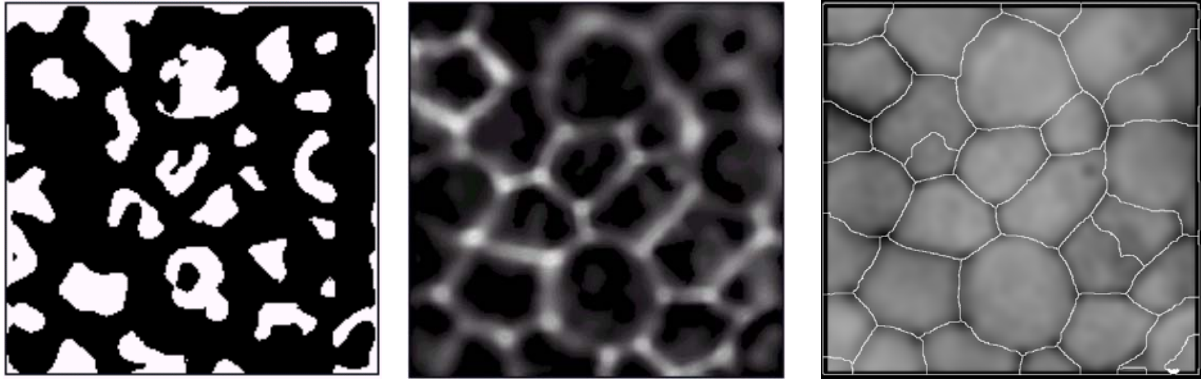


Figura 8: (a) Implantación de marcas por mínimos extendidos, (b) aplicación de los mínimos extendidos, y (c) *overlay* de los contornos obtenidos por watershed sobre la imagen de la Fig. 7(b).

pueden observarse los resultados obtenidos con este proceso completo a partir de la imagen de la Fig. 7(b).

A manera de resumen se presenta en la Fig. 9, el *workflow* completo, indicando la secuencia de pasos y los parámetros de entrada.

4. Resultados obtenidos

En el desarrollo del *workflow* propuesto se han probado distintas técnicas para brindar una solución a la segmentación de este tipo de imágenes. Como imagen prototipo, se utilizaron las de aumento 100x, por presentar los mayores desafíos. En este tipo de imagen se realza la importancia de la aplicación de los estimadores fractales locales para evitar la sub y sobresegmentación. Esto puede observarse en la Fig. 10, donde se presentan imágenes obtenidas retirando del *workflow* el paso de dimensión fractal local, y utilizando solamente el grupo de filtros pasabajos, realzando la importancia de este tipo de operadores.

Para las imágenes 100x, los mejores resultados se obtuvieron utilizando un elemento estructural de radio 3, componentes conectados ente 19 y 22, estimadores fractales con ventanas de 7x7, y filtros Wiener 10x10. En el caso de imágenes 40x se obtuvieron también buenos resultados, a pesar de la pérdida de información original. En este caso los parámetros son similares, con excepción del tamaño de los componentes conectados (ente 7 y 9 en este caso) y además no fue necesaria la aplicación de filtro pasabajos (ver Fig. 11).

Como se había mencionado anteriormente, el objetivo de este trabajo es poder identificar de manera no supervisada las formas de las células epiteliales y las adyacencias con otras formas, de manera que en un futuro se puedan identificar posibles repeticiones de patrones de grupos celulares. Para ello, hemos simplificado el problema de manera de identificar formas poligonales y sus adyacencias. Luego de obtenerse la imagen de salida del *workflow*, se continúa etiquetando cada estructura de bordes cerrados, y luego formando una estructura de descriptores y características de cada forma celular hallada. Los descriptores utilizados fueron, área, convex hull, número de Euler, centroide, extremos, caja minimax que contiene la célula segmentada relativa a la imagen original, diámetro equivalente, solidez, lista de píxeles, perímetro, orientación y excentricidad. En función

