

**Este proyecto se desarrolla con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar, y se cofinancia por la Unión Europea por el FEMPA (Fondo Europeo Marítimo, de Pesca y de Acuicultura)**



**FV 5.1 Informe técnico y visual del estudio, incluyendo una colección de imágenes de tomografía computarizada y un análisis detallado de los hallazgos**

## ÍNDICE

<b>FV 5.1 Informe técnico y visual del estudio, incluyendo una colección de imágenes de tomografía computarizada y un análisis detallado de los hallazgos</b> .....	3
Resumen.....	3
Introducción .....	4
Metodos .....	5
Obtención de los especímenes .....	5
Tomografías.....	5
Procesamiento de la imagen.....	6
Cuantificación de los segmentos de la imagen .....	7
Resultados .....	8
Conclusiones .....	11
Tabla de estudios anatómicos en <i>Maja</i> .....	12
Referencias.....	14
<b>Referencias</b> .....	15
<b>ANEXO I</b> .....	16

## FV 5.1 Informe técnico y visual del estudio, incluyendo una colección de imágenes de tomografía computarizada y un análisis detallado de los hallazgos

### Proyecto MAJA

Cultivo integral de la centolla *Maja brachydactyla*: cría y repoblación

Autores: grupo de trabajo del proyecto MAJA.

Fecha de finalización del informe 30 de enero de 2026.

El presente informe constituye la fuente de verificación FV 5.1 del proyecto, de acuerdo con lo establecido en el marco lógico, y se corresponde con la acción A5: Seguimiento de la morfología y el desarrollo del crustáceo de la especie *Maja brachydactyla*. En el marco de esta acción, se aborda la identificación de modificaciones en las estructuras internas y externas a lo largo de las distintas fases de desarrollo de la especie, así como la detección de posibles anomalías. Para ello, se ha empleado la tomografía computarizada como herramienta de análisis. Este informe recoge los trabajos realizados de preparación de especímenes en diferentes etapas del desarrollo, la realización de escaneos mediante tomografía computarizada, y el análisis de las imágenes obtenidas con el fin de identificar cambios morfológicos y posibles desviaciones respecto al desarrollo normal. La documentación presentada permite verificar el cumplimiento del resultado R5.1 y, de forma específica, del resultado R5.1: Detección de potenciales anomalías en la morfología y la anatomía de *M. brachydactyla* en todas las fases de su desarrollo. En este sentido, la FV 5.1 se materializa en un informe técnico acompañado de material visual del estudio, incluyendo una colección de imágenes de tomografía computarizada y un análisis detallado de los resultados obtenidos.

### Resumen

En esta acción se estudian métodos para estudiar la anatomía de crustáceos utilizando especímenes de maja braquidactilia con diferentes grados de desarrollo. Se pretende facilitar el estudio anatómico de forma cuantitativa a partir de imágenes de tomografía de rayos X y posterior tratamiento de dichas imágenes para individualizar los diferentes elementos del exoesqueleto y automatizar la obtención de métricas que pueden ser interesantes para estudios de anatomía comparada.

El fundamento de esta propuesta técnica consiste en el elevado contraste entre las superficies epidérmicas calcificadas y el resto de los componentes internos del cuerpo del crustáceo.

Este contraste que se deriva de la gran diferencia de contenido en calcio del exoesqueleto con respecto a los órganos internos facilita en gran manera la segmentación (identificación y separación digital de órganos y artejos) de las imágenes tomográficas. De esta forma, se pueden utilizar técnicas de procesamiento de imagen para individualizar los distintos artejos del esqueleto y obtener las métricas de cada uno de forma automática.

Los resultados muestran que se puede individualizar cada artejo individualmente de forma automática, lo que permite cuantificar y determinar datos morfológicos de cada artejo y obtener relaciones entre diversas características morfológicas que pueden ser de interés en estudios del desarrollo y taxonómicos.

