UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E INFORMÁTICA

USP/IFSC/SBI
8-2-001564

RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL DE IMAGENS COM O USO DE DECONVOLUÇÃO A PARTIR DE SEÇÕES BIDIMENSIONAIS OBTIDAS EM MICROSCOPIA ÓPTICA

Murillo Rodrigo Petrucelli Homem

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências em Física Aplicada, sub-área Física Computacional.

Orientador: Prof. Dr. Luciano da Fontoura Costa – CVRG/IFSC/USP

Co-orientador: Prof. Dr. Nelson Delfino d'Ávila Mascarenhas – GAPIS/DC/UFSCar

São Carlos – São Paulo
2003

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

IFSC - SBI
CLASS.....
CUTTER.....
TOMBO.....

Homem, Murillo Rodrigo Petrucelli.
Reconstrução Tridimensional de Imagens Com o Uso de Deconvolução a Partir de Seções Bidimensionais Obtidas em Microscopia Óptica / Murillo Rodrigo Petrucelli Homem. – São Carlos : USP, 2003.
178 p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, 2003.

Orientador: Prof. Dr. Luciano da Fontoura Costa
Co-orientador: Prof. Dr. Nelson Delfino d'Ávila Mascarenhas

1. Processamento Digital de Imagens. 2. Microscopia de Seccionamento Óptico Computacional. 3. Microscopia de Fluorescência. 4. Restauração (Deconvolução). 5. Reconstrução Tridimensional. 6. Esqueletização. I. Título.

UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Av. Trabalhador São-carlense, 400
Caixa Postal 369
13560-970 - São Carlos - SP - Brasil

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE MURILLO RODRIGO PETRUCELLI HOMEM APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 03-10-2003.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Luciano da Fontoura Costa (Orientador e Presidente) – IFSC/USP

Prof. Dr. Eduardo Antônio Barros da Silva – UFRJ

Prof. Dr. Alejandro César Frery Orgambide – UFAL

Prof. Dr. Junior Barreira – IME/USP

Prof. Dr. Jarbas Caiado de Castro Neto – IFSC/USP

À Erika

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

Agradecimentos

... aos Professores Nelson Delfino d'Ávila Mascarenhas e Luciano da Fontoura Costa, pela orientação dedicada e objetiva, sempre presentes no decorrer do desenvolvimento desta tese.

... ao Professor Donald L. Snyder, do Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade de Washington em St. Louis, USA, por me aceitar como estudante no *Electronic Systems and Signals Research Laboratory* (ESSRL).

... à Professora Chrysanthe Preza, do Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade de Washington em St. Louis, pela orientação e preciosos ensinamentos durante meu estágio no *Electronic Systems and Signals Research Laboratory.*

... à Professora Barbara Pickard, do Departamento de Biologia da Universidade de Washington em St. Louis, por permitir o uso do microscópio de fluorescência e pelas discussões sobre o trabalho.

... ao Professor Stefan Meng, do Departamento de Anatomia da Universidade de Viena, Áustria, pelas imagens de artérias e à Professora Rachel O. L. Wong, do Departamento de Anatomia e Neurobiologia da Universidade de Washington em St. Louis, pelas imagens de neurônios.

... em especial, à Erika, pela paciência, compreensão e incentivo durante todo este tempo.

... aos colegas do *Cybernetic Vision Research Group* (CVRG) do IFSC e do *Architecture, Signal and Image Processing Group* (GAPIS) do Departamento de Computação da UFSCar, pelo companheirismo e em especial, a todos aqueles que participaram ativamente nos seminários semanais coordenados pelo Prof. Nelson Mascarenhas na UFSCar, proporcionando uma oportunidade única para aprender e discutir idéias.

... às secretárias e técnicos do Grupo de Instrumentação e Informática do IFSC, em especial à Cláudia, Sueli e ao Marquinhos e às secretárias da pós-graduação do IFSC, em especial à Wladerez, pela atenção de sempre.

... às bibliotecárias da Biblioteca "Bernhard Gross" do IFSC, em especial àquelas do setor de referência.

... à FAPESP pelo suporte financeiro (processo 99/01351-2) e a todos que direta ou indiretamente colaboraram para o resultado final deste trabalho.

Sumário

Capítulo 1 Introdução 15
1.1 Introdução 15
1.2 Motivação e Objetivos 19
1.3 Contribuições 21
1.4 Organização do Texto 22

Capítulo 2 Microscopia de Seccionamento Óptico Computacional 23
2.1 Introdução 23
2.2 Microscopia de Fluorescência 23
2.3 Modelo de Formação da Imagem em Microscopia Óptica 25
2.4 Modelo Discreto de Formação da Imagem 29
2.5 Caracterização do Ruído em Microscopia de Deconvolução 30
2.6 A Função de Espalhamento Pontual 33
2.7 Caracterização do Problema e Revisão da Literatura 43
2.8 Conclusão 51

Capítulo 3 Algoritmos de Restauração Estatísticos 52
3.1 Introdução 52
3.2 Procedimentos para Redução do Ruído Poisson 53
3.2.1 Estimação Usando o Critério de Máximo a Posteriori 53
3.2.2 Estimação Através da Transformação de Anscombe 56
3.3 Filtros Lineares Propostos para Deconvolução 59
3.3.1 Filtro MAP Não-linear 59
3.3.2 Filtro MAP Linearizado 62
3.3.3 Filtro Linear de Goodman-Belsher 64
3.4 Resultados e Discussões 68
3.4.1 Imagens de Estudo 68
3.4.2 Determinação da Função de Espalhamento Pontual 71
3.4.3 Incorporação do Ruído Poisson 73
3.4.4 Medidas, Validações e Critérios de Comparação 73
3.4.5 Avaliação dos Métodos com Dados Simulados 74
3.4.5.1 Redução do Ruído Poisson 75
3.4.5.2 Filtro MAP Linearizado 77
3.4.5.3 Filtro Linear de Goodman-Belsher 80
3.4.5.4 Comparações com o RLLS 83
3.4.6 Avaliação dos Métodos Lineares com Imagens Reais 86
3.5 Conclusão 90

Capítulo 4 Projeções Sobre Conjuntos Convexos 91
4.1 Introdução 91
4.2 Fundamentos de POCS 92

4.3 Conjuntos de Restrições 99
4.3.1 Imagens Protótipos – O Caso Geral 100
4.3.2 Restrição Baseada na Solução de Wiener 102
4.3.3 Restrição Baseada na Solução de Goodman-Belsher 104
4.3.4 Restrição de Suavização Adaptativa Pontual 105
4.3.5 Restrições de Positividade e Extensão Finita 107
4.4 Algoritmos POCS Propostos 110
4.5 Resultados e Discussões 112
4.5.1 Imagens de Estudo e PSF 112
4.5.2 Incorporação do Ruído Aditivo Gaussiano 112
4.5.3 Medidas, Validações e Critérios de Comparação 113
4.5.4 Convergência - Critério de Parada 114
4.5.5 Complexidade Computacional dos Algoritmos 114
4.5.6 Avaliação dos Métodos com Dados Simulados 115
4.5.6.1 Desempenho dos Algoritmos POCS 115
4.5.6.2 Efeito da Restrição de Suavização 121
4.5.6.3 Efeito da Restrição de Suporte Compacto 122
4.5.7 Avaliação dos Métodos com Imagens Reais 124
4.6 Conclusão 128

Capítulo 5 Esqueletização Tridimensional 130
5.1 Introdução 130
5.2 Esqueleto: Definição e Algoritmos 133
5.3 Esqueletização e Campos Potenciais 137
5.4 Campos Vetoriais via Transformada Rápida de Fourier 141
5.5 Estimação de Curvaturas 144
5.6 Resultados e Discussões 146
5.6.1 O Caso Bidimensional 146
5.6.2 O Caso Tridimensional 151
5.6.2.1 Esqueletização de Estruturas Simuladas 151
5.6.2.2 Esqueletização de Artérias 153
5.6.2.3 Esqueletização de Neurônios 157
5.7 Conclusão 160

Capítulo 6 Conclusões e Perspectivas Futuras 161
6.1 Conclusão Geral 161
6.2 Perspectivas Futuras 162

Anexo A - Os Algoritmos MLEM e RLLS 163
A.1 O Algoritmo MLEM 163
A.2 O Algoritmo RLLS 163

Referências Bibliográficas 165

Índice de Figuras

Figura 2-1: Esquema de uma configuração de microscopia de fluorescência. Extraído e modificado a partir de Davidson e Abramowitz (2002) 24
Figura 2-2: Sistema simplificado de formação da imagem em um microscópio óptico. Extraído e modificado a partir de Castleman (1996). 26
Figura 2-3: Esquema de formação de uma imagem tridimensional obtida por uma série de seções ópticas bidimensionais. 27
Figura 2-4: Sistema óptico simples consistindo de uma única lente. 34
Figura 2-5: Diagrama esquemático de uma lente fora de foco. E é a pupila de saída da lente e α' é chamado ângulo de saída. A quantidade fora de foco pode ser especificada pela distância δz ou ainda pelo *optical-path-length error* ω que é a diferença entre duas ondas esféricas S e S' centradas no ponto pertencente ao plano focal I e no ponto pertencente ao plano fora do foco I', respectivamente. Extraído e modificado a partir de Preza (1990). 37
Figura 2-6: Seção radial para quatro OTF desfocadas em diferentes distâncias a partir do plano focal para uma objetiva de imersão em óleo de 100X, 1.3 NA e considerando $\lambda = 0.5$ µm. Os dados foram gerados a partir do modelo de Gibson e Lanni. 39
Figura 2-7: Módulo da OTF desfocada variando a distância do foco para uma objetiva de imersão em óleo de 100X, 1.3 NA considerando um comprimento de onda $\lambda = 0.5$ µm: (a) $\delta z = 0$ µm (no foco); (b) $\delta z \cong 1$ µm; (c) $\delta z \cong 2$ µm. 40
Figura 2-8: PSF desfocada variando a distância do foco para uma objetiva de imersão em óleo de 100X, 1.3 NA considerando $\lambda = 0.5$ µm: (a) $\delta z = 0$ µm (no foco); (b) $\delta z \cong 1$ µm; (c) $\delta z \cong 2$ µm. 41
Figura 2-9: (a) Seção central de uma PSF 3D ao longo do eixo óptico para uma objetiva de imersão em óleo de 100X, 1.3 NA e $\lambda = 0.5$ µm; (b) Seção central da OTF 3D para a mesma objetiva (o *colormap* das imagens foi convenientemente ajustado para o *display*). 42
Figura 3-1: Diagrama de blocos do procedimento para redução do ruído Poisson através da transformação de Anscombe. 58
Figura 3-2: Esquema do *phantom* 3D 68
Figura 3-3: Ilustração de duas seções da imagem do *phantom* 3D utilizado nos experimentos: (a) uma seção no plano *x-y*; (b) uma seção no plano *y-z* 69
Figura 3-4: Diagrama esquemático do *bead*. A parte externa fluoresce no vermelho e a interna no verde. 69
Figura 3-5: Imagem do *bead* obtida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 60X, 1.4 NA de imersão em óleo e um filtro para λ=0.635 µm (vermelho): (a) plano *x-y*; (b) plano *y-z*. 69
Figura 3-6: Imagem do *bead* obtida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 60X, 1.4 NA de imersão em óleo e um filtro para λ=0.535 µm (verde): 70
Figura 3-7: Duas seções para uma imagem de 128x128x128 *voxels* do embrião Volvox com quatro células, adquirida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 100X, 1.3 NA de imersão em óleo e utilizando um filtro para $\lambda = 0.530$ µm. O tamanho do *voxel* na direção *x-y* é de 0.54 µm e na direção *z* é de 0.30 µm: (a) seção 51; (b) seção 63 70

Figura 3-8: Duas seções para uma imagem de 128x128x128 *voxels* de retículo endoplasmático adquirida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 20X, 0.75 NA e um filtro para λ = 0.530 μm. A dimensão do *voxel* é de 0.713x0.713x0.713 μm: (a) seção 50; (b) seção 55..... 70
Figura 3-9: Seções do *phantom* 3D através de um microscópio de fluorescência simulado por uma PSF teórica para uma objetiva de 60X, 1.4 NA e λ=0.530μm: (a) plano *x-y*; (b) plano *y-z*. A dimensão do *voxel* na direção *x-y* é de 0.094 μm e na direção *z* de 0.25 μm. 72
Figura 3-10: Seções do *phantom* 3D através de um microscópio de fluorescência simulado por uma PSF teórica para uma objetiva de 100X, 1.3 NA e λ=0.530μm: (a) plano *x-y*; (b) plano *y-z*. A dimensão do *voxel* é de 0.1426 x 0.1426 x 0.1426 μm..... 72
Figura 3-11: Seções do *phantom* borrado e degradado por ruído Poisson para $\gamma = 1$: (a)-(b) seções no plano *x-y* e *y-z* para a imagem borrada pela PSF1; (c)-(d) seções no plano *x-y* e *y-z* para a imagem borrada pela PSF2. 73
Figura 3-12: Imagens borradas pela PSF1 sem ruído; (a)-(b) seções no plano *x-y* e no plano *y-z*, respectivamente, da imagem estimada pelo algoritmo baseado na AT; (c)-(d) seções da imagem borrada estimada pelo algoritmo baseado no critério MAP..... 76
Figura 3-13: ISNR para as imagens sem ruído, estimadas pelos filtros baseados na AT e no critério MAP, para o caso da imagem borrada pela PSF1..... 76
Figura 3-14: ISNR para as imagens sem ruído, estimadas pelos filtros baseados na AT e no critério MAP, para o caso da imagem borrada pela PSF2..... 77
Figura 3-15: Seções da imagem do *phantom* restaurada pelo filtro MAP linearizado, considerando o borramento pela PSF1: (a)-(b) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, da imagem restaurada utilizando a estimativa sem ruído baseada na AT; (c)-(d) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, da imagem restaurada utilizando a estimativa sem ruído baseada no critério MAP. 78
Figura 3-16: ISNR para as restaurações da imagem do *phantom* borrada pela PSF1 e degradada por ruído Poisson, utilizando o filtro MAP linearizado, considerando as estimativas da imagem borrada e sem ruído através dos procedimentos baseados na AT e no critério MAP..... 78
Figura 3-17: Seções da imagem do *phantom* restaurada pelo filtro MAP linearizado, considerando o borramento pela PSF2: (a)-(b) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, da imagem restaurada utilizando a estimativa sem ruído baseada na AT; (c)-(d) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, da imagem restaurada utilizando a estimativa sem ruído baseada no critério MAP. 79
Figura 3-18: ISNR para as restaurações da imagem do *phantom* borrada pela PSF2 e degradada por ruído Poisson, utilizando o filtro MAP linearizado, considerando as estimativas da imagem borrada e sem ruído através dos procedimentos baseados na AT e no critério MAP..... 79
Figura 3-19: Seções das imagens do *phantom* restauradas pelo filtro de Goodman-Belsher considerando o borramento pela PSF1: (a)-(b) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, utilizando o parâmetro de regularização adaptativo; (c)-(d) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, para o caso onde $\rho = 1$..... 81
Figura 3-20: ISNR para as imagens restauradas pelo filtro de Goodman-Belsher a partir das imagens borradas pela PSF1 e degradadas por ruído Poisson. 81

Figura 3-21: Seções das imagens do *phantom* restauradas pelo filtro de Goodman-Belsher considerando o borramento pela PSF2: (a)-(b) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, utilizando o parâmetro de regularização adaptativo; (c)-(d) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, para o caso onde $\rho = 1$ 82
Figura 3-22: ISNR para as imagens restauradas pelo filtro de Goodman-Belsher a partir das imagens borradas pela PSF2 e degradadas por ruído Poisson. 82
Figura 3-23: Seções das imagens borradas e degradadas por ruído Poisson do *phantom* restauradas pelo algoritmo RLLS: (a)-(b) plano *x-y* e *y-z*, respectivamente, da imagem restaurada considerando o borramento pela PSF1; (c)-(d) plano *x-y* e *y-z* da imagem restaurada a partir da imagem borrada pela PSF2..... 84
Figura 3-24: ISNR para as restaurações das imagens do *phantom*, borradas e degradadas por ruído, pelos algoritmos de Goodman-Belsher, MAP linearizado e RLLS, respectivamente, considerando o borramento pela PSF1. 84
Figura 3-25: ISNR para as restaurações das imagens do *phantom*, borradas e degradadas por ruído, pelos algoritmos de Goodman-Belsher, MAP linearizado e RLLS, respectivamente, considerando o borramento pela PSF2. 85
Figura 3-26: Seções da imagem 3D do embrião Volvox adquirida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 100X, 1.3 NA de imersão em óleo e utilizando um filtro para λ = 0.530 μm: (a) imagem observada; (b) imagem restaurada pelo algoritmo MAP linearizado; (c) imagem restaurada pelo algoritmo de Goodman-Belsher; (d) imagem restaurada pelo algoritmo RLLS..... 87
Figura 3-27: Seções da imagem 3D de retículo endoplasmático adquirida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 20X, 0.75 NA e um filtro para λ = 0.530 μm: (a) imagem observada; (b) imagem restaurada pelo algoritmo MAP linearizado; (c) imagem restaurada pelo algoritmo de Goodman-Belsher; (d) imagem restaurada pelo algoritmo RLLS. 88
Figura 3-28: Seções da imagem 3D do *bead* obtida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 60X, 1.4 NA e um filtro para λ=0.635 μm: (a) imagem observada; (b) imagem restaurada pelo algoritmo MAP linearizado; (c) imagem restaurada pelo algoritmo de Goodman-Belsher; (d) imagem restaurada pelo algoritmo RLLS..... 89
Figura 4-1: Ilustração do conceito de convexidade para conjuntos no plano: (a) convexo; (b) não convexo..... 93
Figura 4-2: Ilustração do algoritmo POCS para dois conjuntos. Verifica-se que para um ponto inicial arbitrário, a seqüência gerada pela relação recursiva apresentada na Eq. (4-9) converge para a intersecção $C_1 \cap C_2$..... 96
Figura 4-3: Ilustração do comportamento do algoritmo POCS seqüencial para o caso de dois conjuntos que não se intersectam..... 97
Figura 4-4: Influência da restrição de suporte compacto. Extraído e modificado a partir de Stark e Yang (1998)..... 109
Figura 4-5: Diagrama de blocos dos algoritmos POCS propostos..... 111
Figura 4-6: Seções das imagens do *phantom* borradas e degradadas por ruído Poisson (γ = 1) e por ruído Gaussiano a 30 dB: (a)-(b) seções no plano *x-y* e *y-z*, respectivamente, da imagem borrada considerando a PSF1; (c)-(d) seções para a imagem borrada pela PSF2. 113

Figura 4-7: Seções nos planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, das imagens restauradas considerando a imagem borrada pela PSF1: (a)-(b) algoritmo POCS1 onde foi utilizada a imagem sem ruído Poisson estimada pelo algoritmo baseado na AT, para a construção do protótipo; (c)-(d) algoritmo POCS1 utilizando a abordagem MAP para a construção do protótipo; (e)-(f) algoritmo POCS2; (g)-(h) algoritmo MLEM. 117

Figura 4-8: Seções nos planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, das imagens restauradas considerando a imagem borrada pela PSF2: (a)-(b) algoritmo POCS1 onde foi utilizada a imagem sem ruído Poisson estimada pelo algoritmo baseado na AT, para a construção do protótipo; (c)-(d) algoritmo POCS1 utilizando a abordagem MAP para a construção do protótipo; (e)-(f) algoritmo POCS2; (g)-(h) algoritmo MLEM. 118

Figura 4-9: ISNR para as restaurações pelos algoritmos POCS e MLEM, para o caso da imagem borrada pela PSF1. 119

Figura 4-10: ISNR para as restaurações pelos algoritmos POCS e MLEM, para o caso da imagem borrada pela PSF2. 119

Figura 4-11: (a) Restauração da imagem do *bead* usando as restrições impostas pelos conjuntos S_1 e S_4; (b) Restauração usando os conjuntos S_1, S_3 e S_4. 122

Figura 4-12: Ilustração do efeito da restrição de suporte compacto: (a)-(b) módulos das seções centrais da DFT da imagem observada nos planos *u-v* e *v-w*, respectivamente; (c)-(d) módulo da DFT da solução de Wiener; (e)-(f) módulo da DFT da imagem restaurada pelo algoritmo POCS utilizando os conjuntos S_2 e S_4; (g)-(h) módulo da DFT da imagem restaurada pelo algoritmo POCS usando os conjuntos S_2, S_4 e S_5. 123

Figura 4-13: Seções da imagem 3D do embrião Volvox adquirida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 100X, 1.3 NA de imersão em óleo e utilizando um filtro para λ = 0.530 μm: (a) imagem observada; (b) imagem restaurada pelo algoritmo POCS2; (c) imagem restaurada pelo algoritmo de Goodman-Belsher; (d) imagem restaurada pelo algoritmo MAP linearizado; (e) imagem restaurada pelo algoritmo MLEM; (f) imagem restaurada pelo algoritmo RLLS. 125

Figura 4-14: Seções da imagem 3D de retículo endoplasmático adquirida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 20X, 0.75 NA e um filtro para λ = 0.530 μm: (a) imagem observada; (b) imagem restaurada pelo algoritmo POCS2; (c) imagem restaurada pelo algoritmo de Goodman-Belsher; (d) imagem restaurada pelo algoritmo MAP; (e) imagem restaurada pelo algoritmo MLEM; (f) imagem restaurada pelo algoritmo RLLS. 126

Figura 4-15: Seções da imagem 3D do *bead* obtida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 60X, 1.4 NA de imersão em óleo e um filtro para λ = 0.635 μm: (a) imagem observada; (b) imagem restaurada pelo algoritmo POCS2; (c) imagem restaurada pelo algoritmo de Goodman-Belsher; (d) imagem restaurada pelo algoritmo MAP linearizado; (e) imagem restaurada pelo algoritmo MLEM; (f) imagem restaurada pelo algoritmo RLLS. 127

Figura 5-1: Representação do eixo médio para uma região retangular ilustrando três circunferências de raios máximos centradas em pontos distintos sobre o eixo médio. 134

SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

Figura 5-2: (a) campo vetorial associado a uma estrutura retangular bidimensional; (b) campo vetorial associado a uma estrutura bidimensional em forma de L; (c) esqueleto associado ao campo vetorial. 138
Figura 5-3: (a) imagem binária de uma estrutura em forma de "T"; (b) superfície gerada pela magnitude da força resultante. 140
Figura 5-4: Comportamento da função $h_x[i,j,k]$ para três valores de α: (a) $\alpha = 1$; (b) $\alpha = 2$; (c) $\alpha = 3$ 143
Figura 5-5: (a) Região bidimensional retangular; (b) mapa de curvaturas gerado para $\alpha = 4$; (c) esqueleto extraído seguindo o procedimento da Eq. (5-29). 147
Figura 5-6: (a) mapa de curvaturas gerado para R = 60 e α = 4; (b) mapa de curvaturas gerado para R = 80 e α =4; (c) esqueleto extraído a partir do mapa de curvaturas apresentado em (b). 148
Figura 5-7: (a) contorno em forma de "U"; (b) mapa de curvaturas gerado para $\alpha = 2$; (c) mapa de curvaturas gerado para $\alpha = 5$. 149
Figura 5-8: Exemplos de esqueletos obtidos pelo método proposto. 150
Figura 5-9: (a) estrutura retangular apresentando uma falha; (b) mapa de curvaturas; (c) esqueleto. 150
Figura 5-10: (a) estrutura retangular com borda irregular; (b) mapa de curvaturas obtido para $\alpha = 4$ e R = 70; (c) esqueleto. 151
Figura 5-11: Esqueleto da Figura 5-10c desconsiderando a região da borda que apresenta artefatos. 151
Figura 5-12: Imagem 3D da estrutura utilizada para testar o algoritmo de esqueletização. O cilindro possui um diâmetro de 107 *voxels*. 152
Figura 5-13: Seções bidimensionais dos mapas de curvaturas para $\alpha = 3$: (a) R = 20 *voxels*; (b) R = 45 *voxels*; (c) R = 55 *voxels*. 152
Figura 5-14: Dois ângulos de visão diferentes para o cilindro e o esqueleto. 153
Figura 5-15: Imagens 3D de duas artérias reais: (a) artéria 1; (b) artéria 2. 154
Figura 5-16: Seções dos mapas de curvaturas para as duas artérias estudadas, considerando R = 40 e $\alpha = 3$: (a) artéria 1; (b) artéria 2. 154
Figura 5-17: (a)-(b) dois ângulos de visão para a artéria 1 e o respectivo esqueleto; (c)-(d) dois ângulos de visão para a artéria 2 e o respectivo esqueleto. 155
Figura 5-18: Curvatura do esqueleto da artéria 1 em função de s. 156
Figura 5-19: Torção do esqueleto da artéria 1 em função de s. 156
Figura 5-20: Imagens de neurônios (células ganglionares) obtidas com um microscópio confocal: (a) seção de uma imagem volumétrica de um neurônio capturada na emissão de 530 nm; (b) seção de uma imagem volumétrica de um neurônio capturada na emissão de 630 nm. 158
Figura 5-21: (a) imagem tridimensional segmentada do neurônio obtida para uma emissão de 530 nm; (b) esqueleto. 159
Figura 5-22: (a) imagem tridimensional segmentada do neurônio obtida para uma emissão de 630 nm; (b) esqueleto. 159

Índice de Tabelas

Tabela 3-1: Parâmetros para a PSF teórica para uma lente de 60X, 1.4 NA. 71
Tabela 3-2: Parâmetros para a PSF teórica para uma lente de 100X, 1.3 NA. 72

Lista de Abreviações

2D – Two-Dimensional

3D – Three-Dimensional

AT – Anscombe Transformation

CCD – Charged-Coupled Device

COSM – Computational Optical Sectioning Microscopy

DFT – Discrete Fourier Transform

DIC – Differential Interference Contrast

DT – Distance Transform

EM – Expectation Maximization

FFT – Fast Fourier Transform

FT – Fourier Transform

IAS – Intensity Axis of Symmetry

IDFT – Inverse Discrete Fourier Transform

IFT – Inverse Fourier Transform

ISNR – Improvement in Signal to Noise Ratio

MA – Medial Axis

MAP – Maximum *a Posteriori*

MAT – Medial Axis Transform

ML – Maximum Likelihood

MLEM – Maximum Likelihood Expectation Maximization

MSE – Mean-Squared Error

OTF – Optical Transfer Function

PDF – Probability Density Function

POCS – Projection onto Convex Sets

PSF – Point Spread Function

RI – Refraction Index

RLLS – Regularized Linear Least Squares

SA – Symmetric Axis

SAT – Symmetric Axis Transform

SNR – Signal to Noise Ratio

VTK – Visualization ToolKit

Resumo

A restauração de imagens obtidas através de microscopia de seccionamento óptico computacional, utilizando técnicas de fluorescência, é um problema relevante em muitas aplicações biológicas. Diversos métodos foram propostos nos últimos anos com diferentes graus de sucesso para melhorar a qualidade destas imagens, mas a complexidade dos dados e o custo computacional do processamento ainda permanecem como fatores limitantes neste tipo de problema.

Consideramos, neste trabalho, várias metodologias para a deconvolução de imagens tridimensionais obtidas em microscopia de fluorescência *wide-field*, onde propomos métodos lineares não iterativos e também algoritmos iterativos não lineares, que incorporam a presença do ruído Poisson nas observações devido à baixa contagem de fótons. Ainda, propomos duas abordagens específicas para a redução do ruído Poisson, sendo a primeira baseada em um critério de máximo *a posteriori* e a segunda na transformação de Anscombe.

O primeiro algoritmo de deconvolução linear não iterativo é um método de dois passos baseado em um filtro de restauração não linear derivado a partir de um critério de máximo *a posteriori*, que considera uma distribuição de Poisson para modelar o ruído presente na imagem observada. O segundo, é um filtro de mínimo erro médio quadrático derivado usando o princípio da ortogonalidade no domínio de Fourier a partir de um modelo para o ruído Poisson.

Os métodos iterativos não lineares são baseados na teoria de Projeções sobre Conjuntos Convexos, sendo que propomos o uso de cinco conjuntos de restrições convexas. Estas restrições são derivadas de forma a deconvoluir a imagem observada com a função de espalhamento pontual do microscópio, recuperar parte das freqüências perdidas devido à função de transferência óptica do sistema, garantir a positividade da solução e, também, prevenir erros introduzidos pelo processo de regularização.

Os algoritmos foram analisados utilizando imagens sintéticas, com diferentes níveis de ruído Poisson e com imagens de espécimes reais. Os métodos também foram comparados com os algoritmos *Maximum Likelihood Expectation Maximization* e *Regularized Linear Least Squares*, apresentando boa performance em termos visuais e também uma boa relação custo-benefício.

Ainda, propomos uma metodologia eficiente para a esqueletização tridimensional de estruturas tubulares, como neurônios e artérias, através do cálculo numérico de campos vetoriais e da estimação de curvaturas principais usando o mapa de Weingarten. Dada uma imagem binária, o método consiste em gerar uma imagem em tons de cinza, correspondente à magnitude de um campo de vetores, seguido por uma busca de pontos que pertencem aos vales de potenciais. Pode-se mostrar que estes pontos correspondem à transformação do eixo médio.

Apresentamos resultados para contornos bidimensionais e também para imagens tridimensionais de neurônios e artérias. O algoritmo demonstrou uma boa performance, uma vez que o campo vetorial pode ser rapidamente calculado usando algoritmos de transformada rápida de Fourier.

Abstract

The deconvolution of images obtained by means of optical-sectioning wide-field fluorescence microscopy, is a relevant problem in biological applications. Several methods have been proposed in the last few years, with different degrees of success, to improve the quality of the images, but the data complexity and the computational cost remain a limiting factor in this problem.

We present in this work several methodologies to perform the deconvolution of three-dimensional data obtained by wide-field fluorescence microscopy. We present both linear, non-iterative and non-linear, iterative methods that take into accont the nature of the noise due to the low level of photon counts. We also propose two algoritms to reduce the Poisson noise. The first one is based on a maximum *a posteriori* approach and the second one is based on the Anscombe transformation.

The first linear, non-iterative algorithm is a two-pass method based on a non-linear maximum *a posteriori* restoration filter derived using the Poisson noise model. The second linear, non-iterative deconvolution algorithm is a pointwise, space-invariant, minimum mean square restoration filter for the Poisson image noise model derived using the orthogonality principle in the Fourier domain.

The non-linear, iterative methods are based on the Projection onto Convex Sets theory. In the restoration algorithms, we combine five constraints sets in order to restore the out-of-focus blur, to retrieve the missing frequencies due to the transfer function of the optical system, to guarantee positiveness, and also to prevent the regularization errors.

The methods were analysed using phantoms with several degrees of Poisson noise and with real cell images. Also, they were compared with the Maximum Likelihood Expectation Maximization and Regularized Linear Least Squares algorithms. All the metodologies demonstrate good performance in terms of both visual results and cost-benefit analysis.

We also propose an approach for efficient three-dimensional skeletonization of tubular structures, such as neurons and arteries, through fast numerical calculation of vector fields and curvature estimation by using the Weingarten formulae. In short, given a binary image, the method consists in generating a grayscale image corresponding to the magnitude of a vector field followed by a search of the points that belong to the botton of the potencial valleys. It can be shown that these points correspond to the medial axis transformation.

We present results for both two-dimensional shapes and three-dimensional arteries and neurons images. The algorithm has demonstrated a good performance due to the fact that the vector field can be easy and fastly calculated using the fast Fourier transform algorithm.

Capítulo 1 Introdução

1.1 Introdução

Desde o advento do microscópio óptico ou de luz, diversos avanços e inovações tecnológicas foram desenvolvidos e acrescentados a esta modalidade do conhecimento [Davidson e Abramowitz (2002)] e hoje, ao lado de outros tipos de microscopia como, por exemplo, a eletrônica [Leal (2000)], estas técnicas já se tornaram de uso comum entre os mais diversos usuários deste tipo de instrumento óptico. Entre estas inovações podemos citar as diversas formas de microscopia de contraste como a microscopia de campo escuro (*dark-field*), de contraste de fase e contraste interferencial de Normaski [Preza (1998)] – também conhecida como DIC (*differential interference contrast*), entre várias outras.

Contudo, uma outra forma de microscopia cresceu rapidamente nos últimos 30 anos e passou a ocupar um lugar de destaque cada vez maior, principalmente nas áreas de ciências médicas e biológicas. Esta modalidade, conhecida como *microscopia de fluorescência,* tomou um grande impulso com o advento da *microscopia confocal* [Corle e Kino (1996)], que associada às técnicas de fluorescência, é capaz de fornecer imagens com extrema nitidez [Davidson e Abramowitz (2002)]. Este tipo de microscopia é hoje muito usado uma vez que é capaz de permitir observações detalhadas de estruturas específicas dentro das células. "Dopando" os componentes celulares de interesse com um material fluorescente (chamado de *fluorocromo*), as estruturas e os tecidos celulares podem ser visualizados e estudados com grande precisão.

Os dois tipos de microscópios mais utilizados em conjunto com estas técnicas são o microscópio *wide-field* (convencional) e o já mencionado microscópio confocal. Ainda, entre os desenvolvimentos recentes destacam-se alguns novos instrumentos como o microscópio confocal 2-fótons [Denk et al. (1990)] e o microscópio 4-PI [Hell et al. (1997)] que são capazes de superar o desempenho dos anteriores.

Particularmente, microscopia óptica de fluorescência é uma das principais ferramentas usadas em histologia e microanatomia onde se destaca o interesse pelo

estudo da estrutura e função dos espécimes fisiológicos. Ainda, em muitas aplicações dentro destas áreas, existe o interesse pela visualização tridimensional do objeto em estudo, o que poderia evitar possíveis interpretações equivocadas da sua estrutura a partir do estudo individual de imagens bidimensionais [Agard et al. (1989)]. Tal procedimento se justifica uma vez que, de maneira geral, verifica-se que *forma* e *função* são extremamente correlacionadas. Por exemplo, em neurociências, a visualização e a descrição de cada estrutura celular é de grande importância em estudos neuromorfométricos, verificando-se que propriedades funcionais dos neurônios são associadas com o formato de suas membranas [Costa (1995)] [Costa (1997)]. Neste sentido, a correta visualização tridimensional é necessária para um entendimento completo de células nervosas.

O problema da visualização tridimensional de um espécime biológico com o uso de um microscópio de fluorescência pode ser solucionado a partir de uma técnica conhecida como *seccionamento óptico* [Agard (1984)] [Streibl (1985)]. Esta técnica consiste basicamente em mover o plano focal do instrumento enquanto uma série de imagens bidimensionais é coletada e armazenada. Posteriormente, estas imagens são empilhadas para formar a estrutura tridimensional que se deseja visualizar [Levinthal e Ware (1972)]. Quando associada a procedimentos computacionais para controle do equipamento, armazenamento, manipulação e processamento destas imagens, esta técnica é conhecida como microscopia de seccionamento óptico computacional (*Computational Optical Sectioning Microscopy* – COSM), sendo muito utilizada para visualizar espécimes biológicos de dimensões microscópicas por se tratar de um procedimento não invasivo.

Dessa forma, microscopia de seccionamento óptico computacional freqüentemente é a técnica de escolha para a geração de imagens tridimensionais usando microscopia de fluorescência *wide-field* ou *confocal.* A decisão sobre o tipo de instrumento a ser utilizado freqüentemente depende da aplicação e da disponibilidade dos equipamentos. Como já mencionado, os efeitos da microscopia de fluorescência são mais notáveis quando associada à microscopia *confocal.* Contudo, o custo deste equipamento é em geral seis vezes superior ao de um sistema convencional [Leal (2000)]. Naturalmente, microscopia de fluorescência utilizando um microscópio convencional é uma alternativa viável capaz de manter uma relação

custo-benefício aceitável entre a qualidade das imagens observadas e custo total do equipamento.

No entanto, as imagens obtidas em microscopia de seccionamento óptico computacional com o uso de um microscópio *wide-field* são essencialmente limitadas quando comparadas com imagens confocais, pois devido a vários fatores, as imagens observadas sofrem de um alto grau de degradação. Em COSM, a maior parte desta degradação é devido à *difração* da luz produzida pela abertura finita do sistema de lentes. Ainda, podemos acrescentar distorções introduzidas pelas próprias lentes como as aberrações esféricas e cromáticas, não linearidades do sensor que é utilizado para captar as imagens e *ruídos* incorporados durante o processo de detecção e armazenamento. A maioria destes problemas pode ser eliminada ou reduzida a níveis aceitáveis em um sistema próximo do ideal. Por exemplo, aberrações no sistema de lentes podem ser minimizadas com lentes de melhor qualidade que são disponíveis atualmente. Contudo, a difração é uma parte inerente do sistema e freqüentemente não pode ser negligenciada. Os efeitos da difração em microscopia convencional são tão severos que comprometem a resolução no plano focal, gerando como resultado uma imagem borrada e de pouca nitidez. Particularmente, a perda da resolução ao longo do eixo óptico (resolução axial) é muito maior quando comparada à perda de resolução lateral. Em resumo, a luz capturada pela objetiva vem de um volume do material cuja profundidade é definida pela objetiva utilizada e isso significa dizer que a luz capturada não veio só da região em foco, mas contêm contribuições das regiões que estão acima e abaixo do plano focal do microscópio.

Mais ainda, quando se trata da aquisição de imagens de espécimes biológicos, outros problemas devem ser levados em consideração, como o tempo de aquisição, que deve ser o menor possível devido ao fenômeno de "*bleaching*" [Conchello (1995)] e também em função da possibilidade de movimentos em dimensões celulares. Esta situação pode levar a aquisição de imagens com um alto nível de ruído nas observações.

Microscopia *wide-field* é uma ferramenta valiosa para trabalhar com espécimes vivos pois evita danos nas células que poderiam ser provocados pelos *lasers* padrões usados em microscópios confocais, além da capacidade de se trabalhar com comprimentos de onda que não são possíveis com o uso destes *lasers*.

Por outro lado, o avanço do microscópio *confocal* sobre o convencional reside justamente na sua capacidade de eliminar ou reduzir ao máximo as contribuições de luz provenientes de planos que estão fora do foco, possibilitando assim um aumento considerável na resolução axial. Mais ainda, um pequeno aumento na resolução lateral também é proporcionado em relação à microscopia *wide-field*. Contudo, nesta modalidade, além do alto custo do equipamento, a sensibilidade e a eficiência luminosa e são inferiores à microscopia convencional. Ainda, microscópios confocais são mais lentos e sempre existe um custo entre sua resolução superior e um aumento na relação sinal ruído.

Dessa forma, para a geração de imagens tridimensionais a partir de seccionamento óptico usando microscopia de fluorescência *wide-field*, cada plano da imagem deve ser processado para que os efeitos da informação provenientes de regiões fora de foco sejam eliminados ou pelo menos reduzidos a níveis aceitáveis.

Modelando a óptica do microscópio (*difração*) e os mecanismos de degradação (*ruídos*), este processamento é realizado através dos chamados algoritmos de deconvolução[1]. Observamos que, como estes algoritmos são capazes de aumentar a resolução lateral e axial das imagens obtidas através de um microscópio *wide-field*, eles também podem ser aplicados a imagens confocais para melhorar ainda mais a qualidade destas.

O presente trabalho propõe o estudo e implementação de algoritmos para a restauração de imagens adquiridas em microscopia *wide-field*, utilizando seccionamento óptico computacional, e a posterior reconstrução tridimensional de espécimes biológicos.

Particularmente, dentre as inúmeras possibilidades de aplicação, propomos a restauração e reconstrução tridimensional de imagens de neurônios obtidas em microscopia de fluorescência, uma vez que o processamento e a visualização destas estruturas são importantes para estudos em neurociência e também se inserem dentro do contexto de estudos do Grupo de Pesquisa em Visão Cibernética.

Ainda dentro deste contexto, também propomos um algoritmo para esqueletização tridimensional de estruturas tubulares, como neurônios e artérias.

---

[1] Por esta razão, microscopia de seccionamento óptico computacional usando microscópios *wide-field* também é conhecida na literatura como *microscopia de deconvolução*.

Aliado a correta visualização tridimensional de células nervosas, algoritmos de esqueletização tornam-se ferramentas valiosas para a análise destas estruturas. Posteriormente à etapa de reconstrução, estes algoritmos podem ser aplicados às ramificações dendríticas para a extração de medidas de interesse em *neuromorfometria computacional.*

1.2 Motivação e Objetivos

Nos últimos 20 anos, aumentaram significativamente os estudos e as pesquisas relacionados à restauração e a posterior reconstrução tridimensional de imagens a partir de seções bidimensionais obtidas em microscopia óptica, principalmente no que se refere ao estudo de espécimes biológicos, sendo que, por se tratar de uma técnica não invasiva, torna-se uma ferramenta muito útil.

Em contrapartida aos algoritmos de restauração e reconstrução, observamos que a visualização de dados em três dimensões é extremamente importante para o entendimento das arquiteturas tridimensionais das células e seus respectivos componentes celulares.

Contudo, apesar da extensa literatura existente, o processamento tridimensional (3D) em microscopia de seccionamento óptico computacional permanece um problema em aberto para aplicações biológicas em função da complexidade dos dados e do custo total de processamento.

De fato, apesar da grande capacidade dos computadores disponíveis atualmente, a grande quantidade de dados e o custo do processamento ainda são fatores limitantes em muitas situações práticas que envolvem estudos de espécimes em curtos intervalos de tempo. Assim, existe a necessidade da busca por algoritmos cada vez mais rápidos do ponto de vista computacional e/ou efetivos do ponto de vista da restauração, capazes de produzir imagens melhores, permitindo assim um aperfeiçoamento em experimentos onde a demanda de tempo é crítica, como é o caso do estudo de espécimes vivos.

Além do borramento oriundo da óptica do microscópio, ainda existem diversas fontes de ruídos que pioram a qualidade das imagens observadas. Como um resultado de muitos problemas que existem quando observando células vivas (por

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

exemplo, para evitar o *photobleaching*[2]), as imagens são freqüentemente adquiridas com baixo tempo de exposição o que significa que são gravadas sob baixa contagem de fótons. Nesta situação as imagens são corrompidas por um tipo de ruído dependente do sinal que pode ser modelado por uma distribuição de Poisson. Além disso, outras fontes de ruídos são ainda incorporadas na imagem observada, como o ruído térmico (eletrônico) oriundo de câmeras CCD (*Charge Couple Devices*), freqüentemente usadas para gravar as imagens.

O problema de interesse em questão é desenvolver algoritmos capazes de aumentar a qualidade das imagens em microscopia *wide-field* de fluorescência em um curto período de tempo ou ainda, algoritmos capazes de superar a performance dos métodos já existentes. Como observado anteriormente, estes métodos podem ser também aplicados diretamente sobre imagens confocais com o intuito de gerar imagens com melhor qualidade.

Outra questão em aberto é a possibilidade, através de microscopia convencional, conjuntamente com algoritmos de deconvolução, de alcançar os resultados obtidos em microscopia confocal (com ou sem pós-processamento das imagens). Até onde podemos verificar, este problema ainda não foi respondido adequadamente.

Dessa forma, abrem-se novas possibilidades de se explorar outras técnicas de restauração e reconstrução tridimensional de imagens a partir de deconvolução de seções ópticas planares.

Assim sendo, o primeiro objetivo deste trabalho consiste no estudo e implementação de novos algoritmos de deconvolução para aplicação em microscopia de seccionamento óptico computacional. A metodologia proposta para a geração destes algoritmos consiste no estudo de métodos estatísticos de restauração e da teoria de Projeções sobre Conjuntos Convexos (*Projection onto Convex Sets* – POCS). Essencialmente, propomos algoritmos não iterativos que promovem resultados rápidos capazes de fornecer uma boa aproximação (estimativa) da imagem verdadeira e também algoritmos iterativos mais elaborados capazes de restaurar com maior precisão as imagens observadas.

---

[2] O fenômeno de *photobleaching* (também conhecido como *fading*) ocorre quando um fluorocromo perde permanentemente a capacidade de fluorescer. Este fenômeno é proporcional ao tempo de exposição.

Como segundo objetivo deste trabalho, propomos um algoritmo de esqueletização tridimensional eficiente para estruturas tubulares, com aplicações em neurociências.

Nos últimos anos, inúmeros algoritmos para geração de esqueletos foram publicados. Verifica-se que muitos deles são abordagens discretas, propostas para imagens bidimensionais e quase sempre a extensão para o caso tridimensional possui um custo computacional elevado. De fato, o problema tridimensional é muito mais complicado devido ao grau de liberdade extra na localização do ponto que pertence ao esqueleto. Mais ainda, verifica-se que o desempenho destes algoritmos freqüentemente está associado a uma aplicação específica.

Dessa forma, o estudo de algoritmos para esqueletização de estruturas tridimensionais que podem ser avaliados rapidamente é um tema atual e relevante.

O algoritmo proposto é baseado na teoria de campos potenciais e pode ser avaliado numericamente através de algoritmos de transformada rápida de Fourier. De fato, a originalidade do método reside no uso da transformada de Fourier para se calcular rápida e eficientemente um campo potencial através de uma imagem binária tridimensional. Particularmente, o método se demonstra eficiente para estruturas tubulares como neurônios e artérias.

Muito embora o objetivo principal seja fornecer uma ferramenta para a extração de medidas de interesse em neuromorfometria computacional, também apresentamos resultados para a geração de esqueletos de estruturas bidimensionais (como um caso particular da metodologia tridimensional) e também resultados da esqueletização de artérias.

1.3 Contribuições

As contribuições almejadas por este trabalho podem ser resumidas em duas frentes:

- Estudo, implementação e avaliação de novos algoritmos para deconvolução de imagens obtidas em microscopia óptica de fluorescência;
- Estudo e implementação de um algoritmo eficiente para esqueletização de estruturas tubulares tridimensionais com aplicações em neurociências.

1.4 Organização do Texto

O Capítulo 2 é dedicado à teoria de Seccionamento Óptico Computacional como uma técnica para obtenção de imagens tridimensionais a partir de microscopia de fluorescência. Neste capítulo são apresentados os problemas inerentes ao microscópio de fluorescência sendo que destacamos um estudo do modelo de formação da imagem e uma análise da função de espalhamento pontual que caracteriza o microscópio. Ainda, uma revisão da literatura e a caracterização do problema de seccionamento óptico são levantadas.

Os Capítulos 3 e 4 são dedicados ao estudo e descrição dos algoritmos de deconvolução propostos. Particularmente, o Capítulo 3 descreve os algoritmos não iterativos baseados em critérios estatísticos e que levam em conta a natureza do ruído Poisson. O Capítulo 4 destina-se à apresentação dos algoritmos iterativos baseados na teoria de Projeções sobre Conjuntos Convexos.

O Capítulo 5 contém o estudo e formalização do algoritmo de esqueletização tridimensional proposto. Encerra-se neste capítulo uma revisão da literatura existente relativa a geração de esqueletos bidimensionais e tridimensionais.

O Capítulo 6 encerra com as conclusões gerais desta tese e as perspectivas para trabalhos futuros.

O Anexo A foi destinado para uma apresentação sucinta dos algoritmos *Maximum Likelihood Expectation Maximization* e *Regularized Linear Least Squares*, os quais são usados para comparações dos resultados apresentados nos capítulos três e quatro.

Capítulo 2 Microscopia de Seccionamento Óptico Computacional

2.1 Introdução

Este capítulo destina-se à descrição do problema de seccionamento óptico computacional utilizando um microscópio de fluorescência. Primeiramente, apresentamos uma descrição sucinta da técnica de fluorescência de forma a contextualizar o problema. Uma descrição detalhada desta técnica foge do escopo desta tese e sugerimos alguns trabalhos para um estudo mais completo. Na seqüência, descrevemos o modelo de formação da imagem em COSM e as suas principais fontes de ruídos. Posteriormente, apresentamos uma caracterização da função de espalhamento pontual que especifica as propriedades de transmissão de um microscópio de fluorescência. Por último, uma revisão da literatura e descrição do problema em COSM é introduzida.

2.2 Microscopia de Fluorescência

Microscopia de fluorescência é uma técnica utilizada por ser capaz de fornecer informações específicas de materiais orgânicos e estruturas celulares vivas [Davidson e Abramowitz (2002)]. Quando comparada a outras formas de microscopia, suas vantagens são em identificar células e componentes celulares sub-microscópicos com um alto grau de especificidade entre o material celular não fluorescente. Neste tipo de microscopia, uma substância conhecida como *fluorocromo* é usada para "*dopar*" uma determinada estrutura e quando excitado por uma luz em determinado comprimento de onda, responde emitindo luz em outro comprimento de onda diferente (dependente do tipo de *fluorocromo* utilizado). Estes "*corantes*" são altamente específicos no sentido de que são capazes de se fixar apenas em determinadas estruturas.

Dessa forma, a tarefa básica do microscópio de fluorescência é permitir que o objeto de estudo seja irradiado por uma luz em determinado comprimento de onda e

então separar a luz fluorescente, que é emitida de volta pelo espécime, da luz gerada pela fonte.

A Figura 2-1 ilustra esta técnica. Uma luz (ultravioleta) é gerada por uma fonte[3] e enviada por uma série de espelhos sendo condensada pela própria objetiva sobre o material em estudo. Neste tipo de microscopia, as objetivas também funcionam como condensadores. A luz que alcança o espécime excita o *fluorocromo* que por sua vez emite como resposta uma luz de comprimento de onda visível muito maior (conseqüentemente, menos energética) que será capturada pela objetiva do instrumento. Esta é irradiada esfericamente em todas as direções, independentemente da direção da luz de excitação, sendo então separada por um espelho *dicróico,* capaz de refletir a luz ultravioleta emitida pela lâmpada, deixando passar apenas a luz emitida pelo espécime.

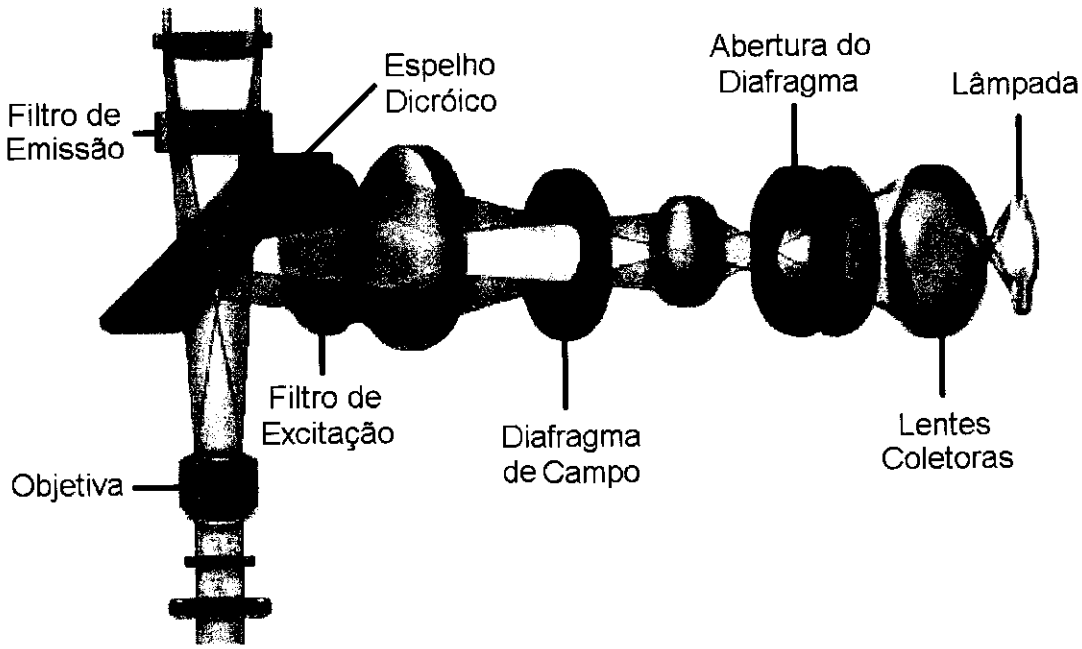


Figura 2-1: Esquema de uma configuração de microscopia de fluorescência. Extraído e modificado a partir de Davidson e Abramowitz (2002).

Ainda, dois tipos de filtros são utilizados. O primeiro, define um comprimento de onda específico para a luz ultravioleta que excita o *fluorocromo* e o

[3] Freqüentemente, são utilizadas lâmpadas de vapor de mercúrio (HBO), que podem estar acima ou abaixo do espécime dependendo da montagem do microscópio: convencional ou invertido.

SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

segundo é um filtro de emissão utilizado para selecionar apenas o comprimento de onda de maior resposta do *fluorocromo*.

Para um estudo mais detalhado sobre o tema sugerimos o trabalho de Davidson e Abramowitz (2002).

2.3 Modelo de Formação da Imagem em Microscopia Óptica

Considere um esquema simplificado de um microscópio óptico como o ilustrado na Figura 2-2.

O sistema de coordenadas tridimensional possui sua origem no centro da base de um objeto tridimensional (função espécime) $f(x,y,z)$[4] com uma espessura T, sendo que o eixo z coincide com o eixo óptico do microscópio. A distância entre o plano onde a imagem bidimensional é observada até a lente é fixa e denotada por d_i. A seção do objeto que está no foco da lente recai sobre $z = z'$ e está a uma distância d_f da lente na direção contrária ao plano onde a imagem é observada. Ainda, o plano onde a imagem é observada possui seu próprio sistema de coordenadas (x', y') com origem no eixo z.

A distância focal d da lente determina d_f a partir da equação da lente

$$\frac{1}{d} = \frac{1}{d_f} + \frac{1}{d_i} \tag{2-1}$$

e o *aumento* produzido pela objetiva (lente) é dado por

$$M = \frac{d_i}{d_f}. \tag{2-2}$$

A lente *aumenta* e rotaciona a imagem por 180° de forma que um ponto (x, y) em um plano do objeto é levado em um ponto $(-Mx, -My)$ no plano da imagem.

Em microscopia, a distância d_i é frequentemente fixada em 160 mm. Assim, desde que d_i e d são fixos, o plano focal pode ser colocado em qualquer posição

[4] A função espécime representa a distribuição de intensidade do objeto correspondente à resposta luminosa do fluorocromo. Assume-se que esta distribuição seja espacialmente incoerente. Neste caso, não existe correlação de fase entre as frentes de onda oriundas de diferentes fontes pontuais e desta forma o sistema é linear em intensidade [Goodman (1996)].

simplesmente movendo-se o espécime para cima ou para baixo na direção do eixo óptico.

Para descrever o modelo de formação da imagem e para simplificar a notação, é interessante fazer referência ao sistema de coordenadas do espécime e não ao sistema de coordenadas da imagem observada.

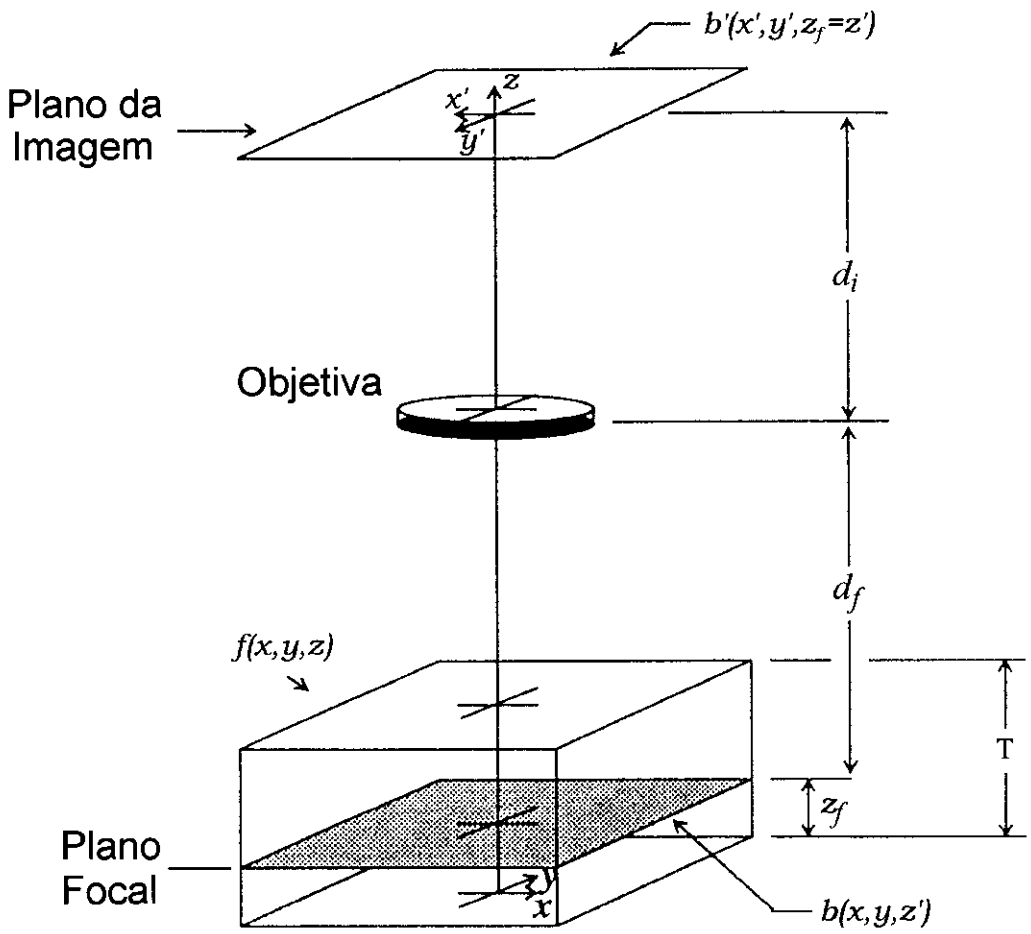


Figura 2-2: Sistema simplificado de formação da imagem em um microscópio óptico. Extraído e modificado a partir de Castleman (1996).