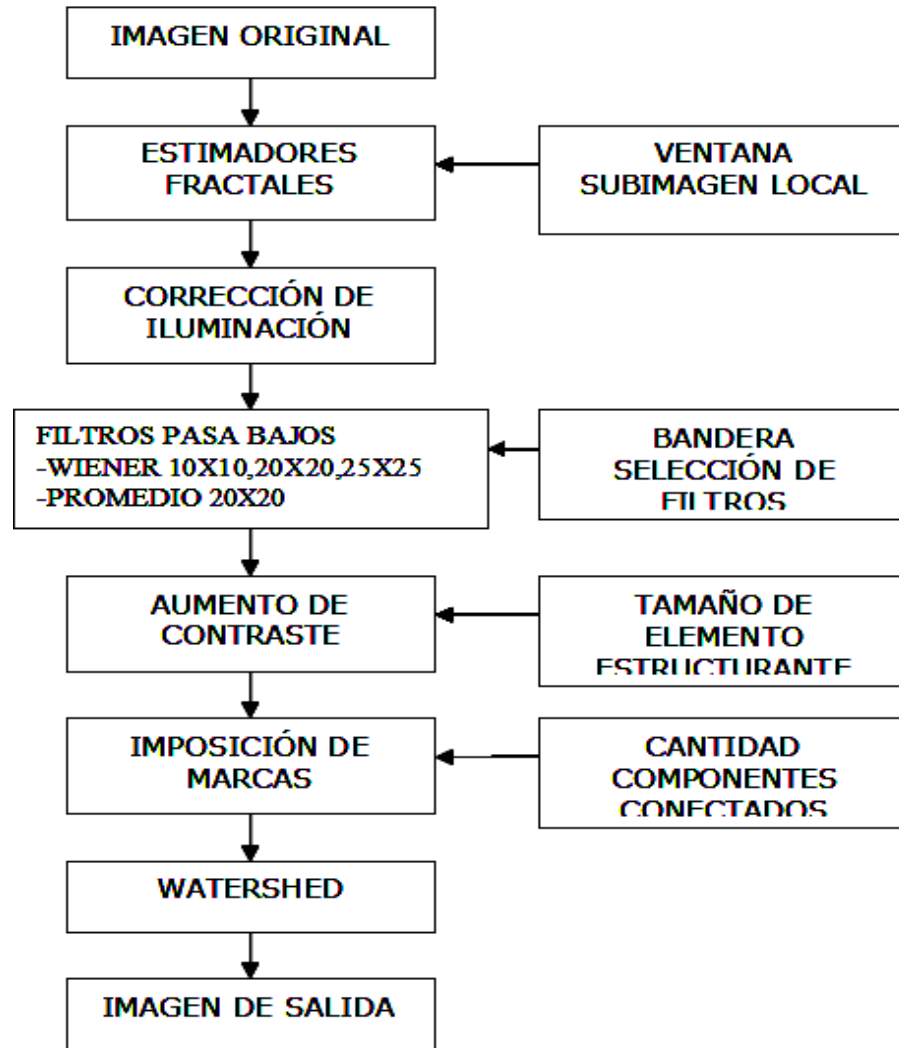


Figura 9: El *workflow*, secuencia de pasos y parámetros de entrada.