## Introducción

En el género *Maja*, el conocimiento anatómico del esqueleto se limita sobre todo a descripciones externas del caparazón y los apéndices durante el desarrollo larvario y juvenil, así como a caracteres diagnósticos para diferenciación de especies<sup>1</sup>. También existen aproximaciones histológicas en órganos reproductores y, más recientemente, sobre el aparato digestivo (ciegos medios)<sup>2</sup>. El esqueleto interno —formado por endosternitos, endopleuritos y apodemas de inserción muscular— apenas ha sido abordado. En contraste, para *Libinia emarginata* se dispone de una descripción exhaustiva de la musculatura de todos los pereiópodos y de la organización del endoesqueleto torácico, lo que permite correlacionar la arquitectura interna con la locomoción<sup>3</sup>.

Hasta la fecha hay muy pocos trabajos sobre anatomía de crustáceos mediante tomografía de rayos X. Un ejemplo pionero en el uso de microtomografía de rayos X para el estudio anatómico de crustáceos lo aporta el trabajo de Castejón et al. (2018)<sup>4</sup>, donde se aplicó esta técnica para describir con gran detalle la anatomía interna del sistema digestivo del cangrejo *Pachygrapsus marmoratus*, evidenciando su valor en estudios morfofuncionales sin necesidad de disección destructiva.

La aplicación de técnicas de imagen no destructivas, como la microtomografía computarizada (micro-CT), permite la visualización interna de estructuras mineralizadas sin necesidad de disección física. Sin embargo, la obtención de modelos tridimensionales precisos a partir de escaneos tomográficos requiere un procesamiento digital riguroso que permita distinguir, segmentar y aislar regiones de interés del exoesqueleto que respondan a criterios anatómicos.

En el presente trabajo se estudia la aplicación de algoritmos para el análisis y procesamiento de imágenes volumétricas para la clasificación digital del exoesqueleto de crustáceos utilizando especímenes de *Maja brachydactyla* como modelo de estudio.

## Metodos

### Obtención de los especímenes

Especímenes juveniles se obtuvieron a partir de cultivo en tanques tras la eclosión de las larvas y engorde en Linternas.

Un especimen adulto se obtuvo de la Jaula de engorde en Batea

### Tomografías

Las condiciones de operación y parámetros técnicos utilizados durante una exploración tomográfica mediante el sistema FF20 CT usando a una adquisición tipo Cone Beam Stop and Go con trayectoria helicoidal.

La exploración se realizó con una duración total de 38 minutos y 15 segundos, utilizando un tubo de rayos X modelo FXE Transmission Beam en modo High Power, con una tensión de 130.0 kV, corriente de 50.0  $\mu$ A y potencia de salida de 6.5 W. El blanco del tubo fue HPT, sin utilizar ningún tipo de filtro para tener detalle de las estructuras quitinosas no calcificadas.

El detector utilizado fue Perkin Elmer Y.Panel 4343 CT, operando en modo Averaged 1x1, con tamaño de píxel de 0.150 mm x 0.150 mm, profundidad de bits de 16 Bit, y frecuencia de captura de 15 Hz. La exposición por cuadro fue de 66.662 ms, sin omisión de fotogramas, con integración temporal de 0.07 s. Condiciones de operación

- Temperatura inicial: 21.2 °C
- Temperatura final: 21.0 °C
- Rango térmico: 21.0–21.2 °C

### Geometría de escaneo

- Distancia foco-detector (FDD): 501.740 mm
- Distancia foco-objeto (FOD): 300.000 mm
- Magnificación: 1.67
- Número de proyecciones: 2614
- Ángulo de escaneo: 373°

- Altura de escaneo: 161.000 mm
- Campo de visión proyectado: 256.5 mm x 256.5 mm
- Tamaño de proyección: 2860 px x 2860 px
- Ángulo del haz: 46.3° x 46.3°

La operación fue ejecutada por el operador genérico de trayectoria helicoidal del sistema Yxlon. Todos los parámetros fueron configurados para garantizar una adquisición precisa, estable y reproducible, adecuada para estudios de alta resolución en objetos de tamaño medio.