Dessa forma, é conveniente definir uma projeção ideal (livre de distorções) do plano da imagem no plano focal [Preza (1990)] [Castleman (1996)].

Esta projeção é idealizada de forma a neutralizar os efeitos do aumento e rotação introduzidos pela lente e dessa forma cria uma imagem correspondente

àquela observada no sistema de coordenas (x', y') (coordenadas da imagem) no sistema de coordenadas (x, y) (coordenadas do objeto).

Denotamos a imagem observada por $b'(x', y', z')$ e a sua projeção de volta ao plano focal por $b(x, y, z')$. Observamos que devido as dimensões do espécime em relação a d_f, pode-se ignorar o aumento produzido pela lente em relação a uma imagem desfocada.

Sendo assim, o problema de interesse consiste em determinar a relação entre $b(x, y, z')$ e $f(x, y, z)$.

De acordo com o modelo de seccionamento óptico computacional um espécime tridimensional $f(x, y, z)$ com uma espessura T pode ser modelado como uma pilha de J seções bidimensionais ao longo do eixo z (eixo óptico) onde $T = (J-1) \cdot \Delta z$ e Δz é a distância entre as seções.

A Figura 2-3 ilustra o espécime como uma pilha de seções bidimensionais obtidas em microscopia ótica movendo-se o plano focal ao longo do eixo ótico.

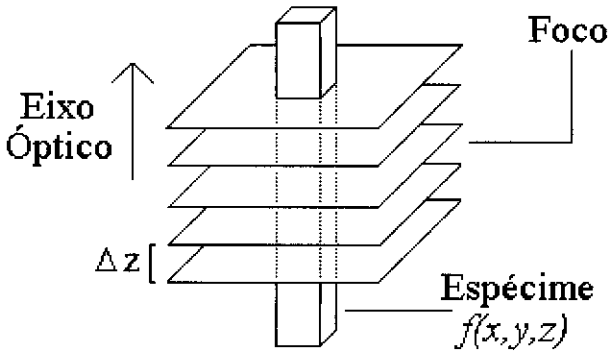


Figura 2-3: Esquema de formação de uma imagem tridimensional obtida por uma série de seções ópticas bidimensionais.

Assim sendo, os dados adquiridos no imageamento de um objeto com uma certa espessura T usando seccionamento óptico consiste de um conjunto de J imagens bidimensionais, no qual cada imagem corresponde a um plano focal diferente.

A teoria de sistemas lineares pode ser aplicada sobre o sistema óptico sob a hipótese de que o espécime 3D de interesse é transparente e emite luz de forma incoerente.

Dessa forma, segundo Preza (1990), a k-ésima imagem observada quando o microscópio esta focado em z_k, para um sistema livre de ruído, é expressa por

$$b_k(x,y) = \sum_{j=0}^{J-1} [f_j(x,y) * h_{k-j}(x,y)] \tag{2-3}$$

onde $f_j(x,y)$ é a j-ésima seção do objeto, o símbolo * denota uma convolução bidimensional e $h_{k-j}(x,y)$ é a imagem de uma fonte pontual (colocada na origem do plano focal) na j-ésima seção do objeto quando o microscópio está focado sobre o k-ésimo plano em z_k. Escrevemos $h_{k-j}(x,y)$ como

$$h_{k-j}(x,y) = h(x,y,z_d), \tag{2-4}$$

onde $z_d = z_k - j \cdot \Delta z$. Esta função é chamada de função de espalhamento pontual (*Point Spread Function* – PSF) bidimensional desfocada e será discutida em maiores detalhes na Seção 2.6.

É evidente a partir da Eq. (2-3) que a luz emitida por todas as J seções do objeto contribuem para a imagem formada no k-ésimo plano. Dessa forma, cada seção da imagem observada é uma versão borrada da imagem verdadeira contendo informação de seções que estão acima e abaixo do plano focal.

Verifica-se que o conjunto de J imagens obtidas a partir da Eq. (2-3) movendo-se o plano focal ao longo do eixo z é o resultado da convolução tridimensional de $f(x,y,z)$ com $h(x,y,z)$ sobre as dimensões x, y e z, sendo que $h(x,y,z)$ é a função de espalhamento pontual tridimensional do microscópio.

Isto pode ser verificado reescrevendo a Eq. (2-3) como

$$b(x,y,z_k) = \sum_{j=0}^{J-1} [f(x,y,j \cdot \Delta z) * h(x,y,z_k - j \cdot \Delta z)]. \tag{2-5}$$

Fazendo a substituição $z = j \cdot \Delta z$ e tomando $\Delta z \to 0$ (conseqüentemente, $J \to \infty$) a somatória na Eq. (2-5) torna-se uma integral e

$$b(x,y,z_k) = \int_0^T f(x,y,z) * h(x,y,z_k - z) dz. \tag{2-6}$$

Sob a hipótese que o objeto não emite luz fora do campo de aquisição da imagem e também fora do intervalo $[0,T]$, reescrevendo a operação de convolução bidimensional na Eq. (2-6) e arrumando as variáveis adequadamente, obtemos

$$b(x,y,z) = \int_{-\infty}^{\infty}\int_{-\infty}^{\infty}\int_{-\infty}^{\infty} f(x',y',z') \cdot h(x-x',y-y',z-z')dx'dy'dz', \tag{2-7}$$

que corresponde a uma convolução tridimensional do espécime com a PSF do microscópio, sendo que $b(x, y, z)$ é a imagem tridimensional observada.

Dessa forma, o problema pode ser expresso como

$$b(x,y,z) = h(x,y,z) * f(x,y,z), \tag{2-8}$$

onde * agora significa uma convolução tridimensional.

Observamos que para a derivação do modelo de formação da imagem apresentado na Eq. (2-8), assumimos que o borramento em microscopia de seccionamento óptico computacional é linear e espacialmente invariante.

Ainda, pelo teorema da convolução, a Eq. (2-8) pode ser escrita no domínio de Fourier como

$$B(u,v,w) = H(u,v,w) \cdot F(u,v,w), \tag{2-9}$$

onde $B(u,v,w)$ é a Transformada de Fourier (*Fourier Transform* – FT) de $b(x, y, z)$, $H(u,v,w)$ é a FT de $h(x, y, z)$, $F(u,v,w)$ é a FT de $f(x, y, z)$ e u, v, w são variáveis no domínio da freqüência.

2.4 Modelo Discreto de Formação da Imagem

Podemos considerar as versões discretas das funções $f(x,y,z)$, $b(x,y,z)$ e $h(x,y,z)$, respectivamente. Dessa forma, sem perda de generalidade, consideramos que as funções contínuas sejam discretizadas em uma matriz tridimensional de dimensão $\mathrm{M \times M \times J}$, assumindo que as seções bidimensionais possuem $\mathrm{M \times M}$ *pixels* e que sejam adquiridas J seções.

Denotamos por $f[x,y,z]$, $b[x,y,z]$ e $h[x,y,z]$ as versões discretas da função espécime, da imagem borrada e da função de espalhamento pontual, respectivamente, sendo que, agora, $x, y, z \in \mathbb{Z}$.

Particularmente, em COSM, as imagens ao longo do plano focal são obtidas através de um motor de passos acoplado ao microscópio capaz de mover o foco em distâncias regulares Δz (da ordem de *mícrons*[5]) [Davidson e Abramowitz (2002)] e

[5] Um mícron corresponde a 10^{-6} m.

frequentemente, em microscopia de deconvolução, câmeras CCD são utilizadas para gravar as imagens observadas [Verveer (1998)]. Dessa forma, as imagens obtidas são versões discretizadas da imagem observada.

Assim sendo, a versão discreta da Eq. (2-8) é expressa por

$$b[x,y,z] = h[x,y,z] * f[x,y,z], \tag{2-10}$$

onde * agora significa uma convolução discreta tridimensional e x, y, $z \in \mathbb{Z}$.

Mais ainda, podemos escrever, no domínio de Fourier,

$$B[u,v,w] = H[u,v,w] \cdot F[u,v,w], \tag{2-11}$$

onde $B[u,v,w]$ é a Transformada Discreta de Fourier (*Discrete Fourier Transform* – DFT) de $b[x,y,z]$, $H[u,v,w]$ é a DFT de $h[x,y,z]$ e $F[u,v,w]$ é a DFT de $f[x,y,z]$, sendo que u, v, $w \in \mathbb{Z}$.

Usando uma ordenação lexicográfica [Andrews e Hunt (1977)] [Gonzalez e Woods (1992)] a Eq. (2-10) pode ser escrita em notação vetorial como

$$\mathbf{b} = \mathbf{Hf}, \tag{2-12}$$

onde $\mathbf{b}$ e $\mathbf{f}$ são vetores de tamanhos $\mathrm{N} \times 1$, onde $\mathrm{N} = \mathrm{M} \cdot \mathrm{M} \cdot \mathrm{J}$, que são construídos empilhando os elementos de $b[x,y,z]$ e $f[x,y,z]$, respectivamente. Neste caso, $\mathbf{H}$ é a matriz quadrada de "*borramento*" de tamanho $\mathrm{N} \times \mathrm{N}$ que gera os efeitos da degradação pela difração, onde os elementos são amostras da PSF discreta tridimensional.

Denotamos os componentes de $\mathbf{b}$ e $\mathbf{f}$ por b_i e f_i, respectivamente, e os elementos de $\mathbf{H}$ por h_{ij}, $1 \le i, j \le \mathrm{N}$. Ainda, a partir da Eq. (2-12) verifica-se que

$$\mathrm{b}_i = \sum_j \mathrm{h}_{ij} \cdot \mathrm{f}_j . \tag{2-13}$$

2.5 Caracterização do Ruído em Microscopia de Deconvolução

Freqüentemente, em microscopia de deconvolução, as imagens observadas são gravadas utilizando câmeras CCD e são sujeitas principalmente a dois tipos de ruídos. O primeiro decorre da natureza estatística da contagem de fótons e o segundo é proveniente do mecanismo interno de controle da câmera.

Evidentemente, existem outras fontes de ruídos em COSM, contudo, na maioria das aplicações, estes podem ser negligenciados. Dessa forma, estamos

[illegible] respectivamente, onde $E[\,]$ denota o valor esperado ou esperança matemática.

interessados apenas nos dois tipos principais de ruídos que ocorrem em COSM com o uso de técnicas de fluorescência.

Devido a problemas como, por exemplo, o *photobleaching* [Conchello (1995)], as seções bidimensionais das imagens observadas devem ser gravadas em um curto tempo de exposição. Dessa forma, as imagens são adquiridas sob baixa contagem de fótons dando origem a um tipo de ruído dependente do sinal que é bem modelado por uma distribuição de Poisson [Snyder e Miller (1991)] [Snyder et al. (1993)].

Este ruído, que é predominante em COSM, pode ser incorporado ao modelo discreto de formação da imagem, descrito na Eq. (2-12), considerando a imagem observada como a realização de um processo de Poisson não homogêneo.

Dessa forma, considere o vetor imagem $\mathbf{u}$ como sendo a versão do vetor $\mathbf{b}$ degradado por ruído Poisson. Cada componente u_i de $\mathbf{u}$ é a realização de uma variável aleatória[6] $\tilde{\mathrm{U}}_i$ descrita por uma distribuição de Poisson. Ainda, denotamos por $\tilde{\mathbf{U}}$ o vetor aleatório cujos componentes são expressos por $\tilde{\mathrm{U}}_i$.

Da teoria clássica de detecção de fótons [Mandel (1959)] [Goodman (1985)], a probabilidade de u_i fótons ocorrerem para uma dada intensidade fixa b_i é

$$p_{\tilde{\mathrm{U}}_i}(\mathrm{u}_i \backslash \mathrm{b}_i) = \frac{(\gamma \cdot \mathrm{b}_i)^{\mathrm{u}_i} \cdot e^{-\gamma \cdot \mathrm{b}_i}}{\mathrm{u}_i!}, \quad \mathrm{u}_i \in \mathbb{N}_0, \tag{2-14}$$

sendo que γ é um parâmetro positivo dado por [Snyder e Miller (1991)]

$$\gamma = \frac{\eta \cdot \tau}{h \cdot \bar{\nu}}, \tag{2-15}$$

onde η é a eficiência quântica do detector, τ é o tempo de integração, h é a constante de Planck [Halliday et al. (1995)] e $\bar{\nu}$ é a freqüência óptica média[7].

Se considerarmos η e $\bar{\nu}$ fixos para um dado detector, γ é diretamente proporcional ao tempo total de integração.

A média e a variância de $\tilde{\mathrm{U}}_i$, para um dado i, são expressos por $E[\tilde{\mathrm{U}}_i] = \gamma \cdot \mathrm{b}_i$ e $Var[\tilde{\mathrm{U}}_i] = \gamma \cdot \mathrm{b}_i$, respectivamente, onde $E[\cdot]$ denota o valor esperado ou esperança matemática.

---

[6] Neste trabalho, denotamos as variáveis aleatórias por letras maiúsculas com um *til*.

[7] Uma discussão detalhada destes parâmetros está fora do escopo deste trabalho. Apresentamos de forma a tornar o texto mais completo.

A Eq. (2-14) é a probabilidade condicional de observar u_i fótons para um *voxel* da imagem, dado que ocorre b_i. Para uma caracterização mais completa é necessária a probabilidade conjunta para o vetor de observações.

Karp e Clark (1970), Walkup (1971), Walkup e Goodman (1973) e Wang (1973) mostraram que dado $\mathbf{b}$, a estatística de contagem dos fótons para cada posição na câmera CCD são variáveis de Poisson independentes, sendo as médias proporcionais às intensidades médias em cada posição. Portanto, consideramos que todos os u_i são independentes para um dado $\mathbf{b}$. Assim, podemos escrever

$$p_{\tilde{\mathbf{U}}}(\mathbf{u} \backslash \mathbf{b}) = p_{\tilde{U}_1}(u_1 \backslash \mathbf{b}) \cdot p_{\tilde{U}_2}(u_2 \backslash \mathbf{b}) \cdot \ldots \cdot p_{\tilde{U}_N}(u_N \backslash \mathbf{b}) \tag{2-16}$$

e como cada u_i depende apenas do correspondente b_i, temos que

$$p_{\tilde{\mathbf{U}}}(\mathbf{u} \backslash \mathbf{b}) = \prod_i \frac{(\gamma \cdot b_i)^{u_i} \cdot e^{-\gamma \cdot b_i}}{u_i!} \ . \tag{2-17}$$

O segundo tipo de ruído incorporado nas imagens observadas é um ruído térmico, oriundo dos dispositivos eletrônicos internos da câmera CCD. Freqüentemente, este é bem modelado por um ruído Gaussiano e independente do sinal [Snyder et al. (1993)] e pode ser incorporado ao modelo de formação da imagem observada $\mathbf{g}$ por um termo aditivo como

$$\mathbf{g} = \mathbf{u} + \mathbf{n} \ , \tag{2-18}$$

onde $\mathbf{n}$ é a realização de um vetor aleatório $\tilde{\mathbf{N}}$, sendo que denotamos por n_i e $\tilde{N}_i$ seus respectivos componentes.

Cada $\tilde{N}_i$ é descrita por uma distribuição normal com média e variância expressas por $E[\tilde{N}_i] = 0$ e $Var[\tilde{N}_i] = \sigma^2_{\tilde{N}}$, respectivamente, para todo i, $1 \leq i \leq N$, sendo que $\sigma^2_{\tilde{N}}$ é uma constante positiva.

Dessa forma, da Eq. (2-18), a imagem observada $\mathbf{g}$ corresponde a soma da imagem borrada, degradada por ruído Poisson, com um termo que representa o ruído Gaussiano independente do sinal.

2.6 A Função de Espalhamento Pontual

De acordo com a teoria da óptica geométrica, a imagem de uma fonte pontual produzida por uma lente convergente é exatamente um ponto [Matveev (1988)]. Contudo, devido a uma distorção inerente a todo sistema óptico, a imagem produzida no plano focal é uma versão borrada deste ponto [Halliday et al. (1995)].

Esta distorção é devida ao fenômeno de difração causado pela abertura finita do sistema de lentes [Born e Wolf (1999)].

O estudo de sistemas onde a difração não pode ser negligenciada frequentemente é relacionado com métodos de análise de Fourier e fazem parte da disciplina conhecida como "Óptica de Fourier" [Goodman (1996)].

Nesse contexto, um sistema limitado pela difração é visto como um sistema linear sendo que esta caracterização é correta para os casos de iluminação espacialmente *coerente* e *incoerente*.

Sendo assim, o sistema é perfeitamente caracterizado através de sua resposta impulsional, também conhecida como função de espalhamento pontual (*Point Spread Function* – PSF).

De maneira geral, pode-se dizer que as propriedades da PSF definem as características fundamentais do sistema de imageamento.

Para efeito de ilustração[8], considere um sistema óptico simples consistindo de uma única lente como na Figura 2-4, onde d_f e d_i são as distâncias da lente ao plano focal e ao plano da imagem, respectivamente, e a sendo o diâmetro da lente.

Dessa forma, dada uma fonte pontual na origem do plano focal, a imagem bidimensional na origem do plano da imagem é uma versão borrada da fonte chamada padrão de difração de *Fraunhofer* – ou disco de *Airy*.

Este fenômeno ocorre quando uma frente de onda é parcialmente bloqueada por um objeto opaco contendo uma fenda [Halliday et al. (1995)]. No exemplo considerado, a difração é devida a um orifício (abertura) circular de diâmetro a, sendo este constituído pelas bordas da lente.

---

[8] Desconsiderando, neste caso, a projeção ideal do plano da imagem no plano do objeto conforme foi definida na Seção 2.3.

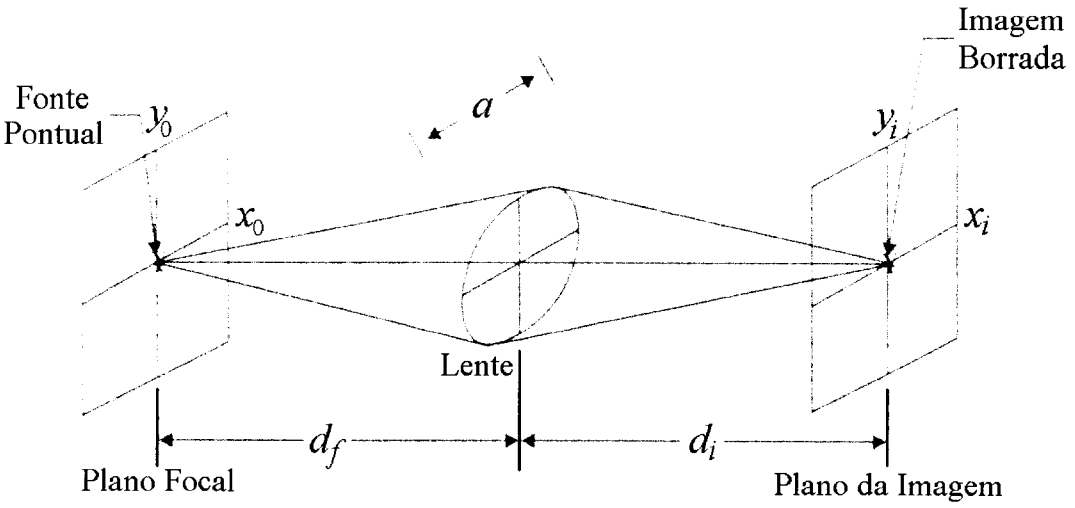


Figura 2-4: Sistema óptico simples consistindo de uma única lente.

A abertura de uma lente pode ser modelada através da função pupila que, para uma abertura circular de diâmetro a centrada em um sistema de coordenadas (x_a, y_a) é definida como

$$p(x_a, y_a) = \begin{cases} 1 & se \quad -\frac{a}{2} \leq \sqrt{x_a^2 + y_a^2} \leq \frac{a}{2} \\ 0 & caso\ contrário \end{cases} \tag{2-19}$$

Assim sendo, a função pupila indica explicitamente como a lente afeta a distribuição de amplitude de uma frente de onda passando através dela.

Para o caso de luz incoerente com comprimento de onda médio λ, a PSF bidimensional no plano da imagem é o espectro de potência da função pupila, sendo expressa em termos da função de Bessel como

$$h(r) = \left[2 \cdot \frac{J_1\left(\pi \cdot \left[\frac{r}{r_0}\right]\right)}{\pi \cdot \left[\frac{r}{r_0}\right]} \right]^2, \tag{2-20}$$

onde $J_1(\cdot)$ é a função de Bessel de primeira espécie de primeira ordem [Bertero e Boccacci (1998)]. Observamos que a PSF bidimensional no plano da imagem é uma função com simetria radial sendo que a constante r_0 é um fator de escala dado por

$$r_0 = \frac{\lambda \cdot d_i}{a} \tag{2-21}$$

e r é a distância radial medida a partir do eixo óptico, no plano da imagem, expressa por

$$r = \sqrt{x_i^2 + y_i^2}\,. \tag{2-22}$$

A função de transferência óptica (*Optical Transfer Function* – OTF) é definida como a transformada de Fourier normalizada da PSF dada pela Eq. (2-20). Particularmente, a OTF pode ser vista como uma forma de especificar a qualidade da lente.

Agora, como a PSF é o espectro de potência da função pupila (para o caso de iluminação incoerente), pelo teorema da autocorrelação, a OTF é a função de auto-correlação normalizada da função pupila sendo então expressa por

$$H(u,v) = \frac{R_p(u,v)}{R_p(0,0)}, \tag{2-23}$$

onde u e v são variáveis de freqüência espacial.

Dessa forma, pode-se mostrar que para uma lente com abertura circular de diâmetro a e luz incoerente com comprimento de onda médio λ, a OTF no plano da imagem é expressa por [Hopkins (1955)]

$$H(q) = \frac{2}{\pi - 2} \cdot \left\{ cos^{-1}\left(\frac{q}{f_c}\right) - sen\left[cos^{-1}\left(\frac{q}{f_c}\right)\right]\right\}, \tag{2-24}$$

onde q é a freqüência radial dada por

$$q = \sqrt{u^2 + v^2}\,. \tag{2-25}$$

O parâmetro f_c define a mais alta freqüência espacial que pode passar através do sistema e é chamado *freqüência de corte*, sendo determinado por

$$f_c = \frac{1}{r_0} = \frac{a}{\lambda \cdot d_i}. \tag{2-26}$$

A Eq. (2-24) é a expressão para a OTF no plano da imagem. A transformada inversa de Fourier desta expressão fornece a PSF bidimensional – ou o padrão de difração de *Fraunhofer* [Castleman (1996)].

No caso particular de microscopia de fluorescência, a luz emitida pelo espécime é espacialmente incoerente e a PSF tridimensional corresponde à imagem de uma fonte pontual fluorescente (com um comprimento de onda específico) após passar pelo sistema de lentes do microscópio.

Para se restaurar uma imagem tridimensional que é adquirida usando COSM é necessário processar as imagens bidimensionais obtidas, ou melhor dizendo, suas projeções sobre o plano focal no sistema de coordenadas do objeto (assim como descrito na Seção 2.3). Dessa forma, um conhecimento acurado da PSF tridimensional no sistema de coordenadas do objeto é importante para o desenvolvimento de algoritmos de deconvolução.

Observando novamente o mecanismo de projeção ideal do plano da imagem no plano do objeto, considere uma fonte pontual centrada na origem do sistema de coordenadas do plano focal.

A PSF tridimensional discreta do microscópio pode ser derivada a partir de um conjunto de funções bidimensionais igualmente espaçadas ao longo do eixo óptico em intervalos regulares de tamanho Δz a partir do plano focal. Estas funções são expressas pela Eq. (2-4) que repetimos aqui por conveniência, como

$$h_{k-j}(x, y) = h(x, y, z_d), \tag{2-27}$$

onde $z_d = z_k - j \cdot \Delta z$. Ela representa a imagem da fonte pontual na j-ésima seção quando o microscópio está focado sobre o k-ésimo plano em z_k e dessa forma é chamada de PSF desfocada.

Segundo Preza (1990), uma maneira para determinar este conjunto de funções consiste em derivar o conjunto de OTF bidimensionais correspondentes a cada uma das PSF desfocadas. A derivação de uma OTF desfocada de uma certa distância a partir do plano focal, ou melhor, a OTF no plano do objeto a uma distância δz do plano focal, é devida a Hopkins, sendo construída a partir da *função pupila estendida* que incorpora o efeito da difração fora do foco.

A Figura 2-5 ilustra um diagrama esquemático de uma lente circular fora de foco e para este caso, a função pupila estendida[9] é expressa por

$$p_D(x_a, y_a) = p(x_a, y_a) \cdot e^{j\frac{K \cdot \omega \cdot (x_a^2 + y_a^2)}{a^2}} \tag{2-28}$$

onde $j^2 = -1$,

$$K = \frac{8\pi}{\lambda \cdot a^2} \tag{2-29}$$

[9] Sistemas ópticos com aberrações são freqüentemente modelados através de funções pupilas complexas [Castleman (1996)].

e o chamado máximo "*optical-path-length error*" (como mostrado na Figura 2-5) é

$$\omega = -d_i - \delta z \cdot cos\,\alpha' + \left(d_i^2 + 2 \cdot d_i \cdot \delta z + \delta z^2 \cdot cos^2\,\alpha'\right)^{1/2}, \tag{2-30}$$

sendo que

$$\alpha' = arctan\left(\frac{a}{2 \cdot d_i}\right) \tag{2-31}$$

é o ângulo de saída da função pupila.

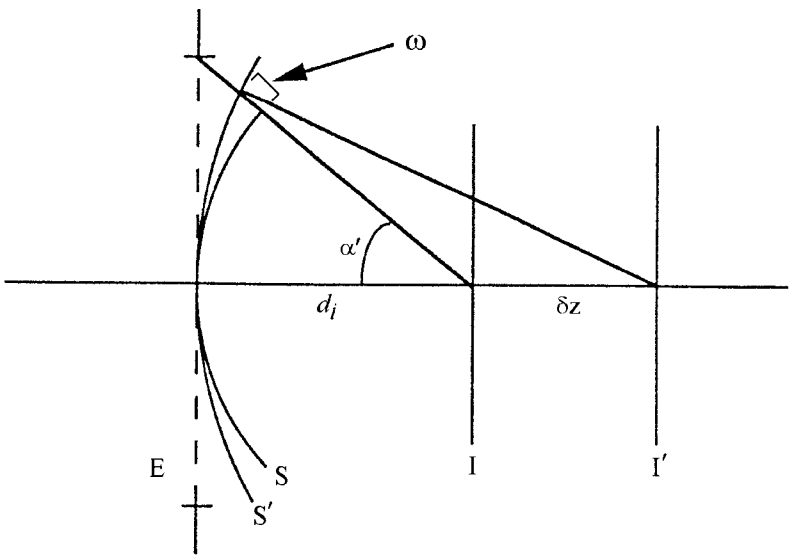


Figura 2-5: Diagrama esquemático de uma lente fora de foco. E é a pupila de saída da lente e α' é chamado ângulo de saída. A quantidade fora de foco pode ser especificada pela distância δz ou ainda pelo *optical-path-length error* ω que é a diferença entre duas ondas esféricas S e S' centradas no ponto pertencente ao plano focal I e no ponto pertencente ao plano fora do foco I', respectivamente. Extraído e modificado a partir de Preza (1990).

A partir da Eq. (2-28), Hopkins derivou a OTF de um sistema óptico desfocado para o caso livre de aberrações (em função da freqüência radial normalizada) como

$$\begin{aligned} H_D(\tilde{q}) = {} & \frac{4}{\pi s} cos\left(\frac{1}{2} s\tilde{q}\right)\left\{\hat{\beta} J_1(s) + \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^{n+1} \frac{sen(2n\hat{\beta})}{2n}\left[J_{2n-1}(s) - J_{2n+1}(s)\right]\right\} - \\ & - \frac{4}{\pi s} sen\left(\frac{1}{2} s\tilde{q}\right) \sum_{n=0}^{\infty} (-1)^n \frac{sen((2n+1)\hat{\beta})}{2n+1}\left[J_{2n}(s) - J_{2n+2}(s)\right] \end{aligned} \tag{2-32}$$

sendo que, $\tilde{q} = \frac{2 \cdot q}{f_c}$ é a freqüência radial normalizada, $\hat{\beta} = cos^{-1}\left(\frac{q}{f_c}\right)$, $s = 2K\,\omega\,\tilde{q}$ e $J_n(s)$ é a função de Bessel de primeira espécie de ordem n.

Devido à simetria radial, a OTF desfocada bidimensional pode ser obtida por uma revolução completa sobre o plano u–v. Portanto, a PSF tridimensional $h(x, y, z)$ é o conjunto de PSF bidimensionais desfocadas que são obtidas através da transformada de Fourier inversa sobre as OTF bidimensionais, construídas a partir da Eq. (2-32) [Castleman (1996)]. Por sua vez, a OTF tridimensional $H(u, v, w)$ pode ser obtida através da transformada de Fourier unidimensional das funções de transferência desfocadas ao longo do eixo óptico [Preza (1990)].

Em microscopia, a freqüência de corte no plano u–v é equivalente à freqüência de corte bidimensional no plano focal e usualmente é expressa em termos da *abertura numérica* como

$$f_c^{uv} = \frac{M \cdot a}{\lambda \cdot d_i} = \frac{a}{\lambda \cdot d_f} \cong \frac{2 \cdot NA}{\lambda}, \tag{2-33}$$

onde NA é a abertura numérica da objetiva e é definida como

$$NA = \hat{n} \cdot sen(\hat{\alpha}) \cong \frac{a}{2 \cdot d_f}, \tag{2-34}$$

sendo $\hat{n}$ o índice de refração do *meio*[10] entre o espécime e a lente e

$$\hat{\alpha} = arctan\left(\frac{a}{2 \cdot d_f}\right). \tag{2-35}$$

A freqüência de corte na direção do eixo óptico é dada por

$$f_c^{w} \cong \frac{NA^2}{2 \cdot \lambda}. \tag{2-36}$$

A Eq. (2-32) é o modelo analítico para a geração das funções de Transferência Óptica desfocadas. Contudo, devemos observar que esta expressão foi derivada para o caso ideal, ou seja, livre de aberrações produzidas pela lente (por exemplo, aberrações esféricas). Assim, na prática, este modelo fornece uma aproximação para a OTF de uma objetiva.

O modelo que é aceito atualmente para a PSF teórica é baseado nos trabalhos de Gibson e Lanni (1989), Gibson e Lanni (1990) e Gibson e Lanni (1991), o qual incorpora no modelo descrito pela Eq. (2-32) efeitos de aberrações introduzidas pela lente. Este será o modelo usado para a geração das funções de espalhamento pontuais necessárias para os algoritmos de restauração propostos neste trabalho.

---

[10] Os *meios* mais comuns em microscopia de fluorescência são a água, ar e o óleo de imersão.

De forma a ilustrar o comportamento da OTF desfocada [Frieden (1967)] [Stokseth (1969)], considere os dados apresentados na Figura 2-6. Ela apresenta o perfil da seção radial para quatro funções de transferências desfocadas em diferentes distâncias a partir do plano focal. Este exemplo corresponde a uma objetiva de imersão em óleo de 100X, com uma abertura numérica de 1.3 e considerando um comprimento de onda λ = 0.5 μm. Pode-se mostrar que a freqüência de corte neste caso é de 5.2 μm^{-1}. As funções foram normalizadas de forma que o máximo valor seja igual a 1. Pode-se observar que a OTF decai rapidamente em função da maior distância ao plano focal e também assume valores negativos. Este comportamento também é ilustrado na Figura 2-7 onde o módulo das funções desfocadas são expressos na forma de "gráfico de função". A Figura 2-8 apresenta as PSF desfocadas que foram obtidas a partir da transformada de Fourier inversa das imagens da Figura 2-7.

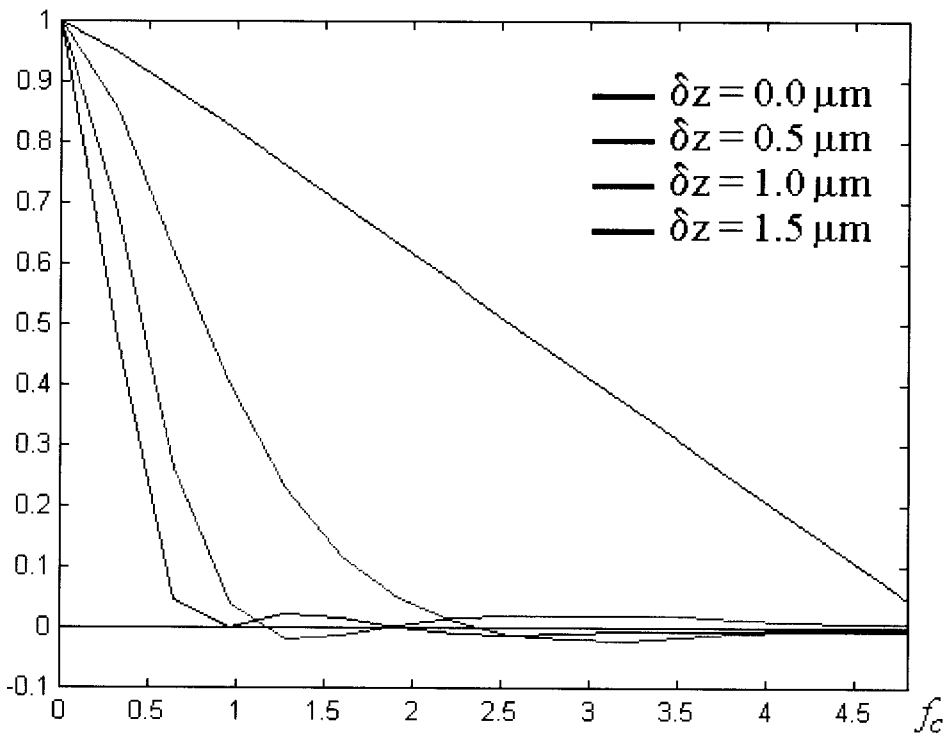


Figura 2-6: Seção radial para quatro OTF desfocadas em diferentes distâncias a partir do plano focal para uma objetiva de imersão em óleo de 100X, 1.3 NA e considerando λ = 0.5 μm. Os dados foram gerados a partir do modelo de Gibson e Lanni.

IESC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

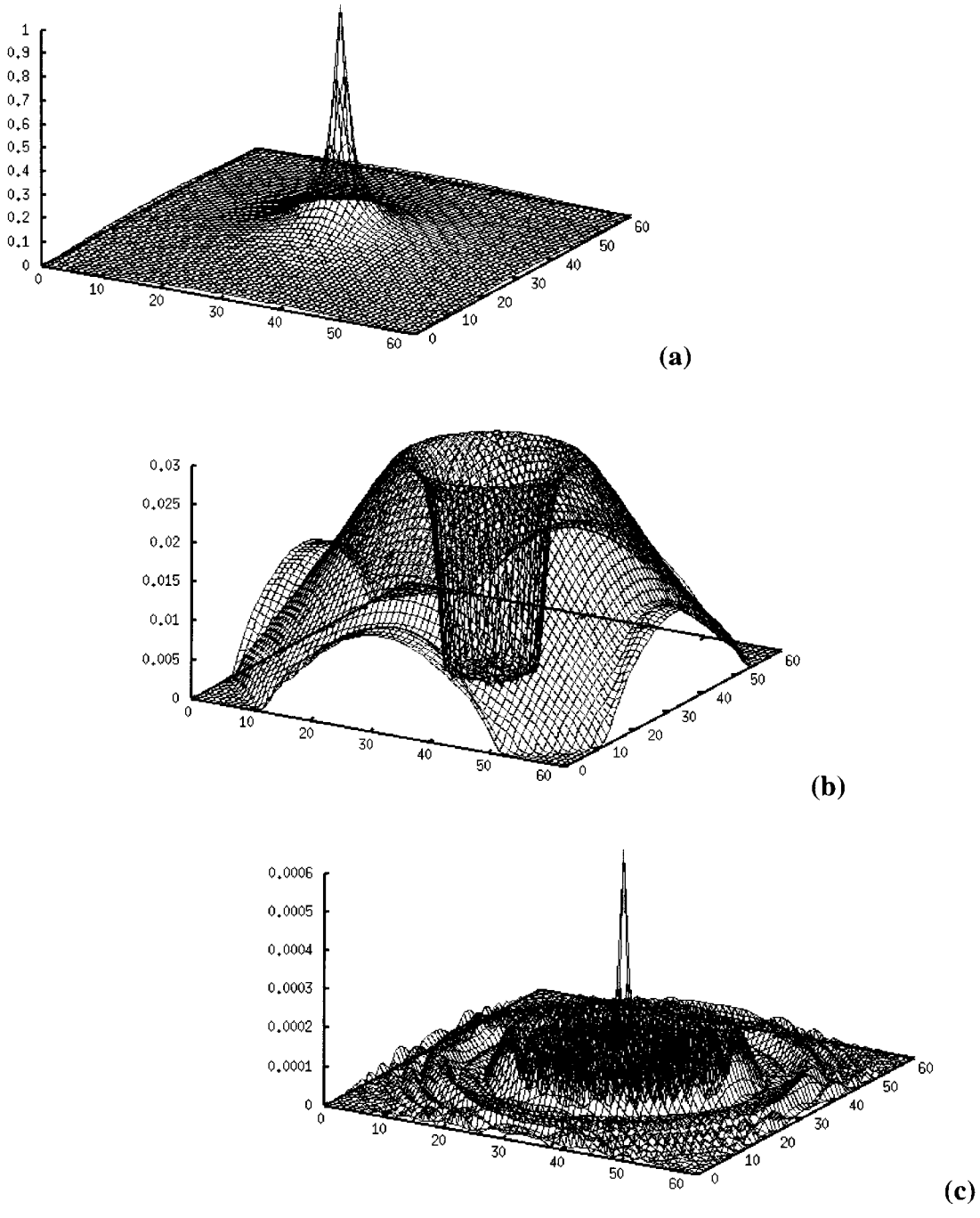


Figura 2-7: Módulo da OTF desfocada variando a distância do foco para uma objetiva de imersão em óleo de 100X, 1.3 NA considerando um comprimento de onda $\lambda = 0.5$ μm: (a) $\delta z = 0$ μm (no foco); (b) $\delta z \cong 1$ μm; (c) $\delta z \cong 2$ μm.

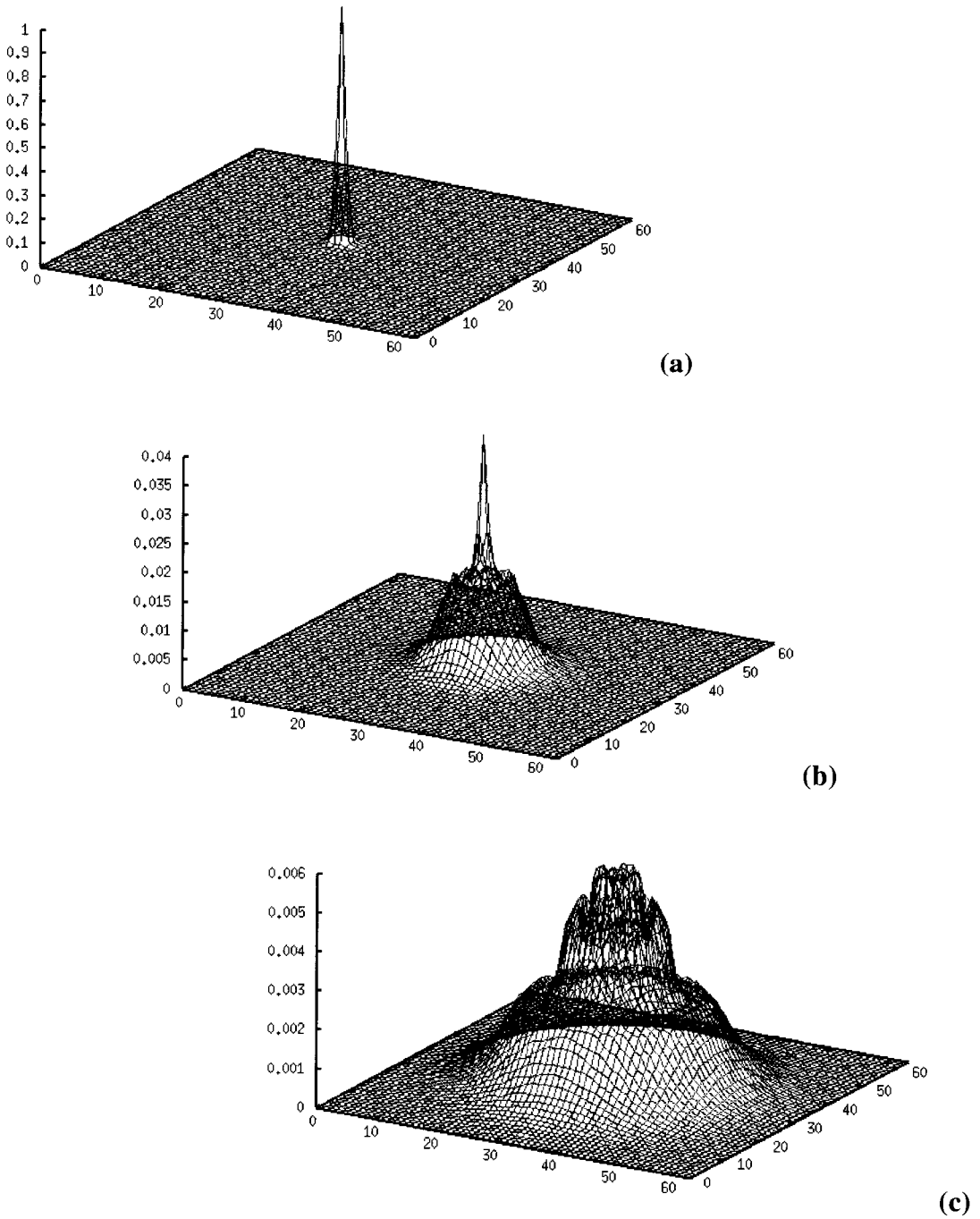


Figura 2-8: PSF desfocada variando a distância do foco para uma objetiva de imersão em óleo de 100X, 1.3 NA considerando $\lambda = 0.5$ μm: (a) $\delta z = 0$ μm (no foco); (b) $\delta z \cong 1$ μm; (c) $\delta z \cong 2$ μm.

A Figura 2-9a apresenta um corte da PSF tridimensional ao longo do eixo óptico gerada por um conjunto de PSF bidimensionais como as apresentadas na Figura 2-8. Podemos observar que a PSF 3D possui um espalhamento muito maior na direção do eixo óptico do que na direção do plano x–y. Isto significa dizer que as imagens observadas são muito mais *borradas* na direção do eixo z.

Os efeitos deste espalhamento podem ser mais bem entendidos no domínio da freqüência. A Figura 2-9b apresenta um corte da OTF tridimensional obtida pela FT da PSF 3D.

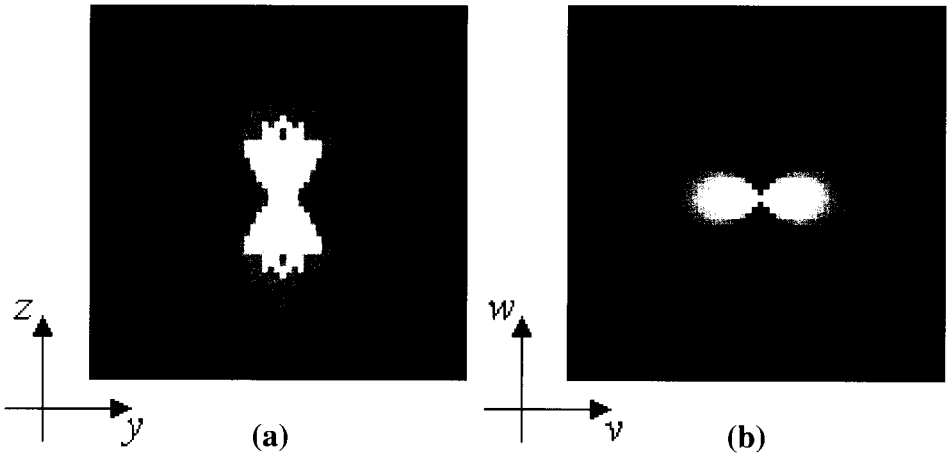


Figura 2-9: (a) Seção central de uma PSF 3D ao longo do eixo óptico para uma objetiva de imersão em óleo de 100X, 1.3 NA e λ = 0.5 μm; (b) Seção central da OTF 3D para a mesma objetiva (o *colormap* das imagens foi convenientemente ajustado para o *display*).

Esta figura ilustra o chamado "*cone de freqüências perdidas*" ao longo do eixo óptico. Este cone define as freqüências que não são transmitidas através do sistema de lentes. Dessa forma, além da OTF atuar como um filtro "*passa-baixa*", toda a informação que recai dentro deste cone é perdida [Preza (1990)].

Devido a estas limitações, o processo de formação de uma imagem através de microscopia *wide-field* sofre com a perda de informações que estão presentes no objeto estudado.

Embora estas limitações possam variar para diferentes funções pupilas (diferentes objetivas), o cone de freqüências nulas sempre estará presente. Esta é a principal limitação no processo de formação de imagens 3D em microscopia de seccionamento óptico computacional.

2.7 Caracterização do Problema e Revisão da Literatura

Na ausência de qualquer tipo de ruído, a solução para a Eq. (2-12), página 30, poderia ser obtida diretamente pela inversão da matriz $\mathbf{H}$, ou seja,

$$\mathbf{f} = \mathbf{H}^{-1}\mathbf{b}. \tag{2-37}$$

Contudo, a inversa da matriz de borramento, $\mathbf{H}^{-1}$, frequentemente não existe, ou em outras palavras, alguns de seus autovalores são nulos. Mais ainda, na presença de ruído, mesmo os autovalores diferentes de zero podem ser muito pequenos e o processo de inversão poderia levar a uma amplificação do ruído, produzindo resultados inaceitáveis.

Problemas desta natureza são chamados *mal-condicionados* [Tikhonov e Arsenin (1977)] no sentido de que a solução pode não existir, ou pode não ser única ou, ainda, pode não depender dos dados de forma contínua.

A matriz de *borramento* $\mathbf{H}$ neste caso é dita ser mal-condicionada e o problema de se estimar $\mathbf{f}$ a partir das observações borradas e ruidosas corresponde a um problema linear inverso [Rust e Burrus (1972)] [Bertero e Boccacci (1998)], sendo frequentemente denominado de "*deconvolução*". Colocamos o termo *deconvolução* entre aspas pois devemos observar que devido à natureza do problema, formalmente, o processo de deconvolução verdadeira não é possível.

A matriz de *borramento* em COSM é um exemplo típico de matriz mal condicionada onde não existe inversa, e o mais tênue ruído ou erro nas observações pode produzir grandes variações nos resultados estimados.

Uma alternativa para o caso em que $\mathbf{H}^{-1}$ não existe, poderia ser o uso da pseudo-inversa [Andrews e Hunt (1977)]. Neste caso, uma estimativa $\hat{\mathbf{f}}$ para $\mathbf{f}$ poderia ser encontrada por

$$\hat{\mathbf{f}} = \left(\mathbf{H}^T\mathbf{H}\right)^{-1}\mathbf{H}^T\mathbf{g}, \tag{2-38}$$

onde $\mathbf{H}^T$ é a transposta de $\mathbf{H}$. Mesmo neste caso, autovalores de $\mathbf{H}$ próximos de zero, poderiam produzir valores de $\left(\mathbf{H}^T\mathbf{H}\right)^{-1}$ muito pequenos. Desta forma, o estimador da Eq. (2-38) é instável na presença de ruído se $\mathbf{H}$ for mal condicionada.

Mais ainda, seguindo esta abordagem, a informação perdida devido aos autovalores nulos não poderia ser recuperada.

Para se contornar o problema do mau condicionamento, o uso de informação *a priori* e mecanismos de regularização devem ser incorporados ao problema inverso, de forma a obter uma solução aproximada, onde se entende por regularização qualquer procedimento capaz de estabilizar a inversão de uma matriz mal condicionada.

De maneira geral, técnicas de restauração de imagens vêm sendo extensivamente utilizadas em imagens 3D de microscopia *wide-field* [Agard et al. (1989)] [Swedlow et al. (1997)]. Por outro lado, embora as capacidades do microscópio confocal permitirem a reconstrução 3D do objeto verdadeiro sem necessidade de pós-processamento [Wilson (1989)], estas técnicas também podem ser aplicadas para melhorar imagens confocais [Conchello e Hansen (1990)] [Kesterson e Richardson (1991)] [Shaw e Rawlins (1991)] [van der Voort e Strasters (1995)].

Particularmente, nos últimos 20 anos, dentro do contexto de seccionamento óptico computacional, diversos algoritmos com complexidade e tempos de processamento diferentes foram desenvolvidos para solucionar o problema com diferentes "*graus*" de sucesso entre eles [Erhardt et al. (1985)] [Holmes (1988)] [Conchello e Hansen (1990)] [Odgaard et al. (1990)] [Preza et al. (1992)] [Preza et al. (1993)] [Joshi e Miller (1993)] [Tommasi et al. (1993)] [Conchello et al. (1994)] [Carrington et al. (1995)] [Holmes et al. (1995)] [Lane (1996)] [Vitrià e Llacer (1996)] [van Kempen et al. (1997)] [Conchello (1998)] [Verveer (1998)].

Devido à alta dimensionalidade, ou seja, a grande quantidade de dados em COSM, e o custo computacional elevado[11] para o processamento desta informação, o que se espera de um algoritmo de deconvolução é que ele seja capaz de fornecer um resultado aceitável no menor tempo possível. Desta forma, o problema em COSM não se resume apenas em estimar a concentração de fluorescência do objeto verdadeiro, mas fazer isso no menor tempo possível.

Os algoritmos mais simples e rápidos são os algoritmos lineares e não iterativos sendo que uma grande parte da literatura trata destes métodos como, por exemplo, o filtro de Tikhonov [Tikhonov e Arsenin (1977)], o filtro de Wiener

[11] Mesmo para os computadores atuais de alta performance.

[Andrews e Hunt (1977)] e o algoritmo de mínimos quadrados linear regularizado (*Regularized Linear Least Squares* – RLLS) proposto por Preza et al. (1992). Estes três métodos não incorporam a presença do ruído Poisson (embora o RLLS tenha sido proposto especificamente no contexto de COSM), assumindo um ruído aditivo e independente do sinal.

Sendo assim, uma das abordagens proposta no presente texto é a derivação, segundo critérios estatísticos, de algoritmos lineares que incorporam a presença de ruído Poisson nas observações, com aplicações em microscopia de deconvolução.

Contudo, métodos lineares não são capazes de recuperar os componentes de freqüências que recaem dentro do cone de freqüências nulas. Este, de fato, é o maior problema na restauração de imagens *wide-field*, onde uma boa parte da informação essencial presente no objeto inicial é perdida. Mesmo para imagens confocais, as soluções geradas pelos métodos lineares produzem distorções nos resultados, como os artefatos na forma de anéis [Lagendijk e Biemond (1991)] [van der Voort e Strasters (1995)], que não são desejáveis.

Assim sendo, os algoritmos mais efetivos em COSM são aqueles que promovem algum grau de recuperação destas freqüências perdidas além do limite de difração, sendo que diversos autores demonstram ser estes resultados possíveis através de métodos iterativos e não-lineares [Carrington et al. (1995)] [van Kempen et al. (1997)] [Conchello (1998)].

Por mais detalhada que fosse uma revisão sobre o assunto, certamente estaria incompleta em vista da grande variedade de trabalhos encontrados na literatura. Assim sendo, abaixo, procuramos descrever de maneira geral os algoritmos iterativos e não-lineares mais importantes e que foram descritos diretamente no contexto de microscopia de fluorescência.

Uma das abordagens mais antigas neste contexto é a busca por uma solução aproximada proposta inicialmente por Weinstein e Castleman (1971), que sugeriram incluir apenas os efeitos de seções próximas ao plano focal no processo de restauração, observando que estas são as que mais contribuem para o borramento. Este método promove uma solução aproximada uma vez que não incorpora os efeitos de todos os planos focais, contudo é útil para uma estimativa inicial. Posteriormente, Weinstein e Castleman propuseram uma simplificação deste método que incorpora apenas os dois planos adjacentes ao plano focal. Esta versão ficou conhecida como

método dos *vizinhos mais próximos*, sendo bastante rápido e, para algumas aplicações onde se deseja apenas uma solução aproximada, este método é adequado [Preza (1990)].

Depois dos algoritmos de Weinstein e Castleman, um dos mais conhecidos foi o proposto por Agard e Sedat (1983), Agard (1984) e Agard et al. (1989), baseado em uma variação do algoritmo de van Cittert (1931) e Landweber (1951). Este supõe um modelo Gaussiano para o ruído e, neste caso, uma restrição de não negatividade é implementada projetando-se os valores negativos para zero depois de cada iteração. Muito mais tarde este algoritmo foi revisto do ponto de vista de POCS [Stark e Yang (1998)].

Ainda, podemos citar o algoritmo de Carrington, que implementa uma função de verossimilhança para um modelo Gaussiano baseado na regularização de Tikhonov-Miller [Carrington (1990)] [Carrington et al. (1995)] e busca uma solução não negativa através do algoritmo do gradiente conjugado. Uma variação deste método é o algoritmo iterativo de Tikhonov-Miller com restrições. Neste, o funcional é diretamente minimizado por um algoritmo de gradiente conjugado e a condição de não negatividade é incorporada projetando-se os valores negativos para zero depois de cada iteração [Lagendijk (1990)] [van der Voort e Strasters (1995)] [Verveer e Jovin (1997a)].

Seguindo uma abordagem bayesiana, Verveer e Jovin (1997b) e Verveer e Jovin (1998) relataram um procedimento genérico para derivar algoritmos para cada combinação do funcional de verossimilhança com diferentes funções de *penalização* gerando uma série de métodos, como por exemplo, algoritmos que implementam a solução de máxima verossimilhança e de máximo *a posteriori* para os casos de ruído Poisson e Gaussiano.

Uma das abordagens mais populares para deconvolução em microscopia de fluorescência é o método que usa o algoritmo *Expectation-Maximization* (EM) [Dempster et al. (1977)] para achar a solução de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood* – ML) sob a hipótese de ruído Poisson [Holmes (1988)] [Holmes (1989)] [Conchello e Hansen (1990)] [Holmes et al. (1995)] [Conchello (1998)]. Neste caso, a restrição de positividade é implícita. Chamaremos este método de algoritmo MLEM (*Maximum Likelihood Expectation-Maximization*). Observamos que se trata de uma versão generalizada do algoritmo de Shepp e Vardi (1982), sendo capaz de

fornecer aproximações muito acuradas do objeto real. Contudo, sua convergência é extremamente lenta precisando em muitos casos de 1000 a 2000 iterações para alcançar os resultados desejados.

Posteriormente, o algoritmo MLEM foi modificado de forma a incorporar a regularização de Tikhonov por Conchello e McNally (1996) e também para incorporar uma função de *penalização* tipo "*Good's roughness*" por Joshi e Miller (1993) e Markhan e Conchello (1997).

Alguns trabalhos usando POCS também foram relatados no contexto de microscopia de fluorescência. Por exemplo, Lenz (1986) sugeriu um procedimento que usa apenas algumas seções próximas do plano focal para o processo de restauração, assim como o algoritmo dos vizinhos mais próximos. Contudo, Lenz não apresentou resultados numéricos. Koshy et al. (1990) propuseram um algoritmo de projeções baseado na regularização de Tikhonov-Miller, porém sem apresentar resultados conclusivos. Gopalakrishnan et al. (1999) propuseram um algoritmo alternativo baseado no procedimento *row action*, derivado considerando uma configuração específica com alta abertura numérica. Ainda, uma última abordagem foi proposta por Razaz et al. (1997) que sugeriram uma restrição baseada em um limite superior para a variância do ruído. Com exceção de Gopalakrishnan, todos os outros incorporaram uma restrição de positividade e em nenhum destes trabalhos a presença de ruído Poisson foi considerada.

Em contraste com os métodos lineares e não iterativos que são rápidos, os algoritmos não lineares e iterativos são frequentemente lentos, precisando muitas vezes de um grande número de iterações para obter um resultado aceitável. Dessa forma, mesmo fornecendo resultados superiores, em situações onde o tempo de processamento é crítico estes algoritmos podem não ser os mais adequa dos.

Alguns dos algoritmos descritos acima, especificamente aqueles capazes de recuperar os componentes de freqüência perdidas, pertencem a uma classe de métodos que são conhecidos na literatura como *algoritmos de super-resolução* [di Francia (1955)] [Harris (1964a)] [Harris (1964b)] [di Francia (1969)] [Joyce e Root (1984)] [Sementilli et al. (1993)] [Hunt (1995)] [Clarkson e Barrett (1997)]. De fato, verifica-se que os algoritmos mais efetivos em COSM, do ponto de vista da qualidade dos resultados, são aqueles capazes de promover uma super-resolução parcial.