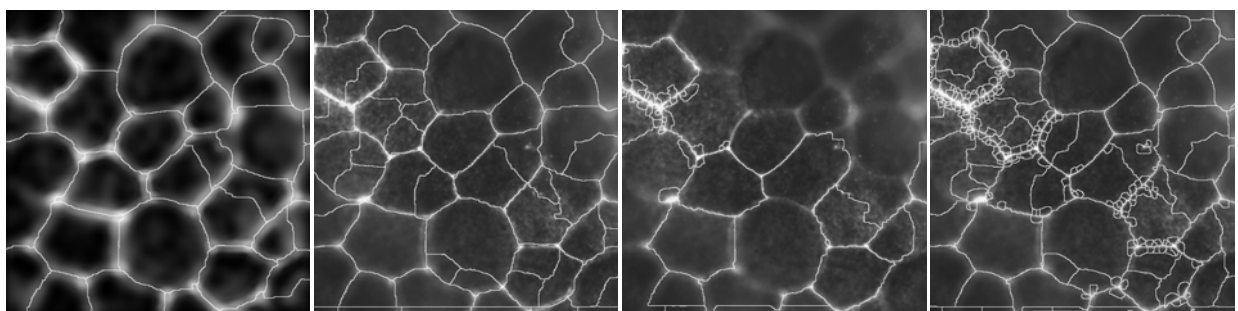


Figura 10: (a) Segmentación de la imagen de prueba con el *workflow* completo. (b) Utilizando filtro de media 39x39. (c) Utilizando Wiener 20x20, y (d) Wiener 25x25.

de estos descriptores, se extraen de cada célula los vértices de cada polígono, y a su vez se identifica el tipo de polígono. Luego, mediante un algoritmo de búsqueda se identifican los vértices comunes y por ende las adyacencias. El algoritmo culmina desplegando un listado de cada célula, su forma, las células adyacentes y sus formas, con la posibilidad de listar, si es requerido, las demás características.

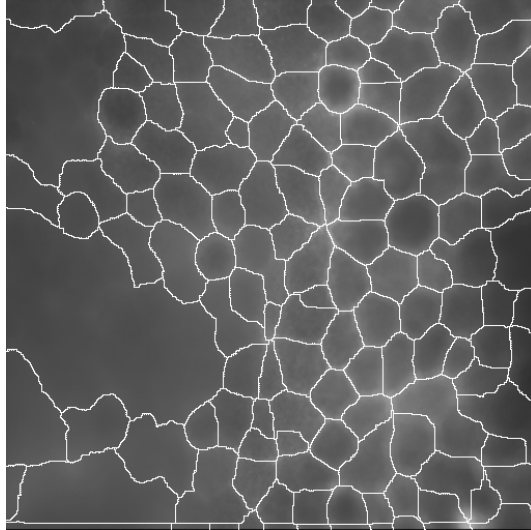


Figura 11: Aplicación del *workflow* a la imagen de 40x en la Fig. 4(c).

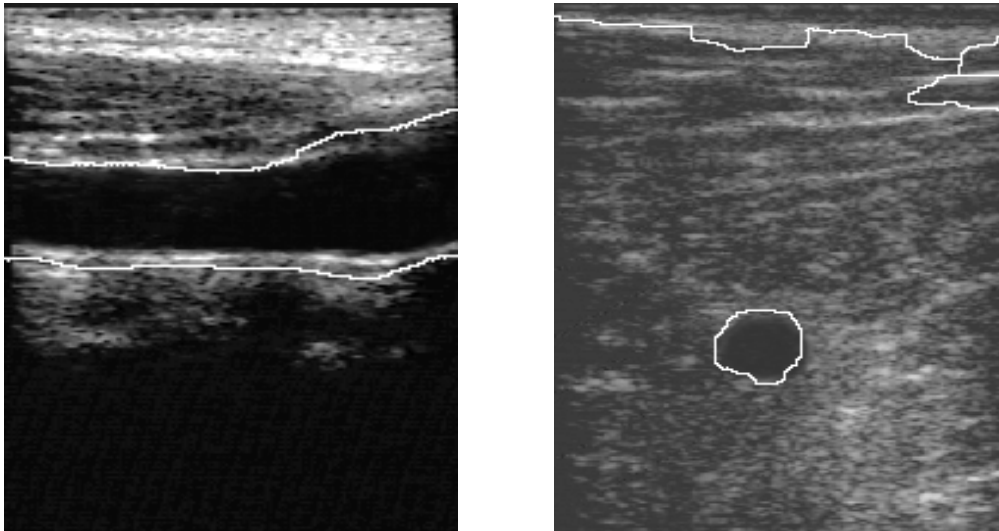


Figura 12: Aplicación del *workflow* a imágenes de ultrasonido.