## Procesamiento de la imagen

Se importó el volumen tridimensional de cada espécimen escaneado mediante tomografía computarizada (CT), asegurando el contraste y la resolución adecuados para distinguir los artejos.

Se aplicó un preprocesamiento de contraste para resaltar las estructuras articulares como regiones brillantes sobre un fondo oscuro. Para ello, se aplicaron filtros de preprocesamiento para la reducción de ruido y la mejora del contraste en las imágenes en escala de grises. El objetivo de este filtrado es preservar la integridad de las estructuras anatómicas relevantes para la segmentación y el análisis morfométrico posterior.

A continuación, se realizó una segmentación inicial para separar las estructuras de la centolla del fondo del exterior, para lo cual se probaron diferentes algoritmos.

Para la separación de objetos, se probaron diversos algoritmos que aplican filtros morfológicos para cortar puentes que conectan estructuras individuales, para individualizar los artejos y placas.



La fase final incluyó el uso de los módulos Labeling y Label Analysis para clasificar, cuantificar y extraer información morfométrica de los distintos componentes segmentados.

### Cuantificación de los segmentos de la imagen

La caracterización de los componentes del exoesqueleto se realizó tras la segmentación de las estructuras de interés en volúmenes 3D. Para cada estructura se calcularon métricas geométricas, de forma que permiten una descripción cuantitativa de los artejos para clasificarlos. Las métricas se describen en la Tabla 1.

En primer lugar, se obtuvieron parámetros generales de tamaño y extensión, incluyendo el volumen (Volume3d), el área superficial (Surface Area) y las dimensiones del paralelepípedo envolvente (Bounding Box). Estas medidas proporcionan una estimación directa de la magnitud relativa de cada componente y permiten comparaciones inter- e intraespecíficas.

Posteriormente, se calcularon descriptores de forma derivados de la matriz de inercia, tales como elongación, planitud (Flatness) y anisotropía, que permiten distinguir entre estructuras alargadas, laminares o isométricas. Asimismo, se incluyeron los diámetros de Feret en 3D (FeretShape3d) y las dimensiones principales de longitud, anchura y grosor (Length3d, Breadth3d, Thickness3d), métricas útiles para caracterizar la morfología comparada de placas y prolongaciones.

Finalmente, se incorporaron medidas de curvatura superficial (IntegralMeanCurvature, IntegralTotalCurvature) y de esfericidad/roundness.

La aplicación de métricas morfométricas de las representaciones digitales de los artejos en el análisis de exoesqueletos permite calcular relaciones anatómicas. En el caso de las placas, parámetros como la planitud (Flatness), el espesor (Thickness3d) y el área superficial (Surface Area) pueden utilizarse para caracterizar su grado de aplanamiento, robustez y extensión. Para las espinas y apófisis, medidas como la longitud (Length3d), la elongación (Elongation) permiten describir su desarrollo, prominencia y disposición respecto al cuerpo. En los tubérculos y nódulos, la esfericidad (Sphericity) y las medidas de curvatura reflejan la convexidad y la regularidad de estas ornamentaciones. Finalmente, para la comparación general entre distintos componentes, parámetros globales como el volumen (Volume3d), la anisotropía (Anisotropy) y las dimensiones del paralelepípedo envolvente (Bounding Box) indican el tamaño, la simetría y el espacio ocupado por cada estructura.

## Resultados

La aplicación del método permitió una segmentación no supervisada reproducible de los artejos, preservando la integridad estructural y facilitando su cuantificación individual. Para la reducción de ruido y la mejora del contraste en las imágenes en escala de grises el mejor algoritmo fue el filtro Non-Local Means (NLM)<sup>5</sup>. Este método realiza una media ponderada de intensidades considerando no solo la proximidad espacial, sino también la similitud entre vecindades locales de la imagen, lo que permite atenuar el ruido manteniendo bordes y detalles finos. A diferencia de los filtros lineales convencionales, el NLM es especialmente eficaz en datos de CT, donde preserva la integridad de las estructuras anatómicas relevantes para la segmentación y el análisis morfométrico posterior.