Uma vez que propomos algoritmos capazes de realizar super-resolução, apresentaremos uma revisão sucinta sobre o tema.

A definição mais precisa para super-resolução segundo Sementilli et al. (1993), é a restauração do espectro de freqüências do objeto para aquelas freqüências inferiores à freqüência de corte e à extrapolação do espectro acima desta.

A restauração espectral até o limite fornecido pela freqüência de corte é obtida pela solução do problema linear inverso e a super-resolução propriamente dita, corresponde à reconstrução do espectro para além da freqüência de corte. Dessa forma, não linearidade é necessária para super-resolução. Sementilli definiu a máxima freqüência obtida pela solução de Tikhonov para caracterizar o limiar acima do qual se deseja a extrapolação do espectro.

O problema da possibilidade de super-resolução vem sendo debatido nos últimos 50 anos. Autores como Harris (1964a) descrevem o problema levando em consideração o teorema da continuação analítica para mostrar que, na ausência de ruído, uma extensão infinita da largura da banda espectral é possível e que esta pode ser estendida unicamente para qualquer imagem. Por outro lado, autores como di Francia (1955) teorizaram que diferentes objetos podem produzir a mesma imagem tornando o problema ambíguo. Dessa forma, a informação contida na imagem seria insuficiente para permitir a perfeita reconstrução do objeto. Mais recentemente, Bertero e Pike (1982) e Frieden (1971) demonstraram que o problema da super-resolução é limitado pelo número de *Shannon* da imagem [Kosarev (1990)]. Sementilli também obteve indicações de que o problema em geral é limitado, uma vez que, freqüentemente, o conhecimento da informação *a priori* é parcial, e derivou limites superiores para as freqüências que podem ser recuperadas.

Apesar das discussões teóricas sobre as possibilidades efetivas de super-resolução, na prática, autores como Gerchberg (1974), Papoulis (1975), Carrington et al. (1995) e Conchello (1998), entre outros [Jain e Ranganath (1981)] [Walsh e Delaney (1994)] [Miura e Baba (1996)], demonstraram experimentalmente a possibilidade real de super-resolução. Atualmente, sabe-se que super-resolução parcial é possível sendo, contudo, limitada por fatores como amostragem e informação *a priori* parcial. Segundo Hunt (1995), as informações *a priori* freqüentemente incorporadas são: conhecimento sobre o contorno do objeto, tamanho, limites inferiores e superiores sobre a intensidade e quaisquer outras

estatísticas do objeto verdadeiro. Neste último caso, por exemplo, supondo um modelo estatístico para a imagem verdadeira, um conhecimento adequado da matriz de covariância ou da média do sinal pode fornecer a informação necessária para realizar super-resolução.

Para mencionar apenas os algoritmos mais importantes no contexto de super-resolução, devemos começar pelos trabalhos pioneiros de Slepian e Pollack (1961), Gerchberg (1974) e Papoulis (1975).

Particularmente, Gerchberg e Papoulis derivaram, de forma independente, uma metodologia que nos dias de hoje é conhecida como algoritmo de Gerchberg-Papoulis, sendo um dos primeiros algoritmos reconhecidamente capaz de recuperar os componentes de freqüências perdidas além do limite de difração.

Este método assume restrições sobre o objeto conjuntamente no domínio da freqüência e no domínio espacial. Para a restrição espacial, se supõe que o objeto possui uma extensão finita, satisfazendo dessa forma a condição de analiticidade (como descrita por Harris). Outras restrições no domínio do espaço como positividade podem ainda ser incorporadas. Por outro lado, a restrição no domínio de Fourier é o conhecimento do espectro de freqüências abaixo do limite de difração. A imposição das restrições espaciais modifica o espectro no domínio de Fourier abaixo do limite de difração, ao mesmo tempo em que expande as freqüências espaciais. A restrição no domínio de Fourier restaura as freqüências até o limite de difração que são modificadas pelas restrições espaciais, enquanto mantém as freqüências extrapoladas. Verifica-se que a imposição destas restrições de forma iterativa converge para uma solução satisfazendo todas as restrições.

Podemos ainda mencionar uma variante proposta por Walsh e Delaney (1994), que introduziu uma modificação do algoritmo de Gerchberg-Papoulis de forma a computar os componentes de freqüência espacial acima do limite de difração diretamente no domínio espacial.

Embora podendo ser considerado, a princípio, um procedimento *ad hoc*, a convergência do algoritmo de Gerchberg-Papoulis é garantida. Mas tarde, este algoritmo foi revisto no contexto de Projeções sobre Conjuntos Convexos [Combettes (1996)] [Stark e Yang (1998)] formalizando dessa forma as propriedades de convergência.

Uma das abordagens consideradas nesse trabalho consiste em derivar algoritmos iterativos baseados na teoria de Projeções sobre Conjuntos Convexos (*Projection onto Convex Sets* – POCS), incorporando a metodologia de Gerchberg-Papoulis. Observamos neste ponto, que usamos o algoritmo MLEM, cujas propriedades de super-resolução são conhecidas, para comparação com os algoritmos POCS propostos no contexto de microscopia de deconvolução.

Outro algoritmo de super-resolução, derivado de forma diferente da anterior, foi proposto, também de forma independente, por Richardson (1972), Lucy (1974) e Shepp e Vardi (1982). Os dois primeiros justificaram o método por uma abordagem bayesiana, enquanto os últimos propuseram um modelo baseado no critério de máxima verossimilhança, supondo uma distribuição de Poisson para a imagem verdadeira. Pode-se verificar que o algoritmo proposto posteriormente por Hunt e Sementilli (1992), baseado em um critério de máximo *a posteriori,* é uma extensão da abordagem de Shepp e Vardi. Mais ainda, verifica-se que o algoritmo MLEM, proposto no contexto de COSM [Conchello (1998)], também é uma versão modificada e generalizada deste algoritmo.

Para terminar, um ponto importante a ser considerado é se microscopia de deconvolução pode de fato proporcionar resultados equivalentes à microscopia confocal, ou seja, se é uma alternativa viável a esta modalidade. Esta questão ainda não foi respondida adequadamente. Apenas Shaw (1995), McNally et al. (1998) e Verveer (1998) trataram deste assunto e, em geral, os resultados apresentados não são conclusivos, muito embora sejam favoráveis à microscopia de deconvolução como substituta para a confocal. Ainda, podemos acrescentar que algoritmos de deconvolução cega [Holmes (1992)] [Holmes et al. (1994)] [Krishnamurthi et al. (1995)] [Avinash (1996)] [Bhattacharyya et al. (1996)] e POCS não foram considerados nestes trabalhos.

2.8 Conclusão

Apresentamos e discutimos o problema da restauração e reconstrução tridimensional de imagens obtidas em microscopia de fluorescência, utilizando a técnica de seccionamento óptico computacional.

Nesse sentido, verificamos que microscopia de deconvolução com um microscópio de fluorescência *wide-field* é um problema fundamentalmente limitado, pois a função de transferência óptica é exatamente igual a zero sobre uma região delimitada por um "cone" no domínio da freqüência. Na região onde esta função assume valores diferentes de zero o sistema atua como um filtro *passa-baixa* e, na região onde assume valores nulos, remove informação da imagem observada.

Desta forma, é importante buscar algoritmos que são capazes de fornecer estimativas acuradas da imagem verdadeira e também recuperar os componentes de freqüência espacial que recaem dentro do cone de freqüências nulas.

Observamos que, sem informação adicional, os algoritmos de deconvolução não são capazes de recuperar estes componentes de freqüência perdidos. Esse é o caso, por exemplo, dos métodos lineares. Todavia, estes algoritmos são viáveis quando a velocidade de processamento é importante. Por sua vez, algoritmos não lineares, capazes de incorporar o conhecimento disponível sobre o problema, promovem aproximações mais precisas da imagem verdadeira.

Nos próximos capítulos apresentaremos novos algoritmos, lineares e não lineares, para a deconvolução de imagens obtidas em microscopia de fluorescência. Os primeiros são derivados a partir de critérios estatísticos e os últimos a partir da teoria de Projeções sobre Conjuntos Convexos. Nestes, a informação *a priori* é incorporada ao problema na forma de restrições convexas. Para isso, seguimos a abordagem de "*imagens protótipos*", que foram originalmente definidas e analisadas por Sezan e Trussell (1991). A metodologia proposta é similar à de Gerchberg-Papoulis, sendo capaz de promover resultados similares ou superiores ao algoritmo *Maximum Likelihood Expectation Maximization*.

Capítulo 3 Algoritmos de Restauração Estatísticos

3.1 Introdução

É bem conhecido que, em microscopia de deconvolução, o ruído dominante é devido à baixa contagem de fótons durante o processo de aquisição de uma imagem, sendo caracterizado por uma distribuição de Poisson [Snyder e Miller (1991)] [Snyder et al. (1993)]. Neste capítulo, apresentamos e discutimos novos métodos para a restauração de imagens que consideram apenas a presença de ruídos desta natureza nas observações.

Até onde podemos verificar, não foram propostos, dentro do contexto de seccionamento óptico computacional, algoritmos para o pré-processamento das imagens com o intuito de eliminar o ruído Poisson antes do processo de deconvolução. Sendo assim, seguindo critérios estatísticos, uma das abordagens propostas neste trabalho consiste no uso de dois procedimentos pontuais e não lineares para a redução do ruído Poisson. Dessa forma, uma vez eliminado o ruído, ou pelo menos minimizado, procedimentos que a princípio não consideram a presença de ruídos desta natureza podem ser aplicados para a restauração.

Por outro lado, também propomos dois filtros lineares para deconvolução que consideram uma distribuição de Poisson para modelar o ruído presente na imagem observada. Lembramos que, embora os métodos lineares não sejam tão eficazes do ponto de vista da restauração, são úteis para fornecer uma primeira estimativa da imagem verdadeira quando um curto tempo de processamento é importante. O primeiro algoritmo é derivado a partir de um filtro de restauração MAP não linear proposto originalmente por Lo (1979) e, o segundo, é derivado a partir de um filtro linear de mínimos quadrados proposto por Goodman e Belsher (1976).

A próxima seção é dedicada aos procedimentos para redução do ruído Poisson presente nas observações e posteriormente, apresentamos a derivação dos algoritmos lineares para deconvolução. A última parte deste capítulo é dedicada à apresentação dos resultados experimentais.

3.2 Procedimentos para Redução do Ruído Poisson

Esta seção é dedicada aos procedimentos propostos para a redução do ruído Poisson presente em imagens adquiridas em COSM.

Primeiramente, apresentamos um algoritmo baseado em um critério de máxima probabilidade *a posteriori* (MAP). Na seqüência, apresentamos um método baseado na transformação não linear de Anscombe, que transforma o ruído dependente do sinal em um ruído aproximadamente aditivo, Gaussiano e independente do sinal.

3.2.1 Estimação Usando o Critério de Máximo *a Posteriori*

Lo (1979) propôs um algoritmo para a redução do ruído Poisson baseado em um critério MAP considerando um modelo Gaussiano para a imagem que se deseja estimar. Neste trabalho, propomos a extensão do trabalho de Lo para o caso tridimensional.

Através de argumentos físicos e também pela tratabilidade matemática, Hunt e Cannon (1976) desenvolveram um modelo estatístico para a imagem verdadeira sendo esta modelada por um processo Gaussiano multivariado, com média do "*ensemble*" não estacionária[12] e covariância estacionária [Trussell e Kruger (1978)].

Dessa forma, seguindo este critério, o vetor imagem verdadeira $\mathbf{f}$ é a realização de um vetor aleatório $\tilde{\mathbf{F}}$, descrito por uma função de densidade de probabilidade (*Probability Density Function* – PDF) expressa por

$$p_{\tilde{\mathbf{F}}}(\mathbf{f}) = \frac{1}{\left((2\pi)^{N/2} \cdot \left| \mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{F}}} \right|^{1/2} \right)} \cdot e^{-\frac{1}{2}(\mathbf{f}-\bar{\mathbf{f}})^T \mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{F}}}^{-1} (\mathbf{f}-\bar{\mathbf{f}})}, \tag{3-1}$$

onde $\bar{\mathbf{f}}$ e $\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{F}}}$ são a média não estacionária e a matriz de covariância de $\tilde{\mathbf{F}}$, respectivamente.

Uma vez que assumimos a imagem verdadeira como a realização de um vetor aleatório, a partir do sistema linear da Eq. (2-12), página 30, é correto afirmar que

---

[12] O termo *imagem média* poderia ser usado, contudo preferimos preservar a nomenclatura dos trabalhos originais.

sob esta hipótese, o vetor imagem borrada $\mathbf{b}$ é a realização de um vetor aleatório $\tilde{\mathbf{B}}$, com PDF expressa por

$$p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b}) = \frac{1}{\left((2\pi)^{N/2} \cdot \left|\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{B}}}\right|^{1/2}\right)} \cdot e^{-\frac{1}{2}(\mathbf{b}-\bar{\mathbf{b}})^T \mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{B}}}^{-1}(\mathbf{b}-\bar{\mathbf{b}})}, \tag{3-2}$$

onde

$$\bar{\mathbf{b}} = \mathbf{H}\bar{\mathbf{f}} \tag{3-3}$$

e

$$\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{B}}} = \mathbf{H}\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{F}}}\mathbf{H}^T \tag{3-4}$$

são a média não estacionária e a matriz de covariância de $\tilde{\mathbf{B}}$, respectivamente.

Dessa forma, a imagem borrada $\mathbf{b}$ também pode ser descrita através de um modelo multivariado Gaussiano.

Assim, dado o vetor imagem observada $\mathbf{d} = \alpha \cdot \mathbf{u}$, degradado por ruído Poisson, onde α é um fator de escala[13], uma estimativa da imagem borrada sem ruído $\mathbf{b}$, utilizando o critério MAP, é obtida maximizando $p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b} \backslash \mathbf{d})$ para todo $\mathbf{b}$, ou seja,

$$\max_{\mathbf{b}} p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b} \backslash \mathbf{d}) \tag{3-5}$$

onde $p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b} \backslash \mathbf{d})$ é PDF condicional de $\mathbf{b}$ dado que ocorre $\mathbf{d}$.

Da regra de Bayes [Papoulis (1965)], temos que

$$p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b} \backslash \mathbf{d}) = \frac{p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d} \backslash \mathbf{b}) \cdot p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b})}{p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d})}, \tag{3-6}$$

onde $p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d} \backslash \mathbf{b})$ é probabilidade condicional de $\mathbf{d}$ dado que ocorre $\mathbf{b}$, $p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d})$ é a probabilidade da observação e $p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b})$ é a densidade de probabilidade *a priori* da imagem borrada sem ruído. Neste caso, $p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b} \backslash \mathbf{d})$ é a densidade de probabilidade *a posteriori*.

Ainda, para simplificação, e pela não negatividade das grandezas envolvidas, freqüentemente se maximiza o logaritmo de $p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b} \backslash \mathbf{d})$. Ou seja,

$$\max_{\mathbf{b}} \left[ln\, p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b} \backslash \mathbf{d})\right] = \max_{\mathbf{b}} \left[ln\, p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d} \backslash \mathbf{b}) + ln\, p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b}) - ln\, p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d})\right]. \tag{3-7}$$

---

[13] A constante α é um artifício incorporado no modelo para simplificar a derivação do filtro.

A solução é obtida tomando-se a derivada de $ln\, p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b}\backslash\mathbf{d})$ em relação a $\mathbf{b}$ e igualando o resultado ao vetor nulo. Mais ainda, desde que $ln\, p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d})$, na Eq. (3-7), não depende de $\mathbf{b}$, podemos desconsiderá-lo no processo de maximização. Assim, temos que

$$\frac{\partial\, ln\, p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d}\backslash\mathbf{b})}{\partial\mathbf{b}}+\frac{\partial\, ln\, p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b})}{\partial\mathbf{b}}=\mathbf{0}^T\ . \tag{3-8}$$

Como $\mathbf{d}=\alpha\cdot\mathbf{u}$, da Eq. (2-17), página 32, verifica-se que

$$p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d}\backslash\mathbf{b})=\prod_i\frac{(\gamma\cdot b_i)^{\frac{d_i}{\alpha}}\cdot e^{-\gamma\cdot b_i}}{\alpha\cdot\left(\frac{d_i}{\alpha}\right)!}\ . \tag{3-9}$$

Assim, podemos escrever:

$$ln\, p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d}\backslash\mathbf{b})=\sum_i ln\left(\frac{(\gamma\cdot b_i)^{\frac{d_i}{\alpha}}\cdot e^{-\gamma\cdot b_i}}{\alpha\cdot\left(\frac{d_i}{\alpha}\right)!}\right)=\sum_i\left(\frac{d_i}{\alpha}\cdot ln\left(\gamma\cdot b_i\right)-\gamma\cdot b_i-ln\,\alpha-ln\left(\frac{d_i}{\alpha}\right)!\right) \tag{3-10}$$

Dessa forma, a primeira parcela da soma na Eq. (3-8) é obtida derivando a Eq. (3-10) em relação a $\mathbf{b}=(b_1,\ldots,b_N)$. Ou seja,

$$\frac{\partial\, ln\, p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d}\backslash\mathbf{b})}{\partial\mathbf{b}}=\left[\frac{d_1}{\alpha\cdot b_1}-\gamma,\frac{d_2}{\alpha\cdot b_2}-\gamma,\ldots,\frac{d_N}{\alpha\cdot b_N}-\gamma\right]. \tag{3-11}$$

Por outro lado, a segunda parcela na soma da Eq. (3-8) é obtida tomando-se o logaritmo da Eq. (3-2), ou seja,

$$ln\, p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b})=-ln\left((2\pi)^{N/2}\cdot\left|\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{B}}}\right|^{1/2}\right)-\frac{1}{2}(\mathbf{b}-\bar{\mathbf{b}})^T\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{B}}}^{-1}(\mathbf{b}-\bar{\mathbf{b}}) \tag{3-12}$$

e derivando em relação a $\mathbf{b}$, obtendo

$$\frac{\partial\, ln\, p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b})}{\partial\mathbf{b}}=-(\mathbf{b}-\bar{\mathbf{b}})^T\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{B}}}^{-1}. \tag{3-13}$$

Substituindo as Eqs. (3-11) e (3-13) na Eq. (3-8), verifica-se que

$$\left[\frac{d_1}{\alpha\cdot b_1}-\gamma,\frac{d_2}{\alpha\cdot b_2}-\gamma,\ldots,\frac{d_N}{\alpha\cdot b_N}-\gamma\right]-(\mathbf{b}-\bar{\mathbf{b}})^T\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{B}}}^{-1}=\mathbf{0}^T. \tag{3-14}$$

Agora, obtendo a transposta de ambos os lados da Eq. (3-14) e observando que $\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{B}}}^{-1}$ é simétrica, podemos escrever:

$$\begin{bmatrix} \frac{d_1}{\alpha \cdot b_1} - \gamma \\ \frac{d_2}{\alpha \cdot b_2} - \gamma \\ \vdots \\ \frac{d_N}{\alpha \cdot b_N} - \gamma \end{bmatrix} - \mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{B}}}^{-1}\left(\mathbf{b} - \bar{\mathbf{b}}\right) = \mathbf{0} \tag{3-15}$$

Supondo $\alpha \cdot \gamma = 1$, o filtro de MAP para estimação da observação sem ruído é então expresso como

$$\gamma \cdot (\mathbf{q} - \mathbf{1}) - \mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{B}}}^{-1}(\mathbf{b} - \bar{\mathbf{b}}) = \mathbf{0} \tag{3-16}$$

onde os componentes do vetor $\mathbf{q}$ são $q_i = {}^{d_i}\!/_{b_i}$ e $\mathbf{1}$ é um vetor unitário.

O filtro derivado na Eq. (3-16) requer o conhecimento da matriz de covariância $\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{B}}}$. Neste trabalho, propomos que $\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{B}}} = \sigma_{\tilde{\mathbf{B}}}^2 \cdot \mathbf{I}$, onde $\sigma_{\tilde{\mathbf{B}}}^2$ é uma constante positiva e $\mathbf{I}$ é a matriz identidade. Desta forma, assumimos que os *voxels* da imagem borrada são não correlacionados, o que é uma hipótese muito restritiva. De fato, os *voxels* da imagem borrada são extremamente correlacionados. Contudo, esta hipótese torna a aplicação do filtro conveniente.

Assim sendo, derivamos um estimador MAP pontual não linear para a imagem borrada sem ruído Poisson expresso por

$$\hat{b}_i = \frac{\left(\bar{b}_i - \gamma \cdot \sigma_{\tilde{\mathbf{B}}}^2\right) \pm \sqrt{\left(\bar{b}_i - \gamma \cdot \sigma_{\tilde{\mathbf{B}}}^2\right)^2 + 4 \cdot \gamma \cdot \sigma_{\tilde{\mathbf{B}}}^2 \cdot d_i}}{2}. \tag{3-17}$$

Observamos que para o uso da Eq. (3-17) a raiz positiva é utilizada pois a intensidade da imagem é uma grandeza não negativa.

3.2.2 Estimação Através da Transformação de Anscombe

Nesta seção, apresentamos uma metodologia para a redução do ruído Poisson baseada na transformação de Anscombe (*Anscombe Transformation* – AT).

Através de uma transformação não linear, o ruído Poisson, que é dependente do sinal, pode ser transformado em um ruído aproximadamente independente do sinal, aditivo [Inouye (1971)] e mais próximo de uma distribuição Gaussiana com média zero e variância unitária [Anscombe (1948)].

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Conforme Anscombe (1948), a AT sobre uma variável aleatória $\tilde{U}_i$ com distribuição de Poisson é expressa por

$$\tilde{Z}_i = 2 \cdot \sqrt{\tilde{U}_i + \frac{3}{8}}\,. \tag{3-18}$$

Mais ainda, segundo Inouye (1971), a nova variável aleatória $\tilde{Z}_i$ pode ser representada através de um modelo aditivo como

$$\tilde{Z}_i = 2 \cdot \sqrt{\tilde{B}_i + \frac{1}{8}} + \tilde{N}_i = \tilde{S}_i + \tilde{N}_i \tag{3-19}$$

onde $\tilde{N}_i$ representa um ruído aproximadamente independente de $\tilde{S}_i$, descrito por uma distribuição mais próxima da Gaussiana, com média

$$E[\tilde{N}_i] \approx 0 \tag{3-20}$$

e variância

$$Var[\tilde{N}_i] \approx 1\,. \tag{3-21}$$

Ainda, pode-se mostrar [Anscombe (1948)] que a média de $\tilde{Z}_i$ é aproximadamente igual a

$$E[\tilde{Z}_i] \approx 2 \cdot \sqrt{E[\tilde{U}_i] + \frac{1}{8}} \tag{3-22}$$

e sua variância

$$Var[\tilde{Z}_i] \approx 1\,. \tag{3-23}$$

Usando estes fatos, é possível agora utilizar técnicas bem conhecidas para a redução de um ruído aditivo e independente do sinal sobre a nova variável no domínio de Anscombe [Mascarenhas et al. (1999)].

Para isso, propomos o filtro de Wiener [Andrews e Hunt (1977)], que é o filtro linear ótimo sob o critério de mínimo erro médio quadrático.

Dessa forma, dado o vetor de observações $\mathbf{u}$, a AT sobre cada u_i, $1 \le i \le N$, é dada por

$$z_i = 2 \cdot \sqrt{u_i + \frac{3}{8}}\,. \tag{3-24}$$

Por sua vez, uma estimativa sem ruído $\hat{s}_i$ para z_i, usando o filtro de Wiener pontual, é obtida por

$$\hat{s}_i = E[\tilde{S}_i] + \frac{\sigma^2_{\tilde{S}_i}}{\sigma^2_{\tilde{S}_i}+1}\left(z_i - E[\tilde{S}_i]\right), \tag{3-25}$$

onde a média e variância de $\tilde{S}_i$, expressas por $E[\tilde{S}_i]$ e $\sigma^2_{\tilde{S}_i}$, devem ser estimadas na prática.

Após a suavização do ruído aditivo, obtemos uma estimativa da imagem borrada sem ruído Poisson pela aplicação da transformação inversa de Anscombe (*Inverse Anscombe Transformation* – IAT) sobre $\hat{s}_i$, expressa por

$$\hat{b}_i = \frac{1}{4}\cdot\hat{s}_i^2 - \frac{1}{8}. \tag{3-26}$$

A Figura 3-1 ilustra um diagrama de blocos para a estimação da imagem borrada sem ruído Poisson seguindo esta metodologia.

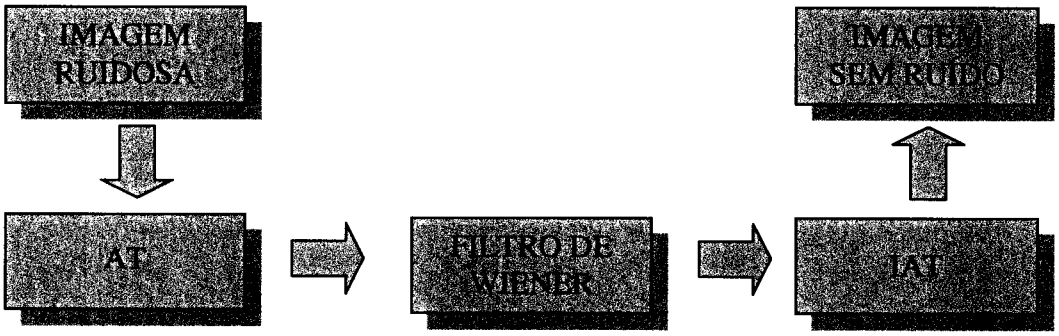


Figura 3-1: Diagrama de blocos do procedimento para redução do ruído Poisson através da transformação de Anscombe.

Observamos que o filtro baseado na AT, assim como o filtro MAP, é um procedimento pontual, ou seja, não leva em consideração a correlação entre os *voxels* da imagem.

Uma última observação sobre a AT merece menção. Segundo Starck e Murtagh (2001), a AT não pode ser aplicada para dados com menos de 20 fótons por *pixel* (ou *voxel*), aproximadamente. Contudo, não encontramos outros trabalhos na literatura que justifiquem esta afirmação.

3.3 Filtros Lineares Propostos para Deconvolução

Nesta seção, descrevemos os métodos lineares não iterativos propostos para deconvolução de imagens obtidas em COSM. Primeiramente, apresentamos um filtro MAP não linear que considera a degradação da imagem observada por ruído Poisson e posteriormente, sob certas hipóteses restritivas, propomos um filtro MAP linearizado, viável para aplicações em microscopia de deconvolução. Apresentamos ainda um filtro linear derivado sob o critério de mínimo erro médio quadrático que também incorpora a presença do ruído Poisson nas observações.

3.3.1 Filtro MAP Não-linear

A derivação do filtro MAP apresentado nesta seção é devida a Lo (1979). Este filtro é derivado a partir de um modelo Gaussiano para a imagem verdadeira e considerando uma distribuição de Poisson para as observações borradas e ruidosas. Observamos que este filtro não leva em consideração a presença de ruído aditivo e independente do sinal.

A partir do modelo Gaussiano descrito na Seção 3.2.1 para formação da imagem, pode-se derivar um estimador MAP para a imagem verdadeira através da expressão

$$\max_{\mathbf{f}} p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b} \setminus \mathbf{d}) = \max_{\mathbf{f}} \frac{p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d} \setminus \mathbf{b}) \cdot p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b})}{p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d})} , \tag{3-27}$$

onde, como antes, $p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b} \setminus \mathbf{d})$ é PDF condicional de $\mathbf{b}$ dado que ocorre $\mathbf{d}$ (densidade de probabilidade *a posteriori*), $p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d} \setminus \mathbf{b})$ é probabilidade condicional de $\mathbf{d}$ dado que ocorre $\mathbf{b}$, $p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d})$ é a probabilidade da observação, $p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b})$ é a densidade de probabilidade *a priori* da imagem borrada sem ruído e $\mathbf{b} = \mathbf{Hf}$.

Analogamente ao que foi feito na Seção 3.2.1, em vista da tratabilidade matemática, uma vez que as grandezas envolvidas são não negativas, para maximizar $p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b} \setminus \mathbf{d})$ costuma-se maximizar a função $ln\, p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b} \setminus \mathbf{d})$, ou seja,

$$\max_{\mathbf{f}} \left[ln\, p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b} \setminus \mathbf{d}) \right] = \max_{\mathbf{f}} \left[ln\, p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d} \setminus \mathbf{b}) + ln\, p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b}) - ln\, p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d}) \right]. \tag{3-28}$$

Uma vez que a função logarítmica é monotônica, maximizar a Eq. (3-28) é equivalente a maximizar a Eq. (3-27). Dessa forma, derivando $ln\, p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b}\setminus\mathbf{d})$ em relação a $\mathbf{f}$ e igualando o resultado ao vetor nulo obtemos

$$\frac{\partial\, ln\, p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d}\setminus\mathbf{b})}{\partial\mathbf{f}}+\frac{\partial\, ln\, p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b})}{\partial\mathbf{f}}=\mathbf{0}^T. \tag{3-29}$$

Observamos que, como antes, desconsideramos o termo $ln\, p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d})$ no processo de maximização, uma vez que não depende de $\mathbf{f}$.

Agora, observamos que com $\mathbf{f}=(f_1,\ldots,f_N)$ e supondo $\alpha\cdot\gamma=1$,

$$\frac{\partial\, ln\, p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d}\setminus\mathbf{b})}{\partial f_j}=\sum_i\left(\frac{d_i}{\alpha}\cdot\frac{h_{ij}}{b_i}-\gamma\cdot h_{ij}\right)=\sum_i\gamma\cdot\left(\frac{d_i}{b_i}-1\right)\cdot h_{ij} \tag{3-30}$$

e, dessa forma, podemos obter a primeira parcela da soma na Eq. (3-29) como

$$\frac{\partial\, ln\, p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d}\setminus\mathbf{b})}{\partial\mathbf{f}}=\left[\sum_i\gamma\cdot\left(\frac{d_i}{b_i}-1\right)\cdot h_{i1},\ldots,\sum_i\gamma\cdot\left(\frac{d_i}{b_i}-1\right)\cdot h_{iN}\right]. \tag{3-31}$$

Por outro lado, substituindo as Eqs. (3-3) e (3-4) na Eq. (3-2), página 54, obtemos

$$p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b})=p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{Hf})=\frac{1}{\left((2\pi)^{N/2}\cdot\left|\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{B}}}\right|^{1/2}\right)}\cdot e^{-\frac{1}{2}(\mathbf{f}-\bar{\mathbf{f}})^T\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{F}}}^{-1}(\mathbf{f}-\bar{\mathbf{f}})}. \tag{3-32}$$

Assim, a segunda parcela da soma na Eq. (3-29) é expressa por

$$\frac{\partial\, ln\, p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{Hf})}{\partial\mathbf{f}}=-(\mathbf{f}-\bar{\mathbf{f}})^T\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{F}}}^{-1}. \tag{3-33}$$

Substituindo as Eqs. (3-31) e (3-33) na Eq. (3-29), obtemos

$$\left[\sum_i\gamma\cdot\left(\frac{d_i}{b_i}-1\right)\cdot h_{i1},\ldots,\sum_i\gamma\cdot\left(\frac{d_i}{b_i}-1\right)\cdot h_{iN}\right]-(\mathbf{f}-\bar{\mathbf{f}})^T\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{F}}}^{-1}=\mathbf{0}^T. \tag{3-34}$$

Dessa forma, tomando a transposta da Eq. (3-34) e sendo $\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{F}}}$ uma matriz simétrica, obtemos:

$$\begin{bmatrix}\sum_i\gamma\cdot\left(\frac{d_i}{b_i}-1\right)\cdot h_{i1}\\ \vdots\\ \sum_i\gamma\cdot\left(\frac{d_i}{b_i}-1\right)\cdot h_{iN}\end{bmatrix}-\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{F}}}^{-1}(\mathbf{f}-\bar{\mathbf{f}})=\mathbf{0} \tag{3-35}$$

Mais ainda, sem perda de generalidade, dado que **H** é uma matriz quadrada, podemos escrever

$$\gamma \cdot \mathbf{H}^T(\mathbf{q}-\mathbf{1}) - \mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{F}}}^{-1}(\mathbf{f}-\bar{\mathbf{f}}) = \mathbf{0} \tag{3-36}$$

sendo $\mathbf{q}$ o vetor onde cada componente é dado por $q_i = {d_i}/{b_i}$.

A não linearidade do estimador da Eq. (3-36) decorre do fato que o vetor $\mathbf{q}$ depende implicitamente de $\mathbf{f}$. Mais ainda, observamos que o vetor $\mathbf{f}$ também aparece multiplicando a inversa da matriz de covariância.

O estimador MAP contém o termo de máxima verossimilhança (*maximum likelihood* – ML) e um termo *a priori* na sua solução. Em outras palavras, maximizar a probabilidade $p_{\tilde{\mathbf{D}}}(\mathbf{d} \setminus \mathbf{b})$ força a solução para aquela obtida pelo filtro inverso, enquanto maximizar a função de densidade de probabilidade $p_{\tilde{\mathbf{B}}}(\mathbf{b})$ é equivalente a forçar uma suavização. Desta forma o filtro MAP tenta balancear a solução inversa com uma restrição de suavização.

Devido a sua natureza não linear e à alta dimensionalidade do problema em COSM, este filtro não pode ser aplicado diretamente sobre as imagens borradas e ruidosas.

Observamos que a complexidade deste filtro é fortemente determinada pela estrutura da matriz **H** e também pela matriz de covariância da imagem verdadeira. Por estas razões, propomos algumas simplificações sobre a estrutura da matriz de borramento e também sobre a matriz de covariância da imagem real, de forma a contornar estes problemas. Este é o tema do próximo tópico.

3.3.2 Filtro MAP Linearizado

Nesta seção, propomos um caminho para linearizar o filtro MAP não linear descrito no tópico anterior, de forma a tornar esta metodologia viável para aplicações em microscopia de deconvolução.

Como descrito no Capítulo 2, assumimos que o borramento em COSM é linear e espacialmente invariante. Sob estas condições, propomos três hipóteses restritivas sobre o filtro da Eq. (3-36) para simplificar o problema.

As hipóteses são:

i. Usamos o fato que a matriz $\mathbf{H}$ em COSM é espacialmente invariante e pode ser aproximada por uma matriz Toeplitz;

ii. Assumimos que a matriz de covariância $\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{F}}}$ pode ser aproximada por $\mathbf{R}_{\tilde{\mathbf{F}}} = \sigma_{\tilde{\mathbf{F}}}^2 \cdot \mathbf{I}$, sendo que $\sigma_{\tilde{\mathbf{F}}}^2$ é uma constante positiva e $\mathbf{I}$ é a matriz identidade;

iii. Por último, assumimos que a imagem borrada e sem ruído pode ser estimada corretamente de forma a aproximar a Eq. (3-36) que é não linear por uma linear.

A hipótese (ii) implica que nenhuma correlação entre os *voxels* da imagem é levada em consideração. Por sua vez, a hipótese (iii) implica que temos conhecimento sobre a imagem borrada e sem ruído. De fato, propomos o uso dos estimadores descritos na Seção 3.2 para obter uma estimativa da imagem borrada e sem ruído Poisson.

Sendo assim, de agora em diante, assumimos que temos conhecimento sobre $\mathbf{b}$, o que implica que o vetor $\mathbf{q}$ também é conhecido.

De forma a simplificar a notação, construímos $\mathbf{s} = \mathbf{q} - \mathbf{1}$ e usando a hipótese (ii) podemos escrever a Eq. (3-36) como

$$\hat{\mathbf{f}} = \gamma \cdot \sigma_{\tilde{\mathbf{F}}}^2 \cdot \mathbf{H}^T \mathbf{s} + \bar{\mathbf{f}}, \tag{3-37}$$

onde denotamos a estimativa de $\mathbf{f}$ por $\hat{\mathbf{f}}$.

Usando a hipótese (i) e métodos de Fourier bem conhecidos [Gonzalez e Woods (1992)] podemos escrever a matriz $\mathbf{H}$ como $\mathbf{H} = \mathbf{W}\mathbf{D}\mathbf{W}^{-1}$, onde $\mathbf{D}$ é uma matriz diagonal, $\mathbf{W}$ é o operador da DFT e $\mathbf{W}^{-1}$ é o operador inverso, isto é, a

Transformada Discreta de Fourier Inversa (*Inverse Discrete Fourier Transform* – IDFT).

Os elementos da matriz $\mathbf{D}$ são amostras da DFT da função de espalhamento pontual. Ainda, temos que $\mathbf{H}^T = \mathbf{W}\mathbf{D}^*\mathbf{W}^{-1}$, onde $\mathbf{D}^*$ é o complexo conjugado de $\mathbf{D}$ [Andrews e Hunt (1977)] [Gonzalez e Woods (1992)].

Portanto, podemos escrever a Eq. (3-37), no domínio de Fourier, como

$$\hat{\mathbf{F}} = \gamma \cdot \sigma_{\tilde{\mathbf{F}}}^2 \cdot \mathbf{D}^*\mathbf{S} + \overline{\mathbf{F}}, \tag{3-38}$$

onde $\hat{\mathbf{F}}$, $\overline{\mathbf{F}}$ e $\mathbf{S}$ são as DFT de $\hat{\mathbf{f}}$, $\overline{\mathbf{f}}$ e $\mathbf{s}$, respectivamente.

Uma vez que $\mathbf{D}^*$ é uma matriz diagonal, a Eq. (3-38) pode ser escrita elemento a elemento como

$$\hat{F}[m,n,o] = \gamma \cdot \sigma_{\tilde{\mathbf{F}}}^2 \cdot H^*[m,n,o] \cdot S[m,n,o] + \overline{F}[m,n,o], \tag{3-39}$$

onde m, n, $o \in \mathbb{Z}$ e $H^*[m,n,o]$ é multiplicado por um fator N.

Dessa forma, uma estimativa $\hat{\mathbf{f}}$ de $\mathbf{f}$ é obtida por

$$\hat{\mathbf{f}} = \mathbf{W}^{-1}\hat{\mathbf{F}}, \tag{3-40}$$

sendo que $\mathbf{W}^{-1}$ é o operador da IDFT. Com isso, derivamos um filtro MAP linear a partir do filtro não linear da Eq. (3-36).

Segundo Hunt e Cannon (1976), considerando o modelo Gaussiano para uma imagem $\mathbf{f}$, esta pode ser descrita como sendo a soma de outros dois componentes, a saber, um componente de baixa freqüência $\overline{\mathbf{f}}$ (descrito como a media não estacionária) e um outro que carrega a informação das flutuações ao redor de $\overline{\mathbf{f}}$. Se denotamos este último por $\mathbf{f}'$, podemos escrever [Lo (1979)]

$$\mathbf{f} = \mathbf{f}' + \overline{\mathbf{f}}. \tag{3-41}$$

Comparando a Eq. (3-39) com a Eq. (3-41), podemos dizer que a primeira parcela na soma da Eq. (3-39) carrega a informação de alta freqüência, correspondente às flutuações ao redor da média.

Observamos que para o uso do filtro proposto, além do conhecimento da imagem borrada e sem ruído, um conhecimento acurado da média não estacionária e da variância do sinal também é necessário. Contudo, na prática estes valores devem ser estimados a partir da imagem observada.

chave na derivação do filtro consiste em determinar $\Phi_{\tilde{\mathbf{U}}}[m,n]$ e $\Phi_{\tilde{\mathbf{U}}\tilde{\mathbf{F}}}[m,n]$.

3.3.3 Filtro Linear de Goodman-Belsher

Goodman e Belsher (1976) descreveram um filtro linear baseado em um critério de mínimo erro médio quadrático que leva em consideração a presença do ruído Poisson.

Propomos, dessa forma, a extensão deste filtro para o caso de dados tridimensionais e sua aplicação em COSM. É importante notar que, assim como o filtro MAP da seção anterior, este filtro não leva em consideração a presença de ruído aditivo e independente do sinal.

Minimizando um critério de erro médio quadrático no domínio de Fourier e fazendo uso do principio da ortogonalidade, a forma do filtro de Goodman-Belsher em duas dimensões é dada por

$$W_{GB}[m,n] = \frac{\Phi_{\tilde{U}\tilde{F}}[m,n]}{\Phi_{\tilde{U}}[m,n]}, \tag{3-42}$$

onde m, $n \in \mathbb{Z}$, $\Phi_{\tilde{U}}[m,n]$ é a densidade espectral de potência da imagem observada (borrada e ruidosa) e $\Phi_{\tilde{U}\tilde{F}}[m,n]$ é a densidade espectral de potência cruzada da imagem observada e da imagem verdadeira. Portanto, a partir da Eq. (3-42), o ponto chave na derivação do filtro consiste em determinar $\Phi_{\tilde{U}}[m,n]$ e $\Phi_{\tilde{U}\tilde{F}}[m,n]$.

Para isso, Goodman e Belsher descreveram um modelo para a imagem detectada, ou seja, a imagem borrada e degradada por ruído Poisson, no caso bidimensional como

$$u[i,j] = \sum_{n=1}^{\mu} \delta[i-i_n, j-j_n], \tag{3-43}$$

onde i, $j \in \mathbb{Z}$, μ é o número total de eventos (fótons) produzidos pela imagem borrada, (i_n, j_n) representa a localização do n-ésimo evento e $\delta[\cdot,\cdot]$ é a função delta de Dirac bidimensional. A partir deste modelo, pode-se mostrar que a densidade espectral de potência para a imagem detectada é expressa por

$$\Phi_{\tilde{U}}[m,n] = \bar{\mu} + \bar{\mu}^2 \cdot \left|H[m,n]\right|^2 \cdot \Phi_{\tilde{F}}[m,n], \tag{3-44}$$

onde $\Phi_{\tilde{F}}[m,n]$ é a densidade espectral de potência para a imagem bidimensional verdadeira e $\bar{\mu}$ é o número total médio de contagem de fótons.

Supondo que o modelo da Eq. (3-43) seja válido para o caso tridimensional, podemos escrever

$$u[i,j,k]=\sum_{n=1}^{\mu}\delta[i-i_n,j-j_n,k-k_n], \tag{3-45}$$

onde $i, j, k \in \mathbb{Z}$, μ agora é o número total de fótons produzidos pela imagem borrada $b[i,j,k]$, (i_n, j_n, k_n) representa a localização do n-ésimo fóton e $\delta[\cdot,\cdot,\cdot]$ é a função delta de Dirac tridimensional.

Dessa forma, a partir da Eq. (3-45), e com alguma álgebra, verificamos que a densidade espectral de potência para a imagem observada em três dimensões pode ser expressa como

$$\Phi_{\tilde{\mathbf{U}}}[m,n,o]=\bar{\mu}+\bar{\mu}^2\cdot\left|H[m,n,o]\right|^2\cdot\Phi_{\tilde{\mathbf{F}}}[m,n,o], \tag{3-46}$$

onde m, n, $o \in \mathbb{Z}$, $\Phi_{\tilde{\mathbf{F}}}[m,n,o]$ agora é a densidade espectral de potência para a imagem verdadeira e $\bar{\mu}$ é o número total médio de contagem de fótons. Ainda, a densidade espectral de potência cruzada para $f[i,j,k]$ e $u[i,j,k]$ é expressa por

$$\Phi_{\tilde{\mathbf{U}}\tilde{\mathbf{F}}}[m,n,o]=\bar{\mu}^2\cdot H^*[m,n,o]\cdot\Phi_{\tilde{\mathbf{F}}}[m,n,o]. \tag{3-47}$$

Portanto, minimizando um critério de erro médio quadrático, no domínio de Fourier, para o modelo de formação da imagem tridimensional, proposto neste trabalho, e fazendo uso do principio da ortogonalidade, a forma do filtro de Goodman-Belsher em três dimensões é expressa por

$$W_{GB}[m,n,o]=\frac{\Phi_{\tilde{\mathbf{U}}\tilde{\mathbf{F}}}[m,n,o]}{\Phi_{\tilde{\mathbf{U}}}[m,n,o]}, \tag{3-48}$$

sendo que, substituindo as Eqs. (3-46) e (3-47) na Eq. (3-48), obtemos

$$W_{GB}[m,n,o]=\frac{\bar{\mu}\cdot H^*[m,n,o]\cdot\Phi_{\tilde{\mathbf{F}}}[m,n,o]}{1+\bar{\mu}\cdot\left|H[m,n,o]\right|^2\cdot\Phi_{\tilde{\mathbf{F}}}[m,n,o]} \tag{3-49}$$

ou ainda,

$$W_{GB}[m,n,o]=\frac{H^*[m,n,o]}{\left|H[m,n,o]\right|^2+\frac{1}{\tau}}, \tag{3-50}$$

onde $\tau=\bar{\mu}\cdot\Phi_{\tilde{\mathbf{F}}}[m,n,o]$.

O filtro de Goodman-Belsher tende para a solução inversa na ausência do ruído Poisson. Nesse sentido, quanto maior é a contagem de fótons, maior é o valor

de τ e menor é a degradação produzida pelo ruído Poisson. Por outro lado, quanto menor a contagem de fótons, menor o valor de τ e maior a suavização produzida pelo filtro.

Observamos que o filtro é ótimo nas condições onde a informação *a priori*, ou melhor, o conhecimento sobre a densidade espectral de potência da imagem verdadeira e o número médio de contagem de fótons, são perfeitos. Contudo, na prática, estes valores devem ser calculados a partir da imagem observada e, assim, o filtro nunca é ótimo no sentido de mínimo erro médio quadrático. Ainda, da mesma forma que o filtro de Wiener, ele assume que o sinal e o ruído são estacionários, e conseqüentemente, não é sensível a mudanças abruptas, tendendo a suavizar contornos.

Podemos fazer um paralelo do filtro na Eq. (3-50) com o filtro de Wiener paramétrico [Andrews e Hunt (1977)] tridimensional dado por

$$W[m,n,o] = \frac{H^*[m,n,o] \cdot \Phi_{\tilde{F}}[m,n,o]}{|H[m,n,o]|^2 \cdot \Phi_{\tilde{F}}[m,n,o] + \rho \cdot \Phi_{\tilde{N}}[m,n,o]} \tag{3-51}$$

ou, reescrevendo convenientemente para os nossos propósitos,

$$W[m,n,o] = \frac{H^*[m,n,o]}{|H[m,n,o]|^2 + \rho \cdot \frac{1}{\beta}}, \tag{3-52}$$

onde

$$\beta = \frac{\Phi_{\tilde{F}}[m,n,o]}{\Phi_{\tilde{N}}[m,n,o]} \tag{3-53}$$

é chamada relação sinal-ruído (*Signal to Noise Ratio* – SNR) para o caso de ruído aditivo e independente do sinal, $\Phi_{\tilde{N}}[m,n,o]$ é a densidade espectral de potência do ruído neste caso e ρ é um parâmetro do filtro. Se $\rho = 1$, obtemos o filtro de Wiener tradicional. Se $\rho > 1$, o filtro tende a enfatizar a estatística do sinal e do ruído e, para $\rho < 1$, o filtro tende a desconsiderar esta estatística [Andrews e Hunt (1977)].

Para $\rho = 1$, a Eq. (3-50) é similar a Eq. (3-52), exceto pela definição diferente entre τ e β. Observamos ainda que para a Eq. (3-50), a SNR não é bem definida, uma vez que o ruído Poisson é dependente do sinal.

Motivados por este paralelo, propomos a inclusão de um parâmetro na Eq.(3-50), de forma a construir um filtro paramétrico expresso por

$$W_{GB}[m,n,o]=\frac{H^{*}[m,n,o]}{\left|H[m,n,o]\right|^{2}+\rho\cdot\frac{1}{\tau}}, \tag{3-54}$$

onde $\tau=\bar{\mu}\cdot\Phi_{\tilde{F}}[m,n,o]$.

Na prática, a escolha do parâmetro de regularização não é uma tarefa simples. Neste trabalho, sugerimos uma abordagem baseada na idéia de que o sistema visual humano é muito mais sensível ao ruído em regiões planas da imagem do que em regiões com mudanças abruptas como, por exemplo, nas bordas dos objetos presentes na imagem. Dessa forma, em regiões planas, a regularização do filtro deve ser maior e em regiões de transições abruptas, a regularização pode ser menor.

Para derivar um parâmetro adaptativo, propomos o uso do *coeficiente de rugosidade* [Aguena (2002)]. Para isso, em cada *voxel* da imagem borrada, calcula-se a soma das diferenças dos *voxels* vizinhos nas direções *x*, *y* e *z*, respectivamente.

As somas das diferenças são expressas pelas equações

$$SD_x[i,j,k]=\sum_{r=0}^{1}\sum_{s=-1}^{1}\sum_{t=-1}^{1}\left|b[i+r-1,j+s,k+t]-b[i+r,j+s,k+t]\right|, \tag{3-55}$$

$$SD_y[i,j,k]=\sum_{r=-1}^{1}\sum_{s=0}^{1}\sum_{t=-1}^{1}\left|b[i+r,j+s-1,k+t]-b[i+r,j+s,k+t]\right|, \tag{3-56}$$

$$SD_z[i,j,k]=\sum_{r=-1}^{1}\sum_{s=-1}^{1}\sum_{t=0}^{1}\left|b[i+r,j+s,k+t-1]-b[i+r,j+s,k+t]\right|, \tag{3-57}$$

sendo o *coeficiente de rugosidade* no ponto (*i,j,k*) definido como

$$SD[i,j,k]=SD_x[i,j,k]+SD_y[i,j,k]+SD_z[i,j,k]. \tag{3-58}$$

Da Eq. (3-58) geramos uma "imagem de rugosidade" normalizada $\overline{SD}[i,j,k]$ e construímos o parâmetro de regularização adaptativo como

$$\rho[i,j,k]=1-\overline{SD}[i,j,k]. \tag{3-59}$$

Dessa forma, quando o coeficiente de rugosidade é grande (próximo de 1), o parâmetro de regularização tente a zero, e quando o coeficiente é próximo de zero, o parâmetro tende a 1.

Como na prática não dispomos da imagem borrada, o procedimento acima é aplicado sobre a imagem observada, processada para a redução do ruído Poisson.

3.4 Resultados e Discussões

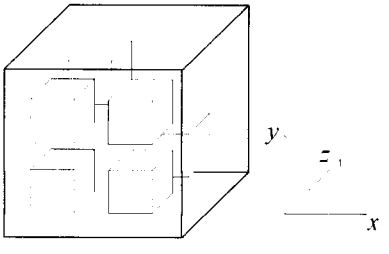
Esta seção é dedicada à apresentação e discussão dos resultados experimentais obtidos pela aplicação dos algoritmos descritos acima no problema de restauração de imagens em microscopia de seccionamento óptico computacional.

3.4.1 Imagens de Estudo

Para o estudo dos algoritmos foram considerados três tipos de imagens: imagens sintéticas (*phantoms*), imagens reais de *beads* e imagens reais de espécimes biológicos.

As imagens de *phantoms* permitem avaliar quantitativamente os resultados da restauração, segundo alguma figura de mérito pré-determinada. A Figura 3-2 ilustra um dos *phantoms* 3D, construído durante o desenvolvimento deste trabalho e que será utilizado para apresentação e discussão dos resultados.

Figura 3-2: Esquema do *phantom* 3D.



O *phantom* consiste de um cubo de intensidade 255 com lados de 32 *voxels*, contendo outros seis cubos, igualmente espaçados, de intensidade nula, com lados de 8 *voxels* no seu interior. O tamanho dos *voxels* é considerado levando em consideração a PSF teórica, utilizada para simular um microscópio de fluorescência, e será discutida no próximo tópico. A imagem de testes considerada possui dimensão 64 x 64 x 64 *voxels*, com a estrutura da Figura 3-2 no centro (Figura 3-3).

Por sua vez, o uso de *beads* permite obter imagens reais de uma estrutura cujo formato é conhecido. O termo *bead* se refere a microesferas de poliestireno fluorescentes que são especialmente construídas para testar o alinhamento, sensibilidade e estabilidade de microscópios de fluorescência.

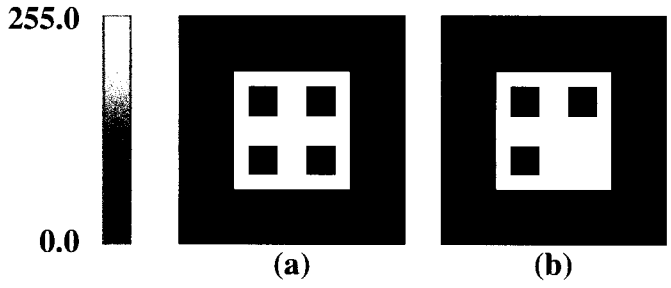


Figura 3-3: Ilustração de duas seções da imagem do *phantom* 3D utilizado nos experimentos: (a) uma seção no plano *x-y*; (b) uma seção no plano *y-z*.

Neste trabalho, utilizamos *beads* de 15 μm de diâmetro da Molecular Probes, Inc.[14]. Quando excitado, o *bead* emite luz em dois comprimentos de onda distintos, sendo que a parte externa emite luz com comprimento de onda no vermelho e a parte interna no comprimento de onda relativo ao verde.

A Figura 3-4 ilustra um diagrama do *bead* e a Figura 3-5 e a Figura 3-6 duas imagens reais obtidas utilizando dois filtros diferentes. A dimensão do *voxel* nas duas imagens é de 0.2376 x 0.2376 x 0.2376 μm.

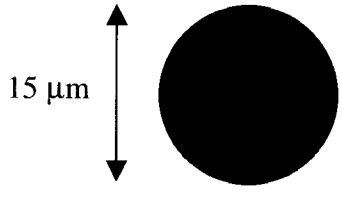


Figura 3-4: Diagrama esquemático do *bead*. A parte externa fluoresce no vermelho e a interna no verde.

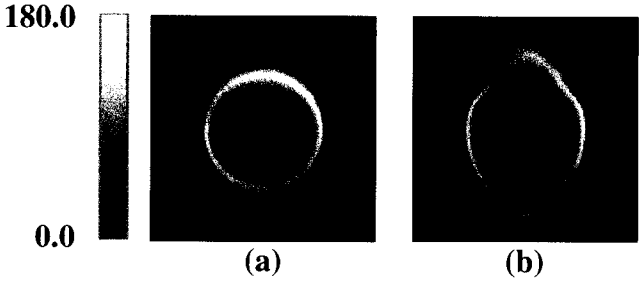


Figura 3-5: Imagem do *bead* obtida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 60X, 1.4 NA de imersão em óleo e um filtro para $\lambda = 0.635$ μm (vermelho): (a) plano *x-y*; (b) plano *y-z*.

As imagens reais de espécimes biológicos (assim como as imagens do *bead* acima) foram obtidas com um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse – TE200, utilizando uma câmera CCD Quantix:57. Este equipamento foi disponibilizado pelo laboratório de microscopia de seccionamento óptico computacional do departamento de biologia da Universidade de Washington em St. Louis, USA. A Figura 3-7 e a Figura 3-8 ilustram duas seções de duas imagens tridimensionais de espécimes reais.

[14] Maiores informações no *site* www.probes.com

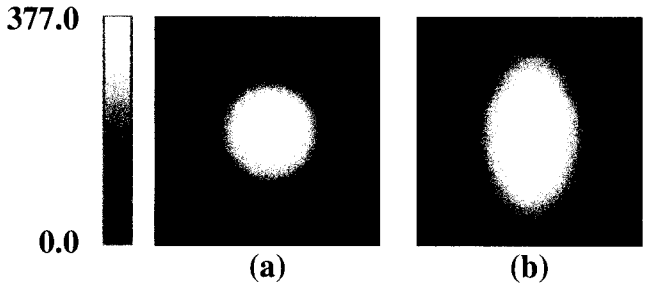


Figura 3-6: Imagem do *bead* obtida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 60X, 1.4 NA de imersão em óleo e um filtro para λ = 0.535 μm (verde): (a) plano *x-y*; (b) plano *y-z*.

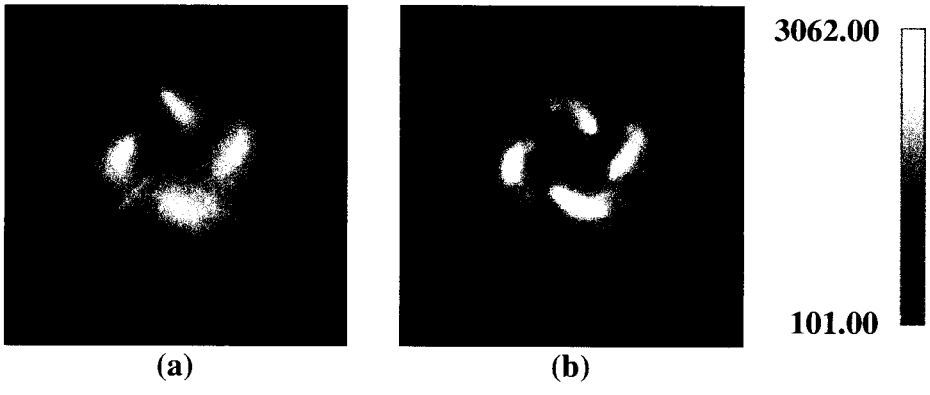


Figura 3-7: Duas seções para uma imagem de 128x128x128 *voxels* do embrião Volvox com quatro células, adquirida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 100X, 1.3 NA de imersão em óleo e utilizando um filtro para λ = 0.530 μm. O tamanho do *voxel* na direção *x-y* é de 0.54 μm e na direção *z* é de 0.30 μm: (a) seção 51; (b) seção 63.