Para comprobar la aplicabilidad de estas ideas en otro tipo de imágenes, fueron utilizadas imágenes de ultrasonido, específicamente de corte transversal de arteria femoral y corte longitudinal de arteria carótida. Los resultados fueron muy prometedores, resaltando la robustez del *workflow* presentado. En la Fig. 12 se observa la detección de fronteras de arteria, mediante el algoritmo propuesto. Puede observarse también algunas sobresegmentación, que no ofrece dificultades para un posible posterior paso de clasificación de formas.

5. Conclusiones y trabajo futuro

El propósito del presente trabajo fue elaborar un *workflow* de procesamiento para ser aplicado sin supervisión a un grupo no determinado de imágenes de microscopía de la piel de embriones de anfibios, con el propósito de segmentar las membranas celulares por medio

del marcado de las moléculas de adhesión, lo cual permite caracterizar y cuantificar la disposición celular para la elaboración y cotejo de modelos. Dadas las dificultades notables que presentan estas imágenes, la clave del procesamiento fue utilizar descriptores fractales previo al proceso de estandarizar la imagen y detectar los contornos.

Los resultados obtenidos para imágenes de 100 aumentos fueron definitivamente satisfactorios, y aún en 40x se genera una descripción geométrica suficientemente precisa de los patrones celulares en porciones importantes de la imagen, sin sub o sobresegmentaciones espurias. El sistema mostró ser suficientemente robusto como para poder ser aplicado exitosamente a otros tipos de imágenes, en particular para imágenes de ultrasonido. La única supervisión requerida es fijar un conjunto reducido de parámetros de procesamiento (tamaños de los *kernel* de los filtros, elementos estructurales, etc.), lo cual puede realizarse en forma interactiva.

Entre los trabajos futuros que se están evaluando y realizando, podemos mencionar la idea de dotar al sistema de cierta inteligencia como para lograr un auto-sintonizado de los parámetros, el manejo simultáneo de varias series con el objeto de lograr segmentar estructuras 3D, y la migración del sistema a GPU para reducir los tiempos de procesamiento aún con imágenes de gran tamaño.

Referencias

- [1] A. Blake and M. Isard. *Active contours: the application of techniques from graphics, vision, control theory and statistics to visual tracking of shapes in motion*. Springer-Verlag, 1998.
- [2] C. Delrieux and R. Katz. Image Segmentation Through Automatic Fractal Dimension Classification. In *Argentine Symposium on Computing Technology*, Buenos Aires, 2003. 32 JAIIO, Jornadas Argentinas de Informática e Investigación Operativa,.
- [3] K.L. Gosner. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae. *Herpetologica*, 16:183–190, 1960.
- [4] Adams C. L., Chen Y. T., Smith S. J., and Nelson W. J. Mechanisms of Epithelial Cell-Cell Adhesion and Cell Compaction Revealed by High-resolution Tracking of E-Cadherin-Green Fluorescent Protein. *The Journal of Cell Biology*, 142(4), 1998.
- [5] B. Mandelbrot and J. van Ness. Fractional Brownian Motion, fractional noises and applications. *SIAM Review*, 10(4):422–437, 1968.
- [6] J. Park and J. M. Keller. Snakes on the Watershed. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 23(10):1201–1205, 2001.
- [7] H.-O. Peitgen and D. Saupe. *The Science of Fractal Images*. Springer-Verlag, New York, 1986.
- [8] J. C. Russ. *The Image Processing Handbook*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1989.
- [9] C. Xu and J. L. Prince. Snakes, Shapes, and Gradient Vector Flow,. *IEEE Transactions on Image Processing*, 28(3):359–369, 1998.