Posteriormente se aplicó el algoritmo Interactive Top-Hat<sup>6</sup> para realizar una primera segmentación de la imagen, mejorar la uniformidad del contraste y resaltar bordes finos. Posteriormente, se utilizó Binary Smoothing para suavizar los bordes segmentados y Remove Islands para eliminar artefactos y estructuras desconectadas de pequeño tamaño que podrían interferir con la segmentación principal<sup>5</sup>.

Una vez eliminados los objetos no adheridos, se procedió a la segmentación del esqueleto, que se realizó en dos etapas, en la primera utilizó el algoritmo Chamfer Method<sup>7</sup> con un parámetro de proximidad de 32 píxeles para diferenciar las partes que no pertenecen al cuerpo, es decir, materiales adheridos a la superficie. Esto no incluye a los epibiontes como poríferos y briozoos calcáreos, balanos, tubos de poliquetos y moluscos juveniles fuertemente adheridos (*Ostrea*)<sup>8</sup>.

En una segunda fase de separación se aplicó el mismo algoritmo pero con un parámetro de proximidad de 12 píxeles para separar regiones contiguas del exoesqueleto, lo que facilitó una

segmentación precisa separando los epibiontes y las zonas de contacto estrecho entre articulaciones y apodemas.

Para la separación de los artejos de los especímenes de crustáceo, se empleó el algoritmo H-Extrema Watershed<sup>5</sup>, y para para segmentar y clasificar virtualmente los artejos de un espécimen crustáceo a partir de datos volumétricos tridimensionales, se aplicó el algoritmo Hierarchical Watershed Segmentation bajo los siguientes parámetros específicos: dimensionalidad: 3D, tipo de objeto: White objects (objetos brillantes sobre fondo oscuro), tamaño del marcador (Marker stent): valor óptimo determinado entre 1024-2048, ajustado empíricamente para maximizar la precisión de segmentación sin sobresegmentar estructuras internas, salida (Output): Split (división de regiones segmentadas en volúmenes independientes), algoritmo: Repeatable (modo repetible activado para garantizar consistencia en ejecuciones sucesivas)

Estos parámetros permitieron una clasificación jerárquica de las regiones segmentadas en función de su prominencia estructural.

El parámetro Neighborhood = 26 permitió una conectividad tridimensional completa, esencial para evitar artefactos de segmentación en zonas de contacto entre artejos.

El valor de Detail Level = 3600 fue seleccionado tras pruebas iterativas, para optimizar la sensibilidad morfológica.

Las regiones resultantes fueron etiquetadas y exportadas como volúmenes independientes, para su análisis morfométrico.

El uso directo del HWS produce un mayor detalle de segmentación.

En modo en dos pasos se obtuvo una segmentación razonablemente precisa de los artejos con preservación de sus límites anatómicos (Figura 1) que permite distinguir entre artejos principales y estructuras accesorias (Figura 2). En la vista dorsal se observa que el procedimiento es capaz de identificar las regiones que forman el caparazón, siguiendo las suturas. La razón es que el algoritmo HWS incide en la ruptura de los puentes más delgados que constituyen las suturas. De este modo diferencian al menos las regiones frontal, gástrica, hepática derecha, dos branquiales (Izda. Y Dcha.), cardíaca e intestinal.