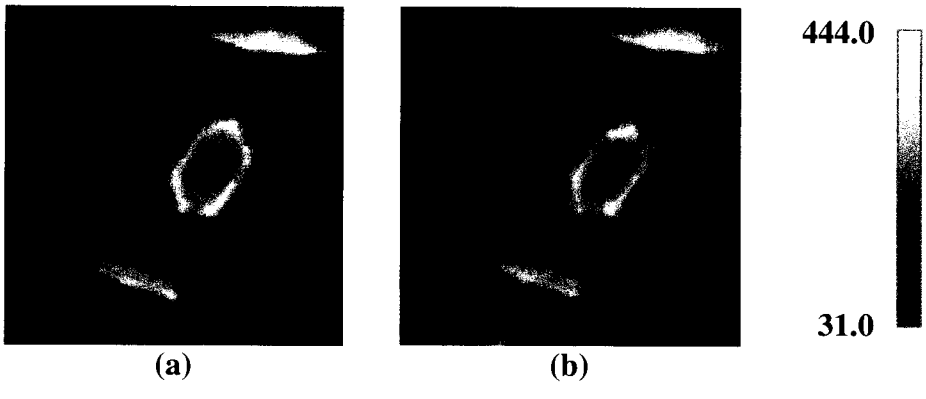


Figura 3-8: Duas seções para uma imagem de 128x128x128 *voxels* de retículo endoplasmático adquirida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 20X, 0.75 NA e um filtro para λ = 0.530 μm. A dimensão do *voxel* é de 0.713 x 0.713 x 0.713 μm: (a) seção 50; (b) seção 55.

3.4.2 Determinação da Função de Espalhamento Pontual

As funções de espalhamento pontual teóricas foram geradas pelo programa XCOSM[15] (*X-Window Interface to Computational Optical Sectioning Microscopy*) [McNally et al. (1996)] mantido pelo *Three-Dimensional Microscopy Laboratory* da *Washington University in St. Louis*, USA. Este programa implementa o modelo teórico de Gibson e Lanni (1989), Gibson e Lanni (1990) e Gibson e Lanni (1991), para a geração de funções de espalhamento pontual de microscópios convencionais (*wide-field*) e confocais.

As PSF teóricas foram utilizadas para a simulação da degradação, produzida por um microscópio de fluorescência *wide-field*, no estudo dos algoritmos com as imagens simuladas (*phantoms*), assim como para a restauração das imagens reais de *beads* e espécimes biológicos.

No caso dos *phantoms*, os resultados apresentados neste trabalho foram preparados para avaliar o comportamento dos algoritmos para duas PSF distintas. A Tabela 3-1 e a Tabela 3-2 descrevem os parâmetros de entrada que foram utilizados no XCOSM para a geração destas PSF.

A título de simplificação, chamaremos a PSF gerada pelos parâmetros da Tabela 3-1 de PSF1 e a PSF gerada pelos parâmetros da Tabela 3-2 de PSF2.

Tabela 3-1: Parâmetros para a PSF teórica para uma lente de 60X, 1.4 NA.

Parâmetros	*Valores*
No. de amostras no plano *x-y*	64
Tamanho do *pixel* no espaço do objeto	0.0940 μm
No. de amostras em *z*	64
Distância entre os planos	0.2500 μm
Aumento lateral da lente	60.0
Abertura numérica da lente	1.4
Comprimento de onda da fluorescência	0.000530 mm
Índice de refração do meio de imersão	1.5100
Índice de refração do espécime	1.3300
Comprimento do tubo óptico	160.0 mm

[15] Disponível para *download* em http://www.essrl.wustl.edu/~preza/xcosm/

Tabela 3-2: Parâmetros para a PSF teórica para uma lente de 100X, 1.3 NA.

Parâmetros	*Valores*
No. de amostras no plano *x-y*	64
Tamanho do *pixel* no espaço do objeto	0.1426 μm
No. de amostras em *z*	64
Distância entre os planos	0.1426 μm
Aumento lateral da lente	100.0
Abertura numérica da lente	1.3
Comprimento de onda da fluorescência	0.000530 mm
Índice de refração do meio de imersão	1.5100
Índice de refração do espécime	1.3300
Comprimento do tubo óptico	160.0 mm

A PSF1 simula um espaçamento entre as seções da imagem 3D muito maior do que o tamanho do *pixel* em cada seção. Por sua vez, a PSF2 simula um espalhamento na direção do eixo óptico muito maior. A Figura 3-9 e a Figura 3-10 mostram as imagens do *phantom*, ilustrado na Figura 3-3, borradas pela PSF1 e pela PSF2, respectivamente.

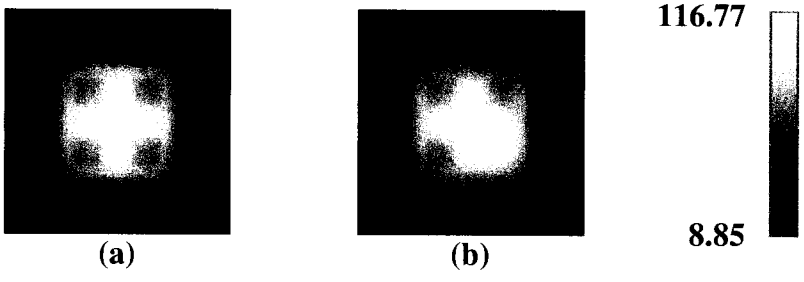


Figura 3-9: Seções do *phantom* 3D através de um microscópio de fluorescência simulado por uma PSF teórica para uma objetiva de 60X, 1.4 NA e $\lambda = 0.530$ μm: (a) plano *x-y*; (b) plano *y-z*. A dimensão do *voxel* na direção *x-y* é de 0.094 μm e na direção *z* de 0.25 μm.

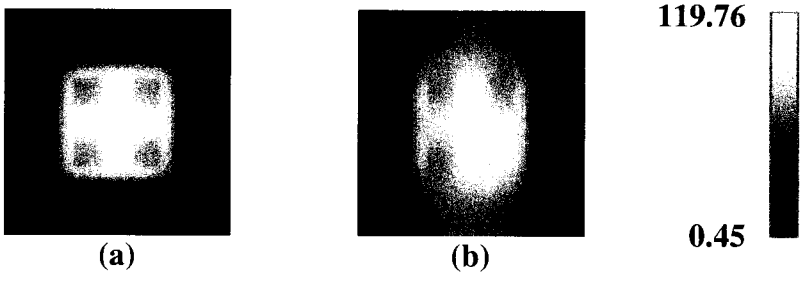


Figura 3-10: Seções do *phantom* 3D através de um microscópio de fluorescência simulado por uma PSF teórica para uma objetiva de 100X, 1.3 NA e $\lambda = 0.530$ μm: (a) plano *x-y*; (b) plano *y-z*. A dimensão do *voxel* é de 0.1426 x 0.1426 x 0.1426 μm.

3.4.3 Incorporação do Ruído Poisson

Para o caso das imagens simuladas, além da avaliação para duas PSF distintas, os experimentos foram conduzidos para estudar o comportamento dos algoritmos sob condições severas de ruído Poisson. Segundo Verveer (1998), diferentes níveis de ruído Poisson podem ser incorporados nas imagens borradas (ilustradas na Figura 3-9 e na Figura 3-10), variando o parâmetro γ na Eq. (2-17), página 32. Seis imagens ruidosas para cada PSF foram construídas variando γ de um a seis. A escolha desta variação foi baseada em um julgamento visual. A idéia é avaliar os métodos para altos níveis de ruído Poisson e, para $\gamma > 6$, o ruído não é tão severo. A Figura 3-11 mostra as seções das imagens do *phantom* ruidoso para o caso onde $\gamma = 1$.

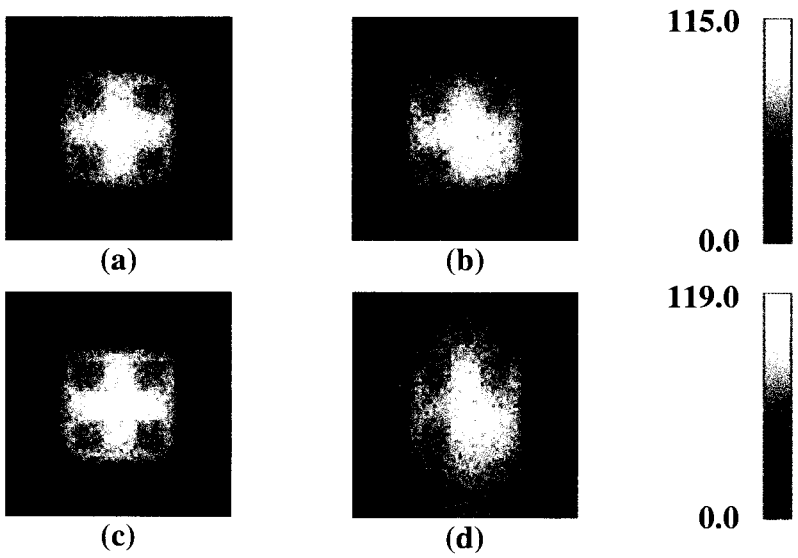


Figura 3-11: Seções do *phantom* borrado e degradado por ruído Poisson para $\gamma = 1$: (a)-(b) seções no plano *x-y* e *y-z*, respectivamente, para a imagem borrada pela PSF1; (c)-(d) seções no plano *x-y* e *y-z* para a imagem borrada pela PSF2.

3.4.4 Medidas, Validações e Critérios de Comparação

Os algoritmos propostos foram testados, avaliados e validados seguindo dois critérios. Primeiro, para o caso das imagens simuladas, os resultados das restaurações foram quantificados através de uma figura de mérito. Segundo, os métodos também foram comparados com outro algoritmo proposto no contexto de microscopia de seccionamento óptico computacional.

Diversas figuras de mérito existem na literatura para quantificar os resultados de algoritmos de restauração. Neste trabalho, a medida escolhida foi a melhoria na relação sinal ruído (*Improvement in Signal to Noise Ratio* – ISNR) em decibéis (dB), sendo definida pela expressão

$$\mathrm{ISNR} = 10 \cdot \log \frac{\sum_{j=1}^{N} (f_j - u_j)^2}{\sum_{j=1}^{N} (f_j - \hat{f}_j)^2} \tag{3-60}$$

onde f_j é o j-ésimo componente da imagem verdadeira (*phantom*) $\mathbf{f}$, em notação matriz-vetor, $\hat{f}_j$ é o j-ésimo componente da imagem restaurada $\hat{\mathbf{f}}$ e u_j é o j-ésimo componente da imagem degradada $\mathbf{u}$.

Um ponto importante que deve ser observado é que variando o parâmetro γ para incorporar o ruído, como descrito acima, faz com que o nível de intensidade nas imagens ruidosas seja multiplicado pelo mesmo valor. Dessa forma, para manter a coerência no uso da Eq. (3-60), os valores de intensidade na imagem verdadeira devem ser multiplicados pelo valor do γ correspondente.

Ainda, as restaurações dos *phantoms* e das imagens reais foram comparadas com outro método linear proposto para microscopia de deconvolução. O método escolhido foi o algoritmo de mínimos quadrados linear regularizado (*Regularized Linear Least Squares* – RLLS) proposto por Preza (1992). Este método está descrito no Anexo A e implementado no programa XCOSM. Para o caso das imagens reais a comparação entre os métodos é visual.

3.4.5 Avaliação dos Métodos com Dados Simulados

Neste tópico, apresentamos os resultados obtidos com os procedimentos para redução do ruído Poisson, assim como aqueles obtidos com os algoritmos de deconvolução lineares, para o caso de imagens simuladas.

Lembramos que as derivações dos métodos lineares não incorporam a presença de ruído aditivo e independente do sinal. Dessa forma, os resultados apresentados nesta seção são derivados considerando as imagens borradas e degradadas apenas por ruído Poisson, que foram obtidas variando o parâmetro γ, conforme descrito na Seção 3.4.3.

Para uma melhor apresentação dos dados, sem prejuízo ao entendimento, mostramos apenas as imagens para $\gamma = 1$.

Para a implementação da DFT utilizamos o algoritmo da transformada rápida de Fourier (*Fast Fourier Transform* – FFT) descrito no *Numerical Recipes in C* [Press et al. (1992)]. Além disso, para evitar os "artefatos de borda" produzidos pela convolução circular, todas as imagens foram estendidas e rebatidas[16] nas três direções [Gomes e Velho (1994)].

3.4.5.1 Redução do Ruído Poisson

A Figura 3-12 mostra as imagens borradas e sem ruído, estimadas pelos algoritmos baseados no critério MAP e na AT, correspondentes àquelas borradas pela PSF1 e degradadas por ruído Poisson ($\gamma = 1$).

Para o uso da Eq. (3-17), página 56, a média do sinal borrado sem ruído foi estimada por um operador de média local usando uma janela de 3 x 3 x 3 *voxels* e a sua variância estimada em uma região uniforme sobre a imagem média.

Para o uso da Eq. (3-25), página 58, a média do sinal no domínio de Anscombe também foi estimada por um operador de média local usando uma janela de 3 x 3 x 3 *voxels*. A variância do sinal, neste caso, também foi estimada em uma região uniforme da imagem média. Observamos que, embora a variância do ruído aditivo no domínio de Anscombe possa ser estimada, preferimos usar a variância teórica que corresponde a 1.

Verificamos que os dois procedimentos apresentam resultados visuais muito semelhantes. Ainda, comparando as imagens da Figura 3-12 com aquelas apresentadas na Figura 3-9, verifica-se que o aspecto visual das imagens estimadas é bem próximo da imagem borrada e sem ruído verdadeira. Embora apresentamos apenas os resultados visuais para o caso da PSF1, estas conclusões são válidas para a imagem borrada pela PSF2, assim como para todos os níveis de ruído Poisson considerados nos experimentos.

A Figura 3-13 e a Figura 3-14 mostram os gráficos de performance (medida pela ISNR) para os dois procedimentos, considerando todos os valores de γ, e para as

---

[16] Observamos que este procedimento produziu melhores resultados do que simplesmente estender a imagem com zeros (*zero-padding*).

duas PSF. Observamos que, apesar dos aspectos visuais apresentados pelos dois procedimentos serem muito próximos, em todos os casos estudados, segundo o critério da melhoria na relação sinal ruído, o algoritmo para redução do ruído Poisson baseado na AT é superior em relação ao algoritmo seguindo o critério MAP.

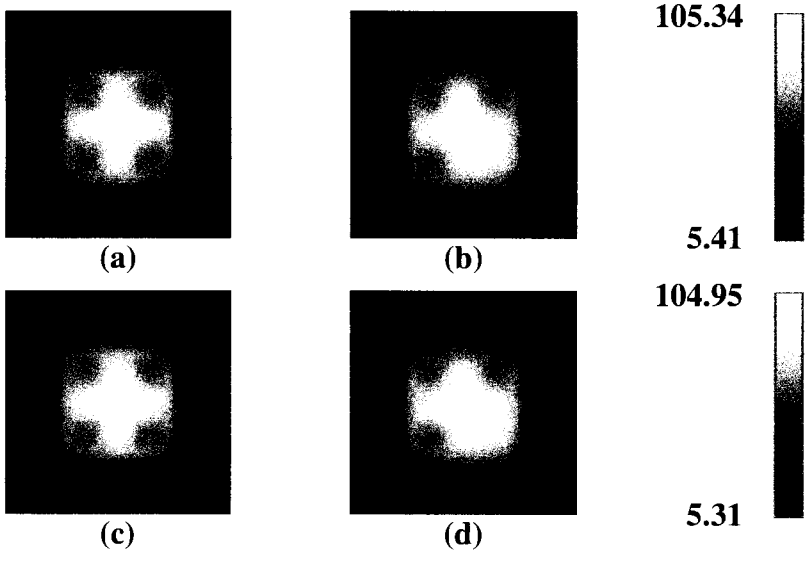


Figura 3-12: Imagens borradas pela PSF1 sem ruído; (a)-(b) seções no plano *x-y* e no plano *y-z*, respectivamente, da imagem estimada pelo algoritmo baseado na AT; (c)-(d) seções da imagem borrada estimada pelo algoritmo baseado no critério MAP.

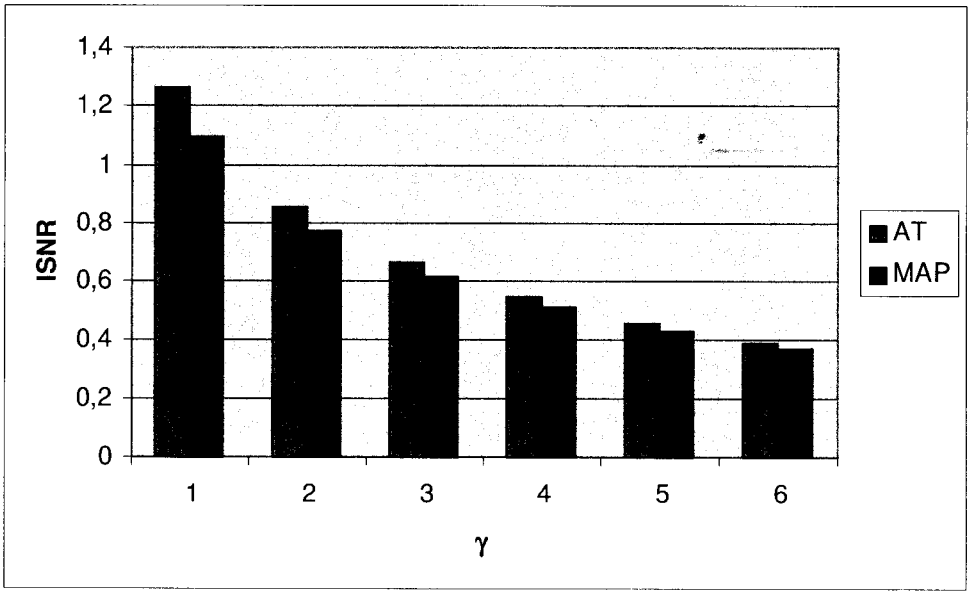


Figura 3-13: ISNR para as imagens sem ruído Poisson, estimadas pelos filtros baseados na AT e no critério MAP, para o caso da imagem borrada pela PSF1.

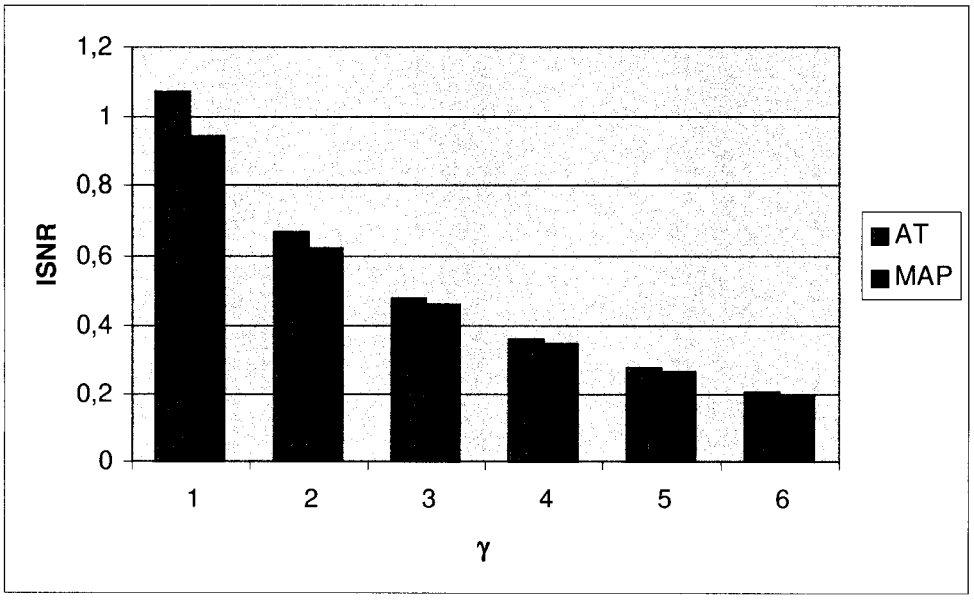


Figura 3-14: ISNR para as imagens sem ruído Poisson, estimadas pelos filtros baseados na AT e no critério MAP, para o caso da imagem borrada pela PSF2.

3.4.5.2 Filtro MAP Linearizado

A Figura 3-15 e a Figura 3-17 mostram as imagens restauradas pelo filtro MAP linearizado para o caso das imagens do *phantom* que foram borradas pelas PSF1 e PSF2, respectivamente, e degradadas por ruído Poisson ($\gamma = 1$).

Para o uso deste filtro, devemos obter estimativas da imagem borrada e sem ruído Poisson. Para isso, propomos o uso dos procedimentos para redução do ruído descritos na Seção 3.2. Observamos que, muito embora, para o caso das simulações, termos o conhecimento destas imagens, optamos por estimá-las, uma vez que é este o caso que se apresenta na prática. Ainda, para o uso da Eq. (3-39), página 63, é necessário o conhecimento da variância e da média não estacionária do sinal. Mais uma vez, optamos por estimar estes valores a partir das observações. Dessa forma, a média não estacionária é obtida a partir da estimativa da imagem borrada e sem ruído e a variância do sinal verdadeiro a partir de uma região uniforme desta imagem.

A Figura 3-16 e a Figura 3-18 mostram os gráficos de performance, segundo a melhoria na relação sinal ruído, para as imagens restauradas, considerando todos os valores de γ. Observamos que, em todos os experimentos, desconsideramos possíveis valores negativos que podem ser produzidos pelo processo de restauração.

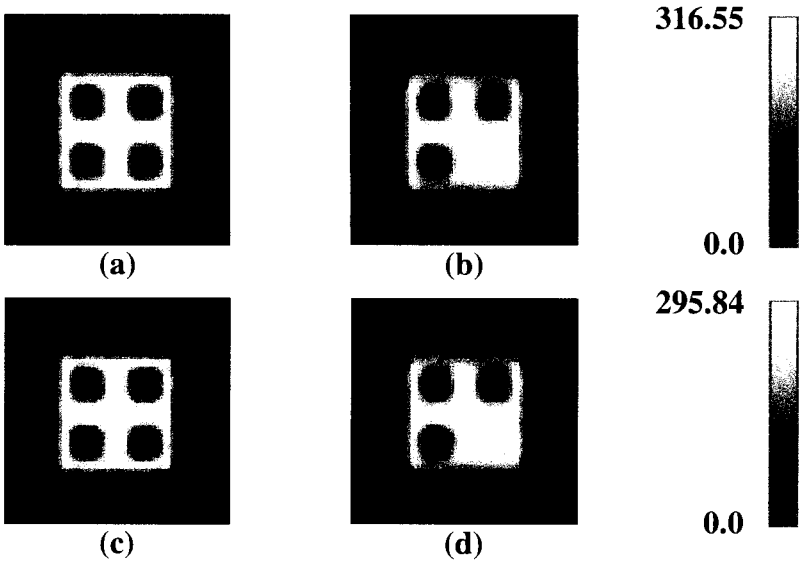


Figura 3-15: Seções da imagem do *phantom* restaurada pelo filtro MAP linearizado, considerando o borramento pela PSF1: (a)-(b) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, da imagem restaurada utilizando a estimativa sem ruído baseada na AT; (c)-(d) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, da imagem restaurada utilizando a estimativa sem ruído baseada no critério MAP.

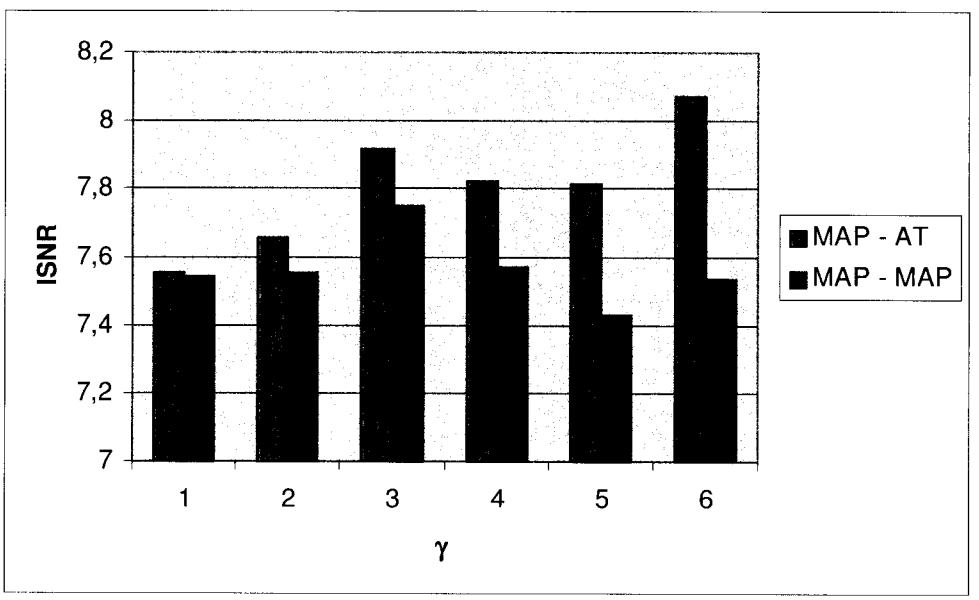


Figura 3-16: ISNR para as restaurações da imagem do *phantom* borrada pela PSF1 e degradada por ruído Poisson, utilizando o filtro MAP linearizado, considerando as estimativas da imagem borrada e sem ruído através dos procedimentos baseados na AT e no critério MAP.

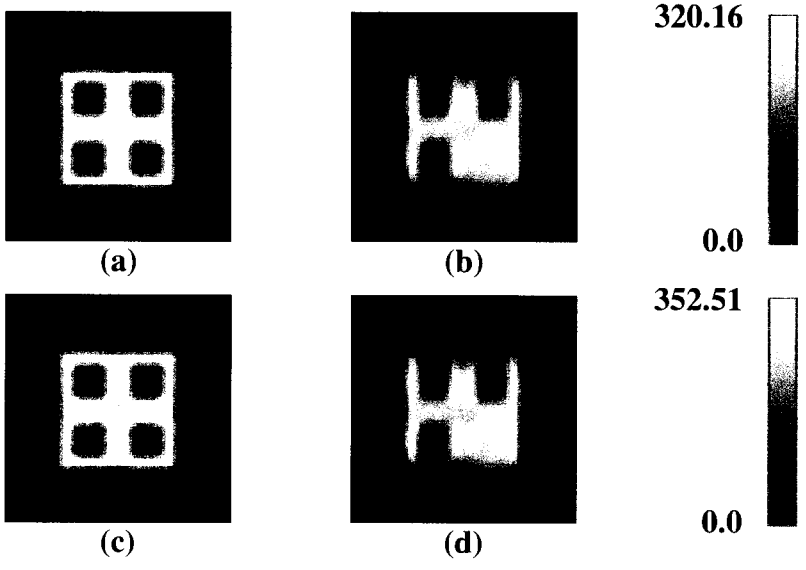


Figura 3-17: Seções da imagem do *phantom* restaurada pelo filtro MAP linearizado, considerando o borramento pela PSF2: (a)-(b) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, da imagem restaurada utilizando a estimativa sem ruído baseada na AT; (c)-(d) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, da imagem restaurada utilizando a estimativa sem ruído baseada no critério MAP.

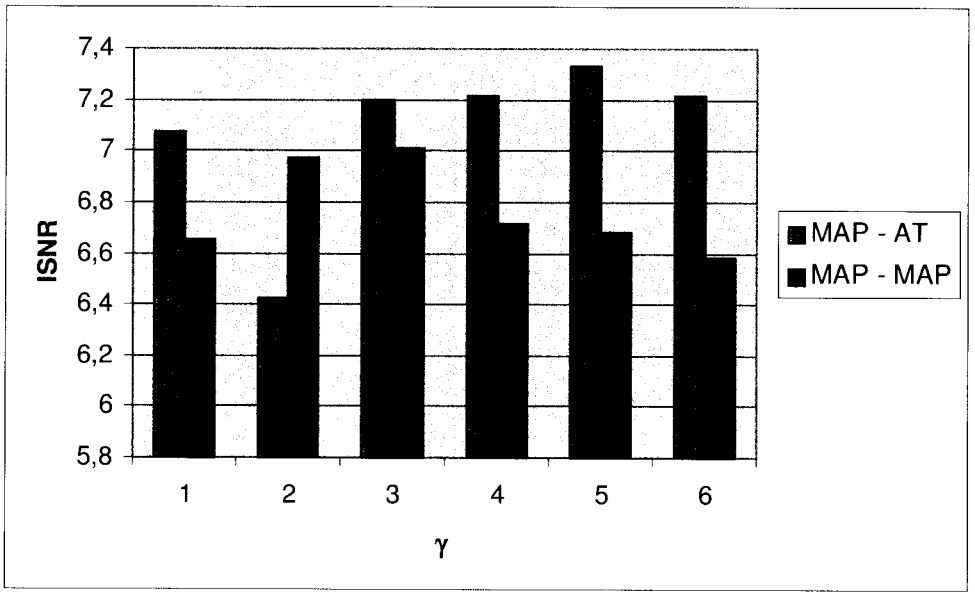


Figura 3-18: ISNR para as restaurações da imagem do *phantom* borrada pela PSF2 e degradada por ruído Poisson, utilizando o filtro MAP linearizado, considerando as estimativas da imagem borrada e sem ruído através dos procedimentos baseados na AT e no critério MAP.

A partir dos dados apresentados na Figura 3-16 e na Figura 3-18 verificamos que o filtro MAP linearizado é bastante robusto para diferentes níveis de ruído Poisson.

Por outro lado, observamos que a performance, segundo a melhoria na relação sinal ruído, não aumenta necessariamente para valores de γ maiores. Esta observação vale para o uso dos dois procedimentos propostos para a estimativa da imagem borrada sem ruído.

Ainda, verificamos que, na maioria dos casos estudados, obtivemos resultados superiores, segundo o critério da ISNR, utilizando a estimativa da imagem borrada baseada na AT. De fato, observamos que o critério baseado na AT produz uma melhor estimativa da imagem borrada e sem ruído do que o critério MAP, o que reflete em uma performance superior do filtro de deconvolução. Estes resultados sugerem que quanto melhor a estimativa da imagem borrada e sem ruído, melhor será o desempenho do processo de restauração.

Também podemos observar uma performance inferior do filtro para o caso da imagem borrada pela PSF2, que possui um espalhamento muito maior na direção do eixo axial. De fato, as imagens na Figura 3-17 mostram uma restauração inferior na direção do eixo óptico em relação às apresentadas na Figura 3-15. Estas observações são válidas para todos os níveis de ruído Poisson estudados.

3.4.5.3 Filtro Linear de Goodman-Belsher

A Figura 3-19 e a Figura 3-21 mostram as imagens obtidas pela aplicação da Eq. (3-54), página 67, sobre as imagens do *phantom* borradas pelas PSF1 e PSF2, respectivamente, e degradadas por ruído Poisson ($\gamma = 1$), considerando o uso do parâmetro de regularização ρ adaptativo e para o caso onde $\rho = 1$.

A Figura 3-20 e a Figura 3-22 mostram os gráficos de performance, em termos da ISNR, considerando os casos para o parâmetro adaptativo, $\rho = 1$, $\rho = 0.5$ e $\rho = 0.1$, respectivamente.

Para estimar a densidade espectral de potência do sinal verdadeiro, optamos por usar a técnica do periodograma [Press et al. (1992)]. Ainda, em todos os casos, o número total médio de contagem de fótons, $\bar{\mu}$, foi estimado utilizando a imagem observada.

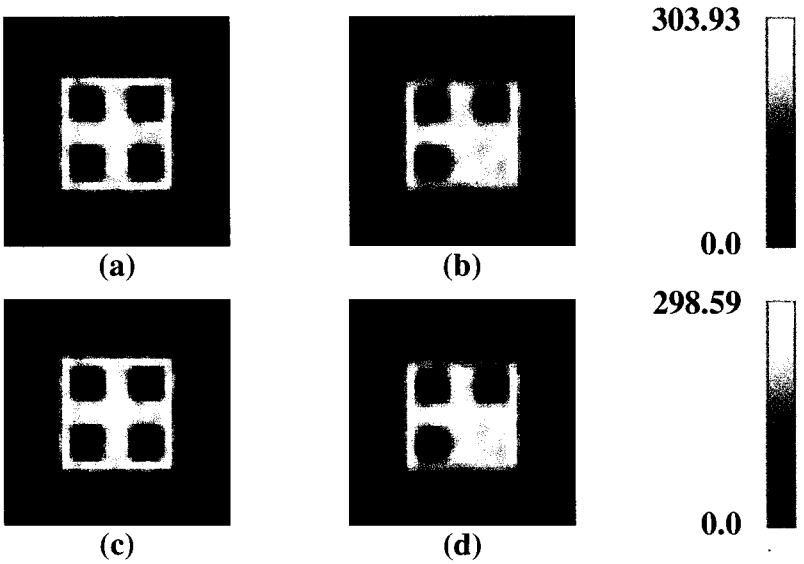


Figura 3-19: Seções das imagens do *phantom* restauradas pelo filtro de Goodman-Belsher considerando o borramento pela PSF1: (a)-(b) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, utilizando o parâmetro de regularização adaptativo; (c)-(d) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, para o caso onde $\rho = 1$.

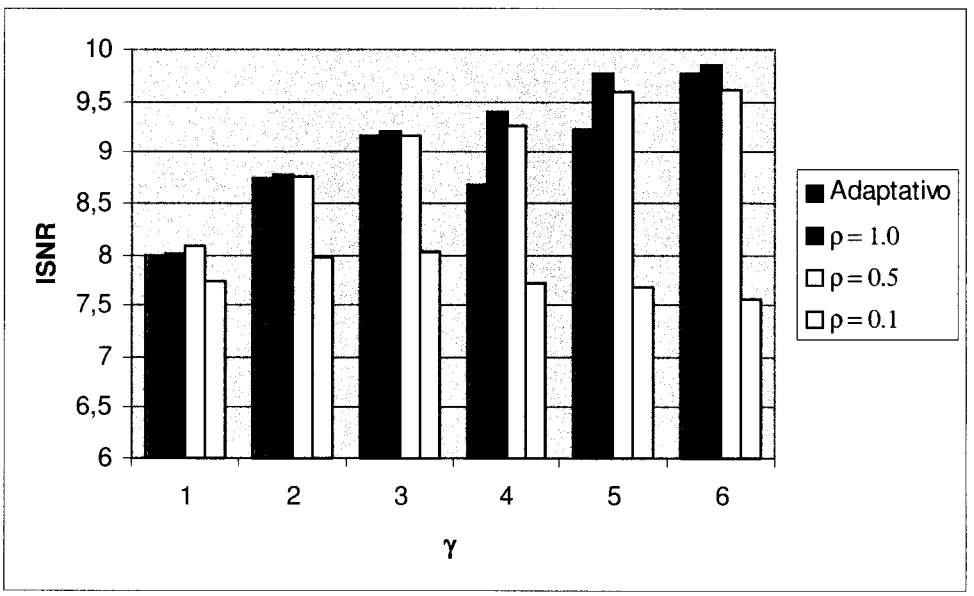


Figura 3-20: ISNR para as imagens restauradas pelo filtro de Goodman-Belsher a partir das imagens borradas pela PSF1 e degradadas por ruído Poisson.

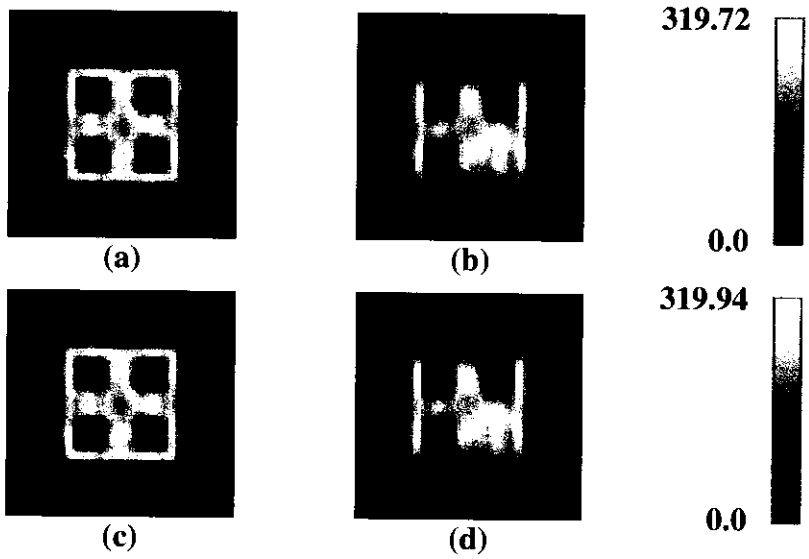


Figura 3-21: Seções das imagens do *phantom* restauradas pelo filtro de Goodman-Belsher considerando o borramento pela PSF2: (a)-(b) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, utilizando o parâmetro de regularização adaptativo; (c)-(d) planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, para o caso onde $\rho = 1$.

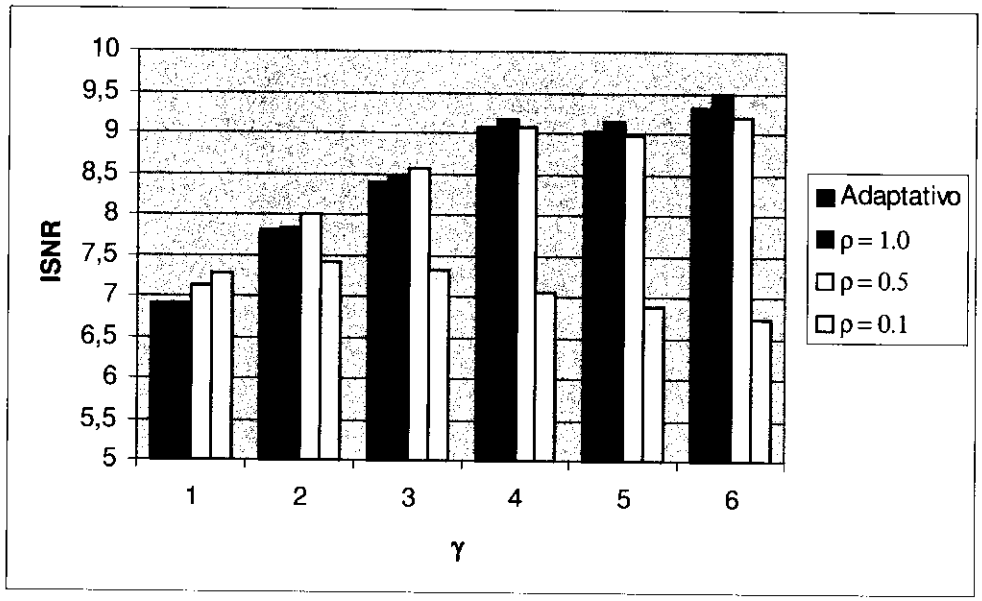


Figura 3-22: ISNR para as imagens restauradas pelo filtro de Goodman-Belsher a partir das imagens borradas pela PSF2 e degradadas por ruído Poisson.

Observamos que, assim como para os resultados apresentados pelo filtro MAP linearizado, optamos por desconsiderar possíveis valores negativos gerados pelo filtro. Assim sendo, todos os valores negativos nas imagens restauradas são projetados para zero.

A partir dos gráficos apresentados na Figura 3-20 e na Figura 3-22, verificamos que o filtro de Goodman-Belsher é robusto para diferentes níveis de ruído Poisson.

Podemos observar que o uso do parâmetro de regularização adaptativo não promove resultados superiores ao caso onde $\rho = 1$. De fato, um dos temas de trabalhos futuros é justamente a procura por mecanismos de regularização adaptativa capazes de superar os resultados atuais.

Mais ainda, observamos que nestes experimentos, as restaurações para $\rho = 0.5$ ou $\rho = 0.1$, nos casos onde $\gamma = 1$ e $\gamma = 2$, produziram resultados similares ou superiores aos obtidos quando $\rho = 1$. Contudo, verificamos que estes resultados não se generalizaram para outros níveis de ruído Poisson.

Assim como nos experimentos conduzidos com o filtro MAP linearizado, as restaurações para o caso da PSF2 também foram inferiores, segundo o critério de ISNR. Os resultados visuais nestes casos também promovem esta conclusão.

3.4.5.4 Comparações com o RLLS

A Figura 3-23 apresenta as imagens relativas aos resultados das restaurações utilizando o algoritmo RLLS sobre as imagens do *phantom* borradas pelas PSF1 e PSF2 e degradadas por ruído Poisson ($\gamma = 1$).

A Figura 3-24 e a Figura 3-25 apresentam os gráficos de performance, em termos da ISNR, para os resultados obtidos com o RLLS, o algoritmo MAP linearizado com melhor performance, ou seja, utilizando a estimativa da imagem borrada e sem ruído derivada através da abordagem da AT, e o algoritmo de Goodman-Belsher considerando $\rho = 1$, respectivamente. Novamente, optamos por projetar para zero todos os valores negativos produzidos pelos métodos propostos, uma vez que o algoritmo RLLS também descarta possíveis valores negativos que podem ser gerados no decorrer do processo de restauração.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

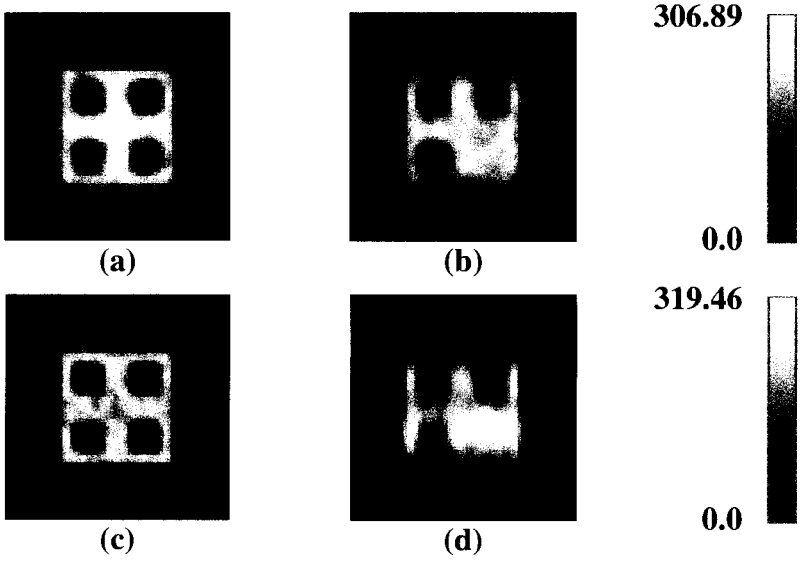


Figura 3-23: Seções das imagens borradas e degradadas por ruído Poisson do *phantom* restauradas pelo algoritmo RLLS: (a)-(b) plano *x-y* e *y-z*, respectivamente, da imagem restaurada considerando o borramento pela PSF1; (c)-(d) plano *x-y* e *y-z* da imagem restaurada a partir da imagem borrada pela PSF2.

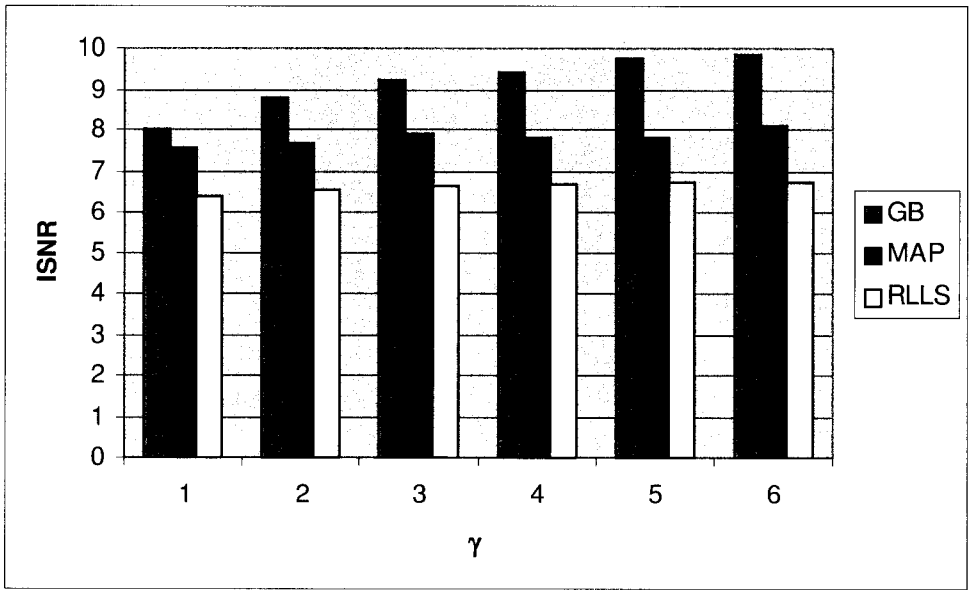


Figura 3-24: ISNR para as restaurações das imagens do *phantom*, borradas e degradadas por ruído Poisson, pelos algoritmos de Goodman-Belsher, MAP linearizado e RLLS, respectivamente, considerando o borramento pela PSF1.

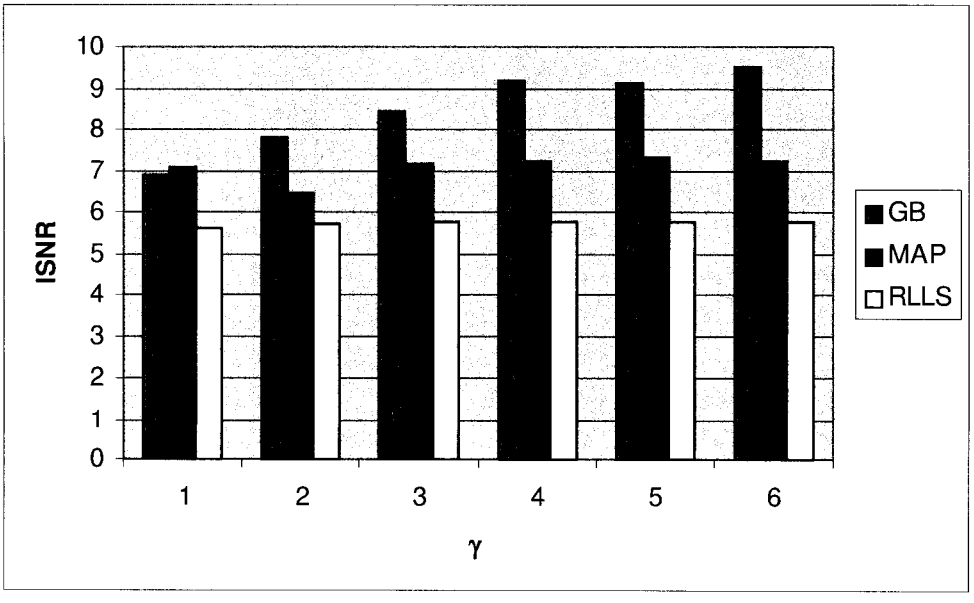


Figura 3-25: ISNR para as restaurações das imagens do *phantom*, borradas e degradadas por ruído Poisson, pelos algoritmos de Goodman-Belsher, MAP linearizado e RLLS, respectivamente, considerando o borramento pela PSF2.

Observamos que o filtro de Goodman-Belsher foi capaz de produzir resultados mais significativos e, por sua vez, o RLLS apresentou uma performance inferior em todos os casos. Contudo, devemos observar que o algoritmo RLLS não é derivado considerando a presença do ruído Poisson. De fato, lembramos que, embora proposto no contexto de COSM, este método considera o caso de ruído branco na sua derivação.

Apesar de produzir resultados inferiores aos gerados pelo algoritmo de Goodman-Belsher, o filtro MAP linearizado também se demonstrou uma alternativa viável ao uso do algoritmo RLLS. Contudo, devemos observar que a performance do filtro MAP linearizado está diretamente relacionada ao conhecimento que temos sobre a variância e a média não estacionária do sinal verdadeiro.

Em todos os casos, estes parâmetros foram estimados a partir das observações (imagens borradas e ruidosas) e, dessa forma, esperamos que este filtro possa apresentar um melhor desempenho a partir de estimativas mais acuradas da variância e da média não estacionária do sinal.

3.4.6 Avaliação dos Métodos Lineares com Imagens Reais

Nesta seção, apresentamos alguns resultados obtidos na restauração de imagens reais com os algoritmos lineares derivados acima. Para comparação, também apresentamos as imagens restauradas com o algoritmo RLLS.

A Figura 3-26 e a Figura 3-27 apresentam as imagens observadas e restauradas para o caso de dois espécimes biológicos (apresentados na Seção 3.4.1, página 68). Por outro lado, a Figura 3-28 apresenta os resultados para uma imagem de *bead*.

No caso dos espécimes biológicos, observamos que o filtro de Goodman-Belsher e o filtro MAP linearizado apresentaram resultados visuais mais significativos em relação aos obtidos com o algoritmo RLLS. Em outras palavras, estes métodos proporcionam um contraste maior nas imagens restauradas. Mais ainda, assim como no caso dos experimentos com imagens simuladas, o filtro de Goodman-Belsher apresentou resultados superiores quando comparado ao algoritmo MAP linearizado. De fato, observamos que a imagem restaurada com o uso deste último filtro mantém algumas estruturas que estão presentes na imagem observada. Isso se deve em grande parte à forma como estimamos a média não estacionária do sinal verdadeiro a partir da imagem observada.

Esta característica do filtro MAP é mais evidente na restauração da imagem do *bead*. De fato, como pode ser observado na Figura 3-28b, a imagem restaurada ainda apresenta um aspecto borrado na parte interna da estrutura.

Novamente, a restauração com melhor aspecto visual, para o caso da imagem do *bead*, foi obtida com o filtro de Goodman-Belsher. Por sua vez, o algoritmo RLLS apresentou uma série de artefatos indesejáveis na forma de anéis (*ringings*) [Lagendijk e Biemond (1991)].

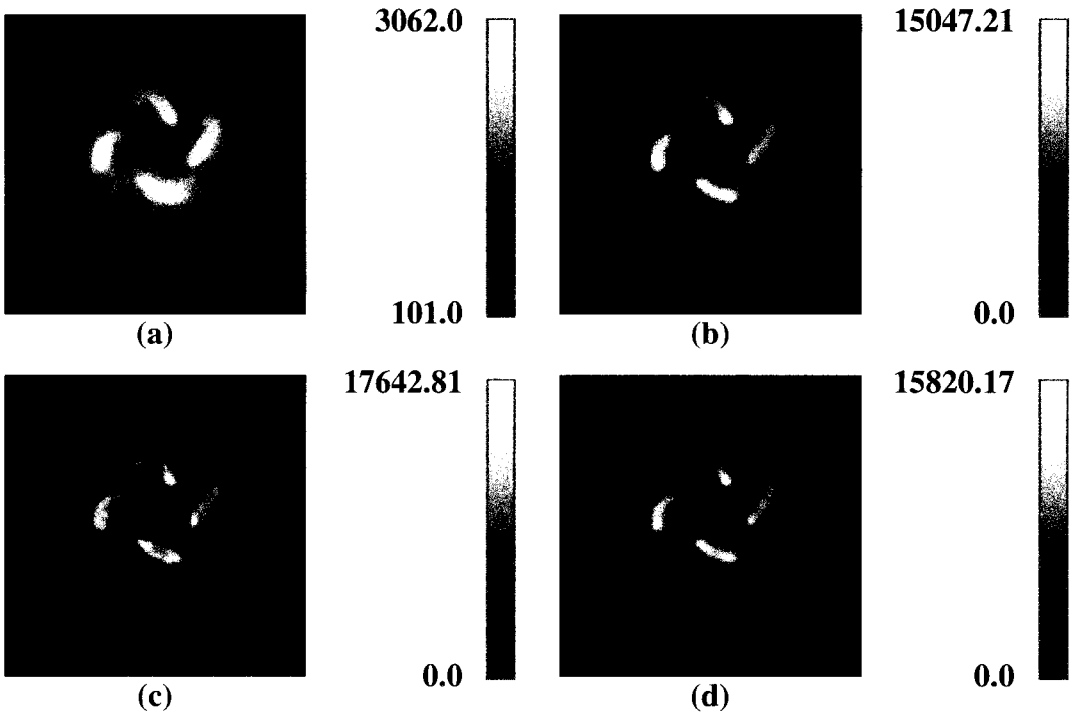


Figura 3-26: Seções da imagem 3D do embrião Volvox adquirida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 100X, 1.3 NA de imersão em óleo e utilizando um filtro para $\lambda = 0.530$ μm: (a) imagem observada; (b) imagem restaurada pelo algoritmo MAP linearizado; (c) imagem restaurada pelo algoritmo de Goodman-Belsher; (d) imagem restaurada pelo algoritmo RLLS.

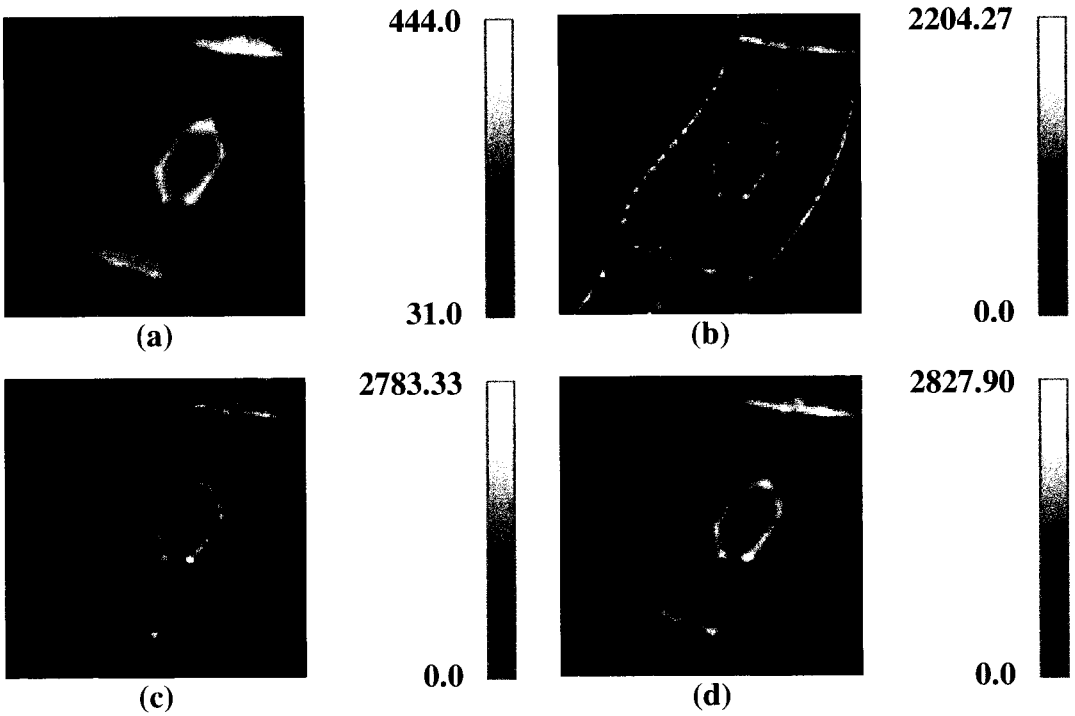


Figura 3-27: Seções da imagem 3D de retículo endoplasmático adquirida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 20X, 0.75 NA e um filtro para λ = 0.530 μm: (a) imagem observada; (b) imagem restaurada pelo algoritmo MAP linearizado; (c) imagem restaurada pelo algoritmo de Goodman-Belsher; (d) imagem restaurada pelo algoritmo RLLS.

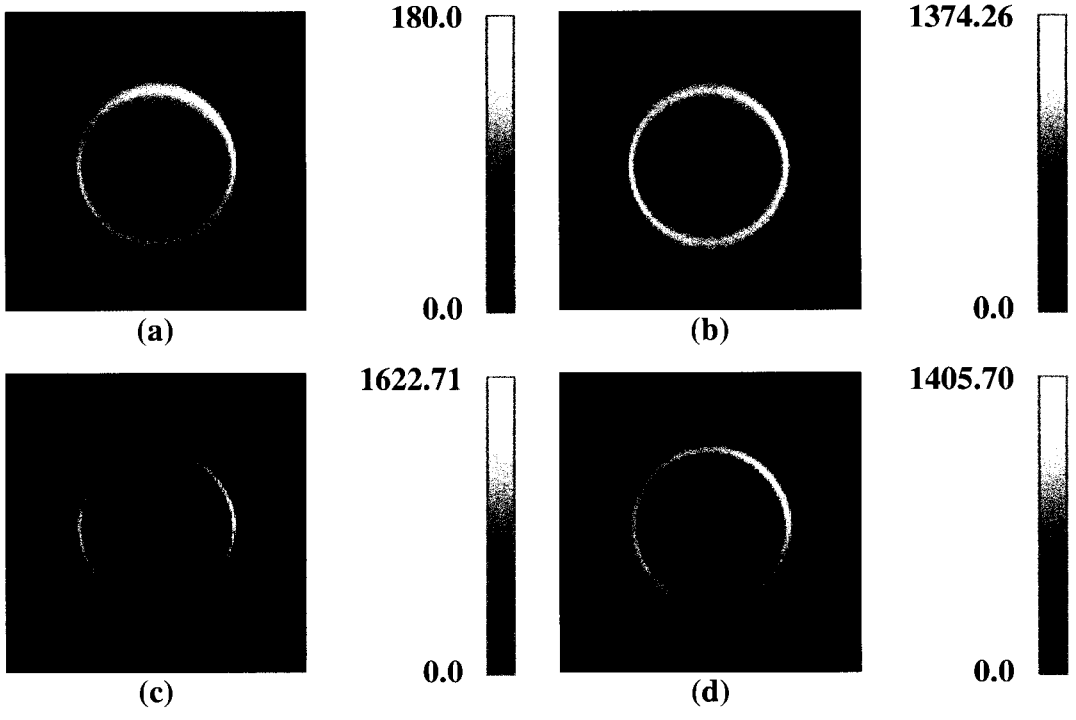


Figura 3-28: Seções da imagem 3D do *bead* obtida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 60X, 1.4 NA de imersão em óleo e um filtro para λ = 0.635 μm: (a) imagem observada; (b) imagem restaurada pelo algoritmo MAP linearizado; (c) imagem restaurada pelo algoritmo de Goodman-Belsher; (d) imagem restaurada pelo algoritmo RLLS.