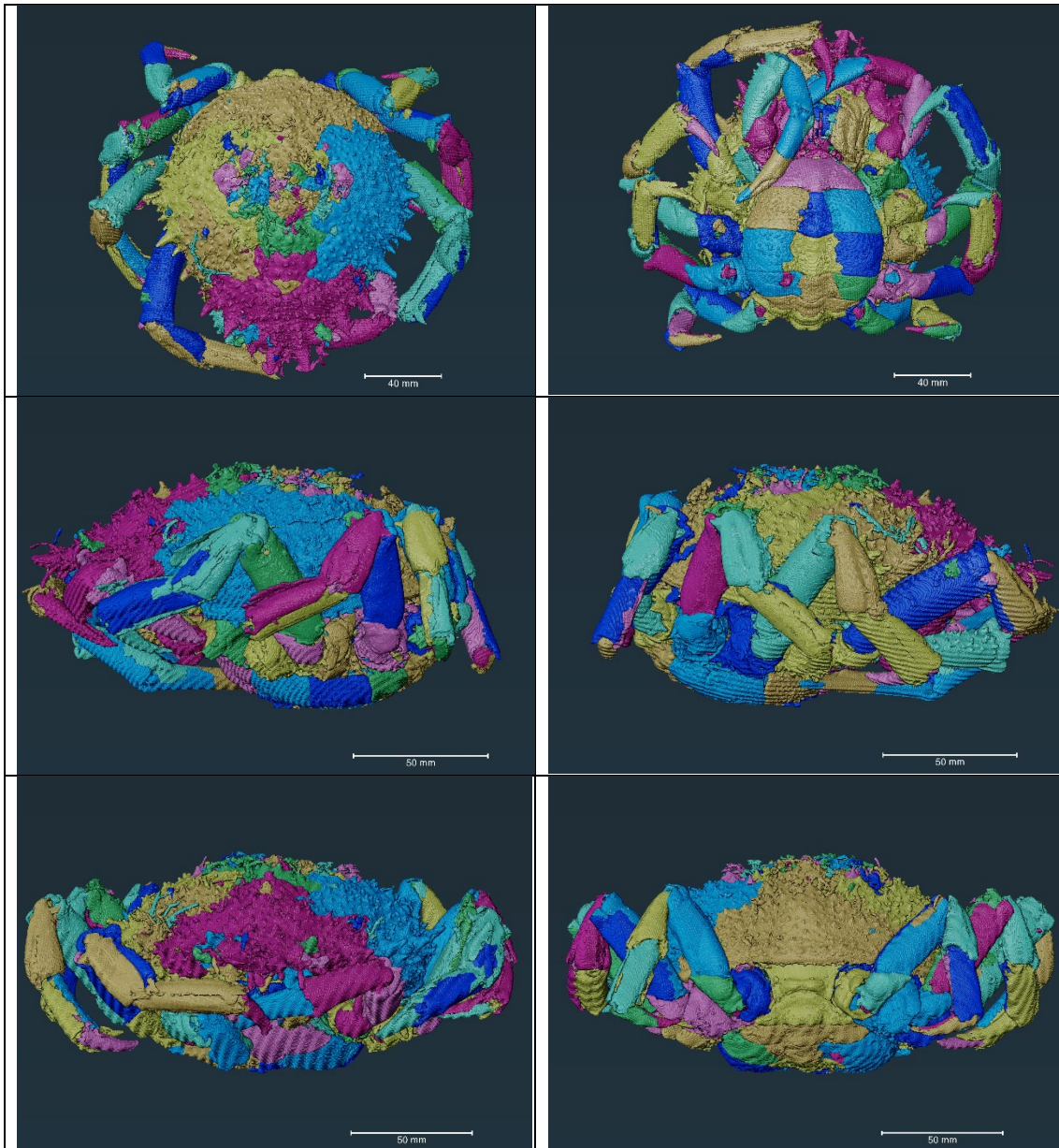


Figura 1. Representación de la segmentación automática de componentes del esqueleto de una hembra de *Maja brachydactyla* inmediatamente después del desove mediante *Hierarchical watershed segmentation*. Los colores representan cada una de las 10246 etiquetas individualizadas de cada uno de los segmentos. Las vistas corresponden de arriba a abajo e izquierda a derecha: Dorsal, ventral, izquierda, derecha, frontal y trasera. Se puede observar que los algoritmos permiten individualizar las placas.

### Alta reproducibilidad del método en especímenes con morfología similar

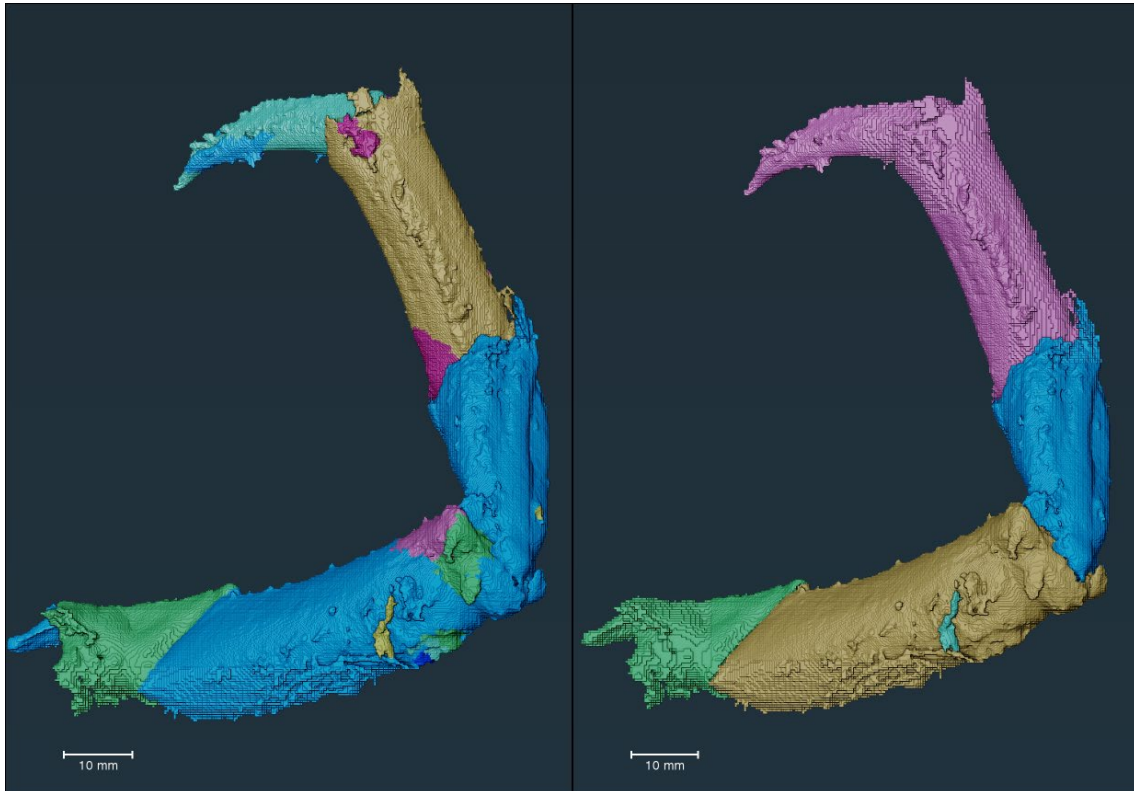


Figura 2. Comparación de los resultados de dos procedimientos de segmentación automática del 3er endopodio derecho. *Hierarchical watershed segmentation* (Izda.) y la segmentación en dos pasos (Dcha.): el primero mediante *H-extrema watershed*, seguido de *hierarchical watershed segmentation*. Se observa que la segmentación en un solo paso diferencia más objetos, lo cual permite identificar los apodemas.

## Conclusiones

Las tomografías permiten obtener reconstrucciones tridimensionales detalladas del exoesqueleto. La aplicación de las técnicas de análisis de imagen desarrolladas inicialmente en diversos campos de la ciencia, medicina y geología es prometedora para su uso en estudios anatómicos de crustáceos.