3.5 Conclusão

Apresentamos e discutimos dois filtros lineares, derivados considerando a presença de ruído Poisson nas observações, para a restauração de imagens tridimensionais obtidas em microscopia de deconvolução. Ainda, propomos o uso de algoritmos específicos para a redução do ruído antes do processo de restauração.

Os algoritmos foram avaliados para diferentes níveis de ruído e também para duas funções de espalhamento pontual com diferentes características.

De maneira geral, nos estudos com imagens simuladas, os métodos apresentaram uma boa performance em relação à melhoria na relação sinal-ruído, adotada para quantificar os resultados das restaurações. Mais ainda, verificamos que os algoritmos são robustos na presença de diferentes níveis de ruído Poisson.

Particularmente, o algoritmo de Goodman-Belsher apresentou resultados mais significativos, quando comparado ao algoritmo MAP linearizado, principalmente em níveis menores de ruído Poisson. Por outro lado, observamos que os resultados obtidos com este último filtro foram superiores aqueles produzidos pelo algoritmo RLLS. Dessa forma, concluímos que as hipóteses utilizadas para a derivação do filtro linear, a partir do filtro geral MAP não linear, são razoáveis, uma vez que elas permitem a aplicação do critério MAP ao problema de microscopia de seccionamento óptico computacional. Além disso, observamos que o filtro MAP linearizado poderá apresentar um melhor desempenho a partir de estimativas mais acuradas da variância e da média não estacionária do sinal verdadeiro.

Finalmente, verificamos que ambos os algoritmos propostos apresentaram uma boa performance visual quando analisados com imagens reais de *beads* e espécimes biológicos.

Concluímos que os métodos lineares, apresentados neste capítulo, são alternativas viáveis para a restauração de imagens tridimensionais, obtidas em microscopia de seccionamento óptico computacional.

Capítulo 4 Projeções Sobre Conjuntos Convexos

4.1 Introdução

Este capítulo descreve os algoritmos propostos para deconvolução de imagens 3D obtidas em microscopia de fluorescência, baseados na teoria de Projeções sobre Conjuntos Convexos (*Projection onto Convex Sets* – POCS).

A teoria de POCS é um caso particular da teoria de conjuntos e de projeções em espaços vetoriais. Particularmente, estamos interessados na formulação do algoritmo POCS iterativo que é devida ao trabalho pioneiro de Gubin et al. (1967), sendo depois aperfeiçoada por Lent e Tuy (1981). Posteriormente, esta metodologia foi popularizada entre a comunidade científica – principalmente na área de processamento de imagens e sinais – pelos trabalhos sucessivos de Youla (1978), Youla e Webb (1982) e Sezan e Stark (1982). Desde então, o algoritmo POCS vem sendo extensivamente aplicado em diferentes áreas como, por exemplo, redes neurais, teoria de comunicações, óptica e processamento de imagens e sinais, sendo que se destacam principalmente as aplicações voltadas para o processamento de imagens médicas, como no caso de reconstrução de imagens tomográficas.

Os algoritmos POCS derivados neste capítulo são mais elaborados do que aqueles discutidos no capítulo anterior. De fato, propomos algoritmos capazes de recuperar parte da informação perdida devido ao cone de freqüências nulas, característico da função de transferência óptica de um microscópio *wide-field*. Mais ainda, além do ruído Poisson, também consideramos a presença de ruído aditivo e independente do sinal nas observações.

Estes algoritmos são baseados em cinco conjuntos de restrições convexas, sendo que dois deles são derivados para deconvoluir a imagem observada com a PSF do microscópio. Para isso, seguindo o conceito de imagens protótipos, propomos o uso de conjuntos baseados em variações ao redor das soluções de Wiener e de Goodman-Belsher, que promovem a restauração das freqüências espaciais até o limite de difração.

Sabe-se que a solução de Wiener é um estimador linear ótimo para o caso de ruído aditivo e independente do sinal. Dessa forma, para usar o conjunto definido sob

este critério, no contexto de microscopia de seccionamento óptico computacional, propomos o pré-processamento das imagens observadas por um dos procedimentos de redução do ruído Poisson que foram descritos no capítulo anterior.

Sugerimos também a incorporação de uma restrição de suavização adaptativa pontual para minimizar os erros oriundos do processo de regularização, característicos dos filtros lineares para restauração. Ainda, incorporamos uma restrição de positividade e uma restrição espacial baseada na extensão finita da imagem verdadeira. Esta última, segundo a abordagem de Gerchberg-Papoulis, garante a recuperação de parte das freqüências perdidas durante o processo de degradação das imagens, ou seja, permite uma extrapolação parcial do espectro de freqüências além do limite de difração.

A próxima seção discute a teoria de Projeções sobre Conjuntos Convexos. Posteriormente, apresentamos o conceito de imagem protótipo e as restrições convexas utilizadas neste trabalho que, combinadas, resultarão nos algoritmos POCS. A última parte deste capítulo é dedicada à apresentação e discussão dos resultados experimentais.

4.2 Fundamentos de POCS

O objetivo deste tópico é apresentar um dos resultados mais importantes da teoria de projeções em espaços vetoriais: o *teorema fundamental de POCS*. Para isso, apresentamos algumas definições e resultados preliminares de forma a fornecer as ferramentas e conceitos matemáticos necessários para o enunciado do teorema. As provas destes resultados não serão apresentadas uma vez que estão fora do escopo deste texto. Contudo, estas podem ser encontradas na literatura citada.

Fundamentalmente, a teoria de projeções é bem estabelecida e formalizada sobre uma classe especial de espaços vetoriais conhecidos como Espaços de Hilbert.

Definição 1: (*Espaço de Hilbert*) Um espaço de Hilbert Ξ é um espaço vetorial com produto interno que é *completo* em relação à norma induzida deste produto interno.

Lembramos que uma seqüência $\{\mathbf{f}_n\}$ em um espaço vetorial é de Cauchy se

$$\lim_{m,n\to\infty} \|\mathbf{f}_m - \mathbf{f}_n\| = 0 \tag{4-1}$$

e que um espaço vetorial normado é *completo* quando toda seqüência de Cauchy neste espaço for convergente. Dessa forma, um espaço vetorial com produto interno é de Hilbert *se e só se* toda seqüência de Cauchy converge com respeito à norma induzida pelo produto interno.

Sobre um espaço de Hilbert, outros dois pontos de extrema importância para os nossos propósitos são os conceitos de convexidade e fechamento. A definição 2 estabelece o conceito de um conjunto convexo e a definição 3 o de conjunto fechado.

Definição 2: Um conjunto $C \subset \Xi$, onde Ξ é um espaço de Hilbert, é convexo se e apenas se para quaisquer $\mathbf{f}_1, \mathbf{f}_2 \in C$ arbitrários, o vetor $\mathbf{f} = \mu \cdot \mathbf{f}_1 + (1-\mu) \cdot \mathbf{f}_2$ também está em C para $0 \leq \mu \leq 1$, ou seja $\mathbf{f} \in C$.

A definição 2 diz que um conjunto é convexo se e apenas se o segmento de reta unindo dois pontos arbitrários de C está totalmente contido em C. A Figura 4-1 ilustra este conceito para dois conjuntos contidos no $\mathbb{R}^2$ (o espaço euclideano é de Hilbert) sendo que um é convexo e o outro é não convexo.

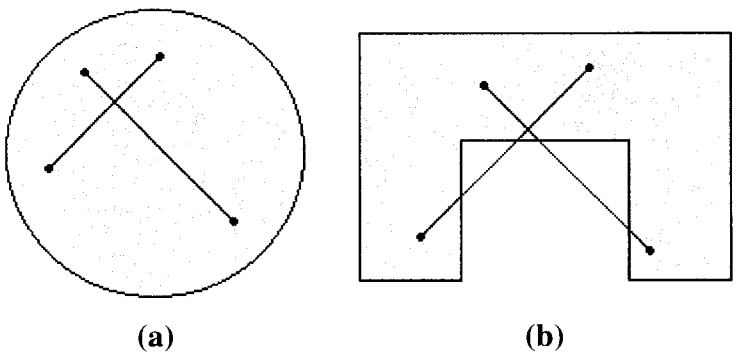


Figura 4-1: Ilustração do conceito de convexidade para conjuntos no plano: (a) convexo; (b) não convexo.

Definição 3: Um conjunto $C \subset \Xi$, onde Ξ é um espaço de Hilbert, é fechado se e apenas se toda seqüência convergente $\{\mathbf{f}_n\}$ contida em C, ou seja, $\mathbf{f}_n \in C$ para todo $n \in \mathbb{N}$, converge para um vetor em C. Isto é, $\mathbf{f}_n \to \mathbf{f} \in C$.

Um conjunto convexo que é fechado é chamado de *conjunto convexo fechado*. Um conceito fundamental que é associado a um conjunto convexo fechado em um espaço de Hilbert é o *operador de projeção*. Este é caracterizado pelo seguinte teorema.

Teorema 1: Seja $C \subset \Xi$ um conjunto convexo fechado, onde Ξ é um espaço de Hilbert. Então para cada $\mathbf{f} \in \Xi$, existe um único $\underline{\mathbf{f}} \in C$ que é o ponto mais próximo de $\mathbf{f}$ em C. Ou seja,

$$\|\mathbf{f} - \underline{\mathbf{f}}\| = \min_{\mathbf{g} \in C} \|\mathbf{f} - \mathbf{g}\|. \tag{4-2}$$

Omitimos a demonstração deste resultado, contudo esta pode ser encontrada em Stark e Yang (1998), na página 35. Este teorema revela uma importante propriedade que é associada a conjuntos convexos e fechados em um espaço de Hilbert. Ele define uma regra que associa para cada $\mathbf{f} \in \Xi$ o seu vizinho mais próximo (e único) em C, que é chamado de projeção de $\mathbf{f}$ sobre C. Esta regra é completamente determinada pelo conjunto C e é chamada de operador de projeção (ou *projetor*) sobre C, sendo denotado por $\mathbf{P}_C$. Portanto, dado $\mathbf{f} \in \Xi$, sua projeção $\mathbf{P}_C \cdot \mathbf{f}$ sobre C é definida pelo $\mathbf{g}$ satisfazendo

$$\|\mathbf{f} - \mathbf{P}_C \cdot \mathbf{f}\| = \min_{\mathbf{g} \in C} \|\mathbf{f} - \mathbf{g}\|. \tag{4-3}$$

Por sua vez, a definição 4 apresenta uma extensão da definição de projeção.

Definição 4: (*Projetor Relaxado*) Para cada constante $\eta \in (0,2)$, o operador de projeção relaxado sobre $C \subset \Xi$ é definido por

$$\mathbf{T}_C = \mathbf{I} + \eta \cdot (\mathbf{P}_C - \mathbf{I}), \tag{4-4}$$

onde $\mathbf{I}$ é o operador identidade em Ξ.

Dessa forma, para cada $\mathbf{f} \in \Xi$, o operador relaxado $\mathbf{T}_C$ produz

$$\mathbf{T}_C \cdot \mathbf{f} = \mathbf{f} + \eta \cdot (\mathbf{P}_C \cdot \mathbf{f} - \mathbf{f}) = (1 - \eta) \cdot \mathbf{f} + \eta \cdot \mathbf{P}_C \cdot \mathbf{f}. \tag{4-5}$$

Claramente, da Eq. (4-5), quando $\eta = 1$, o operador relaxado $\mathbf{T}_C$ se resume ao operador $\mathbf{P}_C$. Em contraste ao operador relaxado, o operador $\mathbf{P}_C$ freqüentemente é chamado de operador *puro* e a sua operação de projeção *pura*.

Uma última definição de faz necessária de forma a caracterizar o teorema fundamental de POCS. É o conceito de convergência fraca.

Definição 5: (*Convergência Fraca*) Em um espaço de Hilbert Ξ, uma seqüência $\{\mathbf{f}_n\}$ converge fracamente[17] para $\mathbf{f} \in \Xi$ se

$$\lim_{n\to\infty} \langle \mathbf{f}_n, \mathbf{g} \rangle = \langle \mathbf{f}, \mathbf{g} \rangle \tag{4-6}$$

para todo $\mathbf{g} \in \Xi$.

Com base nas definições apresentadas acima e também com a ajuda do Teorema 1, podemos considerar M conjuntos convexos e fechados denotados por $C_1, C_2, \ldots, C_{\mathrm{M}}$ em um espaço de Hilbert Ξ e $C = \bigcap_{k=1}^{\mathrm{M}} C_k$.

Para cada um dos conjuntos C_k, $k \in I = \{1, \ldots, \mathrm{M}\}$, onde I é uma família de índices, existe um operador de projeção pura $\mathbf{P}_{C_k}$ sobre C_k, e seu correspondente operador relaxado $\mathbf{T}_{C_k}$, para $\eta_k \in (0,2)$. Ainda considere a composição de projetores dada por

$$\mathbf{T} = \mathbf{T}_{C_{\mathrm{M}}} \cdot \mathbf{T}_{C_{\mathrm{M}-1}} \cdot \ldots \cdot \mathbf{T}_{C_1}. \tag{4-7}$$

Assim, pode-se enunciar o seguinte resultado:

Teorema 2: (*Teorema Fundamental de POCS*) Assuma que $C \neq \varnothing$. Então, para cada $\mathbf{f} \in \Xi$ e para cada $\eta_k \in (0,2)$, $k = 1, \ldots, \mathrm{M}$, a seqüência $\{\mathbf{T}^{(n)} \cdot \mathbf{f}\}$, $n \in \mathbb{N}$, converge fracamente para um ponto de C.

A importância do Teorema 2 é que ele define um algoritmo numérico sistemático para achar um ponto na intersecção não vazia de vários conjuntos convexos fechados.

Este teorema foi primeiramente demonstrado por Gubin et al. (1967) e posteriormente, Youla e Webb (1982) sugeriram uma prova alternativa. Omitimos a demonstração do teorema, contudo esta pode ser encontrada nas referências citadas.

Dessa forma, podemos afirmar que, para um ponto inicial arbitrário $\mathbf{f}^{(0)}$, contido em um espaço de Hilbert Ξ, e M conjuntos convexos e fechados como

---

[17] Em contraste com a convergência fraca, a convergência em norma, isto é, $\lim_{n\to\infty} \|\mathbf{f}_n - \mathbf{f}\| = 0$, é chamada de convergência forte. Pode-se mostrar que em um espaço de Hilbert de dimensão finita, uma seqüência $\{\mathbf{f}_n\}$ converge fracamente se e só se converge fortemente.

descrito acima, sendo que $C \neq \varnothing$, a seqüência $\{\mathbf{f}^{(n)}\}$, $n \in \mathbb{N}$, gerada pela relação recursiva

$$\mathbf{f}^{(n+1)} = \mathbf{T}_{C_M} \cdot \mathbf{T}_{C_{M-1}} \cdot \ldots \cdot \mathbf{T}_{C_1} \cdot \mathbf{f}^{(n)}, \tag{4-8}$$

onde $\mathbf{T}_{C_k}$, $k = 1, \ldots, M$, é definido por $\mathbf{T}_{C_k} = \mathbf{I} - \eta_{n,k} \cdot (\mathbf{P}_{C_k} - \mathbf{I})$, para $\eta_{n,k} \in (0, 2)$, converge fracamente para um ponto de C.

No caso geral, o parâmetro de relaxação $\eta_{n,k}$ pode depender especificamente do projetor $\mathbf{T}_{C_k}$ e também do passo da iteração n.

Um caso particular para o Teorema 2 é quando $\eta_{n,k} = 1$ para todos os operadores $\mathbf{T}_{C_k}$ e para todas as iterações. Nesta hipótese, a Eq. (4-8) se resume ao algoritmo POCS cíclico [Combettes (1993)] [Marks (1997)] expresso por

$$\mathbf{f}^{(n+1)} = \mathbf{P}_{C_M} \cdot \mathbf{P}_{C_{M-1}} \cdot \ldots \cdot \mathbf{P}_{C_1} \cdot \mathbf{f}^{(n)}. \tag{4-9}$$

A Figura 4-2 ilustra o comportamento da Eq. (4-9) para o caso de dois conjuntos convexos fechados.

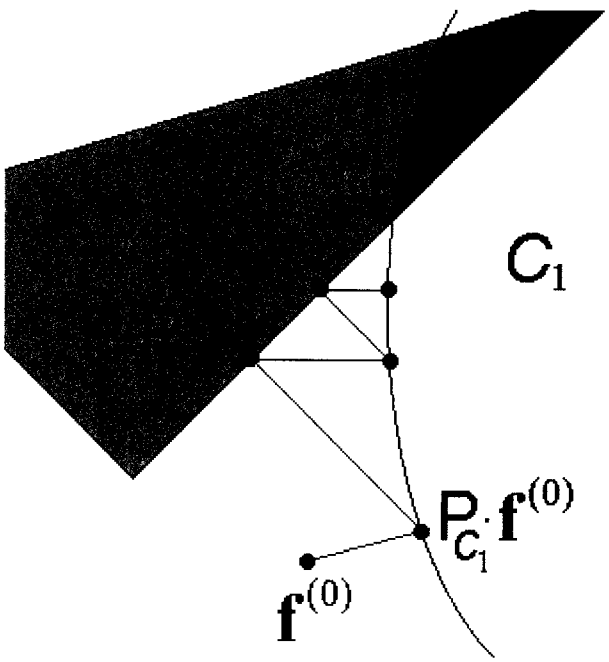


Figura 4-2: Ilustração do algoritmo POCS para dois conjuntos. Verifica-se que para um ponto inicial arbitrário, a seqüência gerada pela relação recursiva apresentada na Eq. (4-9) converge para a intersecção $C_1 \cap C_2$.

Algumas considerações práticas podem ser mencionadas: (i) efeito da escolha do ponto inicial sobre o ponto de convergência; (ii) existência de conjuntos de restrições que não se interceptam devido a imprecisões na informação *a priori* durante a definição dos conjuntos [Sezan (1992)] e (iii) escolha dos valores dos parâmetros de relaxação.

Achar estratégias ótimas para a escolha dos parâmetros de relaxação é em geral um problema difícil de se resolver [Sezan (1992)] [Stark e Yang (1998)]. Freqüentemente, são extremamente dependentes do contexto de aplicação do algoritmo. Na maioria das aplicações onde existem mais de duas restrições, são usados os operadores de projeções puras, ou seja, com os parâmetros de relaxação unitários. Para os casos onde se prefere o uso de relaxação, freqüentemente os parâmetros são determinados heuristicamente [Sezan (1992)] [Stark e Sezan (1994)].

Um problema mais sério é quando os conjuntos de restrições não se interceptam, ou seja, $C = \varnothing$. A Figura 4-3 ilustra um exemplo típico para dois conjuntos. Neste caso, o algoritmo não converge e a solução fica oscilando entre os conjuntos de restrições.

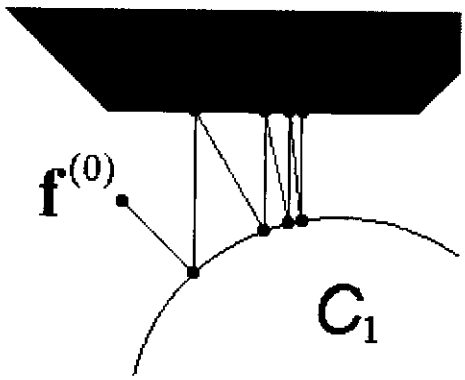


Figura 4-3: Ilustração do comportamento do algoritmo POCS seqüencial para o caso de dois conjuntos que não se intersectam.

A teoria de projeções pode ser generalizada para incorporar casos onde a intersecção dos conjuntos é vazia [Stark e Yang (1998)]. Nesta circunstância, é conveniente usar o algoritmo de projeções simultâneas definido por

$$\mathbf{f}^{(n+1)} = \sum_k w_k \cdot \mathbf{P}_{C_k} \cdot \mathbf{f}^{(n)}, \tag{4-10}$$

sendo que os w_k são constantes positivas, onde $\sum_k w_k = 1$. Esta iteração convergirá para um ponto que satisfaz todas as restrições no sentido de mínimos quadrados ponderado.

Verifica-se que a Eq. (4-10) minimiza a expressão

$$\sum_k w_k \cdot d^2(\hat{\mathbf{f}}, C_k), \tag{4-11}$$

onde $d(\hat{\mathbf{f}}, C_k)$ é a distância de $\hat{\mathbf{f}}$ (o ponto de convergência) a C_k.

Finalmente, quando o conjunto $C \neq \varnothing$ não é unitário, a solução para a qual o algoritmo POCS converge depende fortemente do ponto inicial escolhido. Freqüentemente, esta é uma crítica ao método de projeções [Combettes (1993)]. Contudo, dentro da filosofia de POCS, qualquer ponto que pertença a C é uma solução factível para o problema.

Na teoria de projeções, o objetivo é produzir uma solução (que pode não ser única) que é consistente com toda a informação disponível, isto é, consistente com os dados e com a informação *a priori* sobre o problema [Combettes (1992)]. Neste sentido, a meta não é produzir a "melhor" solução mas uma que satisfaça toda a informação disponível [Combettes (1993)]. A ênfase é colocada na *factibilidade* da solução e não na sua *otimalidade*.

De fato, os métodos tradicionais em processamento de imagens buscam por uma solução que é ótima em relação a algum critério objetivo [Combettes (1993)] como, por exemplo, minimizar o erro médio quadrático ou, ainda, critérios de máxima entropia, máxima verossimilhança ou máximo *a posteriori*.

Freqüentemente, uma das questões fundamentais com as formulações estatísticas ótimas é a "tratabilidade" matemática e computacional, as quais, muitas vezes, requerem simplificações drásticas, tornando difícil (se não impossível) a incorporação de toda a informação *a priori* disponível [Combettes (1992)].

Uma vez que a informação *a priori* pode não ser incorporada de forma adequada ao problema, muitas vezes, seguindo estes critérios, as "soluções ótimas" encontradas violam restrições conhecidas (como por exemplo, valores de intensidades negativos). Mais ainda, devido a limitações práticas, freqüentemente as soluções encontradas são sub-ótimas. Isto pode acontecer, por exemplo, quando se precisa estimar parâmetros e as únicas informações disponíveis para isso são os dados observados.

Contudo, estas considerações não implicam que não se deva levar em consideração critérios estatísticos. Pelo contrário, embora o algoritmo POCS não requer um modelo probabilístico para os dados, pode-se perfeitamente incorporar estes critérios ao problema. Este é justamente o caso dos algoritmos propostos neste trabalho.

No problema específico de restauração de imagens, o algoritmo deve buscar por uma imagem que é consistente com um número definido de restrições *a priori*, descritas na forma de conjuntos convexos fechados, que por sua vez, representam o conhecimento adicional sobre o problema. Cada membro da intersecção dos conjuntos é considerado uma solução factível para o problema de restauração e o processo de regularização pode ser visto como o procedimento de forçar o resultado a satisfazer todas as restrições definidas *a priori*.

4.3 Conjuntos de Restrições

Neste trabalho, sugerimos o uso de cinco conjuntos que, combinados, resultarão nos algoritmos propostos. Os conjuntos de restrições são:

1. Variação ao redor da solução de Wiener (S_1);
2. Variação ao redor da solução de Goodman-Belsher (S_2);
3. Minimização dos erros de regularização (S_3);
4. Positividade (S_4);
5. Suporte compacto (S_5).

As imagens pertencentes aos conjuntos S_1 e S_2 são aproximações das soluções encontradas pelos filtros lineares de Wiener e Goodman-Belsher. De fato, as restrições impostas por estes conjuntos garantem que a solução desejada não se distancie muito daquelas obtidas por estes filtros. Nesse sentido, estas restrições também garantem a recuperação das freqüências espaciais até o limite de difração.

Agora, como um resultado do processo de regularização, incorporado nos filtros de Wiener e Goodman-Belsher, outro tipo de erro, chamado erro de regularização, é introduzido nas imagens restauradas [Lagendijk e Biemond (1991)].

Assim, o terceiro conjunto S_3 impõe uma restrição de suavização adaptativa [Sezan e Tekalp (1990)], de forma a minimizar os artefatos produzidos pelo mecanismo de regularização dos filtros lineares, utilizados na construção dos conjuntos S_1 e S_2.

O quarto conjunto S_4 garante a positividade da solução, uma vez que os filtros lineares podem produzir valores negativos e, por sua vez, o último conjunto S_5 permite uma extrapolação parcial do espectro de freqüências para além do limite de difração.

Os três primeiros conjuntos são baseados no conceito de imagens protótipos [Sezan e Trussell (1991)]. Dessa forma, apresentamos este conceito em primeiro lugar e, na seqüência, apresentamos a definição dos conjuntos e seus operadores de projeção.

4.3.1 Imagens Protótipos – O Caso Geral

A discussão que segue é baseada no trabalho de Sezan e Trussell (1991). No caso geral, pode-se definir uma restrição baseada em protótipo se for possível determinar uma imagem protótipo e um limite de variação a partir deste. Em certo sentido, o protótipo irá definir uma imagem da qual a solução que desejamos não deverá se distanciar muito.

Uma vez determinados, ou seja, dados o protótipo e o limite de variação, o conjunto pode ser definido de duas formas. A primeira é dada por

$$C = \left\{ \mathbf{y} : \|\mathbf{s} - \mathbf{y}\|^2 \leq \xi \right\}, \tag{4-12}$$

onde $\mathbf{s} \in \mathbb{R}^N$ representa o protótipo e $\mathbf{y} \in \mathbb{R}^N$ representa um membro arbitrário do conjunto C. O vetor ξ representa o limite de variação entre $\mathbf{y}$ e o protótipo $\mathbf{s}$.

A segunda forma é expressa por

$$C_k = \left\{ \mathbf{y} : \|s_k - y_k\|^2 \leq \xi_k \right\}, \tag{4-13}$$

onde s_k, y_k e ξ_k são componentes dos vetores $\mathbf{s}$, $\mathbf{y}$ e ξ, respectivamente, e $k = 1, \ldots, N$.

A Eq. (4-13) define uma família de conjuntos (um para cada componente do vetor $\mathbf{s}$) onde cada um corresponde a uma posição espacial específica.

Para cada conjunto expresso por esta família, pode-se definir um operador de projeção. Sendo assim, tem-se um conjunto de projetores $\mathbf{P}_{C_k}$, $k = 1, \ldots, \mathrm{N}$, correspondente a todos os conjuntos fornecidos pela Eq. (4-13).

Por outro lado, o operador de projeção $\mathbf{P}_C$ para o conjunto C na Eq. (4-12) pode ser definido através da composição de operadores $\mathbf{P}_{C_k}$, $k = 1, \ldots, \mathrm{N}$, como

$$\mathbf{P}_C = \mathbf{P}_{C_1} \circ \mathbf{P}_{C_2} \circ \ldots \circ \mathbf{P}_{C_\mathrm{N}} . \tag{4-14}$$

Os conjuntos da Eq. (4-12) e da Eq. (4-13) podem ser combinados simplesmente considerando um generalização da Eq. (4-12) como

$$C = \left\{ \mathbf{y} : \left\| \mathbf{K}(\mathbf{s} - \mathbf{y}) \right\|^2 \leq \xi \right\}, \tag{4-15}$$

onde $\mathbf{K}$ é uma matriz de pesos diagonal.

Dessa forma, o conjunto da Eq. (4-12) é obtido quando $\mathbf{K} = \mathbf{I}$, onde $\mathbf{I}$ é a matriz identidade e o conjunto da Eq. (4-13) é obtido quando $\mathbf{K} = \mathbf{I}_k$, sendo $\mathbf{I}_k$ a matriz onde o k-ésimo elemento da diagonal é 1 e o resto dos elementos são nulos.

Mais ainda, este tipo de restrição pode ser definido diretamente no domínio de Fourier como

$$C = \left\{ \mathbf{y} : \left\| \mathbf{K}(\mathbf{S} - \mathbf{Y}) \right\|^2 \leq \xi \right\}, \tag{4-16}$$

onde $\mathbf{S}$ e $\mathbf{Y}$ são as DFT de $\mathbf{s}$ e $\mathbf{y}$, respectivamente.

Considerações sobre a convexidade e o fechamento para conjuntos definidos dessa forma podem ser encontradas em Stark e Yang (1998).

Freqüentemente, os protótipos são construídos com base na informação *a priori* que se tem sobre o problema. Na prática, são usualmente construídos a partir das imagens observadas como o resultado da aplicação de um operador linear pré-determinado como, por exemplo, o filtro de Wiener.

Definido o protótipo, o limite de variação ξ ao redor deste é obtido por

$$\xi = c \cdot \mathbf{\Psi}, \tag{4-17}$$

sendo c uma constante positiva e

$$\mathbf{\Psi} = E\left[\left\| \tilde{\mathbf{S}} - \tilde{\mathbf{F}} \right\|^2 \right], \tag{4-18}$$

onde $\tilde{\mathbf{S}}$ e $\tilde{\mathbf{F}}$ são os vetores aleatórios correspondentes ao protótipo e a imagem verdadeira, respectivamente.

A Eq. (4-18) é a variação esperada quando a imagem verdadeira é conhecida e a constante c representa a confiança com a qual gostaríamos de ter a solução ideal pertencente ao conjunto descrito na Eq. (4-15), sendo freqüentemente determinada pelo usuário. Por outro lado, esta constante também pode ser usada para garantir a intersecção entre os conjuntos de restrições.

4.3.2 Restrição Baseada na Solução de Wiener

Assumimos que o protótipo $\mathbf{s}^w$ para o primeiro conjunto é obtido pela aplicação do filtro de Wiener paramétrico, apresentado na Eq. (3-51), página 66, sobre a imagem observada $\mathbf{g}$, devidamente processada para eliminação do ruído Poisson. Dessa forma, para cada componente s_k^w de $\mathbf{s}^w$, assumindo $\mathbf{K} = \mathbf{I}_k$, definimos um conjunto convexo na forma da Eq. (4-13) como

$$C_k^w = \left\{ \mathbf{y} : \left\| S_k^w - Y_k \right\|^2 \leq \xi_k^w \right\}, \tag{4-19}$$

onde S_k^w e Y_k são componentes dos vetores $\mathbf{S}^w$ e $\mathbf{Y}$, as DFT de $\mathbf{s}^w$ e $\mathbf{y}$, respectivamente, e ξ_k^w são componentes do vetor $\boldsymbol{\xi}^w$.

A projeção de um vetor imagem arbitrário $\mathbf{v}$ sobre C_k^w é definida através do operador de projeção $\mathbf{P}_{C_k^w}$, no domínio da freqüência, como mostra a equação

$$\mathbf{P}_{C_k^w} \cdot \mathbf{v} = \underline{\mathbf{v}} \Leftrightarrow \underline{\mathbf{V}}, \tag{4-20}$$

onde $\underline{\mathbf{V}}$ é a DFT de $\underline{\mathbf{v}}$, sendo que cada componente $\underline{V_i}$, $i = 1, \ldots, N$, de $\underline{\mathbf{V}}$ é determinado por

$$\underline{V_i} = \begin{cases} S_i^w - \sqrt{\xi_i^w} \cdot \dfrac{\Delta_i}{|\Delta_i|} & se \quad |\Delta_i|^2 \geq \xi_i^w \quad e \quad i = k \\ V_i & caso\ contrário \end{cases}, \tag{4-21}$$

onde $\Delta_i = S_i^w - V_i$ e V_i, $i = 1, \ldots, N$, são componentes do vetor $\mathbf{V}$, a DFT de $\mathbf{v}$.

Observamos que o conjunto definido pela Eq. (4-19) é construído para um particular componente do vetor protótipo.

Para todos os componentes, o primeiro conjunto de restrição proposto é escrito como

$$S_1 = \left\{ \mathbf{y} : \left\| \mathrm{S}_k^w - \mathrm{Y}_k \right\|^2 \leq \xi_k^w \,, \quad k = 1, \ldots, \mathrm{N} \right\}, \tag{4-22}$$

e a projeção sobre S_1 definida como

$$\mathbf{P}_1 = \mathbf{P}_{C_1^w} \circ \mathbf{P}_{C_2^w} \circ \ldots \circ \mathbf{P}_{C_\mathrm{N}^w}, \tag{4-23}$$

de acordo com a Eq. (4-14).

Definido o conjunto e seu operador de projeção, resta determinar o vetor $\boldsymbol{\xi}^w$ quando o protótipo é obtido pela aplicação do filtro de Wiener. A partir da Eq. (4-18) e da Eq. (3-51), página 66, pode-se mostrar que a variação esperada, no domínio da freqüência, quando a imagem verdadeira é conhecida, é dada por

$$\Psi^w[m,n,o] = \frac{\mathrm{N} \cdot \Phi_{\tilde{\mathrm{N}}}[m,n,o] \cdot \Phi_{\tilde{\mathrm{F}}}[m,n,o]}{\left|H[m,n,o]\right|^2 \cdot \Phi_{\tilde{\mathrm{F}}}[m,n,o] + \Phi_{\tilde{\mathrm{N}}}[m,n,o]}, \tag{4-24}$$

onde m, n, $o \in \mathbb{Z}$.

Observamos que obtemos a expressão para $\Psi^w[m,n,o]$ para o caso do filtro de Wiener não paramétrico, ou seja, $\rho = 1$ na Eq. (3-51). A partir de uma ordenação lexicográfica da Eq. (4-24), construímos o vetor $\boldsymbol{\Psi}^w$ e da Eq. (4-17) verifica-se que o limite de variação neste caso é expresso por

$$\boldsymbol{\xi}^w = c \cdot \boldsymbol{\Psi}^w. \tag{4-25}$$

Como já foi mencionado, para se usar o conjunto S_1, precisamos reduzir o nível de ruído Poisson na imagem observada, uma vez que o filtro de Wiener não leva em consideração a presença de ruídos desta natureza. A hipótese neste caso é que o ruído Poisson é predominante em relação ao ruído Gaussiano presente na imagem observada, de forma que devemos aplicar um dos procedimentos descritos no Capítulo 3 para redução de ruído Poisson e considerar o ruído remanescente como aproximadamente aditivo e independente do sinal, muito embora não sendo descrito necessariamente por um processo Gaussiano.

Lembramos que os filtros derivados no Capítulo 3 para a redução do ruído Poisson não incorporam a presença de ruído aditivo e independente do sinal. Dessa forma, a hipótese de que o ruído Poisson é dominante é de fundamental importância para podermos aplicar estes filtros diretamente sobre a imagem observada, desconsiderando a presença do ruído aditivo e independente do sinal.

4.3.3 Restrição Baseada na Solução de Goodman-Belsher

Uma vez que o filtro de Wiener não é derivado na presença de ruído Poisson, propomos uma modificação do conjunto S_1 de forma a incorporar o ruído desta natureza. Para isso, propomos um conjunto de restrição baseado no filtro parametrizado de Goodman-Belsher, descrito na Eq. (3-54), página 67.

Lembramos que este filtro não leva em consideração a presença de ruído aditivo e independente do sinal.

Mais uma vez, assumimos a hipótese de que o ruído Poisson é dominante em relação ao ruído Gaussiano presente na imagem observada, de forma que podemos aplicar o filtro de Goodman-Belsher desconsiderando a presença do ruído aditivo.

Desta forma, a segunda imagem protótipo $\mathbf{s}^{gb}$ é obtida pela aplicação do filtro de Goodman-Belsher paramétrico sobre a imagem observada $\mathbf{g}$ sem a necessidade de processamento para a redução do ruído Poisson.

Como antes, para cada componente s_k^{gb} de $\mathbf{s}^{gb}$, assumindo $\mathbf{K} = \mathbf{I}_k$, definimos um conjunto convexo na forma da Eq. (4-13) como

$$C_k^{gb} = \left\{ \mathbf{y} : \left\| \mathrm{S}_k^{gb} - \mathrm{Y}_k \right\|^2 \leq \xi_k^{gb} \right\}, \tag{4-26}$$

onde S_k^{gb} e Y_k são componentes dos vetores $\mathbf{S}^{gb}$ e $\mathbf{Y}$, as DFT de $\mathbf{s}^{gb}$ e $\mathbf{y}$, respectivamente, e ξ_k^{gb} são componentes do vetor $\boldsymbol{\xi}^{gb}$.

A projeção de um vetor imagem arbitrário $\mathbf{v}$ sobre C_k^{gb} é definida através do operador de projeção $\mathbf{P}_{C_k^{gb}}$, no domínio da freqüência, como mostra a equação

$$\mathbf{P}_{C_k^{gb}} \cdot \mathbf{v} = \underline{\mathbf{v}} \Leftrightarrow \underline{\mathbf{V}}, \tag{4-27}$$

onde $\underline{\mathbf{V}}$ é a DFT de $\underline{\mathbf{v}}$, sendo que cada componente $\underline{\mathrm{V}_i}$, $i = 1, \ldots, \mathrm{N}$, de $\underline{\mathbf{V}}$ é determinado por

$$\underline{\mathrm{V}_i} = \begin{cases} \mathrm{S}_i^{gb} - \sqrt{\xi_i^{gb}} \cdot \dfrac{\Delta_i}{|\Delta_i|} & se \quad |\Delta_i|^2 \geq \xi_i^{gb} \quad e \quad i = k \\ \mathrm{V}_i & caso\ contrário \end{cases}, \tag{4-28}$$

onde, agora, $\Delta_i = S_i^{gb} - V_i$ e V_i, $i = 1,\ldots,N$, são componentes do vetor **V**, a DFT do vetor $\mathbf{v}$.

O conjunto definido pela Eq. (4-26) é construído para um particular componente do vetor protótipo. Para todos os componentes, o segundo conjunto de restrição proposto é então escrito como

$$S_2 = \left\{ \mathbf{y} : \left\| S_k^{gb} - Y_k \right\|^2 \leq \xi_k^{gb} \,, \quad k = 1,\ldots,N \right\}, \tag{4-29}$$

e a projeção sobre S_2, de acordo com a Eq. (4-14), definida como

$$\mathbf{P}_2 = \mathbf{P}_{C_1^{gb}} \circ \mathbf{P}_{C_2^{gb}} \circ \ldots \circ \mathbf{P}_{C_N^{gb}} \,. \tag{4-30}$$

Resta determinar o vetor $\boldsymbol{\xi}^{gb}$. A partir da Eq. (4-18) e da Eq. (3-54), página 67, considerando $\rho = 1$, pode-se mostrar que a variação esperada, no domínio de Fourier, quando a imagem verdadeira é conhecida, é dada por

$$\Psi^{gb}[m,n,o] = \frac{N \cdot \Phi_{\tilde{\mathbf{F}}}[m,n,o]}{\left| 1 + \bar{\mu} \cdot \left| H[m,n,o] \right|^2 \cdot \Phi_{\tilde{\mathbf{F}}}[m,n,o] \right|^2} \,. \tag{4-31}$$

A partir de uma ordenação lexicográfica da Eq.(4-31), construímos o vetor $\boldsymbol{\Psi}^{gb}$ e a partir da Eq. (4-17), constrói-se o limite de variação como

$$\boldsymbol{\xi}^{gb} = c \cdot \boldsymbol{\Psi}^{gb} \,. \tag{4-32}$$

4.3.4 Restrição de Suavização Adaptativa Pontual

O terceiro conjunto implementa uma restrição de suavização adaptativa pontual, a qual também é definida através de uma imagem protótipo. A idéia desta restrição é tentar minimizar os erros de regularização (artefatos) introduzidos pelos filtros lineares usados nos conjuntos S_1 e S_2 [Sezan e Tekalp (1990)].

Da mesma forma, para cada componente s_k^{sm} do vetor protótipo $\mathbf{s}^{sm}$, definimos um conjunto convexo na forma da Eq. (4-13) como

$$C_k^{sm} = \left\{ \mathbf{y} : \left\| s_k^{sm} - y_k \right\|^2 \leq \xi_k^{sm} \right\}, \tag{4-33}$$

onde ξ_k^{sm} são componentes do vetor $\boldsymbol{\xi}^{sm}$.

O protótipo neste caso é definido pela aplicação um filtro espacial passa-baixa (operador de média local) sobre a imagem observada processada para redução do ruído Poisson. Como antes, após o processamento, assumimos que o ruído remanescente na imagem seja aproximadamente aditivo e independente do sinal. Assim, o protótipo é uma estimativa (versão suavizada) da imagem borrada sem ruído. Observamos que este procedimento é heurístico e que poderíamos usar a imagem estimada sem ruído Poisson diretamente, sem a necessidade do operador de média. Contudo, este procedimento facilita a derivação de uma expressão para a variação esperada da Eq. (4-18).

De fato, é difícil determinar $\mathbf{\Psi}^{sm}$, uma vez que isso requer o conhecimento da autocorrelação local da imagem atual [Sezan e Trussell (1991)]. Contudo, assumindo que o ruído é descrito por um processo estacionário com média zero, é possível derivar uma estimativa para $\Psi^{sm}[r,s,t]$, r, s, $t \in \mathbb{Z}$, no domínio do espaço, como

$$\hat{\Psi}^{sm}[r,s,t] = \|z\|^2 \cdot \left(\frac{\sigma^2_{\tilde{\mathbf{B}}}[r,s,t] - \sigma^2_{\tilde{\mathbf{N}}}}{\|h\|^2} \right) + \|m\|^2 \cdot \sigma^2_{\tilde{\mathbf{N}}}, \tag{4-34}$$

onde $\sigma^2_{\tilde{\mathbf{B}}}[r,s,t]$ é a variância local da imagem observada (sem ruído Poisson) e $\sigma^2_{\tilde{\mathbf{N}}}$ é a variância do ruído aditivo e independente do sinal. Ainda, os termos $\|z\|^2$, $\|h\|^2$ e $\|m\|^2$ são definidos por

$$\|z\|^2 = \sum_{(r,s,t)\in\Omega_z} |z[r,s,t]|^2, \quad \|h\|^2 = \sum_{(r,s,t)\in\Omega_h} |h[r,s,t]|^2 \quad e \quad \|m\|^2 = \sum_{(r,s,t)\in\Omega_m} |m[r,s,t]|^2, \tag{4-35}$$

sendo que z, h e m são os *kernels* dos operadores convolucionais $\mathbf{Z} = \mathbf{MH} - \mathbf{I}$, $\mathbf{H}$ e $\mathbf{M}$, respectivamente, onde $\mathbf{H}$ é a matriz de borramento, $\mathbf{M}$ é o operador de média local usado para a construção do protótipo e $\mathbf{I}$ é o operador identidade. Ainda, Ω_z, Ω_h e Ω_m são os suportes dos respectivos *kernels*.

A partir de uma ordenação lexicográfica da Eq. (4-34), construímos o vetor $\hat{\mathbf{\Psi}}^{sm}$ e, da Eq. (4-17), o limite de variação neste caso é expresso por

$$\hat{\xi}^{sm} = c \cdot \hat{\mathbf{\Psi}}^{sm}. \tag{4-36}$$

Agora, a projeção de um vetor imagem arbitrário $\mathbf{v}$ sobre C_k^{sm} é definida através do operador de projeção $\mathbf{P}_{C_k^{sm}}$, como mostra a equação

$$\mathbf{P}_{C_k^{sm}} \cdot \mathbf{v} = \underline{\mathbf{v}}, \tag{4-37}$$

sendo que cada componente $\underline{\mathrm{v}}_i$, $i = 1, \ldots, \mathrm{N}$, de $\underline{\mathbf{v}}$ é determinado por

$$\underline{\mathrm{v}}_i = \begin{cases} \mathrm{s}_i^{sm} + \sqrt{\hat{\xi}_i^{sm}} & se \quad \mathrm{v}_i > \mathrm{s}_i^{sm} + \sqrt{\hat{\xi}_i^{sm}} \quad e \ i = k \\ \mathrm{s}_i^{sm} - \sqrt{\hat{\xi}_i^{sm}} & se \quad \mathrm{v}_i < \mathrm{s}_i^{sm} - \sqrt{\hat{\xi}_i^{sm}} \quad e \ i = k \\ \mathrm{v}_i & caso\ contrário \end{cases} \tag{4-38}$$

O conjunto definido pela Eq. (4-33) é construído para um particular componente do vetor protótipo $\mathbf{s}^{sm}$. Dessa forma, para todos os componentes, o terceiro conjunto de restrição proposto é escrito como

$$S_3 = \left\{ \mathbf{y} : \left\| \mathrm{s}_k^{sm} - \mathrm{y}_k \right\|^2 \leq \xi_k^{sm}, \quad k = 1, \ldots, \mathrm{N} \right\}, \tag{4-39}$$

e a projeção sobre S_3 definida como

$$\mathbf{P}_3 = \mathbf{P}_{C_1^{sm}} \circ \mathbf{P}_{C_2^{sm}} \circ \cdots \circ \mathbf{P}_{C_\mathrm{N}^{sm}}. \tag{4-40}$$

4.3.5 Restrições de Positividade e Extensão Finita

O quarto conjunto é obtido através da imposição que a imagem solução deva ser não negativa, uma vez que a intensidade luminosa é sempre uma grandeza não negativa. Esta condição é necessária uma vez que a solução de Wiener, assim como a de Goodman-Belsher, pode assumir valores negativos.

Assim, o conjunto S_4 é definido como

$$S_4 = \{ \mathbf{y} : \mathrm{y}_k \geq 0, \ k = 1, \ldots, \mathrm{N} \}. \tag{4-41}$$

A projeção de um vetor imagem arbitrário $\mathbf{v}$ sobre S_4 é definida por

$$\mathbf{P}_4 \cdot \mathbf{v} = \underline{\mathbf{v}}, \tag{4-42}$$

sendo que cada componente $\underline{\mathrm{v}}_k$, $k = 1, \ldots, \mathrm{N}$, de $\underline{\mathbf{v}}$ é determinado por

$$\underline{\mathrm{v}}_k = \begin{cases} \mathrm{v}_k & se \quad \mathrm{v}_k \geq 0 \\ 0 & caso\ contrário \end{cases} \tag{4-43}$$

e $\mathbf{P}_4$ é o operador de projeção sobre S_4.

O último conjunto é derivado para tentar recuperar parte das freqüências que recaem dentro do cone de freqüências nulas gerado pela OTF do sistema de

imageamento. Neste caso, a hipótese fundamental é que a imagem verdadeira tenha um suporte compacto, ou melhor dizendo, uma extensão finita em todas as direções, sendo que os valores fora deste suporte são nulos.

Dessa forma, definimos o conjunto S_5 como

$$S_5 = \{\mathbf{y} : \mathrm{y}_k = 0 \ \ para \ \ \mathrm{f}_k = 0, \ k = 1, \ldots, \mathrm{N}\}, \tag{4-44}$$

onde f_k, $k = 1, \ldots, \mathrm{N}$, são componentes do vetor imagem verdadeira.

A projeção de um vetor imagem arbitrário $\mathbf{v}$ sobre S_5 é determinada por

$$\mathbf{P}_5 \cdot \mathbf{v} = \underline{\mathbf{v}}, \tag{4-45}$$

sendo $\mathbf{P}_5$ o operador de projeção sobre S_5.

Cada componente $\underline{\mathrm{v}_k}$, $k = 1, \ldots, \mathrm{N}$, de $\underline{\mathbf{v}}$ é determinado por

$$\underline{\mathrm{v}_k} = \begin{cases} \mathrm{v}_k & se \ \ \mathrm{f}_k \neq 0 \\ 0 & caso\ contrário \end{cases} \tag{4-46}$$

Observamos que, para a implementação deste operador de projeção, é necessário o conhecimento sobre o suporte da imagem verdadeira. Contudo, na prática, como este suporte não é conhecido, optamos por um suporte aproximado, estimado a partir da imagem observada.

As demonstrações de que os conjuntos S_1, S_2, S_3, S_4 e S_5 são convexos e fechados, assim como a derivação dos respectivos projetores, são apresentadas em Stark e Yang (1998).

A abordagem de impor restrições alternando entre o domínio espacial e o domínio de Fourier é similar ao algoritmo de Gerchberg-Papoulis [Gerchberg (1974)] [Papoulis (1975)].

A Figura 4-4 ilustra o efeito da imposição da restrição de suporte compacto para o caso unidimensional. A Figura 4-4a ilustra uma parte do espectro de um sinal obtido pela imposição da restrição no domínio de Fourier. A Figura 4-4b ilustra a transformada de Fourier inversa e a Figura 4-4c a imposição da restrição de suporte compacto. A Figura 4-4d ilustra a FT do "novo" sinal demonstrando a extrapolação do espectro acima do limite de difração. As freqüências do sinal abaixo deste limite que foram modificadas são então restauradas (Figura 4-4e) e o processo se repete voltando para o domínio espacial (Figura 4-4f).

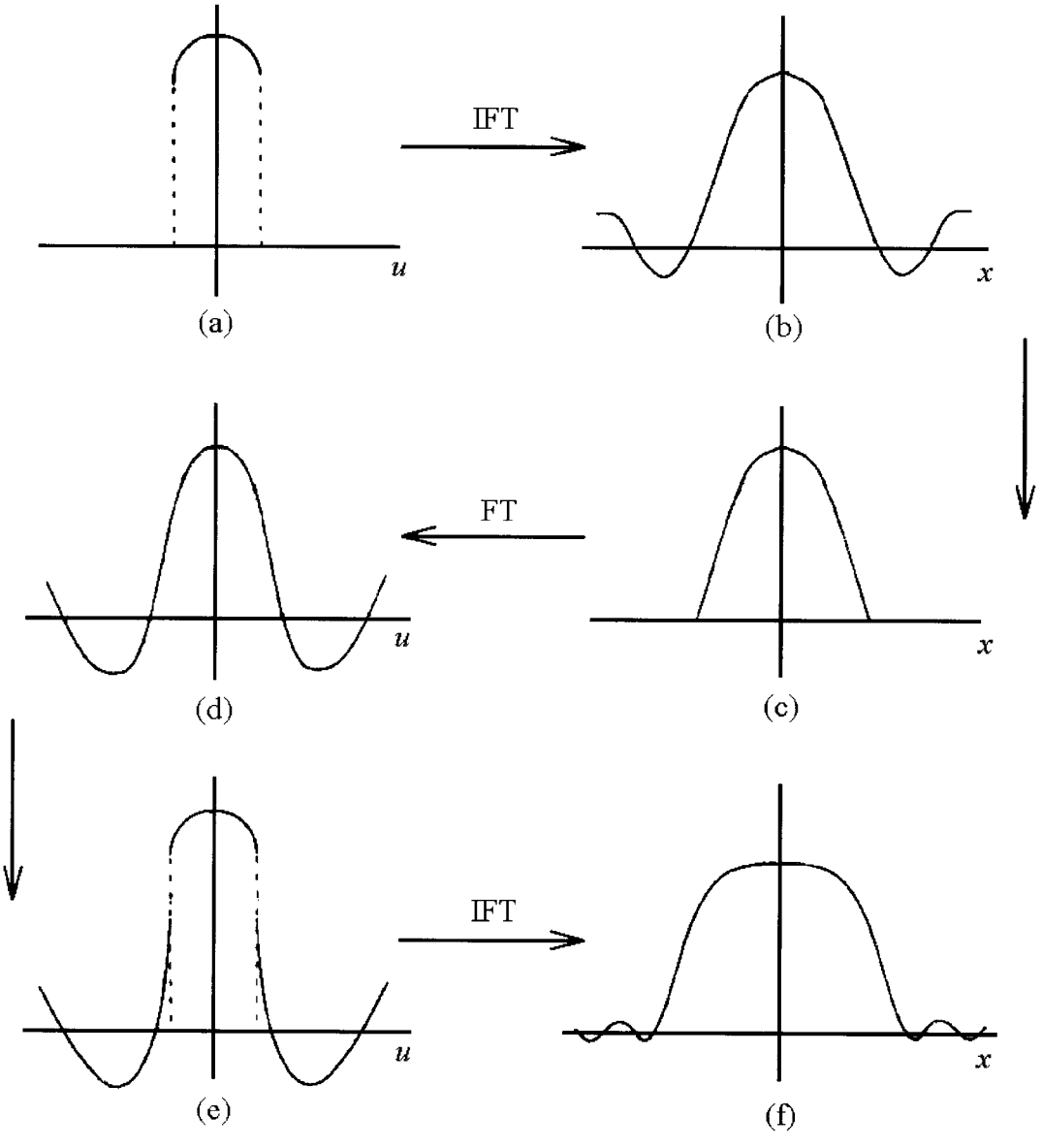


Figura 4-4: Influência da restrição de suporte compacto. Extraído e modificado a partir de Stark e Yang (1998).

4.4 Algoritmos POCS Propostos

Dada uma imagem inicial $\mathbf{f}^{(0)}$, uma estimativa em n passos para a imagem verdadeira pode ser obtida por um dos seguintes algoritmos POCS:

$$\mathbf{f}^{(n+1)} = \mathbf{P}_5 \cdot \mathbf{P}_4 \cdot \mathbf{P}_3 \cdot \mathbf{P}_1 \cdot \mathbf{f}^{(n)} \tag{4-47}$$

$$\mathbf{f}^{(n+1)} = \mathbf{P}_5 \cdot \mathbf{P}_4 \cdot \mathbf{P}_3 \cdot \mathbf{P}_2 \cdot \mathbf{f}^{(n)} \tag{4-48}$$

A imagem inicial $\mathbf{f}^{(0)}$ pode ser, por exemplo, a imagem observada (borrada e ruidosa), uma imagem nula ou uniforme ou até mesmo a solução de Wiener ou de Goodman-Belsher.

Ainda, pré-processamento para reduzir o ruído Poisson é necessário quando usar o algoritmo da Eq. (4-47) e deve-se lembrar que a Eq. (4-48) não leva em consideração a presença de ruído aditivo e independente do sinal.

A Figura 4-5 ilustra um diagrama de blocos para o uso destes algoritmos.

Embora estamos interessados nos algoritmos de projeções puras, é evidente que podemos considerar as versões relaxadas das Eqs. (4-47) e (4-48), expressas por

$$\mathbf{f}^{(n+1)} = \mathbf{T}_5 \cdot \mathbf{T}_4 \cdot \mathbf{T}_3 \cdot \mathbf{T}_1 \cdot \mathbf{f}^{(n)} \tag{4-49}$$

$$\mathbf{f}^{(n+1)} = \mathbf{T}_5 \cdot \mathbf{T}_4 \cdot \mathbf{T}_3 \cdot \mathbf{T}_2 \cdot \mathbf{f}^{(n)} \tag{4-50}$$

onde $\mathbf{T}_k = \mathbf{I} - \eta_{n,k} \cdot (\mathbf{P}_k - \mathbf{I})$ para $\eta_{n,k} \in (0, 2)$ e $k \in \{1,2,3,4,5\}$. Contudo, as versões relaxadas serão temas para trabalhos futuros.

A título de simplificação, de agora em diante, chamaremos a Eq. (4-47) de algoritmo POCS1 e a Eq. (4-48) de algoritmo POCS2.