Este enfoque es especialmente útil en estudios de biomecánica, taxonomía digital y modelado funcional de apéndices crustáceos, así como en estudios comparativos, biomecánicos y funcionales.

## Tabla de estudios anatómicos en *Maja*

Año	Especie	Tipo de anatomía estudiada	Referencia	DOI
2002	<i>M. crispata</i>	Desarrollo larvario (morfología externa de zoeas y megalopas)	Rodríguez (2002)	10.1080/00222930110059655
2004	<i>M. squinado</i>	Comportamiento agregativo; implicaciones anatómicas de apéndices locomotores y quelípedos	González-Gurriarán & Sampedro (2004)	
2006	<i>M. brachydactyla</i>	Madurez gonadal; morfometría reproductiva	Corgos & Freire (2006)	
2006	<i>M. brachydactyla</i>	Muda terminal y migración reproductiva; anatomía reproductiva funcional	Corgos, Verísimo & Freire (2006)	
2007	<i>M. brachydactyla</i>	Maduración ovárica; histología de ovarios y vitelogénesis	Rotllant et al. (2007)	10.1007/s00227-007-0688-y
2007	<i>M. brachydactyla</i>	Crecimiento y composición larvaria; morfología de zoeas	Andrés et al. (2007)	
2008	<i>M. brachydactyla</i> , <i>M. squinado</i>	Desarrollo larvario completo; morfología externa	Guerao et al. (2008)	<a href="https://doi.org/10.1080/00222930802254755">https://doi.org/10.1080/00222930802254755</a>
2008	<i>M. brachydactyla</i>	Crecimiento larvario; anatomía externa	Andrés et al. (2008)	10.1016/J.AQUACULTURE.2007.10.026
2009	<i>M. brachydactyla</i>	Sistema reproductor masculino; anatomía interna y ultraestructura	Simeó, Ribes & Rotllant (2009, <i>Tissue &amp; Cell</i> )	<a href="https://doi.org/10.1016/j.tice.2009.02.002">https://doi.org/10.1016/j.tice.2009.02.002</a>
2009	<i>M. brachydactyla</i>	Espermatogénesis; histología testicular	Simeó et al. (2009, <i>Journal of Morphology</i> )	
2009	<i>M. brachydactyla</i>	Desarrollo post-larvario y dimorfismo sexual incipiente	Guerao & Rotllant (2009)	<a href="https://doi.org/10.3989/SCIMAR.2009.73N4797">https://doi.org/10.3989/SCIMAR.2009.73N4797</a>
2010	<i>M. squinado</i>	Desarrollo juvenil temprano; morfología de apéndices	Guerao & Rotllant (2010)	<a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.006">http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.006</a>
2011	<i>M. squinado</i> , <i>M. brachydactyla</i>	Identificación de especies; morfología externa diagnóstica (carapacho, apéndices)	Guerao et al. (2011)	<a href="https://doi.org/10.3989/SCIMAR.2011.75N1129">https://doi.org/10.3989/SCIMAR.2011.75N1129</a>
2020	<i>M. squinado</i> , <i>M. brachydactyla</i>	Determinación de edad mediante estructuras del pedúnculo ocular (cutícula de estatocistos)	Sheridan et al. (2020)	

Año	Especie	Tipo de anatomía estudiada	Referencia	DoI
2022	<i>Maja</i> spp. (Brachyura)	Morfología e histología de ciegos medios (midgut caeca)	Castejón et al. (2022)	

Tabla 1. Tabla de métricas relevantes para clasificación del esqueletos.