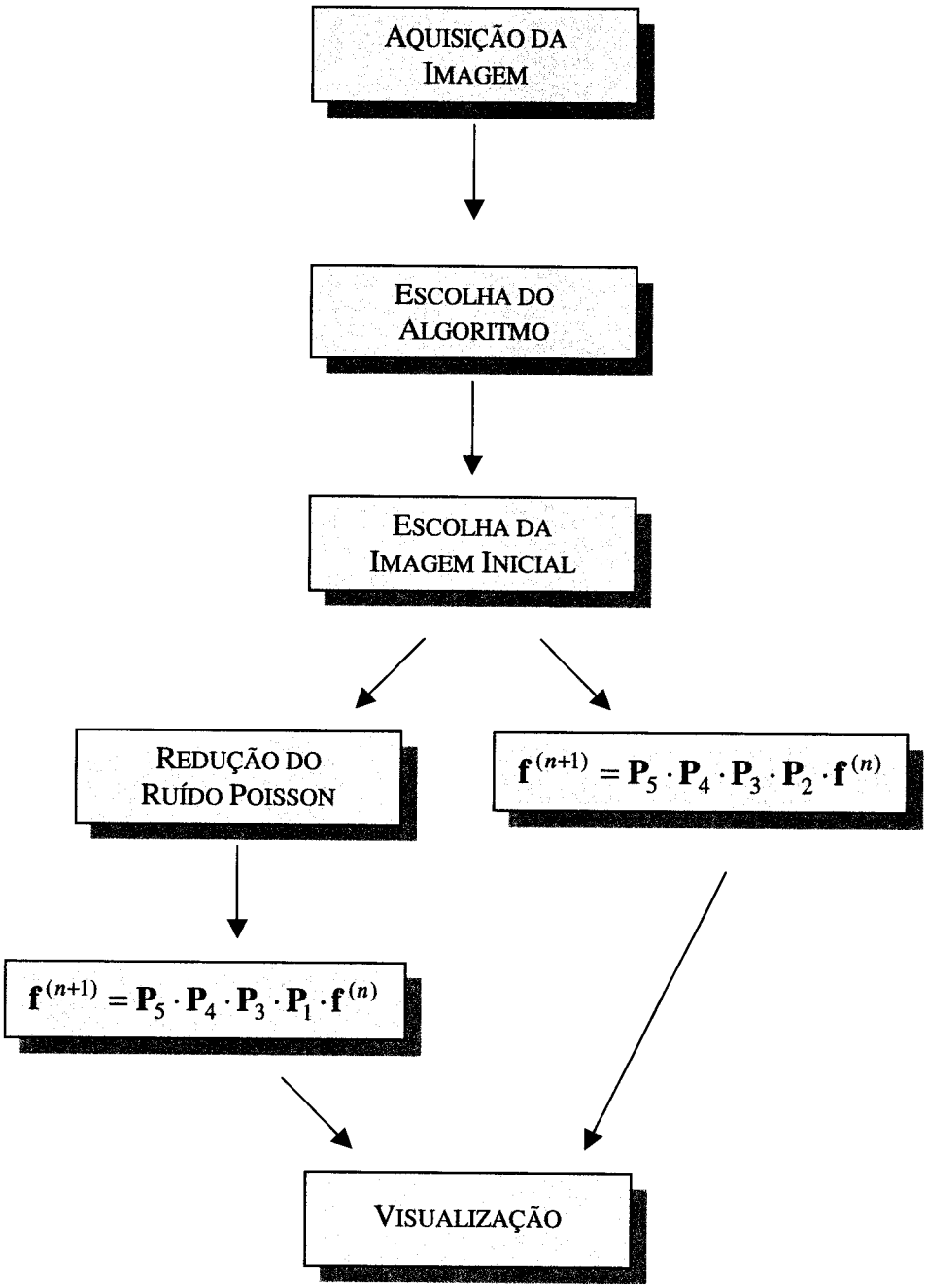


Figura 4-5: Diagrama de blocos dos algoritmos POCS propostos.

4.5 Resultados e Discussões

Esta seção apresenta os resultados experimentais obtidos pela aplicação dos algoritmos iterativos e não lineares, derivados neste capítulo, ao problema de restauração de imagens em microscopia de deconvolução.

4.5.1 Imagens de Estudo e PSF

Para o estudo dos algoritmos POCS foram consideradas as imagens descritas na Seção 3.4.1 do capítulo anterior. Ou seja, os experimentos foram conduzidos sobre as mesmas imagens, reais e sintéticas, estudadas para o caso dos algoritmos lineares. Da mesma forma, consideramos as imagens do *phantom* borradas pela PSF1 e pela PSF2, conforme descrito na Seção 3.4.2, e degradadas por ruído Poisson, variando o parâmetro γ na Eq. (2-17), página 32, conforme descrito na Seção 3.4.3.

4.5.2 Incorporação do Ruído Aditivo Gaussiano

Além do ruído dependente do sinal, presente nas imagens observadas, a metodologia apresentada neste capítulo também considera a presença de ruído aditivo e independente do sinal nas observações.

Dessa forma, para o estudo dos algoritmos POCS com o uso de imagens simuladas, também acrescentamos um ruído Gaussiano e independente do sinal, com média zero, sobre todas as imagens borradas e degradadas por ruído Poisson, conforme descrito no Capítulo 2, página 32.

A variância do ruído aditivo, incorporado em cada imagem, foi determinada de forma que a relação sinal-ruído (SNR) permanecesse constante em 30 dB para todas as simulações. Esta escolha foi baseada em um critério visual e também para garantir que o ruído Poisson permaneça predominante.

A título de ilustração, a Figura 4-6 apresenta as seções das imagens do *phantom* borradas pela PSF1 e pela PSF2, respectivamente, e degradadas por ruído Poisson, considerando apenas o caso onde $\gamma = 1$, na Eq. (2-17), e também por ruído aditivo e independente do sinal a 30 dB.

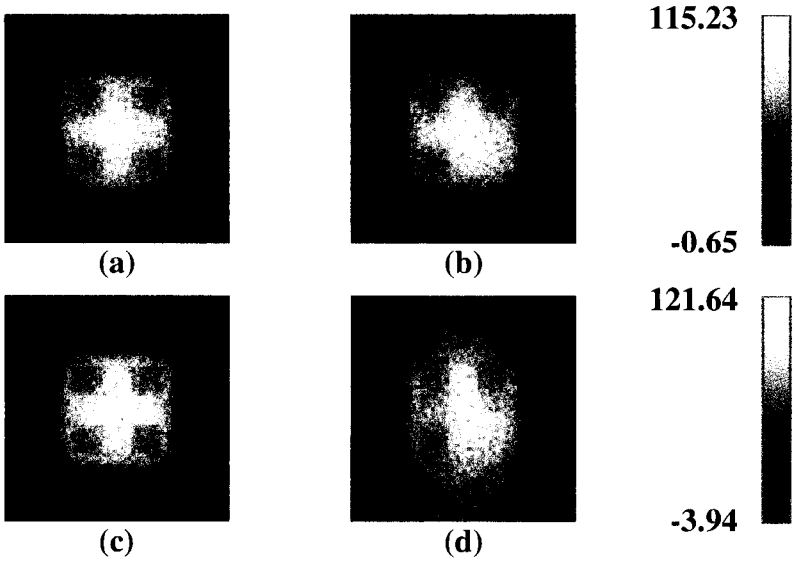


Figura 4-6: Seções das imagens do *phantom* borradas e degradadas por ruído Poisson (γ = 1) e por ruído Gaussiano a 30 dB: (a)-(b) seções no plano *x-y* e *y-z*, respectivamente, da imagem borrada considerando a PSF1; (c)-(d) seções para a imagem borrada pela PSF2.

4.5.3 Medidas, Validações e Critérios de Comparação

Assim como no capítulo anterior, os algoritmos foram testados, avaliados e validados seguindo dois critérios.

Novamente, para o caso das imagens simuladas, os resultados das restaurações foram quantificados através da melhoria na relação sinal ruído (ISNR). Dessa forma, para os propósitos deste capítulo, a ISNR é definida como

$$\mathrm{ISNR} = 10 \cdot \log \frac{\sum_{j=1}^{N} (f_j - g_j)^2}{\sum_{j=1}^{N} (f_j - \hat{f}_j)^2} \tag{4-51}$$

onde, como antes, f_j é o *j*-ésimo componente da imagem verdadeira (*phantom*) $\mathbf{f}$, $\hat{f}_j$ é o *j*-ésimo componente da imagem restaurada $\hat{\mathbf{f}}$ e, agora, g_j é o *j*-ésimo componente da imagem degradada $\mathbf{g}$ (imagem borrada e degradada por ruído Poisson e Gaussiano).

Além disso, os métodos também foram comparados com o algoritmo iterativo *Maximum Likelihood Expectation Maximization* (MLEM), proposto anteriormente

no contexto de microscopia de seccionamento óptico computacional por autores como Holmes (1988), Conchello e Hansen (1990), Holmes et al. (1995) e Conchello (1998). Este algoritmo é apresentado de forma sucinta no Anexo A e implementado no programa XCOSM.

Para o caso das imagens reais, a comparação entre os resultados gerados pelos métodos propostos e os produzidos pelo algoritmo MLEM é visual.

4.5.4 Convergência - Critério de Parada

Embora a convergência do algoritmo POCS seja garantida (desde que a intersecção de todos os conjuntos de restrições seja não vazia), na prática optamos por utilizar um critério de parada.

Dessa forma, o critério adotado consiste em, dado um $\varepsilon > 0$, interromper o processo iterativo se a Eq. (4-52) abaixo for satisfeita [Katsaggelos (1999)].

$$\frac{\left\| \hat{\mathbf{f}}^{(n)} - \hat{\mathbf{f}}^{(n-1)} \right\|}{\left\| \hat{\mathbf{f}}^{(n-1)} \right\|} \leq \varepsilon \tag{4-52}$$

Na expressão acima, $\hat{\mathbf{f}}^{(n)}$ corresponde a uma estimativa da imagem verdadeira no n-ésimo passo e, nos experimentos, o valor de ε foi fixado em $\varepsilon = 0.001$.

4.5.5 Complexidade Computacional dos Algoritmos

Após a construção dos protótipos e dos limites de variação ao redor destes, grande parte do esforço computacional dos algoritmos POCS está no processo iterativo, uma vez que estes impõem restrições conjuntas no domínio espacial e no domínio da freqüência, para cada iteração. De fato, observamos que o esforço computacional necessário para a construção dos conjuntos é muito pequeno comparado com o necessário para o algoritmo atingir o resultado final, ou seja, para convergir, uma vez iniciado o processo iterativo.

Ainda, uma vez que o cálculo das projeções é relativamente simples, a implementação dos algoritmos requer essencialmente o cálculo de duas transformadas discretas de Fourier em cada passo.

EESC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA

Dessa forma, podemos dizer que a complexidade computacional dos algoritmos POCS1 e POCS2, descritos nas Eqs. (4-47) e (4-48), respectivamente, é aproximadamente da ordem de duas DFT por iteração.

Em contraste aos algoritmos POCS, a implementação do algoritmo MLEM requer o cálculo de quatro DFT para cada passo do processo iterativo [Bertero e Boccacci (1998)]. Assim, a complexidade computacional deste método, em cada passo, é aproximadamente duas vezes maior do que a dos algoritmos POCS propostos.

Uma comparação e análise mais acurada das complexidades computacionais destes dois algoritmos serão deixadas para trabalhos futuros.

4.5.6 Avaliação dos Métodos com Dados Simulados

Neste tópico, apresentamos os resultados obtidos com os algoritmos de deconvolução iterativos para o caso das imagens simuladas.

4.5.6.1 Desempenho dos Algoritmos POCS

Algumas observações gerais são necessárias antes da apresentação dos resultados. Na construção dos protótipos para os conjuntos S_1 e S_2 utilizamos os filtros de Wiener e de Goodman-Belsher com parâmetros de regularização $\rho = 1$. Esta opção foi em função do bom desempenho apresentado pelo filtro de Goodman-Belsher neste caso particular.

Para a implementação da DFT utilizamos o algoritmo da transformada rápida de Fourier (*Fast Fourier Transform* – FFT) descrito por Press et al. (1992). Novamente, como no capítulo anterior, para evitar os "artefatos de borda" produzidos pela convolução circular, as imagens foram estendidas e rebatidas nas três direções.

Para estimar a densidade espectral de potência do sinal verdadeiro, optamos por usar a técnica do periodograma [Press et al. (1992)]. Ainda, na derivação da imagem protótipo para o conjunto S_1, a densidade espectral de potência do ruído aditivo foi estimada a partir da sua variância, assumindo que este é branco. Por outro

lado, na derivação da imagem protótipo para o conjunto S_2, o número total médio de contagem de fótons, $\bar{\mu}$, foi estimado a partir da imagem observada.

O protótipo do conjunto S_3 foi construído pela aplicação de um filtro espacial *passa-baixa* (utilizando uma janela volumétrica de 3x3x3 *voxels*) sobre a imagem observada, processada para redução do ruído Poisson. Na derivação do limite de variação para este caso, a variância local da imagem observada e a variância do ruído aditivo foram calculadas a partir da imagem estimada sem ruído Poisson.

Ainda, assumimos $c = 1$ na derivação dos limites de variações para os conjuntos S_1, S_2 e S_3. Observamos que esta escolha foi suficiente para garantir a intersecção dos conjuntos em todos os casos estudados.

O suporte utilizado na construção do conjunto S_5 foi considerado como sendo a extensão do *phantom* original mais 5 *voxels* em todas as direções. Observamos que, muito embora temos o conhecimento real do suporte para o caso das imagens simuladas, optamos por usar um suporte "aproximado", uma vez que na prática este deve ser estimado a partir do conhecimento que se tem da estrutura presente na imagem.

A Figura 4-7 apresenta as imagens para os resultados produzidos pelos algoritmos POCS1, POCS2 e também para o algoritmo MLEM, para o caso das imagens borradas pela PSF1. Assim como no capítulo anterior, sem prejuízo ao entendimento, mostramos apenas as imagens para $\gamma = 1$. No caso do algoritmo POCS1, apresentamos os resultados onde a imagem utilizada para a construção do protótipo foi processada pelos dois algoritmos de redução do ruído Poisson que foram discutidos no Capítulo 3.

Por sua vez, a Figura 4-8 apresenta os resultados para as imagens borradas pela PSF2. A Figura 4-9 e a Figura 4-10 mostram os gráficos de performance em relação a ISNR para todos os casos estudados.

Nestes experimentos, utilizamos a solução de Wiener como a imagem inicial $\mathbf{f}^{(0)}$ nos algoritmos POCS, que convergiram entre 12 e 176 iterações. Além disso, observamos que todos os conjuntos de restrições foram ativados até o critério de parada da Eq. (4-52), página 114, ser satisfeito. Para o algoritmo MLEM, o processo foi interrompido após 1000 iterações.

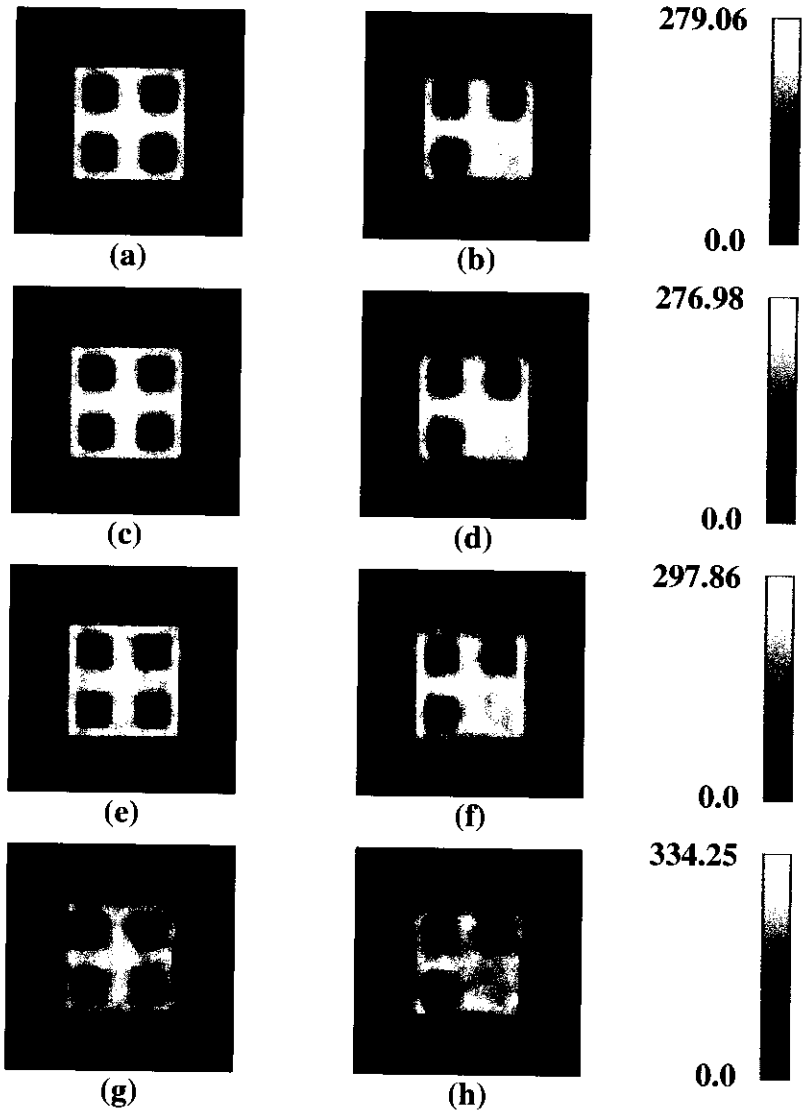


Figura 4-7: Seções nos planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, das imagens restauradas considerando a imagem borrada pela PSF1: (a)-(b) algoritmo POCS1 onde foi utilizada a imagem sem ruído Poisson estimada pelo algoritmo baseado na AT, para a construção do protótipo; (c)-(d) algoritmo POCS1 utilizando a abordagem MAP para a construção do protótipo; (e)-(f) algoritmo POCS2; (g)-(h) algoritmo MLEM.

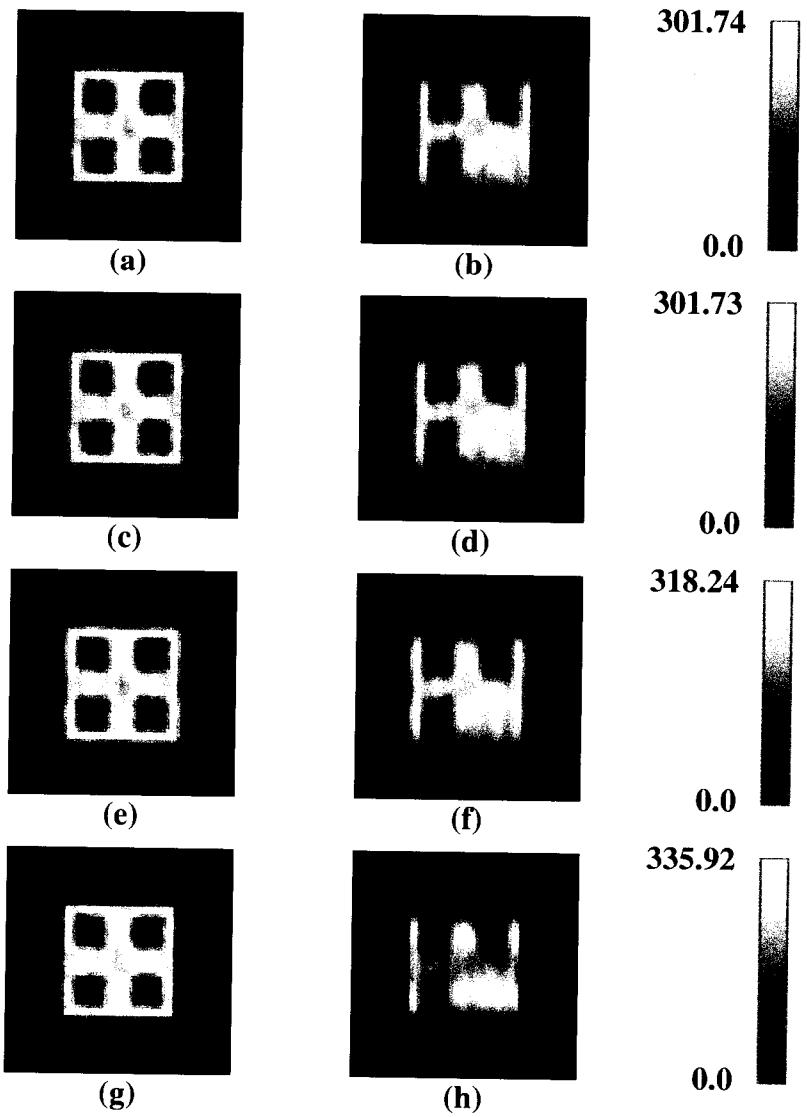


Figura 4-8: Seções nos planos *x-y* e *y-z*, respectivamente, das imagens restauradas considerando a imagem borrada pela PSF2: (a)-(b) algoritmo POCS1 onde foi utilizada a imagem sem ruído Poisson estimada pelo algoritmo baseado na AT, para a construção do protótipo; (c)-(d) algoritmo POCS1 utilizando a abordagem MAP para a construção do protótipo; (e)-(f) algoritmo POCS2; (g)-(h) algoritmo MLEM.

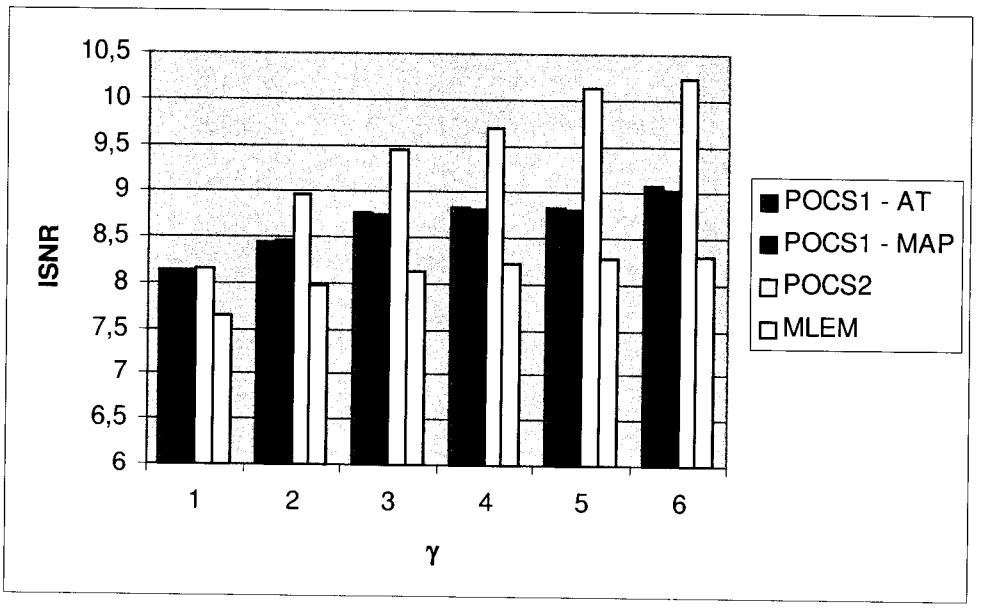


Figura 4-9: ISNR para as restaurações pelos algoritmos POCS e MLEM, para o caso da imagem borrada pela PSF1.

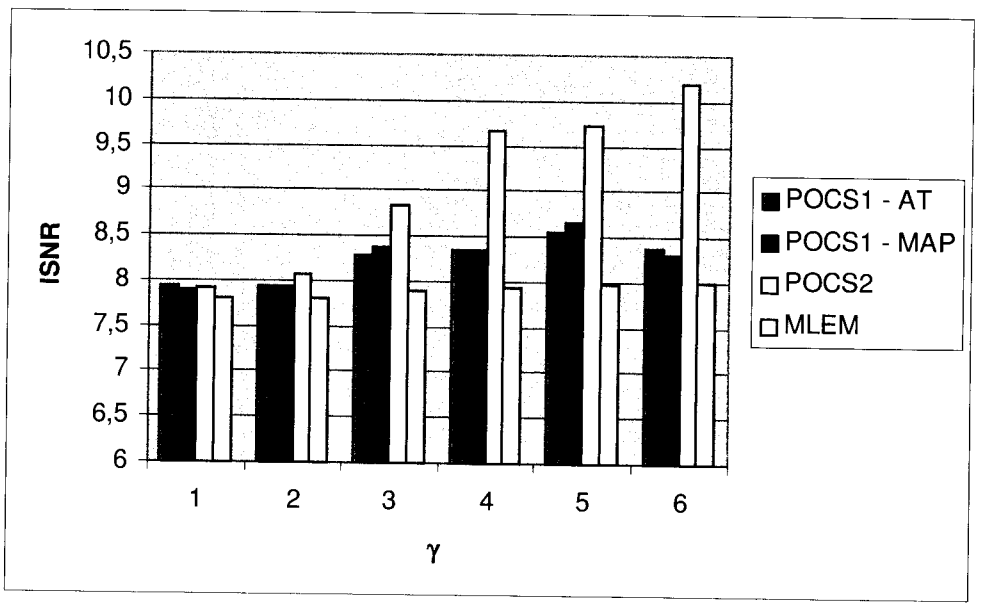


Figura 4-10: ISNR para as restaurações pelos algoritmos POCS e MLEM, para o caso da imagem borrada pela PSF2.

De maneira geral, com base nos resultados apresentados nos gráficos da Figura 4-9 e Figura 4-10, verificamos que os algoritmos propostos são bastante robustos na presença de diferentes níveis de ruído Poisson.

Ainda, observamos que, embora a estimativa para a imagem borrada sem ruído usando o critério da AT seja superior ao critério MAP, o algoritmo POCS1 apresentou uma grande estabilidade para os dois casos. Ou seja, mesmo usando a estimativa da imagem borrada pelo critério AT esse algoritmo não apresentou, na maioria dos casos, uma performance superior, quando comparado aos resultados produzidos utilizando a imagem borrada e sem ruído estimada pelo critério MAP.

Por sua vez, podemos dizer que o algoritmo POCS2 apresentou resultados mais significativos quando comparado aos outros métodos, principalmente para valores de γ elevados.

Em todos os casos, as restaurações das imagens borradas pela PSF2 foram inferiores em relação às restaurações das imagens borradas pela PSF1. Contudo, podemos perceber uma melhora significativa no aspecto visual destas imagens no plano y-z em relação às restaurações produzidas pelos filtros lineares, que foram apresentadas no Capítulo 3.

Com base nos experimentos realizados, observamos que os algoritmos POCS apresentam um desempenho superior ao algoritmo MLEM, segundo o critério da melhoria na relação sinal ruído. Contudo, devemos observar que, diferentemente dos filtros de Wiener e de Goodman-Belsher, que são utilizados para a construção dos protótipos, o algoritmo MLEM não minimiza um critério de erro médio quadrático. De fato, esse algoritmo procura maximizar um critério de verossimilhança. Dessa forma, a comparação entre estes métodos, seguindo o critério da ISNR, não é muito justa neste caso. Apesar disso, na maioria dos experimentos, verificamos que o algoritmo MLEM apresentou um resultado visual inferior em relação àqueles produzidos pelos algoritmos POCS.

Também observamos que os custos computacionais dos algoritmos POCS foram inferiores ao algoritmo MLEM. De fato, nestes experimentos, este último precisou de 1000 iterações para produzir os resultados apresentados na Figura 4-7 e na Figura 4-8, em contraste aos algoritmos POCS que convergiram entre 12 e 176 iterações. Isso representa uma diferença muito significativa entre os custos computacionais dos métodos, uma vez que cada iteração do algoritmo MLEM

precisa calcular quatro DFT ao passo que os algoritmos POCS precisam de apenas duas DFT por iteração.

Devemos notar que, de maneira geral, o algoritmo POCS não é conhecido por possuir uma convergência rápida [Stark e Yang (1998)]. Pelo contrário, na maioria das aplicações, o algoritmo pode precisar além de 1000 iterações para um resultado aceitável. Evidentemente, isto depende da aplicação e dos conjuntos de restrições usados. Contudo, este não é o caso para os algoritmos propostos neste trabalho.

Mais ainda, observamos que as imagens geradas após algumas poucas iterações dos algoritmos POCS, digamos, por exemplo, 10 iterações, são bastante similares àquelas produzidas após a convergência. Mesmo nos casos onde o algoritmo convergiu em um número de iterações superior a 100, as imagens após 10 ou 15 iterações são muito próximas da solução final obtida. Verificamos que esta diferença é da ordem de décimos para os valores de intensidades dos *voxels*.

Isso sugere que podemos parar o algoritmo após algumas poucas iterações obtendo uma solução muito próxima da que seria obtida caso deixássemos o algoritmo convergir. Em outras palavras, podemos alterar convenientemente o valor de ε na Eq. (4-52), página 114, de forma a permitir apenas algumas iterações. Em contraste ao algoritmo MLEM, isso permite uma redução ainda maior no custo computacional dos algoritmos POCS.

Todavia, lembramos que as conclusões a respeito da complexidade computacional dos algoritmos POCS propostos, principalmente quando comparada ao algoritmo MLEM, ainda são preliminares. De fato, uma análise mais acurada da complexidade destes métodos e uma comparação mais efetiva com o algoritmo MLEM deverão ser realizadas.

4.5.6.2 Efeito da Restrição de Suavização

Para ilustrar o efeito da restrição de suavização imposta pelo conjunto S_3, considere os resultados da restauração do *bead* apresentado na Figura 3-5, página 69. A Figura 4-11a mostra a seção central do *bead* restaurado utilizando apenas os conjuntos S_1 e S_4, ou seja, restaurado pelo algoritmo POCS utilizando apenas a restrição baseada na solução de Wiener e a restrição de positividade. A Figura 4-11b

ilustra o resultado da restauração com o uso dos conjuntos S_1, S_3 e S_4, ou seja, incorporando a restrição de suavização. Observamos que sem a restrição imposta por S_3, o resultado apresenta artefatos ao redor do objeto de interesse. Esta conclusão é válida para todos os casos estudados.

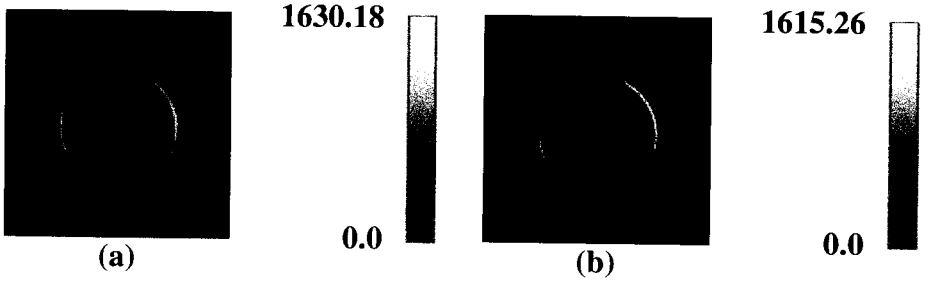


Figura 4-11: (a) Restauração da imagem do *bead* usando as restrições impostas pelos conjuntos S_1 e S_4; (b) Restauração usando os conjuntos S_1, S_3 e S_4.

4.5.6.3 Efeito da Restrição de Suporte Compacto

Segundo Sementilli et al. (1993), filtros lineares como o filtro de Tikhonov ou a solução de Wiener, são capazes de recuperar freqüências até o limite definido pela freqüência de corte. Desta forma, para estudar a capacidade de super-resolução dos algoritmos propostos neste trabalho, procuramos avaliar o módulo da DFT das imagens restauradas em comparação com a solução de Wiener.

A Figura 4-12a e a Figura 4-12b mostram as seções centrais do módulo da DFT, nos planos *u-v* e *v-w*, respectivamente, da imagem do *phantom* borrada pela PSF1, apresentada na Figura 3-11, página 73. A Figura 4-12c e Figura 4-12d mostram as seções correspondentes para a imagem restaurada pelo filtro de Wiener. O filtro, neste caso, foi aplicado sobre a imagem borrada e sem ruído Poisson estimada (usando a abordagem baseada na AT). A Figura 4-12e e a Figura 4-12f mostram as seções da DFT, correspondentes aos planos *u-v* e *v-w*, respectivamente, relativas a imagem restaurada pelo algoritmo POCS utilizando apenas os conjuntos S_2 e S_4. Por último, a Figura 4-12g e a Figura 4-12h mostram as seções da DFT que correspondem à imagem restaurada pelo algoritmo POCS utilizando os conjuntos S_2, S_4 e S_5.

Estas imagens foram geradas através da expressão

$$D[m,n,o] = c \cdot log\left(1 + |F[m,n,o]|\right), \tag{4-53}$$

onde m, n, $o \in \mathbb{Z}$, $D[m,n,o]$ é a imagem mostrada, $F[m,n,o]$ é a DFT da imagem analisada e em todos os casos, assumimos $c = 1$ [Gonzalez e Woods (1992)].

Neste experimento, o suporte foi considerado como sendo a extensão do *phantom* original mais 5 *voxels* em todas as direções. Verificamos que apenas a restrição de positividade já é capaz de incorporar alguns componentes de freqüência. Já com o uso da restrição de suporte compacto, observamos um aumento considerável de freqüências em comparação com a solução de Wiener.

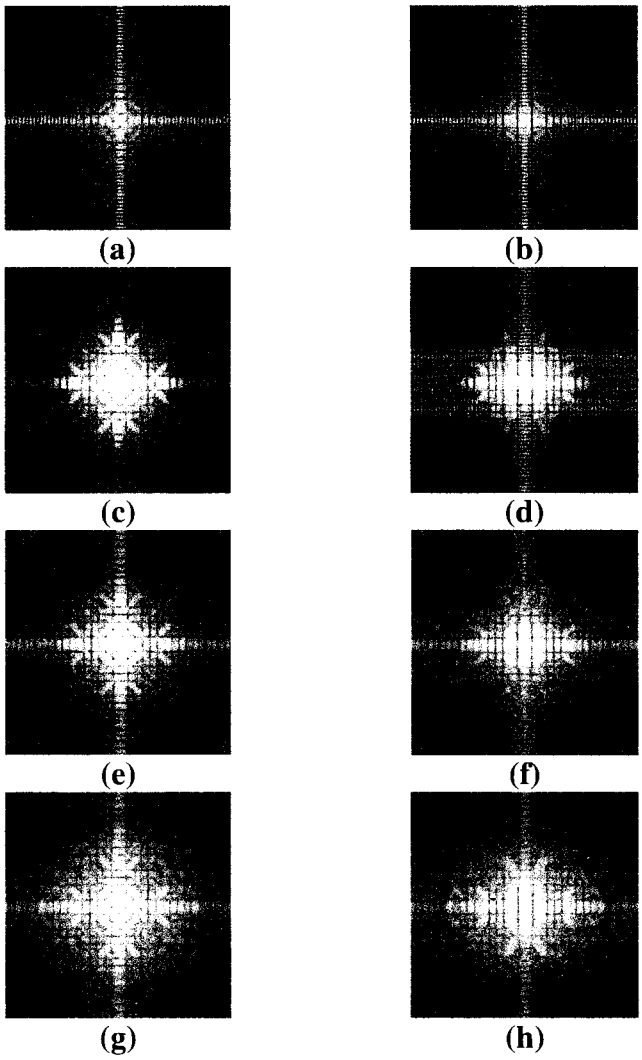


Figura 4-12: Ilustração do efeito da restrição de suporte compacto: (a)-(b) módulos das seções centrais da DFT da imagem observada nos planos *u-v* e *v-w*, respectivamente; (c)-(d) módulo da DFT da solução de Wiener; (e)-(f) módulo da DFT da imagem restaurada pelo algoritmo POCS utilizando os conjuntos S_2 e S_4; (g)-(h) módulo da DFT da imagem restaurada pelo algoritmo POCS usando os conjuntos S_2, S_4 e S_5.

4.5.7 Avaliação dos Métodos com Imagens Reais

A Figura 4-13 e a Figura 4-14 apresentam os resultados obtidos com os algoritmos propostos para duas imagens de espécimes biológicos reais e, por sua vez, a Figura 4-15 apresenta os resultados das restaurações para uma imagem de *bead*. As imagens de testes utilizadas são as mesmas apresentadas na Seção 3.4.1, página 68.

Ainda, a título de comparação entre os métodos, repetimos aqui os resultados obtidos com os filtros lineares, apresentados na Seção 3.4.6, página 86, além das imagens restauradas pelos algoritmos MLEM e RLLS.

As restaurações obtidas com o algoritmo MLEM nas três figuras foram obtidas após 1000 iterações. Por sua vez, apresentamos apenas os resultados que correspondem ao algoritmo POCS2, uma vez que este foi o método que apresentou melhor performance nos experimentos com imagens simuladas. Neste caso, para a imagem da Figura 4-13b o algoritmo convergiu em 87 iterações, para a Figura 4-14b, em 46 iterações e o resultado apresentado na Figura 4-15b foi obtido após 73 iterações.

A partir destas imagens, observamos que os resultados visuais apresentados pelos algoritmos POCS e MLEM são muito semelhantes, seja no caso de espécimes biológicos assim como para a restauração da imagem do *bead*. De fato, os resultados visuais gerados por estes dois métodos foram muito próximos em todos os casos de imagens reais estudados. Ainda, podemos verificar a superioridade destes resultados em relação aqueles produzidos pelos métodos lineares.

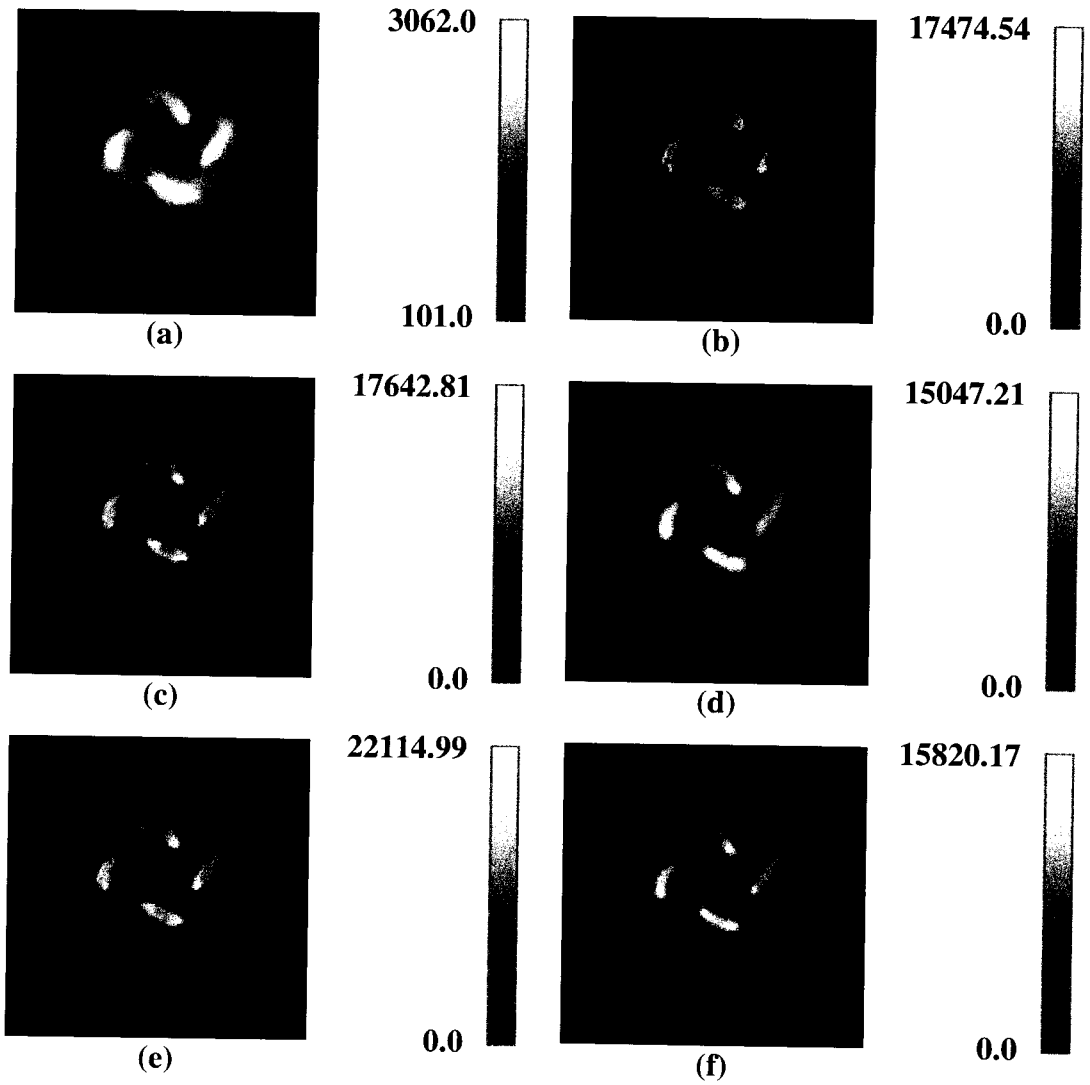


Figura 4-13: Seções da imagem 3D do embrião Volvox adquirida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 100X, 1.3 NA de imersão em óleo e utilizando um filtro para $\lambda = 0.530$ μm: (a) imagem observada; (b) imagem restaurada pelo algoritmo POCS2; (c) imagem restaurada pelo algoritmo de Goodman-Belsher; (d) imagem restaurada pelo algoritmo MAP linearizado; (e) imagem restaurada pelo algoritmo MLEM; (f) imagem restaurada pelo algoritmo RLLS.

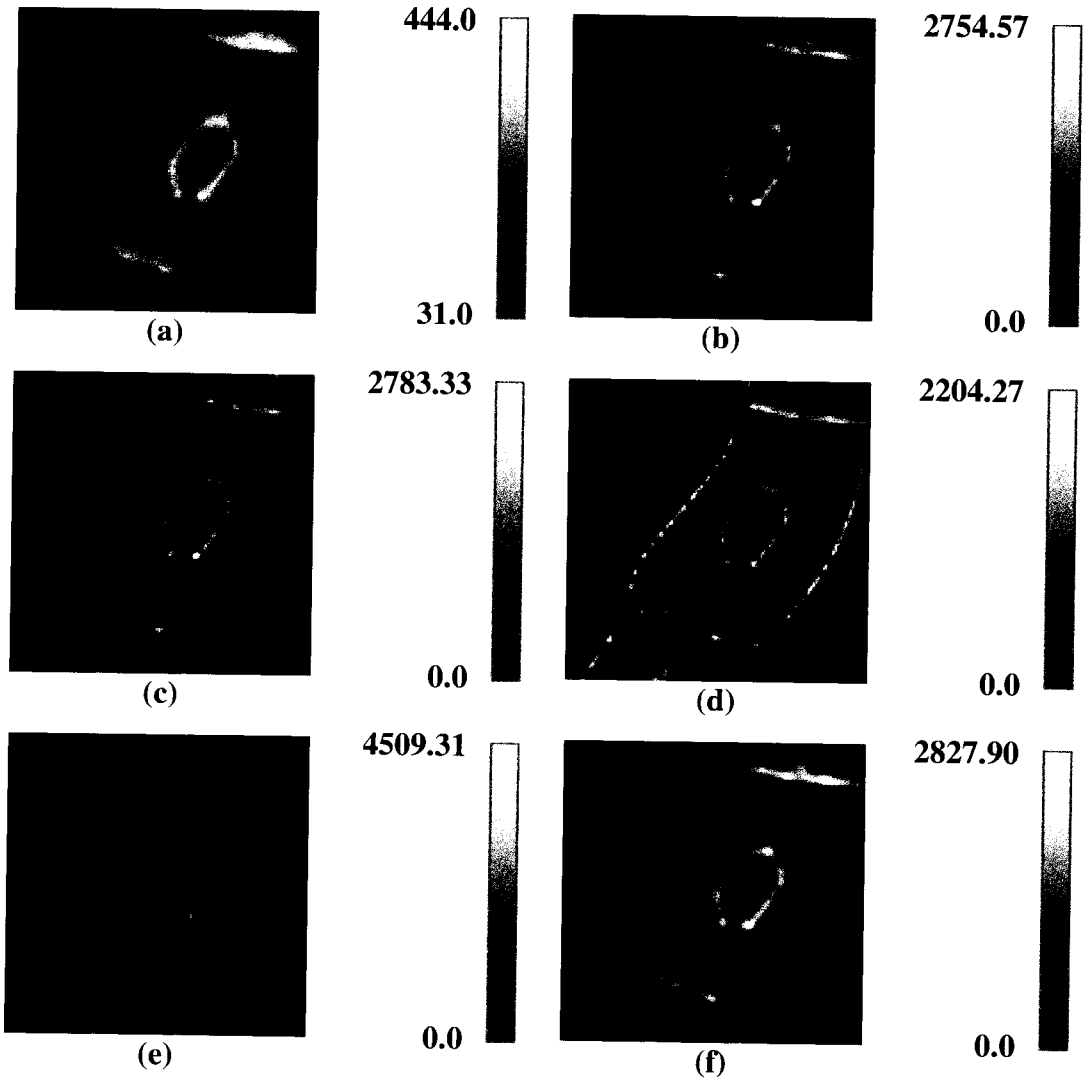


Figura 4-14: Seções da imagem 3D de retículo endoplasmático adquirida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 20X, 0.75 NA e um filtro para λ = 0.530 μm: (a) imagem observada; (b) imagem restaurada pelo algoritmo POCS2; (c) imagem restaurada pelo algoritmo de Goodman-Belsher; (d) imagem restaurada pelo algoritmo MAP linearizado; (e) imagem restaurada pelo algoritmo MLEM; (f) imagem restaurada pelo algoritmo RLLS.

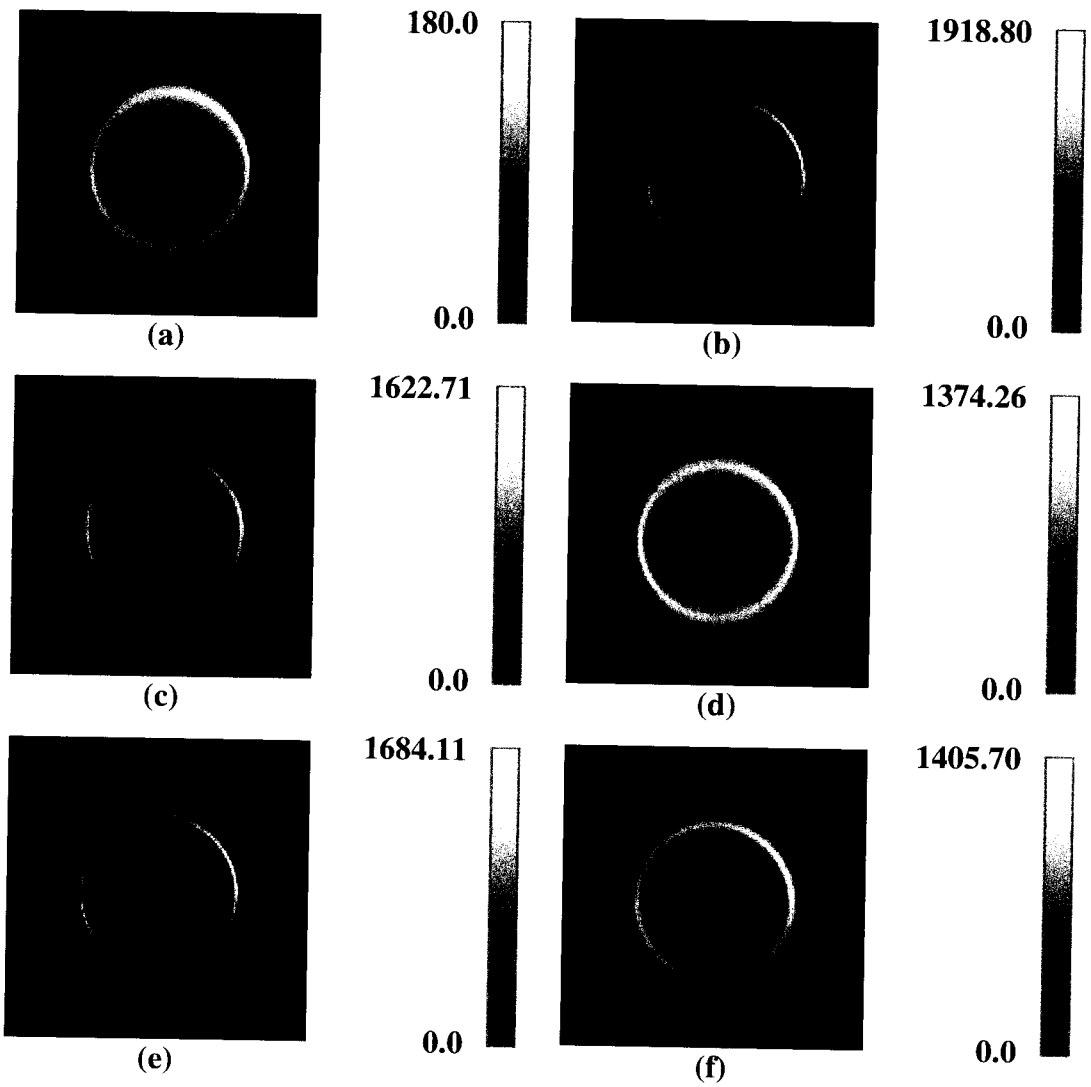


Figura 4-15: Seções da imagem 3D do *bead* obtida com um microscópio de fluorescência *wide-field* usando uma objetiva de 60X, 1.4 NA de imersão em óleo e um filtro para λ = 0.635 μm: (a) imagem observada; (b) imagem restaurada pelo algoritmo POCS2; (c) imagem restaurada pelo algoritmo de Goodman-Belsher; (d) imagem restaurada pelo algoritmo MAP linearizado; (e) imagem restaurada pelo algoritmo MLEM; (f) imagem restaurada pelo algoritmo RLLS.

4.6 Conclusão

Neste capítulo, apresentamos e discutimos novos algoritmos iterativos e não lineares baseados na teoria de Projeções sobre Conjuntos Convexos, para a restauração de imagens tridimensionais obtidas em microscopia de deconvolução.

Os algoritmos foram avaliados para diferentes níveis de ruído Poisson e também para duas funções de espalhamento pontual com características diferentes.

De maneira geral, nos estudos com imagens simuladas, todos os métodos apresentaram uma boa performance em relação à melhoria na relação sinal ruído, adotada para quantificar os resultados das restaurações.

Os resultados também demonstraram que os algoritmos propostos são bastante robustos na presença de altos níveis de ruído Poisson.

Ainda, apresentaram uma boa performance visual quando analisados com imagens reais e também quando comparados com outros métodos propostos na literatura.

Particularmente, os algoritmos POCS apresentaram resultados superiores aos produzidos pelos métodos lineares, especialmente quando o filtro de Goodman-Belsher é utilizado para a construção do protótipo.

Também observamos que, embora a abordagem para redução do ruído Poisson baseada na transformação de Anscombe demonstrou superioridade em relação ao critério MAP, o algoritmo POCS, com a imagem protótipo derivada a partir da solução de Wiener, produziu resultados similares utilizando as duas estimativas.

A partir da análise do módulo da transformada de Fourier das imagens restauradas, verificamos a capacidade dos algoritmos em recuperar parte das freqüências perdidas devido ao cone de freqüências nulas gerado pela função de transferência do microscópio.

Apesar dos métodos propostos apresentarem uma rápida convergência, precisando na maioria dos casos estudados de menos de 100 iterações para convergir (mesmo sem relaxação), observamos que a estimativa da imagem verdadeira, após algumas poucas iterações, é muito próxima a do resultado final.

Esta observação sugere que podemos interromper o algoritmo POCS após algumas iterações (por exemplo, 10 ou 15), obtendo uma estimativa da imagem verdadeira muito similar àquela que seria obtida, caso esperássemos a convergência do algoritmo.

Esta conclusão é muito importante pois, como discutido no Capítulo 2, o tempo de processamento é um dos principais fatores limitantes em COSM.

Sendo assim, os algoritmos propostos podem fornecer uma solução similar, ou superior, àquela que seria obtida com o algoritmo MLEM, com um número muito menor de iterações.

Contudo, devemos observar que as complexidades computacionais dos algoritmos POCS e MLEM são diferentes, sendo que comparações mais efetivas, levando em consideração o tempo de processamento para cada iteração e a qualidade dos resultados finais para os dois métodos, devem ser realizadas.

Capítulo 5 Esqueletização Tridimensional

5.1 Introdução

Nos últimos anos, têm-se constatado um crescente interesse nos estudos relacionados à questão da *estrutura* e da *função* de espécimes fisiológicos, sendo que, em diversos trabalhos, é notória a conclusão que *"forma"* e *"função"* possuem uma estreita correlação, definindo os mecanismos de funcionamento de uma célula.

Particularmente, alguns autores também demonstram a importância de medidas morfológicas quantitativas de estruturas vasculares [Can et al. (1999)] – como vasos e artérias – e de estruturas neurais [Capowski e Sedivec (1981)] [Costa (1995)] [Simic et al. (1997)] [Costa e Velte (1999)], como uma forma de estudá-las.

No campo específico da neurociência, as células neurais são caracterizadas por um conjunto de prolongamentos (chamados de *processos)* que correspondem aos dendritos e ao axônio, sendo que a função de cada neurônio pode ser especificada pela extensão e espessura destes prolongamentos [Costa (2000)]. Dessa forma, o conhecimento sobre a maneira como a morfologia neural se relaciona com a função de determinada célula é considerado um dos principais meios para se estudar e entender o funcionamento dos processos neurais [Costa (1995)]. Uma vez verificado que as propriedades funcionais dos neurônios são associadas com o formato de suas membranas, técnicas de reconstrução tridimensional de neurônios podem ser ferramentas valiosas para estudos *neuromorfométricos.*

Segundo Streekstra e Pelt (2002), algumas características básicas relacionadas à topologia do neurônio como a linha central dos seguimentos (também conhecido como esqueleto), a espessura do dendrito para cada ponto sobre esta linha, a posição das bifurcações e os pontos finais dos prolongamentos, são suficientes para derivar modelos elétricos e morfológicos para os processos neurais [Stockley et al. (1993)].

Dessa forma, além da reconstrução tridimensional, para um entendimento mais completo destes processos, deve-se adicionar mecanismos para extração de medidas representativas e significativas, como o comprimento e a espessura dos dendritos. Neste contexto, Costa e Velte (1999) propuseram uma série de medidas

EESC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

específicas para a classificação de processos neurais como, por exemplo, a *área de influência*, além das já citadas *comprimento* e *espessura*.

O problema da reconstrução de neurônios [Toga (1990)] produzindo modelos representativos da árvore dendrítica como, por exemplo, dendrogramas [Cesar e Costa (1997)], ou ainda, modelos de cilindros generalizados [Herzog et al. (1997)] [Xu et al. (1998)], com o objetivo de representar a estrutura neural, é frequentemente denominado de *neuron tracing*.

Uma descrição detalhada da história inerente ao problema da reconstrução de neurônios (*neuron tracing*) pode ser encontrada em Capowski e Sedivec (1981).

De maneira geral, os sistemas atuais são semi-automáticos necessitando da intervenção humana, onde, frequentemente, é o usuário que determina quais são as estruturas de interesse que deverão ser incorporadas no processo de reconstrução [Capowski e Sedivec (1981)] [Burton (1999)]. Algumas tentativas para a automatização deste processo podem ser mencionas como o trabalho de Cohen et al. (1994) para reconstrução 3D de neurônios obtidos em microscopia confocal e o trabalho de Can et al. (1999) que, embora proposto para o caso de reconstrução vascular através de angiogramas, pode ser estendido para a aplicação em neurônios [Al-Kofahi et al. (2002)].

Contudo, as técnicas automáticas existentes frequentemente falham em produzir modelos aceitáveis [Sharein et al. (1994)] e procedimentos semi-automáticos [Coleman et al. (1977)] [Cesar e Costa (1997)] são particularmente trabalhosos. Ainda, podemos dizer que problemas como a velocidade de processamento, a grande quantidade de dados necessários à reconstrução, a automação completa e a sensibilidade ao ruído ainda são temas de estudo.

Dessa forma, pesquisas direcionadas para a geração de procedimentos mais efetivos vêm se tornando cada vez mais numerosas com o aumento significativo de técnicas capazes de fornecer grande quantidade de dados volumétricos, como é o caso, por exemplo, da microscopia de fluorescência [Sharein et al. (1994)] [Herzog et al. (1997)] [Xu et al. (1998)] [Al-Kofahi et al. (2002)].

Nesse sentido, a busca por algoritmos para reconstrução tridimensional e extração de medidas capazes de descrever adequadamente um modelo para o neurônio são problemas em aberto e de grande relevância.

Sendo assim, o principal objetivo deste capítulo é fornecer uma ferramenta que possa ser utilizada para a extração de medidas de interesse em *neuromorfometria computacional.*

Para isso, propomos um algoritmo de esqueletização para estruturas tubulares – como os dendritos dos neurônios ou estruturas vasculares como veias e artérias – baseado em uma abordagem contínua e que pode ser implementado através de algoritmos de transformada rápida de Fourier (*Fast Fourier Transform* – FFT).

O conceito de esqueleto é uma ferramenta poderosa para a extração de medidas morfométricas sendo identificado como um mecanismo adequado para representar a estrutura de um contorno. De fato, algoritmos de esqueletização fornecem ferramentas importantes em muitas aplicações como visão computacional, processamento e análise de imagens, compactação de dados etc. Uma razão particular que justifica a importância de esqueletos em processamento visual é o papel da simetria na percepção visual humana [Costa e Cesar (2000)].

O algoritmo proposto possui características desejáveis como baixo custo computacional, pouca sensibilidade à complexidade do contorno e suavidade da curva produzida.

Aliado às técnicas de deconvolução para imagens obtidas em microscopia de fluorescência, o método proposto pode fornecer uma ferramenta valiosa em neuromorfometria.

De fato, vários trabalhos já demonstraram o uso de microscopia confocal para aquisição de imagens volumétricas de neurônios com a finalidade de extração de medidas [Sharein et al. (1994)] [Belichenko e Dahlström (1995)] [Herzog et al. (1997)] [Xu et al. (1998)] [Al-Kofahi et al. (2002)]. Contudo, até onde podemos observar, não foram relatados trabalhos utilizando microscopia *wide-field* para este propósito. Portanto, as técnicas de restauração de imagens propostas nos capítulos anteriores podem ser aliadas aos mecanismos de esqueletização de forma a incorporar o uso da microscopia de deconvolução em estudos *neuromorfométricos.*

A próxima seção introduz o conceito de esqueleto e uma breve revisão dos principais algoritmos existentes. Posteriormente, o método proposto para esqueletização de estruturas tubulares é apresentado.