Categoría	Métrica (Avizo)	Descripción	Utilidad anatómica
Tamaño global	Volume3d	Volumen del componente ( $\text{mm}^3$ , $\mu\text{m}^3$ )	Permite comparar el volumen total de distintos elementos del exoesqueleto, incluyendo el espesor (Artejos, placas).
Superficie	Surface Area	Área superficial del objeto	Relacionado con funciones de protección, intercambio o articulación.
Forma general	Elongation	Relación entre el eje mayor y menor	Indica si un componente es alargado (espinas, apófisis) o más isométrico.
	Flatness	Relación de espesor respecto a los otros ejes	Describe placas o láminas delgadas.
	Anisotropy	Medida de cuán diferente es la extensión en los 3 ejes principales	Identifica estructuras simétricas vs. anisotrópicas.
	Sphericity / Roundness (si disponible)	Grado de semejanza a una esfera	Útil para nódulos o tubérculos en la superficie.
Dimensiones características	FeretShape3d	Diámetros máximos (longitud, anchura, grosor)	Define proporciones anatómicas (ej. relación longitud/anchura de placas).

	Length3d / Breadth3d / Thickness3d	Longitud, anchura y espesor principales	Métricas básicas para describir proporciones del exoesqueleto.
Orientación	LengthOrientPhi / LengthOrientTheta	Orientación del eje mayor	Permite comparar direcciones de espinas, costillas o suturas.
	BreadthOrientPhi / Theta	Orientación del eje intermedio	Complementa la descripción de geometría espacial.
Curvatura	IntegralMeanCurvature	Promedio de la curvatura sobre la superficie	Informa sobre convexidad o concavidad (ej. curvatura de placas o espinas).
	IntegralTotalCurvature	Integral de curvatura gaussiana	Diferencia entre superficies planas, convexas o complejas.
Envolvente	Bounding box	Caja mínima que envuelve el objeto	Define su espacio de ocupación, útil para comparaciones entre individuos o taxones.

## Referencias

1. Neumann, V. A review of the *Maja squinado* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) species-complex with a key to the eastern Atlantic and Mediterranean species of the genus. *Journal of Natural History* **32**, 1667–1684 (1998).
2. Castejón, D. *et al.* Morphology and ultrastructure of the midgut gland (“hepatopancreas”) during ontogeny in the common spider crab *Maja brachydactyla* Balss, 1922 (Brachyura, Majidae). *Arthropod Structure and Development* **49**, 137–151 (2019).
3. Vidal-Gadea, A. G. & Belanger, J. H. Muscular anatomy of the legs of the forward walking crab, *Libinia emarginata* (Decapoda, Brachyura, Majoidea). *Arthropod Structure & Development* **38**, 179–194 (2009).
4. Castejón, D. *et al.* Micro-computed tomography and histology to explore internal morphology in decapod larvae. *Sci Rep* **8**, 14399 (2018).
5. Schlüter, S., Sheppard, A., Brown, K. & Wildenschild, D. Image processing of multiphase images obtained via X-ray microtomography: A review. *Water Resources Research* (2014) doi:10.1002/2014WR015256.

6. Coupe, P. *et al.* An Optimized Blockwise Nonlocal Means Denoising Filter for 3-D Magnetic Resonance Images. *IEEE Trans. Med. Imaging* **27**, 425–441 (2008).
7. Borgfors, G. Hierarchical chamfer matching: a parametric edge matching algorithm. *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell.* **10**, 849–865 (1988).
8. Fernández, L. *et al.* Epibiosis and Ornamental Cover Patterns of the Spider Crab *Maja squinado* on the Galician Coast, Northwestern Spain: Influence of Behavioral and Ecological Characteristics of the Host. *Journal of Crustacean Biology* **18**, 728 (1998).

## Referencias

Sharaby, A., Gesraha, M., & Fallatah, S. (2020). Botanical extracts against the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae), during storage conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00294-1>

Schaub, B., & Kroschel, J. (2018). Developing a biocontrol strategy to protect stored potato tubers from infestation with potato tuber moth species in the Andean region. *Journal of Applied Entomology*, 142, 78 - 88. <https://doi.org/10.1111/jen.12426>

## ANEXO I