5.2 Esqueleto: Definição e Algoritmos

Existe uma grande variedade de métodos propostos na literatura para a geração de esqueletos bidimensionais ou tridimensionais, sendo que a classificação destes algoritmos, assim como a própria definição de esqueleto, não é única.

A idéia por trás do procedimento de esqueletização é buscar uma representação do objeto com a menor quantidade de informação possível sendo que, informalmente, podemos dizer que um esqueleto é uma representação que reduz um contorno bidimensional (ou tridimensional) a uma forma mais simples, mantendo as propriedades topológicas do objeto original. Isto significa dizer que, em tese, o esqueleto deve ser insensível a variações de tamanho, rotação e translação [Gonzalez e Woods (1992)].

Para os nossos propósitos, o esqueleto de uma região pode ser definido através da transformada do eixo médio (*Medial Axis Transform* – MAT), também conhecida como transformada do eixo de simetria (*Symmetric Axis Transform* – SAT), originariamente definida por Blum (1967), Blum (1973) e Blum e Nagel (1978), motivado por critérios biológicos, como uma forma de expressar a simetria de um contorno.

O eixo médio (*Medial Axis* – MA) ou eixo de simetria (*Symmetric Axis* – SA) é o lugar geométrico de todos os pontos que são eqüidistantes de pelo menos dois pontos pertencentes à borda do objeto, e frequentemente pode ser obtido através da Transformada da Distância (*Distance Transform* – DT) [Niblack et al. (1992)]. Em outras palavras, o eixo médio é composto pelo conjunto dos centros de todos os círculos (para o caso bidimensional) ou esferas (para o caso tridimensional) interiores máximos.

Conjuntamente com uma função que especifica o raio da máxima circunferência ou esfera centrada em qualquer ponto sobre ele, o eixo médio define a representação MAT (ou SAT). A título de exemplo, a Figura 5-1 ilustra o MAT para uma região retangular bidimensional. Neste sentido, o eixo médio, ou eixo de simetria, confunde-se com o conceito de esqueleto.

O conceito de MAT (ou SAT) foi estendido por Gauch e Pizer (1993) para representar esqueletos de imagens bidimensionais em tons de cinza através da

definição do Eixo de Simetria de Intensidade (*Intensity Axis of Symmetry* – IAS). A idéia básica é pensar na imagem em tons de cinza como uma superfície tridimensional e definir as curvas de níveis para esta superfície. Isso pode ser obtido simplesmente considerando a superfície como "gráfico de função". O IAS é então construído a partir do MAT para cada curva de nível da imagem.

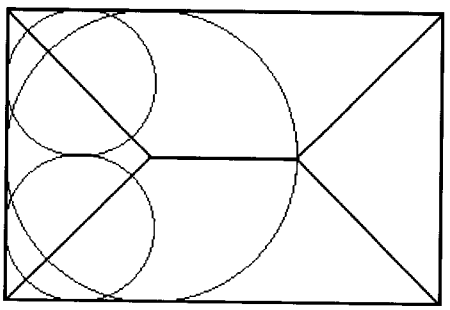


Figura 5-1: Representação do eixo médio para uma região retangular ilustrando três circunferências de raios máximos centradas em pontos distintos sobre o eixo médio.

Além de características como invariância à escala, rotação e translação, em tese, o esqueleto ideal deve possuir ao menos três características principais: a preservação da conectividade[18] entre os pontos do esqueleto, centralização e possuir apenas um *pixel* (ou *voxel*) de espessura. Podemos citar ainda como características desejáveis um baixo custo de processamento computacional, baixa sensibilidade à complexidade do contorno do objeto e que a curva gerada seja suave.

Evidentemente, não existe um algoritmo que satisfaça a maioria destas propriedades. De maneira geral, uma das alternativas é assumir que a conectividade deve ser preservada ao passo que outras condições possam ser relaxadas [Niblack et al. (1992)].

Os principais algoritmos de esqueletização podem ser divididos em duas classes genéricas: algoritmos de *thinning* (também conhecidos como algoritmos de erosão) [Lam et al. (1992)] e algoritmos baseados na DT [Niblack et al. (1992)]. Evidentemente, esta classificação é genérica e não é única, sendo que nem todos os algoritmos existentes podem ser facilmente classificados em uma destas duas categorias. A título de exemplo, vale mencionar outra classificação proposta por Wright (1995), que divide os algoritmos em função da abordagem utilizada para se

[18] Conectividade significa que o esqueleto deve ter o mesmo número de *componentes* que o objeto.

obter o resultado almejado. Wright separa os métodos existentes em quatro grandes categorias que são os algoritmos de *thinning*, algoritmos de propagação de ondas, algoritmos baseados na transformada da distância e, por último, algoritmos baseados em técnicas analíticas.

Os métodos que pertencem à primeira classe, os algoritmos de erosão, procuram eliminar iterativamente, camada por camada, os pontos que pertencem à borda do objeto através da identificação daqueles pontos que podem ser removidos sem afetar a topologia do objeto [Zhou e Toga (1999)]. Verifica-se que, de maneira geral, este procedimento possui um custo muito alto do ponto de vista computacional, uma vez que cada ponto do objeto deve ser testado para determinar se pode ou não ser eliminado. Ainda, uma atenção especial é necessária para preservar a conectividade dos pontos que pertencem ao esqueleto, o que não é uma tarefa trivial.

Freqüentemente, para o caso tridimensional, é difícil demonstrar que algoritmos de esqueletização baseados nesta abordagem preservam a conectividade entre os *voxels* [Zhou e Toga (1999)].

Embora existam diversos algoritmos de *thinning* 2D propostos, a extensão do problema para o caso 3D é muito mais difícil. De fato, o problema de esqueletização 3D frequentemente é mais complicado do que o caso 2D, em função do grau de liberdade extra na localização do ponto. Um algoritmo desta classe proposto para o caso 3D é o método de Tsao e Fu (1981), sendo que, também podemos citar os trabalhos de Ma (1995) e Ma e Sonaka (1996).

Diferentemente dos algoritmos de erosão, os métodos baseados na transformada da distância procuram os esqueletos baseados em uma métrica. A DT produz a menor distância entre cada ponto interior do objeto até a sua borda, sendo que, posteriormente, o esqueleto é identificado através dos máximos locais [Niblack et al. (1992)].

Particularmente, diferentes métricas podem ser usadas como a *chessboard* [Arcelli e di Baja (1985)], a *cityblock* [Arcelli e di Baja (1989)], a hexagonal [Meyer (1988)], a quase-euclideana [Montanari (1968)] e a métrica euclideana [Ho e Dyer (1986)]. Esta última é a escolha mais natural em função da sua isotropia, contudo não é a mais adequada devido à natureza discreta das imagens digitalizadas.

A qualidade dos resultados, assim como o custo computacional dos algoritmos, varia consideravelmente em função da escolha da métrica. Por exemplo, a DT usando a métrica *cityblock* ou a *chessboard* promovem resultados mais rápidos quando comparadas a DT usando a métrica euclideana, contudo os resultados frequentemente são inferiores.

Todavia, algoritmos baseados na DT não são eficientes. Embora este procedimento seja direto, é relativamente caro do ponto de vista computacional, uma vez que a distância deve ser avaliada para todos os pontos da região interior do objeto. Observamos que, evidentemente, este problema é agravado para grandes quantidades de dados como é o caso de estruturas tridimensionais [Pudney (1996)].

Assim como nos algoritmos de erosão, uma das maiores dificuldades nos algoritmos baseados na DT é a preservação da conectividade entre os pontos que pertencem ao esqueleto. De maneira geral, podemos dizer que ambas as abordagens, embora definidas sob critérios diferentes, possuem problemas semelhantes, seja para o caso bidimensional como para o tridimensional.

Outras abordagens podem ser mencionadas como por exemplo o algoritmo de "*extinção e propagação de fogo*" baseado em um modelo de "*grass fire*" [Montanari (1969)] [Xia (1989)] e algoritmos baseados no diagrama de Voronoi [Kirkpatrick (1979)] [Ogniewicz e Ilg (1992)]. Particularmente, métodos baseados no diagrama de Voronoi são mais adequados para objetos poligonais, garantindo teoricamente esqueletos conectados. Contudo, objetos com contorno muito irregular tornam o diagrama muito denso [Zhou e Toga (1999)].

Ainda, podemos dizer que a maioria das abordagens propostas para o caso 3D são baseadas em procedimentos discretos e/ou aproximados para determinar o MA. Podemos citar algumas poucas abordagens contínuas, como o trabalho de Dutta e Hoffmann (1993), os algoritmos de Brandt e Algazi (1992) e Levender et al. (1992), baseados no diagrama de Voronoi, os algoritmos de Reddy e Turkiyyah (1995) e Sheehy et al. (1996), baseados na triangulação de Delaunay e, finalmente, o algoritmo proposto por Ahuja e Chuang (1997) e Chuang et al. (2000), baseado na teoria de campos potenciais. Este último é a base e motivação para o método de esqueletização proposto no presente texto.

5.3 Esqueletização e Campos Potenciais

Ahuja e Chuang (1997) e Chuang et al. (2000) propuseram uma abordagem contínua de esqueletização bidimensional e tridimensional baseada na teoria de campos potenciais. Neste caso, ao invés de uma métrica, usa-se uma função escalar definida como o campo potencial gerado por uma distribuição uniforme de cargas elétricas sobre a borda do objeto. Observa-se que a função potencial e a função distância (métrica) produzem estruturas espaciais similares como *picos*, *vales* e *pontes*.

Esta metodologia é capaz de aumentar significativamente a performance computacional. De fato, o uso de campos potenciais ajuda a evitar a tarefa cara de calcular a transformada da distância em cada *pixel/voxel*.

De acordo com um modelo teórico, a magnitude do campo potencial é infinita para os pontos na região da borda e decai rapidamente em função da distância. Assume-se que a borda do objeto possui uma distribuição uniforme de cargas elétricas e os vales produzidos pelo campo potencial resultante são usados para estimar o MA. De fato, os pontos ao longo do "vale de potencial" gerado no interior do objeto são intimamente relacionados com os ramos do MA.

A título de ilustração, a Figura 5-2a mostra o campo de vetores associado com o esqueleto da região retangular apresentada na Figura 5-1. A Figura 5-2b ilustra o campo de vetores associado a uma região em forma de "L" e a Figura 5-2c mostra o respectivo esqueleto.

A partir destas imagens fica evidente a estreita relação entre o campo de vetores associado a um campo potencial, gerado por uma distribuição uniforme de cargas sobre a borda do objeto, e o MA. Observamos que os vales de potencial correspondem aos pontos de mínima magnitude da força resultante, gerada pelo campo de vetores.

Uma vez que a direção da força depende de todos os pontos da borda e não apenas dos pontos vizinhos, o vale de potencial é contínuo e sua localização é espacialmente suave e insensível às perturbações sobre a região da borda [Chuang et al. (2000)].

O algoritmo considerado em Chuang et al. (2000) para o caso tridimensional foi proposto para estruturas poliedrais onde se conhece uma expressão analítica para o campo potencial. A partir deste campo, dado um conjunto de pontos iniciais, o algoritmo segue as linhas de força associadas ao campo de vetores até alcançar uma configuração de equilíbrio, gerando o esqueleto desejado. O algoritmo pode ser descrito como segue.

Dado um conjunto de pontos iniciais:

1. Segue-se a direção contrária da força até que um ponto de força nula seja obtido, isto é, um potencial mínimo seja alcançado;
2. Repita o passo 1 para todos os pontos iniciais;
3. Termine a busca se existe apenas um ponto de mínimo potencial;
4. Derive ramos adicionais identificando vales de potenciais através da conexão de vizinhos de mínimos potenciais.

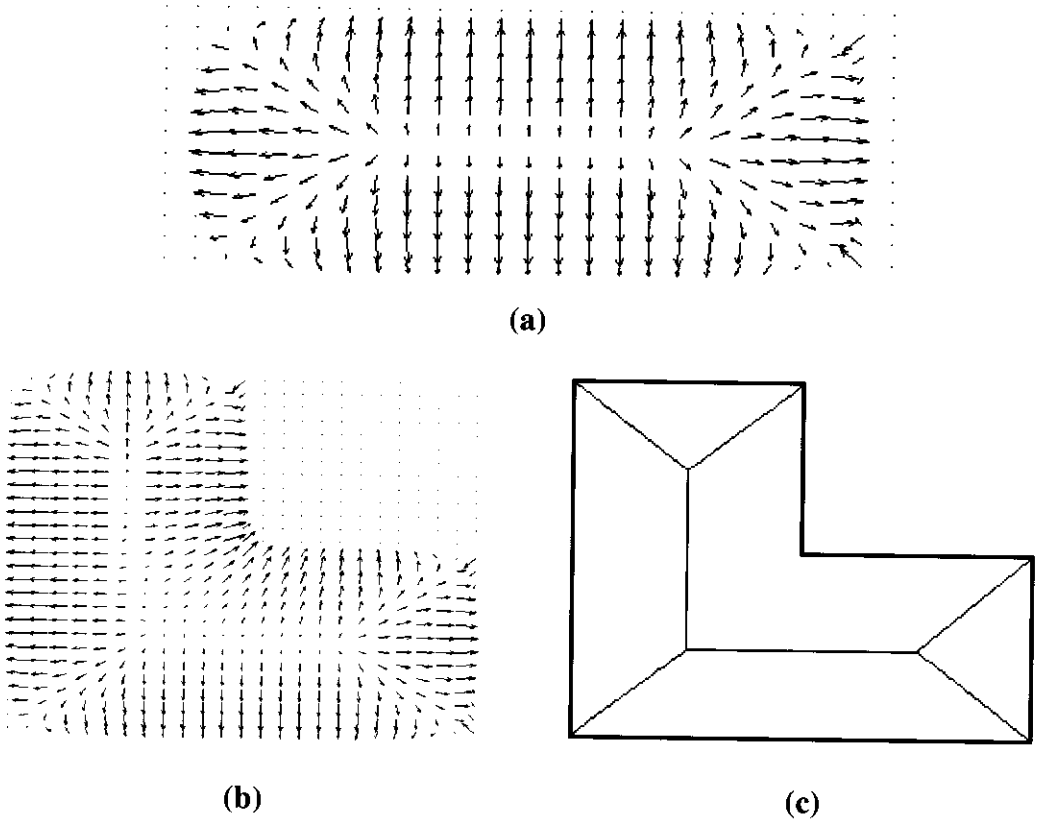


Figura 5-2: (a) campo vetorial associado a uma estrutura retangular bidimensional; (b) campo vetorial associado a uma estrutura bidimensional em forma de L; (c) esqueleto associado ao campo vetorial.

Podemos identificar alguns pontos negativos nesta abordagem. Primeiro, o algoritmo apenas é vantajoso quando se dispõe de um meio efetivo para o cálculo do campo potencial.

Chuang et al. (2000) aplicaram o método para objetos poliedrais bidimensionais e tridimensionais que possuíam expressões fechadas, o que torna o cálculo do campo potencial vantajoso. Desta forma, este algoritmo fica restrito ao caso em que podemos construir analiticamente o campo potencial (e o correspondente campo de vetores).

O segundo ponto é a necessidade de fixar pontos iniciais para o algoritmo.

Dada uma imagem binária, a qual para nossos propósitos corresponde a uma região com uma distribuição uniforme de cargas elétricas[19], propomos um algoritmo que supera o algoritmo proposto por Chuang nestes dois aspectos: primeiro, uma forma eficiente para calcular o campo vetorial em qualquer imagem e não apenas para objetos poliedrais e, segundo, a extração direta do MA sem a necessidade de pontos iniciais.

A primeira parte é baseada no trabalho de Costa (1999) que mostra como usar a FFT para o cálculo de campos vetoriais. A segunda, é baseada nos trabalhos de Gauch (1992) e Gauch e Pizer (1993), que demonstram a relação entre "vales" em uma imagem de tons de cinza e extremos de curvatura das curvas de níveis desta imagem, onde os "vales" são relacionados com os eixos de simetria de intensidade. Dessa forma, usando a teoria de geometria diferencial, é possível determinar os pontos que pertencem ao eixo médio do objeto.

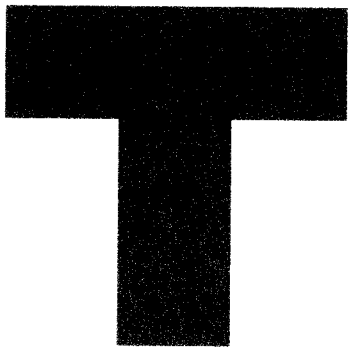
Em resumo, dada uma imagem binária, construímos um campo de vetores através da FFT. Posteriormente, dada a imagem formada pela magnitude da força associada ao campo vetorial (imagem em tons de cinza), procuramos por pontos que pertencem aos vales de potenciais através da identificação de extremos de curvaturas das curvas de níveis definidas em termos do IAS.

A título de ilustração, a Figura 5-3 mostra uma imagem binária de uma estrutura em forma de "T" e a imagem negativa da magnitude da força (expressa como gráfico de função) associada ao campo potencial gerado.

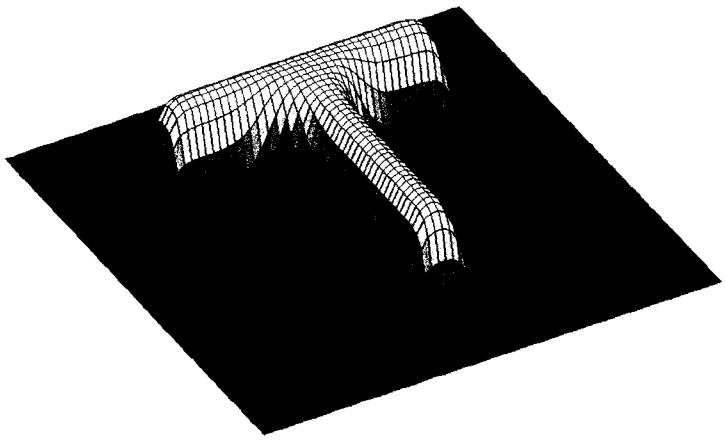
---

[19] Cada *pixel/voxel* corresponde a uma carga elétrica puntiforme. Esta nomenclatura provém da teoria eletromagnética.

Dessa forma, propomos um algoritmo de esqueletização 3D através do cálculo numérico do campo vetorial usando a FFT seguido por um esquema de extração de curvaturas. A principal originalidade do método esta no uso de algoritmos de FFT para o cálculo eficiente do campo vetorial. Até onde podemos verificar, esta abordagem ainda não foi relacionada com algoritmos de esqueletização.



(a)



(b)

Figura 5-3: (a) imagem binária de uma estrutura em forma de "T"; (b) superfície gerada pela magnitude da força resultante.

5.4 Campos Vetoriais via Transformada Rápida de Fourier

Costa (1999) propôs uma maneira efetiva para o cálculo de campos vetoriais baseado na transformada de Fourier. Dada, por exemplo, uma carga puntiforme Q_0 no centro de um sistema de coordenada retangular tridimensional, o campo vetorial em um ponto $\mathbf{p} = (x, y, z)$ é dado por

$$\mathbf{F}(\mathbf{p}) = \frac{Q_0}{2\pi \cdot \|\mathbf{p}\|^{\alpha}} \cdot \frac{\mathbf{p}}{\|\mathbf{p}\|} \tag{5-1}$$

onde α é uma constante positiva e $\|\cdot\|$ é a norma definida sobre o $\mathbb{R}^3$. Se um campo vetorial $\mathbf{F}(x, y, z)$ é o gradiente de um campo escalar $\varphi(x, y, z)$, então $\varphi(x, y, z)$ define uma função potencial para $\mathbf{F}(x, y, z)$. Neste sentido, a Eq. (5-1) pode ser escrita como

$$\mathbf{F}(x, y, z) = \nabla \cdot \varphi(x, y, z) = (F_x(x, y, z), F_y(x, y, z), F_z(x, y, z)) \tag{5-2}$$

onde ∇ é o operador gradiente e $\mathbf{F}(x, y, z)$ é um vetor com três componentes.

Agora, considere o espaço discreto tridimensional e $c[i, j, k]$, $i, j, k \in \mathbb{Z}$, uma função que representa uma distribuição de cargas elétricas puntiformes. As versões discretas para os componentes do vetor da Eq. (5-2) podem ser escritas como

$$F_x[i, j, k] = \frac{1}{2\pi} \cdot \sum_{(r,s,t) \in \Omega} c[i+r, j+s, k+t] \cdot r \cdot (r^2 + s^2 + t^2)^{-\frac{\alpha+1}{2}} \tag{5-3}$$

$$F_y[i, j, k] = \frac{1}{2\pi} \cdot \sum_{(r,s,t) \in \Omega} c[i+r, j+s, k+t] \cdot s \cdot (r^2 + s^2 + t^2)^{-\frac{\alpha+1}{2}} \tag{5-4}$$

$$F_z[i, j, k] = \frac{1}{2\pi} \cdot \sum_{(r,s,t) \in \Omega} c[i+r, j+s, k+t] \cdot t \cdot (r^2 + s^2 + t^2)^{-\frac{\alpha+1}{2}} \tag{5-5}$$

onde Ω é o conjunto dos *voxels* que recaem dentro de uma esfera de raio R centrada em (i,j,k).

Das Eqs. (5-3), (5-4) e (5-5) podemos escrever os componentes do vetor $\mathbf{F}[i, j, k]$ em termos de correlações como

$$F_x[i, j, k] = c[i, j, k] \otimes h_x[i, j, k] \tag{5-6}$$

$$F_y[i, j, k] = c[i, j, k] \otimes h_y[i, j, k] \tag{5-7}$$

$$F_z[i,j,k] = c[i,j,k] \otimes h_z[i,j,k] \tag{5-8}$$

onde $\otimes$ denota a operação de correlação discreta e

$$h_x[i,j,k] = \frac{1}{2\pi} \cdot i \cdot (i^2 + j^2 + k^2)^{-\frac{\alpha+1}{2}} \tag{5-9}$$

$$h_y[i,j,k] = \frac{1}{2\pi} \cdot j \cdot (i^2 + j^2 + k^2)^{-\frac{\alpha+1}{2}} \tag{5-10}$$

$$h_z[i,j,k] = \frac{1}{2\pi} \cdot k \cdot (i^2 + j^2 + k^2)^{-\frac{\alpha+1}{2}} \tag{5-11}$$

A Figura 5-4 ilustra o comportamento de $h_x[i,j,k]$ para três valores de α. O comportamento das Eqs. (5-10) e (5-11) é similar. Observamos que estas funções tendem assintoticamente a zero em todas as direções.

Devido às propriedades de simetria das Eqs. (5-9), (5-10) e (5-11), uma vez que

$$h_x[-i,-j,-k] = -h_x[i,j,k] \tag{5-12}$$

$$h_y[-i,-j,-k] = -h_y[i,j,k] \tag{5-13}$$

$$h_z[-i,-j,-k] = -h_z[i,j,k] \tag{5-14}$$

podemos escrever as Eqs. (5-6), (5-7) e (5-8) em termos de convoluções discretas como

$$F_x[i,j,k] = c[i,j,k] * h_x[i,j,k] \tag{5-15}$$

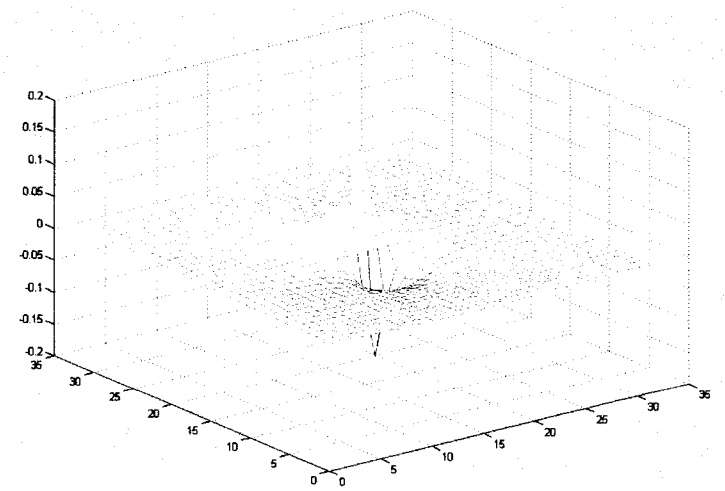
$$F_y[i,j,k] = c[i,j,k] * h_y[i,j,k] \tag{5-16}$$

$$F_z[i,j,k] = c[i,j,k] * h_z[i,j,k] \tag{5-17}$$

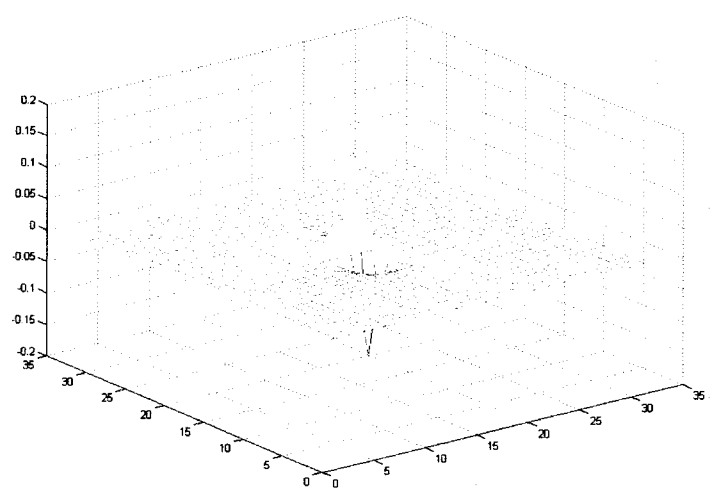
Dessa forma, as Eqs. (5-15), (5-16) e (5-17) podem ser facilmente avaliadas no domínio de Fourier através de algoritmos de FFT.

Uma vez determinado o campo vetorial, construímos uma imagem formada pela magnitude da força. A idéia é buscar vales de potenciais em uma imagem de tons de cinza formada pela magnitude do campo vetorial $\mathbf{F}(x,y,z)$. Para isso, a partir desta imagem, procuramos por extremos de curvatura das curvas de níveis. Este é o tema da próxima seção.

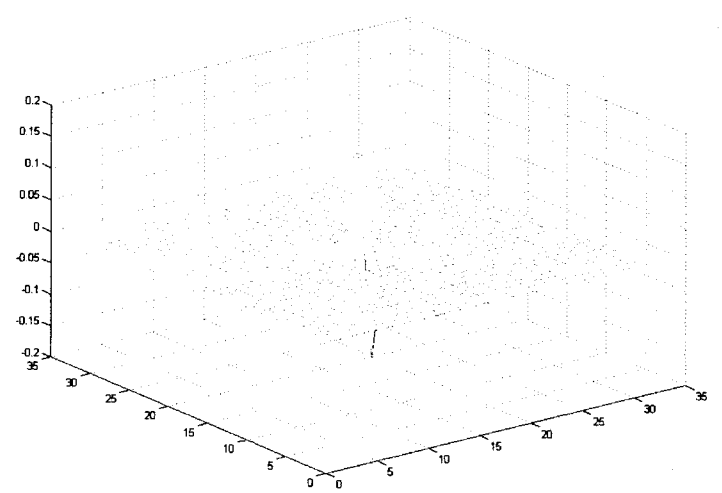
IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO



(a)



(b)



(c)

Figura 5-4: Comportamento da função $h_x[i, j, k]$ para três valores de α: (a) $\alpha = 1$; (b) $\alpha = 2$; (c) $\alpha = 3$.

5.5 Estimação de Curvaturas

Nesta seção, descrevemos o procedimento para a detecção dos vales de potenciais em uma imagem formada pela magnitude do campo de vetores $\mathbf{F}(x, y, z)$.

Como mencionado anteriormente, o eixo médio (esqueleto) possui uma estreita relação com vales de potenciais (regiões com mínima magnitude).

Por outro lado, Leyton (1987) e Gauch e Pizer (1993) demonstram a conexão entre vales de potenciais em uma imagem de tons de cinza e extremos de curvaturas das curvas de níveis desta imagem.

Seguindo Gauch e Pizer, extremos de curvatura das curvas de níveis formam curvas conectadas chamadas *curvas de vértices*, as quais marcam os vales dentro da imagem.

Devido à relação entre simetria e curvatura [Leyton (1987)], curvas de vértices possuem uma relação "um para um" com superfícies IAS [Gauch (1992)].

Considere $I(x, y, z) = \|\mathbf{F}(x, y, z)\|$. Dessa forma, construímos uma hiper-superfície $\mathbf{\Psi} \subset \mathbb{R}^4$ como[20]

$$\mathbf{\Psi}(x, y, z) = (x, y, z, I(x, y, z)). \tag{5-18}$$

A curvatura das curvas de níveis da Eq. (5-18) pode ser calculada com o uso do endomorfismo de Weingarten [Kreyszig (1968)].

Sendo assim, dada $\mathbf{\Psi}(x, y, z)$, escrevemos as equações de Gauss [Spivak (1979)] como

$$\Psi_x(x, y, z) = (1,0,0, I_x(x, y, z)) \tag{5-19}$$

$$\Psi_y(x, y, z) = (0,1,0, I_y(x, y, z)) \tag{5-20}$$

$$\Psi_z(x, y, z) = (0,0,1, I_z(x, y, z)) \tag{5-21}$$

onde $I_x(x, y, z)$, $I_y(x, y, z)$ e $I_z(x, y, z)$ são as derivadas parciais de primeira ordem de $I(x, y, z)$, com respeito a x, y e z.

O vetor normal $\mathbf{N}(x, y, z)$ à curva de nível no ponto $\mathbf{p} = (x, y, z)$ pode ser construído a partir das Eqs. (5-19), (5-20) e (5-21) como

$$\mathbf{N}(x, y, z) = (-I_x(x, y, z), -I_y(x, y, z), -I_z(x, y, z)). \tag{5-22}$$

---

[20] Lembramos que estamos seguindo uma abordagem contínua.

Então, dado $\mathbf{N}(x,y,z)$, o mapa de Weingarten no ponto $\mathbf{p}=(x,y,z)$ é definido como

$$-D_{\mathbf{p}}(\mathbf{N})=\begin{bmatrix} I_{xx} & I_{xy} & I_{xz} \\ I_{yx} & I_{yy} & I_{yz} \\ I_{zx} & I_{zy} & I_{zz} \end{bmatrix} \tag{5-23}$$

Devido a forma como construímos o vetor normal $\mathbf{N}(x,y,z)$, a Eq. (5-23) é a matriz Jacobiana de $I(x,y,z)$ no ponto $\mathbf{p}=(x,y,z)$.

Do teorema de Rodrigues [Kreyszig (1968)], $-D_{\mathbf{p}}(\mathbf{N})$ pode ser diagonalizada e os elementos da diagonal principal são chamados de curvaturas principais[21] no ponto $\mathbf{p}=(x,y,z)$. Assim,

$$\begin{bmatrix} I_{xx} & I_{xy} & I_{xz} \\ I_{yx} & I_{yy} & I_{yz} \\ I_{zx} & I_{zy} & I_{zz} \end{bmatrix} \sim \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{bmatrix} \tag{5-24}$$

onde ~ representa a operação de diagonalização e λ_1, λ_2 e λ_3, são as curvaturas principais.

A curvatura de Gauss-Kronecker em um dado $\mathbf{p}$ é definida como

$$K=\lambda_1\cdot\lambda_2\cdot\lambda_3 \tag{5-25}$$

e a curvatura média como

$$\theta=\frac{\lambda_1+\lambda_2+\lambda_3}{3} \tag{5-26}$$

A imagem formada pela curvatura média em cada ponto define o que chamamos de *mapa de curvaturas*.

A extração do esqueleto a partir do mapa de curvaturas será discutida separadamente para o caso bidimensional e tridimensional na próxima seção.

Observamos que o procedimento acima foi derivado para o caso contínuo. Para implementação, devemos considerar a versão discreta da imagem formada pela magnitude do campo vetorial.

---

[21] As curvaturas correspondem aos autovalores da matriz Jacobiana.

5.6 Resultados e Discussões

Apresentamos nesta seção os resultados que descrevem o comportamento da metodologia proposta para a geração de esqueletos.

Embora o objetivo principal seja a extração de esqueletos de estruturas tubulares no caso tridimensional, apresentamos primeiro alguns exemplos para o caso bidimensional. Isso é feito por várias razões. Primeiro, a extração do esqueleto bidimensional é um caso particular do caso 3D. Segundo, o entendimento do algoritmo é mais claro estudando o caso 2D. Ainda, para este caso, temos uma formulação analítica para a extração do eixo médio a partir do mapa de curvaturas, o que não foi possível derivar ainda para o caso 3D.

5.6.1 O Caso Bidimensional

Embora o algoritmo de esqueletização proposto tenha sido derivado no caso 3D, a aplicação em imagens 2D é imediata, bastando simplesmente desconsiderar o terceiro componente do vetor da Eq.(5-2), página 141.

Considere novamente a versão contínua do problema. Após a geração do mapa de curvaturas, construímos o vetor normal a superfície (definida como o "gráfico de função" da imagem formada pela magnitude do campo de vetores) no ponto $\mathbf{p} = (x, y)$ como

$$\mathbf{N}(x, y) = (-I_x(x, y), -I_y(x, y)). \tag{5-27}$$

Agora, por construção, a partir da Eq. (5-27), obtemos um vetor tangente à superfície no ponto $\mathbf{p}$ expresso por

$$\mathbf{T}(x, y) = (-I_y(x, y), I_x(x, y)). \tag{5-28}$$

Ainda, seja a curvatura média no ponto $\mathbf{p} = (x, y)$ dada por $\theta(x, y)$. Assim, dado o mapa de curvaturas médias, construímos uma nova imagem onde cada ponto é obtido por

$$< \nabla \cdot \theta(x, y), \mathbf{T}(x, y) >, \tag{5-29}$$

sendo que $< \cdot, \cdot >$ denota o produto interno no $\mathbb{R}^2$ e ∇ o operador gradiente.

Verifica-se que os pontos que pertencem ao esqueleto são os valores de transição entre regiões com sinais contrários na imagem gerada pela Eq. (5-29). Assim, para determinar o esqueleto, consideramos a versão discreta da imagem gerada pela Eq. (5-29) e varremos esta imagem da esquerda para a direita e de cima para baixo buscando os pontos de transição.

Em todos os casos estudados, utilizamos valores para α entre 1 e 6. Valores acima de 7 já não foram capazes de gerar um mapa de curvaturas do qual o esqueleto pudesse ser extraído. Verificamos também a possibilidade de usar valores fracionários, como, por exemplo, $\alpha = 3{,}5$.

A título de ilustração, a Figura 5-5 mostra o resultado da aplicação deste procedimento para uma região retangular binária de 256 x 64 *pixels* considerando $\alpha = 4$ e $R = 70$ *pixels*[22]. Esta metodologia apresenta uma boa performance gerando esqueletos com um *pixel* de espessura. Contudo, algumas considerações são necessárias.

Em primeiro lugar, como a operação de convolução *borra* toda a imagem e não apenas o objeto de interesse, usamos a imagem original como uma máscara. Assim, após gerarmos a imagem correspondente à magnitude do campo de vetores, todos os pontos que correspondem a zero na imagem original são colocados também em zero. Só então, as curvaturas médias são calculadas e armazenadas no mapa de curvaturas.

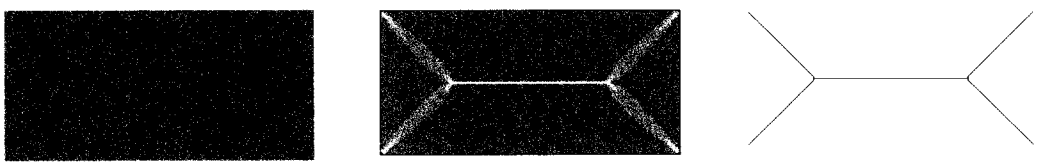


Figura 5-5: (a) Região bidimensional retangular; (b) mapa de curvaturas gerado para $\alpha = 4$; (c) esqueleto extraído seguindo o procedimento da Eq. (5-29).

Uma etapa intermediária é necessária antes da aplicação da Eq. (5-29). O mapa de curvaturas descreve o comportamento local da imagem gerada pela magnitude do campo de vetores. Devido às imprecisões numéricas nos cálculos das

[22] Lembramos que R é o raio do suporte circular das máscaras de convolução $h_x[i,j,k]$, $h_y[i,j,k]$ e $h_z[i,j,k]$.

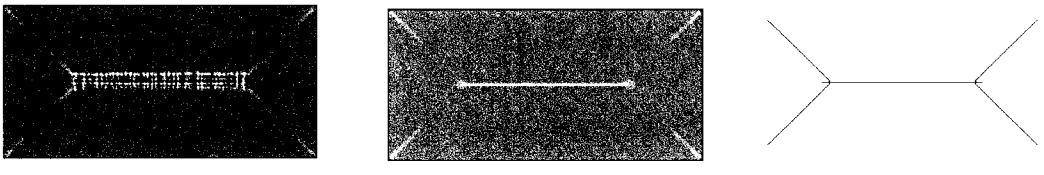
primeiras e das segundas derivadas, necessárias para a construção da matriz Jacobiana na Eq. (5-23), um limiar de rejeição deve ser definido para que estas imperfeições não sejam incorporadas na imagem do esqueleto. Esta operação é feita analisando o mapa de curvaturas para cada valor de α escolhido.

Verificamos que todos os pontos pertencentes à borda do objeto assumem valores de curvatura média negativos e, dessa forma, são desconsiderados com a escolha adequada do limiar.

Observamos que esta operação de limiarização necessita da intervenção do usuário o que não é uma característica desejável. Um dos trabalhos futuros consiste justamente em automatizar a escolha deste limiar.

Outras questões importantes são a escolha do raio R do suporte das máscaras de convolução definidas nas Eqs. (5-9), (5-10) e (5-11), página 142, e da constante α. Até o momento, não foi possível determinar com precisão a relação entre α e R. Contudo, verifica-se que são fortemente correlacionados sendo que também dependem do contorno do objeto.

Por exemplo, considere novamente a região retangular da Figura 5-5a. O mapa de curvaturas da Figura 5-5b foi obtido para um raio de 70 *pixels*. Nas mesmas condições, ou seja, para o valor de $\alpha = 4$, se utilizarmos R = 60, obtemos o mapa de curvaturas da Figura 5-6a. Embora este valor, a princípio, seja suficiente para que os pontos que estão na região do esqueleto sofram a influência da borda (o retângulo tem 64 *pixels* de altura), ele não é suficiente para construir um mapa de curvaturas adequado.



(a) **(b)** **(c)**

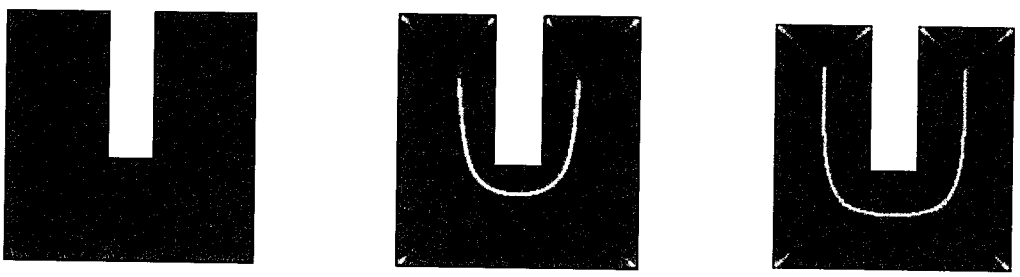
Figura 5-6: (a) mapa de curvaturas gerado para R = 60 e α = 4; (b) mapa de curvaturas gerado para R = 80 e α =4; (c) esqueleto extraído a partir do mapa de curvaturas apresentado em (b).

Por outro lado, considerando um raio de 80 *pixels*, ou seja, maior do que o necessário para produzir o esqueleto apresentado na Figura 5-5c, produzimos o mapa

de curvaturas da Figura 5-6b. O esqueleto extraído a partir deste mapa é apresentado na Figura 5-6c, sendo que podemos perceber dois pequenos prolongamentos que não existem no esqueleto da Figura 5-5c.

Observamos que em diversos casos estudados, a utilização de um raio maior do que o necessário pode levar a introdução de artefatos nos esqueletos produzidos.

Como outro exemplo, considere a estrutura em forma de "U" ilustrada na Figura 5-7a. Para um valor de R fixo, pequenos valores de α podem fazer com que os "braços" da estrutura influenciem fortemente um no outro (Figura 5-7b), o que não é um efeito desejável. Por exemplo, no caso tridimensional, esta situação pode ocorrer com os dendritos de um neurônio. Este efeito pode ser minimizado com valores de α "grandes", como 4 ou 5, por exemplo (Figura 5-7c).



(a) (b) (c)

Figura 5-7: (a) contorno em forma de "U"; (b) mapa de curvaturas gerado para $\alpha = 2$; (c) mapa de curvaturas gerado para $\alpha = 5$.

De maneira geral, observamos que esta metodologia resulta em uma ferramenta poderosa para a extração de esqueletos. Contudo, maiores estudos deverão ser conduzidos no sentido de determinar com maior precisão a relação entre α e o raio R do suporte das máscaras de convolução.

A Figura 5-8 ilustra outros exemplos de esqueletos para estruturas bidimensionais extraídos pelo método proposto.

Uma outra questão importante é a estabilidade do algoritmo em relação a perturbações na borda do objeto. A Figura 5-9a ilustra uma região retangular de 256 por 64 *pixels* contendo uma "falha" em um dos lados. A Figura 5-9b ilustra o mapa de curvaturas obtido utilizando $\alpha = 4$ e um raio de 70 *pixels*. O esqueleto é apresentado na Figura 5-9c. O algoritmo demonstrou bastante estabilidade na presença da falha.

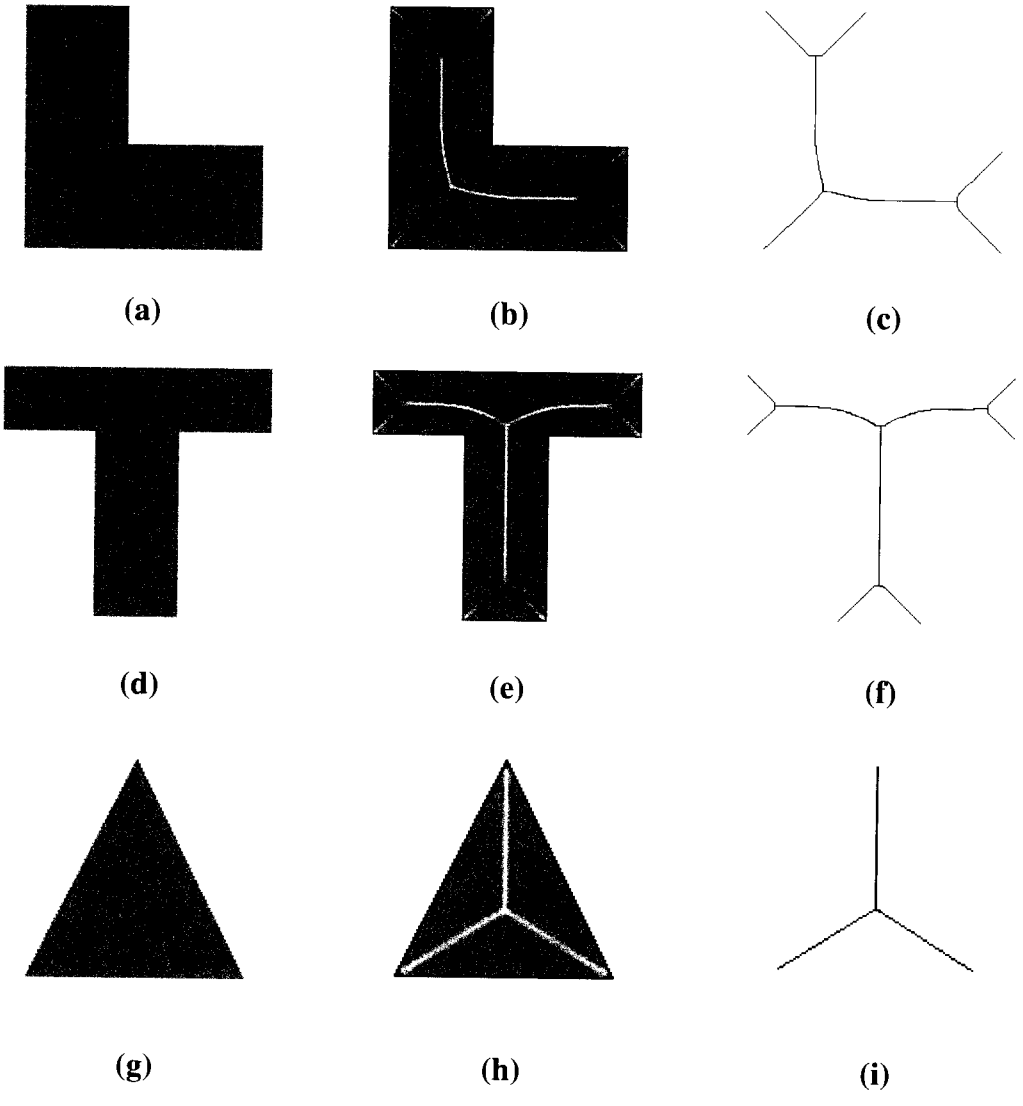


Figura 5-8: Exemplos de esqueletos obtidos pelo método proposto.

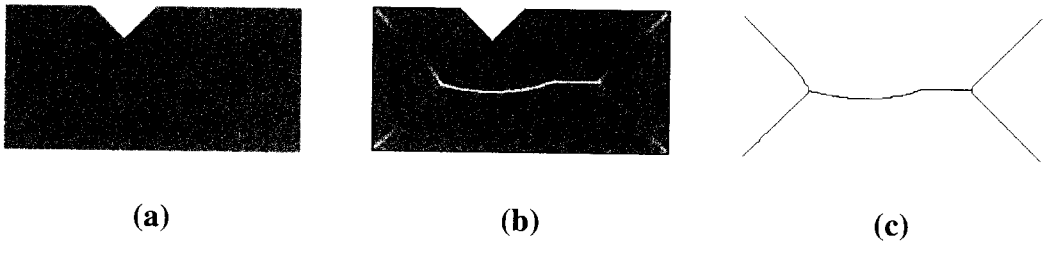


Figura 5-9: (a) estrutura retangular apresentando uma falha; (b) mapa de curvaturas; (c) esqueleto.

Como outro exemplo, considere a estrutura "retangular" da Figura 5-10a apresentando grande irregularidade no contorno. A Figura 5-10b e a Figura 5-10c mostram o mapa de curvaturas e o respectivo esqueleto, obtidos para esta estrutura. O esqueleto neste caso apresenta uma série de irregularidades na região próxima a borda do objeto, mas a região central apresenta grande estabilidade. Observamos que se desconsiderarmos a região próxima à borda, obtemos o esqueleto apresentado na Figura 5-11 que é similar a um dos resultados apresentado por Chuang et al. (2000).

(a) (b) (c)

Figura 5-10: (a) estrutura retangular com borda irregular; (b) mapa de curvaturas obtido para $\alpha = 4$ e $R = 70$; (c) esqueleto.

Figura 5-11: Esqueleto da Figura 5-10c desconsiderando a região da borda que apresenta artefatos.

5.6.2 O Caso Tridimensional

Passamos a apresentar os resultados para o caso tridimensional. Primeiramente, apresentamos uma análise da esqueletização de uma estrutura cilíndrica simulada. Posteriormente, apresentamos os resultados para imagens 3D reais de artérias e neurônios. Lembramos que todas as observações feitas para o caso bidimensional permanecem válidas para o caso tridimensional.

5.6.2.1 Esqueletização de Estruturas Simuladas

Para avaliar o comportamento do algoritmo em imagens tridimensionais de estruturas tubulares, testamos o método em uma imagem binária de um cilindro, ilustrado na Figura 5-12. A imagem foi gerada utilizando o pacote *Visualization ToolKit* (VTK) [Schroeder et al. (1998)].

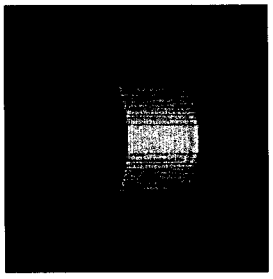
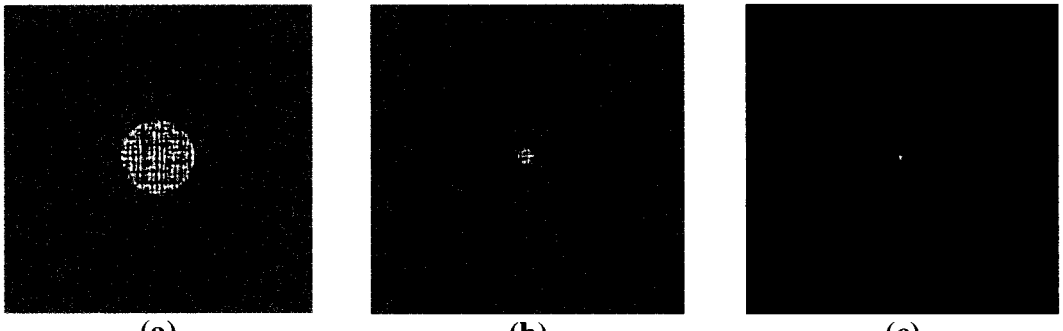


Figura 5-12: Imagem 3D da estrutura utilizada para testar o algoritmo de esqueletização. O cilindro possui um diâmetro de 107 *voxels*.

Para a geração do mapa de curvaturas, estendemos (dobramos o comprimento) o cilindro na direção axial (ao longo do eixo z) de forma a evitar que a base circular dos dois lados gere interferência durante a fase de convolução.

Como no caso 2D, para um α fixo, a escolha de um R pequeno pode não ser suficiente para produzir um mapa de curvaturas adequado.

Por exemplo, a Figura 5-13 ilustra os mapas de curvaturas obtidos para três valores diferentes de R, considerando $\alpha = 3$. Como podemos verificar, os dois primeiros valores de R não foram suficientes para produzir um mapa de curvaturas adequado para a extração do esqueleto. Observamos que para qualquer valor de α escolhido, sempre haverá um raio mínimo para a geração do mapa de curvaturas.



(a) **(b)** **(c)**

Figura 5-13: Seções bidimensionais dos mapas de curvaturas para $\alpha = 3$: (a) $R = 20$ *voxels*; (b) $R = 45$ *voxels*; (c) $R = 55$ *voxels*.

Diferentemente do caso 2D, não derivamos ainda um mecanismo geral para a extração do esqueleto, com um *voxel* de espessura, a partir do mapa de curvaturas para este caso.

Contudo, para o caso particular do cilindro e das artérias, devido à disposição das seções bidimensionais, o procedimento adotado foi capaz de produzir o esqueleto.

O cilindro se estende ao longo do eixo z (eixo axial) sendo que as seções bidimensionais são discos (circunferências) com um diâmetro de 107 *pixels*. Dessa forma, obtemos o gradiente bidimensional em cada seção do mapa de curvaturas e verifica-se que o esqueleto corresponde aos pontos de transição entre as regiões com sinais contrários. Assim, como no caso 2D, varremos cada seção de cima para baixo e da esquerda para a direita determinando estes pontos de transição.

A Figura 5-14 ilustra dois ângulos de visão diferentes para o cilindro e o esqueleto obtido.

(a) (b)

Figura 5-14: Dois ângulos de visão diferentes para o cilindro e o esqueleto.

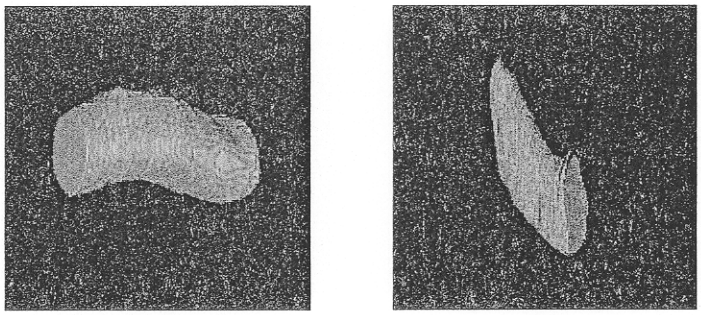
Para o caso desta estrutura, fica fácil avaliar a capacidade do método em produzir esqueletos centralizados. Verificamos, neste e em outras estruturas estudadas, que o esqueleto passa pelo ponto central de cada seção 2D.

5.6.2.2 Esqueletização de Artérias

O método na seção anterior foi aplicado com sucesso em imagens reais de artérias. O conjunto de imagens (já segmentadas) que estudamos foram cedidas pelo Prof. Stefan Meng do Departamento de Anatomia da Universidade de Viena, Áustria e foram obtidas por tomografia computadorizada. A Figura 5-15 mostra as imagens 3D para duas artérias. Estas imagens foram geradas através do VTK.

O tamanho do *pixel* em cada seção das imagens corresponde a 0,3 x 0,3 mm e o espaçamento entre as seções de 0,3 mm. Contudo, para facilitar o processamento destas imagens, cada seção 2D foi decimada por um fator quatro.

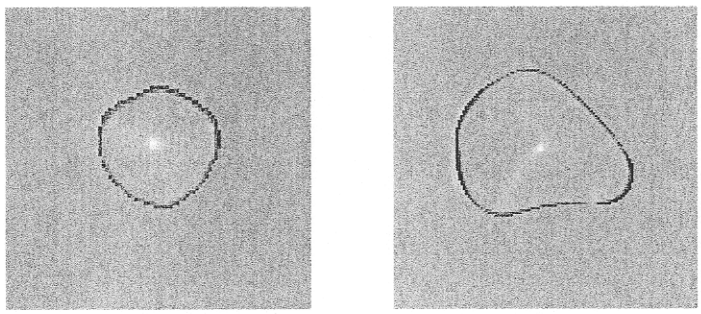
Uma vez que as artérias se estendem na direção do eixo z, podemos obter esqueletos com um *voxel* de espessura pelo procedimento da seção anterior.



(a) (b)

Figura 5-15: Imagens 3D de duas artérias reais: (a) artéria 1; (b) artéria 2.

A Figura 5-16 ilustra duas seções dos mapas de curvaturas para as duas artérias, considerando o mesmo valor de α e R. Podemos verificar que a região de maior intensidade nos mapas corresponde a região do esqueleto. Ainda, devemos lembrar que, assim como no caso do cilindro, as imagens foram estendidas (dobradas) na direção do eixo z de forma a evitar problemas causados pelas regiões laterais da imagem.



(a) (b)

Figura 5-16: Seções dos mapas de curvaturas para as duas artérias estudadas, considerando $R = 40$ e $\alpha = 3$: (a) artéria 1; (b) artéria 2.

A Figura 5-17 ilustra os esqueletos obtidos para as duas artérias. Podemos observar pela Figura 5-17c, por exemplo, que existe um "achatamento" da artéria 2 em um dos lados. Contudo, o algoritmo ainda foi capaz de extrair o esqueleto desejado.

Outra observação importante é a capacidade do algoritmo em produzir uma curva suave, sendo insensível às perturbações da borda. De fato, analisando plano a plano as imagens das artérias, observamos uma grande irregularidade no contorno, o

que não é refletida no esqueleto obtido. Dessa forma, para o caso particular das artérias, o algoritmo foi capaz de extrair esqueletos "suaves" de um *voxel* de espessura.

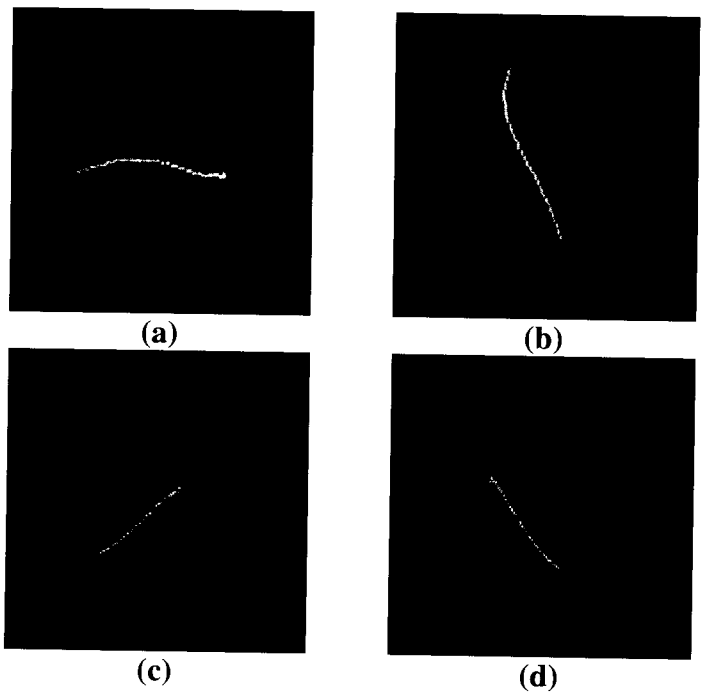


Figura 5-17: (a)-(b) dois ângulos de visão para a artéria 1 e o respectivo esqueleto; (c)-(d) dois ângulos de visão para a artéria 2 e o respectivo esqueleto.

Embora o objetivo deste trabalho não seja a extração de medidas, e sim o estudo de uma ferramenta para a extração, ilustramos duas medidas que podem ser obtidas através dos esqueletos gerados.

Supondo que o esqueleto obtido possa ser representado por uma curva parametrizada $\alpha(t) = (x(t), y(t), z(t))$ [Tenenblat (1998)], onde t é o parâmetro e $(x(t), y(t), z(t))$ são as coordenadas da curva em função de t, a curvatura e a torção podem ser obtidas por

$$Curv(s(t)) = \frac{|\alpha'(t) \; x \; \alpha''(t)|}{|\alpha'(t)|^3} \tag{5-30}$$

e

$$Tor(s(t)) = \frac{\langle \alpha'(t) \; x \; \alpha'''(t), \alpha''(t) \rangle}{|\alpha'(t) \; x \; \alpha''(t)|^2}, \tag{5-31}$$

onde $\alpha'(t)$, $\alpha''(t)$ e $\alpha'''(t)$ são as primeiras, segundas e terceiras derivadas de $\alpha(t)$, que são obtidas através das derivadas das coordenadas. Estas expressões são definidas para uma reparametrização de $\alpha(t)$ por comprimento de arco, sendo o novo parâmetro expresso por $s(t)$ [Tenenblat (1998)].

A Figura 5-18 e a Figura 5-19 mostram os gráficos da curvatura e da torção, em função de s, para o esqueleto da artéria 1.

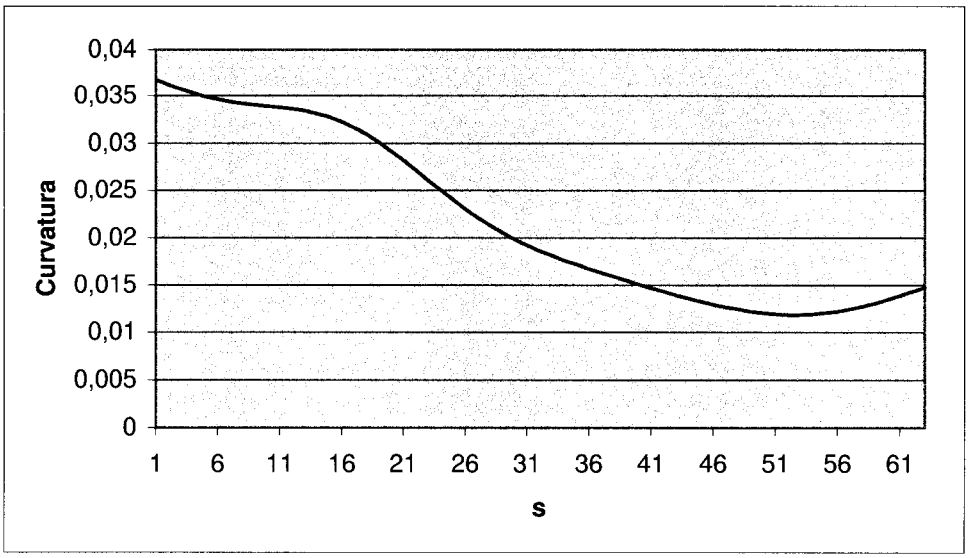


Figura 5-18: Curvatura do esqueleto da artéria 1 em função de s.

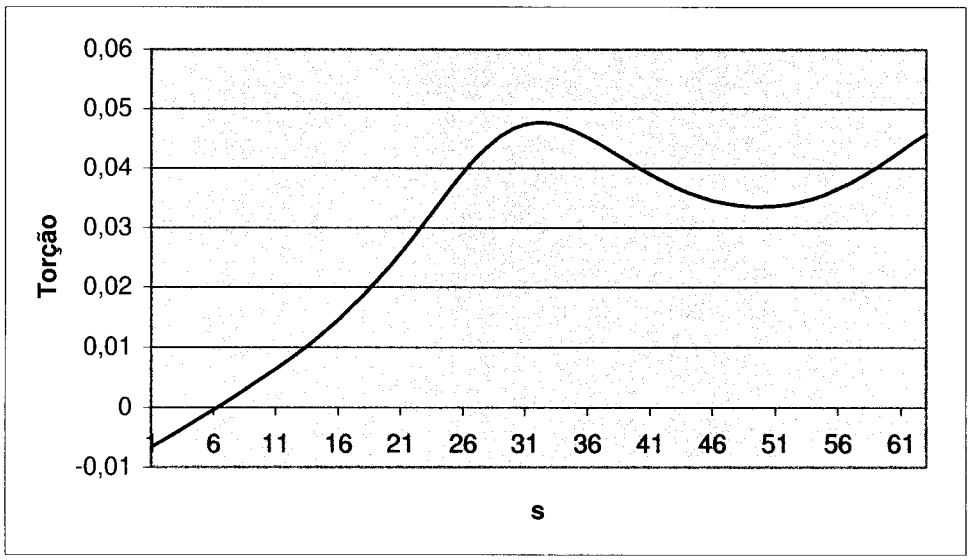


Figura 5-19: Torção do esqueleto da artéria 1 em função de s.

5.6.2.3 Esqueletização de Neurônios

Apresentamos nesta seção os resultados parciais que foram obtidos pela aplicação do algoritmo de esqueletização proposto em imagens tridimensionais de neurônios.

De maneira geral, podemos dizer que os estudos para o caso de imagens de neurônios ainda estão incompletos, sendo que devemos procurar por mecanismos mais efetivos para a determinação do esqueleto.

De fato, o procedimento adotado nos tópicos anteriores para a extração do esqueleto a partir do mapa de curvaturas não foi adequado para estas imagens, não sendo capaz de produzir esqueletos com um *voxel* de espessura.

Contudo, obtivemos resultados preliminares, gerando resultados muito próximos dos esqueletos desejados, através de operações de limiarização sobre o mapa de curvaturas.

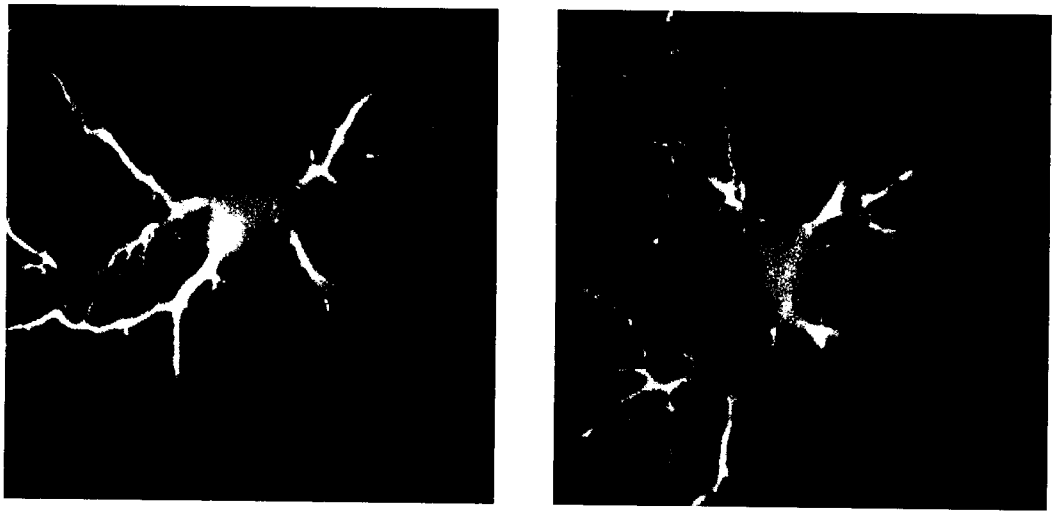
As duas imagens de neurônios (células ganglionares) que estudamos foram obtidas com um microscópio confocal (2-fótons) utilizando técnicas de fluorescência e foram cedidas pela Prof. Rachel Yong do Departamento de Anatomia e Neurobiologia da Universidade de Washington em St. Louis, USA.

A Figura 5-20 ilustra duas seções para estas duas imagens tridimensionais capturadas na emissão de 530 nm e 630 nm, respectivamente.

Algumas considerações neste ponto são necessárias. Uma das idéias deste trabalho é justamente a geração de esqueletos de imagens de neurônios obtidas em microscopia de fluorescência. Dessa forma, para imagens adquiridas com um microscópio *wide-field*, sugerimos a aplicação dos algoritmos de restauração propostos nos capítulos anteriores para melhorar a qualidade das imagens obtidas.

Todavia, optamos por não usar os algoritmos de deconvolução nas imagens originais apresentadas na Figura 5-20 antes da geração do mapa de curvaturas. São duas as razões. Em primeiro lugar, as imagens foram obtidas com um microscópio confocal 2-fótons, o que promove resultados superiores ao confocal convencional. Observamos que, mesmo assim, poderíamos optar por algoritmos de restauração para melhorar ainda mais a qualidade destas imagens. Contudo, no caso particular das imagens apresentadas na Figura 5-20, verificamos que algumas regiões da *soma* dos neurônios estão saturadas, o que introduziria erros no processo de deconvolução.

Dessa forma, neste momento, optamos por segmentar diretamente as imagens originais sem a etapa de deconvolução.



(a) (b)

Figura 5-20: Imagens de neurônios (células ganglionares) obtidas com um microscópio confocal: (a) seção de uma imagem volumétrica de um neurônio capturada na emissão de 530 nm; (b) seção de uma imagem volumétrica de um neurônio capturada na emissão de 630 nm.

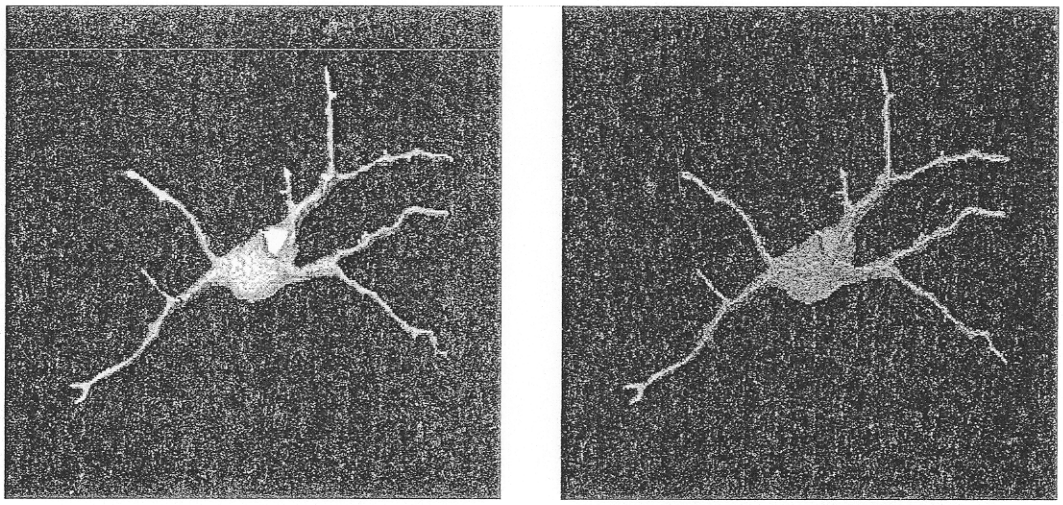
O processo de segmentação adotado foi simplesmente uma operação de limiarização sobre as imagens originais para eliminação do ruído e de pequenos dendritos. Posteriormente, os mapas de curvaturas foram gerados, para cada imagem, procurando pelas relações entre α e R que produziram os melhores resultados. Finalmente, a partir de limiarizações sobre os mapas de curvaturas, obtivemos as aproximações para os esqueletos.

A Figura 5-21 e a Figura 5-22 mostram as imagens tridimensionais segmentadas para as duas células apresentadas na Figura 5-20 e os respectivos esqueletos.

Verificamos que, embora não sejam esqueletos de um *voxel* de espessura, estas imagens mostram que o algoritmo é capaz de fornecer resultados significativos na esqueletização de neurônios.

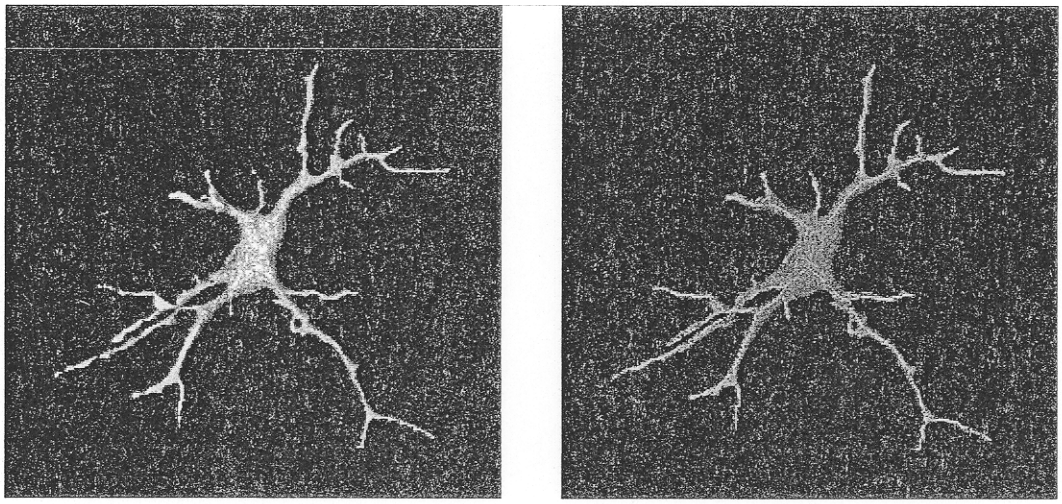
A meta agora é a busca por mecanismos mais eficientes e capazes de extrair o esqueleto desejado a partir do mapa de curvaturas, gerado a partir da magnitude do campo de vetores.

ICMC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO



(a) (b)

Figura 5-21: (a) imagem tridimensional segmentada do neurônio obtida para uma emissão de 530 nm; (b) esqueleto.



(a) (b)

Figura 5-22: (a) imagem tridimensional segmentada do neurônio obtida para uma emissão de 630 nm; (b) esqueleto.

5.7 Conclusão

Apresentamos, neste capítulo, um algoritmo eficiente para esqueletização de estruturas tridimensionais através de campos vetoriais, gerados numericamente via algoritmos de FFT, e por estimação de curvaturas principais, através do mapa de Weingarten.

De fato, o método apresentou uma boa performance, uma vez que o campo vetorial pode ser calculado rapidamente usando o algoritmo da transformada rápida de Fourier.

Embora o objetivo principal seja a geração de esqueletos para o caso tridimensional, aplicamos e discutimos o algoritmo no caso bidimensional. Posteriormente, discutimos a aplicabilidade do método para estruturas tubulares tridimensionais, como neurônios e artérias.

De maneira geral, o método foi capaz de produzir esqueletos centralizados e suaves, com pouca sensibilidade às perturbações do contorno do objeto. Porém, uma análise mais efetiva da relação entre α e R deverá ser conduzida.

Para o caso bidimensional e, especificamente, no caso das artérias tridimensionais, foram possíveis as derivações de esqueletos com um *pixel/voxel* de espessura. Contudo, a derivação de um mecanismo geral para a extração do esqueleto, a partir do mapa de curvaturas, ainda não foi possível.

Capítulo 6 Conclusões e Perspectivas Futuras

6.1 Conclusão Geral

Neste trabalho, estudamos e implementamos novos algoritmos para a restauração de imagens adquiridas em microscopia de seccionamento óptico computacional, utilizando técnicas de fluorescência.

Ainda, além dos algoritmos de deconvolução, propomos um algoritmo de esqueletização para estruturas tubulares, como neurônios e artérias, baseado em uma abordagem contínua e que pode ser avaliado rapidamente através de algoritmos de transformada rápida de Fourier.

Em relação aos algoritmos de restauração propostos, os resultados foram bastante significativos, sendo que os métodos apresentaram uma boa performance em relação à melhoria na relação sinal-ruído e também quando comparados com outros algoritmos propostos na literatura.

Observamos que, embora estudamos o problema no caso de microscopia *wide-field*, todos os métodos podem ser aplicados ao caso de imagens confocais.

Particularmente, no caso dos algoritmos POCS seqüenciais, observamos uma boa relação custo-benefício em razão da rápida convergência apresentada por estes métodos. Sendo assim, verificamos que a metodologia POCS é uma alternativa viável para aplicações em microscopia de seccionamento óptico computacional.

Por outro lado, em relação ao algoritmo de esqueletização, os resultados demonstram que a metodologia proposta é capaz de produzir resultados apreciáveis. O algoritmo apresentou uma boa performance para o caso bidimensional e também para as imagens tridimensionais de artérias, sendo capaz de produzir esqueletos suaves e de um *pixel/voxel* de espessura.

Mais ainda, no caso das imagens de neurônios, embora não tenha sido possível derivar um mecanismo genérico capaz de extrair o esqueleto a partir do mapa de curvaturas, concluímos que a metodologia proposta é capaz de fornecer uma ferramenta poderosa para aplicações em neuromorfometria computacional.

6.2 Perspectivas Futuras

Do exposto nos capítulos precedentes, verificamos que existem diversos pontos que merecem ser considerados em trabalhos futuros.

Particularmente, em relação aos algoritmos de deconvolução, podemos mencionar:

1. Estudo e avaliação dos algoritmos de deconvolução propostos para o caso de imagens adquiridas em microscopia confocal;
2. Uma comparação mais efetiva entre os algoritmos POCS e o algoritmo MLEM, levando em consideração a complexidade computacional, o tempo de processamento e qualidade das imagens produzidas;
3. Derivação de um parâmetro de regularização adaptativo para o filtro de Goodman-Belsher e para o filtro de Wiener, capaz de produzir resultados superiores aos atuais;
4. Extensão dos algoritmos POCS seqüenciais propostos para o caso paralelo, usando projeções aproximadas e iterações extrapoladas para além do intervalo (0,2) conforme descrito por Combettes (1993).

Ainda, em relação ao algoritmo de esqueletização proposto, podemos destacar os seguintes pontos:

1. Determinação precisa da relação entre α e R;
2. Comparações do método com outros algoritmos propostos na literatura;
3. Derivação de mecanismos eficientes para a extração do esqueleto a partir do mapa de curvaturas no caso de imagens de neurônios;
4. Extensão do algoritmo para a geração de esqueletos de sólidos geométricos;
5. Automatização do procedimento de esqueletização de neurônios e a geração de dendrogramas.

Anexo A - Os Algoritmos MLEM e RLLS

A.1 O Algoritmo MLEM

Para o caso de ruído Poisson, a PDF condicional do vetor de observações $\mathbf{u}$, dado o vetor imagem $\mathbf{f}$, é expressa por (ver Capítulo 2, página 32)

$$p_{\tilde{\mathbf{U}}}(\mathbf{u} \setminus \mathbf{b}) = \prod_i \frac{(\gamma \cdot \mathrm{b}_i)^{\mathrm{u}_i} \cdot e^{-\gamma \cdot \mathrm{b}_i}}{\mathrm{u}_i!}, \tag{A-1}$$

onde $\mathbf{b} = \mathbf{Hf}$, $\mathrm{b}_i = \sum_j \mathrm{h}_{ij} \cdot \mathrm{f}_j$ e h_{ij} são elementos da matriz de borramento $\mathbf{H}$.

Dessa forma, tomando-se o logaritmo natural da Eq. (A-1) podemos escrever o funcional de verossimilhança como

$$L = \sum_i \mathrm{u}_i \cdot ln\left(\gamma \cdot \sum_j \mathrm{h}_{ij} \cdot \mathrm{f}_j\right) - \gamma \cdot \sum_i \sum_j \mathrm{h}_{ij} \cdot \mathrm{f}_j . \tag{A-2}$$

O algoritmo *Expectation-Maximization* (EM) [Dempster et al. (1977)] é usado para maximizar o funcional de verossimilhança da Eq. (A-2) produzindo o algoritmo iterativo (assumindo $\gamma = 1$) expresso por

$$\mathbf{f}^{(n+1)} = \mathbf{f}^{(n)} \mathbf{H}^T \left(\mathbf{Hf}^{(n)}\right)^{-1} \mathbf{u} . \tag{A-3}$$

O algoritmo da Eq. (A-3) é conhecido como algoritmo MLEM (*Maximum Likelihood Expectation Maximization*), ou algoritmo de Richardson-Lucy [Richardson (1972)] [Lucy (1974)], e foi estudado no contexto de microscopia de fluorescência por diversos autores [Holmes (1988)] [Conchello e Hansen (1990)] [Holmes et al. (1995)] [Conchello (1998)] [Verveer (1998)].

A.2 O Algoritmo RLLS

O algoritmo RLLS (*Regularized Linear Least Squares*) [Preza et al. (1992)] [Preza et al. (1993)] é derivado para o caso de ruído branco aditivo e independente do sinal, com variância σ^2, considerando o modelo

$$\mathbf{g} = \mathbf{Hf} + \mathbf{n}, \tag{A-4}$$

onde $\mathbf{g} \in \mathbb{R}^N$ é o vetor de observações, $\mathbf{H}$ a matriz de borramento, $\mathbf{f} \in \mathbb{R}^N$ a imagem verdadeira e $\mathbf{n} \in \mathbb{R}^N$ o vetor ruído, sendo N a dimensão do espaço.

Dessa forma, o algoritmo é derivado através do problema de minimização

$$\hat{\mathbf{f}}_k = \arg\min_{\tilde{\mathbf{f}}_k} \left\| \mathbf{g} - \mathbf{H}\tilde{\mathbf{f}}_k \right\|^2, \tag{A-5}$$

sujeito a $\tilde{\mathbf{f}}_k \in \left\{ \tilde{\mathbf{f}}_k \setminus \tilde{\mathbf{f}}_k = \sum_{i=0}^{k-1} a_i \cdot \mathbf{e}_i \right\}$ para $k \leq \mathrm{N}$, sendo que $\hat{\mathbf{f}}_k$ é uma estimativa para a imagem verdadeira e $\{\mathbf{e}_i\}_0^{\mathrm{N}-1}$ são os vetores da DFT normalizados e ordenados de acordo com os autovalores $\{\mu_i\}_0^{\mathrm{N}-1}$ de $\mathbf{H}$.

Ainda, o problema pode ser reescrito como

$$\min_{a_i} \left\| \mathbf{g} - \mathbf{H} \sum_{i=0}^{k-1} a_i \cdot \mathbf{e}_i \right\|^2, \tag{A-6}$$

o qual é satisfeito para

$$a_i = \frac{\mu_i^* \cdot < \mathbf{e}_i, \mathbf{g} >}{|\mu_i|^2}, \tag{A-7}$$

sendo que μ_i^* é o complexo conjugado de μ_i.

Assim sendo, constrói-se uma família de estimadores lineares de mínimos quadrados como

$$\hat{\mathbf{f}}_k = \sum_{i=0}^{k-1} a_i \cdot \mathbf{e}_i \ , \ k \leq \mathrm{N}, \tag{A-8}$$

e $\hat{\mathbf{f}}_k \rightarrow \hat{\mathbf{f}}$ quando $k \rightarrow \mathrm{N}$.

Cada $\hat{\mathbf{f}}_k$ é uma estimativa de $\hat{\mathbf{f}}$ com variância expressa por

$$Var\left[\hat{\mathbf{f}}_k\right] = \sigma^2 \cdot \sum_{i=0}^{k-1} |\mu_i|^{-2}, \ k \leq \mathrm{N}. \tag{A-9}$$

Quando $k \rightarrow \mathrm{N}$, $\hat{\mathbf{f}}_k$ se aproxima da solução $\hat{\mathbf{f}}$. Contudo, conforme $k \rightarrow \mathrm{N}$ a variância expressa pela Eq. (A-9) cresce, aumentando o erro médio quadrático (*Mean-Squared Error* – MSE). Baseado em uma medida de precisão linear, o método procura por um limiar de tolerância para o MSE produzindo uma solução com melhor custo-benefício entre a variância e a precisão da estimativa.

Referências Bibliográficas

Agard, D. A. and Sedat, J. W. *Three-Dimensional Architecture of a Polytene Nucleus*. Nature, Vol. 302, pp. 676-681, 1983.

Agard, D. A. *Optical Sectioning Microscopy: Cellular Architecture in Three Dimensions*. Ann. Rev. Biophys. Bioeng, Vol. 13, pp. 191-219, 1984.

Agard, D. A. et al. *Fluorescence Microscopy in Three-Dimensions*. Meth. Cell Biol., Vol. 30, pp. 353-377, 1989.

Aguena, M. L. S. *Fusão de Imagens Multiespectrais Utilizando Técnicas POCS*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 2002.

Ahuja, N. and Chuang, J. -H. *Shape Representation Using a Generalized Potential Field Model*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, Vol. 19, No. 2, pp. 169-176, February 1997.

Al-Kofahi, K. A. et al. *Rapid Automated Three-Dimensional Tracing of Neurons From Confocal Image Stacks*. IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine, Vol. 6, No. 2, pp. 171-187, June 2002.

Andrews, H. C. and Hunt, B. R. *Digital Image Restoration*. Prentice-Hall, Inc., 1977.

Anscombe, F. J. *The Transformation of Poisson, Binomial and Negative-Binomial Data*. Biometrika, Vol. 15, pp. 246-254, 1948.

Arcelli, C. and di Baja, G. S. *A Width-Independent Fast Thinning Algorithm*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Inteligence, Vol. PAMI-7, pp. 463-474, 1985.

Arcelli, C. and di Baja, G. S. *A One-Pass Two-Operation Process to Detect the Skeletal Pixels on the 4-Distance Transform*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Inteligence, Vol. PAMI-11, pp. 411-414, 1989.

Avinash, G. B. *Data-Driven, Simultaneous Blur and Image Restoration in 3-D Ffluorecence Microscopy*. Journal of Microscopy, Vol. 183, Part 2, pp. 145-157, August 1996.

Belichenko, V. and Dahlström, A. *Confocal Laser Scanning Microscopy and 3D Reconstruction of Neuronal Structures in Human Brain Cortex*. Neuroimage, Vol. 2, pp. 201-207, 1995.

Bertero, M. and Pike, E. R. *Resolution in Diffraction-Limited Imaging, a Singular Value Analysis I. The Case of Coherent illumination*. Opt. Acta, Vol. 29, pp. 727-746, 1982.

Bertero, M. and Boccacci, P. *Introduction to Inverse Problems in Imaging*. Institute of Physics Publishing, IOP, 1998.

Bhattacharyya, S. et al. *ML-Blind Deconvolution Algorithm: Recent Developments*. In: Three-Dimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing, C. J. Cogswell, G. S. Kino, and T. Wilson (Eds.), Proc. SPIE, Vol. 2655, pp. 175-186, 1996.

Blum, H. *A Transformation for Extracting New Descriptors of Shape*. Models for the Perception of Speech and Visual Form, W. Wathen-Dunn (Ed.), Cambridge, Mass.: MIT Press, 1967.

Blum, H. *Biological Shape and Visual Science*. J. Theoret. Biol., Vol. 38, pp.205-287, 1973.

Blum, H. and Nagel, R. N. *Shape Description Using Weighted Symmetric Axis Features*. Pattern Recognition, Vol. 10, pp.167-180, 1978.

Born, M. and Wolf, E. *Principles of Optics. Eletromagnetic Theory of Propagation Interference and Difraction of Light*. 7th edition, Cambridge, England: Cambridge University Press, 1999.

Brandt, J. W. and Algazi, V. R. *Continuous Skeleton Computation by Voronoi Diagram*. CVGIP: Image Understanding, Vol. 55, No. 3, pp. 329-338, 1992.

Burton, B. P. *Automated 3D Reconstruction of Neuronal Structures From Serial Sections*. Master's Dissertation, Texas A&M University, August 1999.

Can, A. et al. *Rapid Automated Tracing and Feature Extraction from Retinal Fundus Images Using Direct Explanatory Algorithms*. IEEE Trans. Information Tech. in Biomedicine, Vol. 3, No. 2, pp. 125-138, June 1999.

Capowski, J. and Sedivec, M. *Accurate Computer Reconstruction and Graphics Display of Complex Neurons Utilizing State-of-the-art Interactive Techniques*. Comp. Biomed. Res., Vol. 14, pp. 512-532, 1981.

Carrington, W. A. *Image Restoration in 3D Microscopy with Limited Data*. Bioimaging and Two-Dimensional Spectroscopy. L. C. Smith (Ed.), Proc. SPIE, Vol. 1205, pp. 72-83, 1990.

Carrington, W. A. et al. *Superresolution Three-Dimensional Images of Fluorescence in Cells with Minimal Light Exposure*. Science, Vol. 268, pp. 1483-1487, 1995.

Castleman, K. R. *Digital Image Processing*. Prentice-Hall, Inc., 1996.

Cesar Jr., R. M. and Costa, L. da F. *Semi-Automated Dendrogram Generation for Neural Shape Analysis*. Anais do X Simpósio Brasileiro de Computação Gráfica e Processamento de Imagens, Campos do Jordão, SP, Brasil, pp.147-154, Outubro 1997.

Chuang, J. H. et al. *Skeleton of Three-Dimensional Object Using Generalized Potencial Field.* IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, Vol. 22, No. 11, November 2000.

van Cittert, P. H. *Zum Einfluss der Spaltbreit auf die Intensitätsverteilung in Sprektrallinien.* Zeitschrift für Physik, Vol. 69, pp. 298-308, 1931.

Clarkson, E. and Barrett, H. *A Bound on Null Functions for Digital Imaging Systems with Positivity Constraints.* Optics Letters, Vol. 22, No. 11, pp. 814-815, June 1997.

Cohen, A. R. et al. *Automated Tracing and Volume Measurements of Neurons From 3D Confocal Fluorescence Microscopy Data.* Journal of Microscopy, Vol. 173, Part 2, pp. 103-114, February 1994.

Coleman, P. D. et al. *Semiautomatic Tracking of Neuronal Processes.* In: Computer Analysis of Neuronal Structures, R. D. Lindsay (Ed.), New York: Plenum Press, pp. 91-109, 1977.

Combettes, P. L. *Convex Set Theoretic Image Recovery: History, Current Status, and New Directions.* Journal of Visual Communications and Image Representation, Vol. 3, No. 4, pp. 307-315, December 1992.

Combettes, P. L. *The Foundations of Set Theoretic Estimation.* Proceedings of the IEEE, Vol. 81, No. 2, February 1993.

Combettes, P. L. *The Convex Feasibility Problem in Image Recovery.* In: Advances in Imaging and Electron Physics, P. Hawkes (Ed.), Vol. 95, New York: Academic Press, pp. 155-270, 1996.

Conchello, J. -A. and Hansen, E. W. *Ehanced Three-Dimensional Reconstruction from Confocal Scanning Microscope Images. 1: Deterministic and Maximum Likelihood Reconstruction.* Appl. Opt., Vol. 29, pp. 3795-3804, 1990.

Conchello, J. -A. et al. *Enhanced Three-Dimensional Reconstruction from Confocal Scanning Microscope Images. II. Depth Discrimination Versus Signal-to-Noise Ratio in Partially Confocal Images.* Appl. Opt., Vol. 33, No. 17, pp. 3740-3750, 1994.

Conchello, J. -A., *Fluorescence Photobleaching Correction for Expectation Maximization Algorithm.* In: Three-Dimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing, T. Wilson and C. J. Cogswell (Eds.), Proc. SPIE, Vol. 2412, pp. 138-146, 1995.

Conchello, J. -A. and McNally, J. G. *Fast Regularization Technique for Expectation Maximization Algorithm for Computational Optical Sectioning Microscopy.* In: Three-Dimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing, C. J. Cogswell, G. S. Kino, and T. Wilson (Eds.), Proc. SPIE, Vol. 2655, pp.199-208, 1996.

Conchello, J. -A. *Super-Resolution and Convergence Properties of the Expectation-Maximization Algorithm for Maximum-Likelihood Deconvolution of Incoherent Images*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 15, No. 10, pp. 2609-2620, 1998.

Corle, T. R. and Kino, G. S. *Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems*. Academic Press, 1996.

Costa, L. da F. *Computer Vision Based Morphometric Characterization of Neural Cells*. Rev. Sci. Instrum., Vol. 66, No. 7, pp. 3770-3773, July 1995.

Costa, L. da F. *Novas Perspectivas em Neuromorfometria e Neuromodelagem*. Tese de Livre-Docência, IFSC, Universidade de São Paulo, Janeiro 1997.

Costa, L. da F. *Gauss' Law in Image Processing and Analysis via Fast Numerical Calculation of Vetors Fields*. Real Time Imaging, Vol. 5, pp. 243-251, 1999.

Costa, L. da F. and Velte, T. J. *Automatic Characterization and Classification of Ganglion Cells from the Salamander Retina*. The Journal of Comparative Neurology, Vol. 404, pp. 33-51, 1999.

Costa, L. da F. *Robust Skeletonization Through Exact Euclidean Distance Transform and Its Application to Neuromorphometry*. Real-Time Imaging, Vol. 6, pp. 415-431, 2000.

Costa, L. da F. and Cesar Jr., R. M. *Shape Analysis and Classification: Theory and Practice*. CRC Press, 2000.

Davidson, M. W. and Abramowitz, M. *Optical Microscopy*. In: Encyclopedia of Imaging Science and Technology, J. Hornak (Ed.), Vol. 2, New York: Wiley-Interscience, pp. 1106-1141, 2002.

Dempster, A. P. et al. *Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm*. J. R. Stat. Soc. B, Vol. 39, pp. 1-38, 1977.

Denk, W. et al. *Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy*. Science, Vol. 248, pp. 73-76, 1990.

Dutta, D. and Hoffmann, C. M. *On the Skeleton of Simple CSG Objects*. Trans. J. Mechanical Design, Vol. 115, No. 1, pp. 87-94, March 1993.

Erhardt, A. et al. *Reconstructing 3-D Light-Microscopy Images by Digital Image Processing*. Applied Optics, Vol. 24, No. 2, pp. 194-200, 1985.

di Francia, G. T. *Resolving Power and Information*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 45, No. 7, pp. 497-501, July 1955.

di Francia, G. T. *Degrees of Freedom of an Image*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 59, No. 7, pp. 799-804, July 1969.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Frieden, B. R. *Optical Transfer of the Three-Dimensional Object*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 57, No. 1, pp. 56-66, 1967.

Frieden, B. R. *Evaluation, Design and Extrapolation Methods for Optical Signals, Based on Use of the Prolate Functions*. In: Progress in Optics, E. Wolf (Ed.), Vol. 9, North-Holland, Amsterdam, pp. 311-407, 1971.

Gauch, J. M. *Multiresolution Image Shape Description*. Springer-Verlag, Inc., 1992.

Gauch, J. M. and Pizer, S. M. *The Intensity Axis of Symmetry and Its Application to Image Segmentation*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, Vol. 15, No. 8, pp. 753-770, August 1993.

Gerchberg, R. W. *Super-Resolution Through Error Energy Reduction*. Optica Acta, Vol. 21, pp. 709-720, 1974.

Gibson, S. F. and Lanni, F. *Diffraction by a Circular Apperture as a Model for Three-Dimensional Optical Microscopy*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 6, No. 9, pp. 1357-1367, 1989.

Gibson, S. F. and Lanni, F. *Measured and Analytical Point Spread Functions of the Optical Microscope for Use in 3-D Optical Serial Sectioning Microscopy*. Optical Microscopy for Biology, pp. 109-118, 1990.

Gibson, S. F. and Lanni, F. *Experimental Test of an Analytical Model of Aberration in an Oil-Immersion Objective Lens Used in Three-Dimensional Light Microscopy*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 8, pp. 1601-1613, 1991.

Gomes, J. e Velho, L. *Computação Gráfica: Imagem*. Rio de Janeiro: IMPA/SBM, 1994.

Gonzalez, R. C. and Woods, R. E. *Digital Image Processing*. Addison-Wesley Publishing Company, 1992.

Goodman, J. W. and Belsher, J. F. *Fundamental Limitations in Linear Invariant Restoration of Atmospherically Degraded Images*. Proc. SPIE, Vol. 75, pp. 141-154, 1976.

Goodman, J. W. *Statistical Optics*. Wiley-Interscience, 1985.

Goodman, J. W. *Introduction to Fourier Optics*. 2nd edition, The McGraw-Hill Companies, Inc., 1996.

Gopalakrishnan, V. K. et al. *Restoration of Three Dimensional Images Using the Row Action Projection Method*. IEEE International Symposium on Circuits and Systems, Orlando, FL, pp. 33-36, 1999.

Gubin, L. G. et al. *The Method of Projection for Finding the Common Point of Convex Sets*. USSR Comput. Math. and Math. Physics, Vol. 7, pp. 1-24, 1967.

Halliday, D. et al. *Fundamentos de Física*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1995.

Harris, J. L. *Resolving Power and Decision Theory*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 54, No. 3, pp. 606-611, May 1964.

Harris, J. L. *Diffraction and Resolving Power*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 54, No. 7, pp. 931-936, July 1964.

Hell, S. W. et al. *Far-Field Fluorescence Microscopy With Three-Dimensional Resolution in the 100-nm Range*. J. Microsc., Vol. 187, pp. 1-7, 1997.

Herzog, A. et al. *Restoration of Three-Dimensional Quasi-Binary Images from Confocal Microscopy and its Application to Dendritic Trees*. In: Three-Dimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing, C. J. Cogswell, J.-A. Conchello, and T. Wilson (Eds.), Proc. SPIE, Vol. 2984, pp. 146-157, 1997.

Ho, S. B. and Dyer, C. R. *Shape Smoothing Using Medial Axis Transform*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Inteligence, Vol. PAMI-8, pp. 512-520, 1986.

Holmes, T. J. *Maximum-Likelihood Image Restoration Adapted for Noncoherent Optical Imaging*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 5, pp. 666-673, 1988.

Holmes, T. J. *Expectation-Maximization Restoration of Band- Limited, Truncated Point-Process Intensities with Application in Microscopy*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 6, No. 7, July 1989.

Holmes, T. J. *Blind Deconvolution of Quantum-Limited Incoherent Imagery: Maximum-Likelihood Approach*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 9, pp. 1052-1061, 1992.

Holmes, T. J. et al. *Simultaneous Image and Point Spread Function Reconstruction for 3D Light Microscopy*. In: Image Reconstruction and Restoration, T. J. Schulz and D. L. Snyder (Eds.), Proc. SPIE, Vol. 2302, pp. 359-368, 1994.

Holmes, T. J. et al. *Ligth Microscopic Images Reconstructed by Maximum Likelihhod Deconvolution*. In: Handbook of Biological Confocal Microscopy, J. B. Pawley (Ed.), 2nd edition, New York: Plenum Press, pp. 389-402, 1995.

Hopkins, H. H. *The Frequence Response of a Defocused Optical System*. Proceedings of the Royal Society of London A, Vol. 231, pp. 91-103, 1955.

Hunt, B. H. and Cannon, T. M. *Nonstationary Assumptions for Gaussian Models of Images*. IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Vol. SMC-6, pp. 876-882, December 1976.

Hunt, B. R. and Sementilli, P. *Description of a Poisson Imagery Super-Resolution Algorithm.* In: Astronomical Data Analysis Software and Systems, I. Worrall et al. (Eds.), Astronomical Society of the Pacific, San Francisco, Vol. 25, pp. 196-199, 1992.

Hunt, B. R. *Super-Resolution of Images: Algorithms, Principles, Performance.* International Journal of Imaging Systems and Technology, Vol. 6, pp. 297-304, 1995.

Inouye, T. *Square Root Transform for the Analysis of Quantum Flutuations in Spectrum Data.* Nuclear Instruments and Methods, Amsterdam, Vol. 91, pp. 581-584, 1971.

Jain, A. K. and Ranganath, S. *Extrapolation Algorithms for Discrete Signals with Application in Spectral Estimation.* IEEE Transactions on Accoustics, Speech, and Signal Processing, Vol. ASSP-29, No. 4, pp. 830-845, August 1981.

Joshi, S. and Miller, M. I. *Maximum a Posteriori Estimation with Good's Roughness for Three-Dimensional Optical Sectioning Microscopy.* J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 10, pp. 1078-1085, 1993.

Joyce, L. S. and Root, W. L. *Precision Bounds in Superressolution Processing.* J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 1, No. 2, pp. 149-168, 1984.

Karp, S. and Clark, J. R. *Photon Counting: A Problem in Classical Noise Theory.* IEEE Transactions on Information Theory, Vol. IT-16, pp. 672-680, November 1970.

Katsaggelos, A. K. *Iterative Image Restoration Algorithms.* Optical Engineering, Vol. 28, No. 7, pp. 735-748, July 1999.

van Kempen, G. M. P. et al. *A Quantitative Comparison of Image Restoration Methods for Confocal Microscopy.* J. Microsc., Vol. 185, pp. 354-365, 1997.

Kesterson, J. and Richardson, M. *Confocal Microscope Capability with Desktop Affordability.* Advanced Imaging, pp. 23-26, October 1991.

Kirkpatrick, D. G. *Efficient Computation of Continuous Skeletons.* Proc. 20th Ann. IEEE Symp. Foundations of Computer Science, pp. 18-27, October 1979.

Kosarev, E. L. *Shannon's Superresolution Limit for Signal Recovery.* Inverse Problems, Vol. 6, pp. 55-76, 1990.

Koshy, M. et al. *Solution of Toeplitz Systems for the Restoration of 3-D Optical Sectioning Microscopy Data.* In: Bioimaging and Two-Dimensional Spectroscopy, L. C. Smith (Ed.), Proc. SPIE, Vol. 1205, pp. 64-71, 1990.

Kreyszig, E. *Introduction to Differential Geometry and Riemannian Geometry.* University of Toronto Press, 1968.

Krishnamurthi, V. et al. *Blind Deconvolution of Fluorescence Micrographs by Maximum-Likelihood Estimation*. Appl. Opt., Vol. 34, pp. 6633-6647, 1995.

Lagendijk, R. L. *Iterative Identification and Restoration of Images*. Ph.D. Thesis, Delft Technical University, Delft, The Netherlands, 1990.

Lagendijk, R. L. and Biemond, J. *Interative Identification and Restoration of Images*. Kluwer Academic Publishers, 1991.

Lam, L. et al. *Thinning Methodologies – A Comprehensive Survey*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, Vol. 14, No. 9, September 1992.

Landweber, L. *An Iteration Formula for Fredholm Integral Equations of the First Kind*. Am. J. Math., Vol. 4, pp. 189-199, 1951.

Lane, R. G. *Methods for Maximum Likelihood Decovolution*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 13, No. 10, pp. 1992-1998, October 1996.

Leal, L. H. M. *Fundamentos de Microscopia*. Rio de Janeiro: Editora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2000.

Lent, A. and Tuy, H. *An Iterative Method for Extrapolation of Band-Limited Functions*. Journal of Math. Anal. and Applications, Vol. 83, pp. 544-565, 1981.

Lenz, R. *3-D Reconstruction with a Projection onto Convex Sets Algorithm*. Optics Communications, Vol. 57, No. 1, pp. 21-25, 1986.

Levender, D. et al. *Voronoi Diagrams of Set-Theoretic Solid Models*. IEEE Computer Graphics and Applications, Vol. 12, No. 5, pp. 69-77, 1992.

Levinthal, C. and Ware, R. *Three-Dimensional Reconstruction from Serial Sections*. Nature, Vol. 236, pp. 207-211, March 1972.

Leyton, M. *Symmetry-Curvature Duality*. Computer Vision, Graphics, and Image Processing, Vol. 38, pp. 327-341, 1987.

Lo, C. M. *Estimation of Image Signals with Poisson Noise*. University of Southern California, Doctoral Thesis, 1979.

Lucy, L. B. *An Iterative Technique for the Rectification of Observed Distributions*. Astron. J., Vol. 79, pp. 745-759, 1974.

Ma, C. M. *A Fully Parallel Thinning Algorithm for Generating Medial Faces*. Pattern Recognition Letters, Vol. 16, pp. 83-87, January 1995.

Ma, C. M. and Sonaka, M. *A Fully Parallel 3D Thinning Algorithm and Its Applications*. Computer Vision and Image Understanding, Vol. 64, No. 3, pp. 420-433, November 1996.

Mandel, L. *Fluctuation of Photon Beams: The Distribution of the Photo-Electrons.* Proc. Phys. Soc., Vol. 74, pp. 233-243, September 1959.

Markhan, J. and Conchello, J. -A. *Tradeoffs in Regularized Maximum-Likelihood Image Restoration.* In: Three-Dimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing, C. J. Cogswell, J. -A. Conchello, and T. Wilson (Eds.), Proc. SPIE, Vol. 2984, pp. 136-145, 1997.

Marks, R. J. *Alternating Projections onto Convex Sets.* In: Deconvolution of Images and Spectra, P. A. Jansson (Ed.), 2nd edition, New York: Academic Press, 1997.

Mascarenhas, N. D. A. et al. *Transmission Tomography Under Poisson Noise Using the Anscombe Transformation and Wiener Filtering of the Projections.* Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, Vol. 423, pp. 265-271, 1999.

Matveev, A. N. *Optics.* Moscow: Mir Publishers, 1988.

McNally, J. G. et al. *Tutorial - Image Restoration for 3-D Microscopy.* April 26-27, IBC, Washington University, St. Louis, MO, 1996.

McNally, J. G. et al. *Comparing Methods for 3D Microscopy.* In: Three-Dimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing, C. J. Cogswell, J. -A. Conchello, and T. Wilson (Eds.), Proc. SPIE, Vol. 3261, pp. 108-116, 1998.

Meyer, F. *Skeletons in Digital Spaces.* In: Image Analysis and Mathematical Morphology, J. Serra (Ed.), Vol. 2, London: Academic Press, pp. 257-296, 1988.

Miura, N. and Baba, N. *Superresolution for a Nonnegative Band-Limited Image.* Optics Letters, Vol. 21, No. 15, pp. 1174-1176, August 1996.

Montanari, U. *A Method of Obtaining Skeletons Using a Quasi-Euclidean Distance.* Journal of the Assoc. Comput. Mach. (JACM), Vol. 15, No. 4, pp. 600-624, October 1968.

Montanari, U. *Continuous Skeletons from Digitized Images.* Journal of the ACM (JACM), Vol. 16, No. 4, pp. 534-549, October 1969.

Niblack, C. W. et al. *Generating Skeletons and Centerlines from the Distance Transform.* Graphical Models and Image Processing, Vol. 54, No. 5, pp. 420-437, September 1992.

Odgaard, A. et al. *A Direct Method for Fast Three-Dimensional Serial Reconstruction.* J. Microscopy, Vol. 159, pp. 335-342, September 1990.

Ogniewicz, R. and Ilg, M. *Voronoi Skeletons: Theory and Applications.* Proc. CVPR'92, Champaign, Illinois, pp. 63-69, June 1992.

Papoulis, A. *Probability, Random Variables, and Stochastic Processes.* McGraw-Hill, 1965.

Papoulis, A. *A New Algorithm in Spectral Analysis and Bandlimited Extrapolation.* IEEE Trans. Circuits Syst., Vol. CAS-22, pp. 735-742, 1975.

Press, W. H. et al. *Numerical Recipes in C.* 2nd edition, Cambridge University Press, 1992.

Preza, C. *A Regularized Linear-Reconstruction Method for Optical Sectioning Microscopy.* Master's Thesis, Sever Institute of Technology, Washington University in St. Louis, St. Louis, Missouri, USA, 1990.

Preza, C. et al. *Regularized Linear Method for Reconstruction of Three-Dimensional Microscopic Objects from Optical Sections.* J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 9, No. 2, pp. 219-228, February 1992.

Preza, C. et al. *Image Reconstruction for 3-D Light Microscopy with a Regularized Linear Method Incorporating a Smoothness Prior.* In: Biomedical Image Processing and Biomedical Visualization, R. S. Acharya and D. B. Goldgof (Eds.), Proceedings of the Symposium on Electronic Imaging, Science and Technology, IS&T/SPIE, pp. 129-139, February 1993.

Preza, C. *Phase Estimation Using Rotational Diversity for Differential Interference Contrast Microscopy.* Ph.D. Thesis, Sever Institute of Technology, Washington University in St. Louis, St. Louis, Missouri, USA, 1998.

Pudney, C. J. *Distance-Based Skeletonization of 3D Images.* Proceedings of the IEEE TENCON, Digital Signal Processing Applications, pp. 209-214, 1996.

Razaz, M. et al. *Restoration of 3D Real Images Using Projection onto Convex Sets.* In: Image Processing: Mathematical Methods and Applications, J. Blackledge (Ed.), Oxford Univ. Press, pp. 127-144, 1997.

Reddy, J. M. and Turkiyyah, G. M. *Computation of 3D Skeletons Using a Generalized Delaunay Triangulation Technique.* Computer-Aided Design, Vol. 27, No. 9, pp. 677-694, September 1995.

Richardson, W. H. *Bayesian-Based Iterative Method of Image Restoration.* J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 62, pp. 55-60, 1972.

Rust, B. W. and Burrus, W. R. *Mathematical Programing and the Numerical Solution of Linear Equations.* New York: American Elsevier Publishing Company, Inc., 1972.

Schroeder, W. et al. *The Visualization Toolkit.* 2nd edition, Upper Saddle River: Prentice Hall, 1998.

Sementilli, P. J. et al. *Analysis of the Limit to Superresolution in Incoherent Imaging.* J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 10, No. 11, pp. 2265-2276, November 1993.

Sezan, M. I. and Stark, H. *Image Restoration by the Method of Convex Projections: Part 2 – Application and Numerical Results*. IEEE Trans. Med. Imaging, Vol. MI-1, pp. 95-101, October 1982.

Sezan, M. I. and Tekalp, A. M. *Adaptative Image Restoration with Artifact Suppression Using the Theory of Convex Projections*. IEEE Trans. Acoust., Speech, Signal Processing, Vol. 38, pp.181-185, 1990.

Sezan, M. I. and Trussell, H. J. *Prototype Image Constraints for Set-Theoretic Image Restoration*. IEEE Transactions on Signal Processing, Vol. 39, No. 10, pp. 2275-2285, October 1991.

Sezan, M. I. *An Overview of Convex Projections Theory and Its Application to Image Recovery Problems*. Ultramicroscopy, Vol. 40, pp. 55-67, 1992.

Sharein, R. G. et al. *3D Neuron Tracing from Confocal Microscope Data Using a Head-Coupled Display*. Proc. SPIE, Vol. 2184, 1994.

Shaw, P. J. and Rawlins, D. J. *The Point-Spread Function of a Confocal Microscope: Its Measurement and Use in Deconvolution of 3-D Data*. Journal of Microscopy, Vol. 163, Part 2, pp.151-165, August 1991.

Shaw, P. J. *Comparison of Wide-Field Deconvolution and Confocal Microscopy for 3D Imaging*. Handbook of Biological Confocal Microscopy, J. B. Pawley (Ed.), 2nd edition, New York: Plenum Press, pp. 373-387, 1995.

Sheehy, D. J. et al. *Shape Description by Medial Surface Construction*. IEEE Trans. Visualization and Computer Graphics, Vol. 2, No. 1, pp. 62-73, March 1996.

Shepp, L. A. and Vardi, Y. *Maximum Likelihood Reconstruction for Emission Tomography*. IEEE Trans. Med. Imaging, Vol. MI-1, pp. 113-122, 1982.

Simic, G. et al. *Volume and Neuron Numbers of The Human Hippocampal Formation in Normal Aging and Alzheimer's Disease*. J. Comp. Neurol., Vol. 379, pp. 482-494, 1997.

Slepian, D. and Pollack, H. O. *Prolate Spheroidal Wave Functions, Fourier Analysis and Uncertainty – I*. Bell Systems Tech. Journal, Vol. 40, pp. 43-62, 1961.

Snyder, D. L. and Miller, M. I. *Random Point Processes in Time and Space*. New York: Springer-Verlag, Inc., 1991.

Snyder, D. L. et al. *Image Recovery from Data Acquired with a Charge-Couple-Device Camera*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 10, No. 5, pp. 1014-1023, May 1993.

Spivak, M. *A Comprehensive Introduction to Differential Geometry*. Vol. 3, Berkeley: Publish or Perish, 1979.

Starck, J. L. and Murtagh, F. *Astronomical Image and Signal Processing*. IEEE Signal Processing Magazine, pp. 30-40, March 2001.

Stark, H. and Sezan, I. M. *Image Processing Using Projetion Methods*. In: Real Time Optical Information Processing, B. Javidi and J. Horner (Eds.), Orlando: Academic Press, Inc., pp. 185-232, 1994.

Stark, H. and Yang, Y. *Vector Space Projections, A Numerical Approach to Signal and Image Processing, Neural Nets, and Optics*. A Wiley-Interscience Publication, 1998.

Stockley, E. W. et al. *A System for Quantitative Morphological Measurement and Electrotonic Modelling of Neurons: Three Dimensional Reconstruction*. J. Neurosc. Methods, Vol. 47, pp. 39-51, 1993.

Stokseth, P. A. *Properties of a Defocused Optical System*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 59, No. 10, October 1969.

Streekstra, G. J. and Pelt, J. V. *Analysis of Tubular Structures in Three-Dimensional Confocal Images*. Network Comput. Neural Syst., Vol. 13, pp. 381-395, 2002.

Streibl, N. *Three-Dimensional Imaging by a Microscope*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 2, No. 2, pp. 121-127, February 1985.

Swedlow, J. R. et al. *Deconvolution in Optical Microscopy*. In: Deconvolution of Images and Spectra, P. A. Jansson (Ed.), 2nd edition, New York: Academic Press, pp. 284-309, 1997.

Tenenblat, K. *Introdução à Geometria Diferencial*. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 1998.

Tikhonov, A. N. and Arsenin, V. Y. *Solutions of Ill-Posed Problems*. New York: Wiley, 1977.

Toga, A. W. *Three-Dimensional Neuroimaging*. New York: Raven Press, 1990.

Tommasi, T. et al. *3-D Reconstruction in Optical Microscopy by a Frequency-Domain Approach*. Signal Processing, Vol. 32, pp. 357-366, 1993.

Trussell, H. J. and Kruger, R. P. *Comments on "Nonstationary Assumptions for Gaussian Models in Images"*. IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Vol. SMC-8, No. 7, pp. 579-582, July 1978.

Tsao, Y. F. and Fu, K. S. *A Parallel Thinning Algorithm for 3D Pictures*. Computer Graphics and Image Processing, Vol. 17, pp. 315-331, 1981.

Verveer, P. J. and Jovin, T. M. *Acceleration of the ICTM Image Restoration Algorithm*. J. Microsc., Vol. 188, pp. 191-195, 1997.

Verveer, P. J. and Jovin, T. M. *Efficient Superresolution Restoration Algorithm Using Maximum a Posteriori Estimations with Application to Fluorescence Microscopy*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 14, pp. 1696-1706, 1997.

Verveer, P. J. *Computational and Optical Methods for Improving Resolution and Signal Quality in Fluorescence Microscopy*. Ph.D. Thesis, Delft Technical University, Delft, The Netherlands, 1998.

Verveer, P. J. and Jovin, T. M. *Efficient Image Restoration Based on Good's Roughness Penalty with Application to Fluorescence Microscopy*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 15, pp. 1077-1083, 1998.

Vitrià, J. and Llacer, J. *Reconstructing 3D Light Microscopic Images Using the EM Algorithm*. Pattern Recognition Letters, Vol. 17, No. 14, pp. 1491-1498, 1996.

van der Voort, H. T. M. and Strasters, K. C. *Restoration of Confocal Images for Quantitative Image Analysis*. J. Microsc., Vol. 178, pp. 165-181, 1995.

Walkup, J. F. *Limitation in Interferometric Measurements and Image Restoration at Low Light Levels*. Ph.D. Dissertation, Stanford University, July 1971.

Walkup, J. F. and Goodman, J. W. *Limitations of Fringe-Parameter Estimation at Low Ligth Levels*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 63, pp. 399-407, April 1973.

Walsh, D. O. and Delaney, P. A. N. *Direct Method for Superresolution*. J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 11, No. 2, pp. 572-579, February 1994.

Wang, L. L. *Detection and Estimation of an Optical Image by Photon-Counting Techniques*. Ph.D. Dissertation, University of California, 1973.

Weinstein, M. and Castleman, K. R. *Reconstructioning 3D Specimens from 2D Section Images*. Proceedings of the SPIE, Vol. 26, pp. 131-138, 1971.

Wilson, T. *Optical Sectioning in Confocal Fluorescence Microscopes*. J. Microsc., Vol. 154, pp. 143-156, 1989.

Wright, M. W. *The Extended Euclidean Distance Transform*. Ph.D. Thesis, University of Cambridge, June 1995.

Xia, Y. *Skeletonization Via the Realization of the Fire Front's Propagation and Extinction in Digital Binary Shapes*. IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intelligence, Vol. 11, pp. 1076-1086, November 1989.

Xu, F. et al. *Extracting Generalized Cylinder Models of Dendritic Trees from 3D Image Stacks*. In: Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing, C. J. Cogswell et al. (Eds.), Proc. SPIE, Vol. 3261, pp. 149-158, 1998.

Youla, D. C. *Generalized Image Restoration by the Method of Alternating Orthogonal Projections*. IEEE Transactions on Circuit and Systems, Vol. 25, pp. 694-702, 1978.

Youla, D. C. and Webb, H. *Image Restoration by the Method of Convex Projections: Part 1 – Theory*. IEEE Trans. Med. Imaging, Vol. MI-1, pp. 81-94, October 1982.

Zhou, Y. and Toga, A. W. *Efficient Skeletonization of Volumetric Objects*. IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics, Vol. 5, No. 3, pp. 196-209, 1999.