

CORREÇÃO DE ARTEFATOS DE MOVIMENTO EM IMAGENS DE VÍDEO DE MICROSCOPIA INTRAVITAL COM APLICAÇÃO NA DETECÇÃO AUTOMÁTICA DE LEUCÓCITOS

Carlos H. V. Pinto*, Paulo G. de L. Freire*, Bruno C. G. da Silva*, Danielle Bernardes**, Juliana C. Tavares** e Ricardo J. Ferrari*

*Departamento de Computação – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, Brasil

**Departamento de Fisiologia e Biofísica – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, Brasil

e-mail: carlos.pinto@dc.ufscar.br

Resumo: A microscopia intravital (MI) é uma poderosa ferramenta para observação e imageamento *in vivo* de sistemas biológicos, tendo importante aplicação no estudo das interações leucócito-endotélio que ocorrem na microcirculação de diversos tecidos animais. Um dos principais obstáculos para a análise *in vivo* é a presença de borramento e de artefatos de movimento nas sequências de quadros de vídeo adquiridas, em decorrência da respiração e dos batimentos cardíacos inevitáveis do animal. Isso compromete significativamente a detecção e o rastreamento de leucócitos ao longo dos quadros, tanto em análises visuais como nas automáticas. Assim, este trabalho realizou o estudo e aplicação de duas técnicas de deconvolução cega para a correção de artefatos de movimento em vídeos de MI, com uma avaliação quantitativa de como tal restauração afeta o desempenho de dois métodos de detecção automática de leucócitos. Pela análise comparativa de precisão *versus* revocação, concluiu-se que a restauração dos quadros de fato melhora a eficácia das detecções automáticas e, assim, tem utilidade no pré-processamento de vídeos para análises *in vivo*.

Palavras-chave: microscopia intravital, detecção automática de leucócitos, deconvolução cega.

Abstract: *Intravital microscopy (IM) is a powerful tool for the in vivo observation and imaging of biological systems, having important application in the study of the leukocyte-endothelial interactions which occur in the microcirculation of various animal tissues. One of the major obstacles for the in vivo analysis is the presence of blurring and motion artifacts in the acquired video frames sequences, due to the animal's unavoidable breathing and heartbeats. This greatly compromises the detection and tracking of leukocytes over the frames, both in visual and automatic analyzes. Therefore, this paper carried out the study and application of blind deconvolution techniques for the correction of motion artifacts in IM videos, with a quantitative assessment of how such restoration affects the performance of two automatic methods of leukocytes detection. From the comparative precision versus recall analysis it was*

concluded that the frames restoration in fact improves the effectiveness of the automatic detections and, therefore, it can be useful in the preprocessing of videos for in vivo analyses.

Keywords: *intravital microscopy, automatic detection of leukocytes, blind deconvolution.*

Introdução

A microscopia intravital (MI) é uma poderosa ferramenta para observação e imageamento *in vivo* de sistemas biológicos, tendo importante aplicação no estudo das interações leucócito-endotélio que ocorrem na microcirculação de diversos tecidos animais, sob condições normais e patológicas, visando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias [1, 2]. Tradicionalmente, a análise das sequências de imagens é realizada de maneira visual por um especialista. Entretanto, trata-se de um trabalho repetitivo, que consome muito tempo, e cuja precisão das medições pode ser afetada pela fadiga visual do observador e também variar significativamente entre diferentes observadores [3]. Assim, o estudo e desenvolvimento de técnicas automáticas para a detecção, o rastreamento e a análise de leucócitos em vídeos de MI figura atualmente como uma área de pesquisa bastante ativa [3].

Diferentemente do que ocorre na análise *in vitro*, o controle das condições de aquisição das imagens de MI é bastante limitado, especialmente no que se refere à imobilização do animal em observação. Por essa razão, um dos principais obstáculos nesse tipo de análise é a presença de borramento e de artefatos de movimento nas imagens de vídeo adquiridas, surgidos em decorrência da respiração e dos batimentos cardíacos do animal [4, 5]. Isso compromete significativamente a detecção e o rastreamento dos leucócitos ao longo da sequência de quadros, tanto nas análises visuais como naquelas realizadas por métodos automáticos.

Até certo ponto, o movimento pode ser corrigido com técnicas de co-registro de imagens [4, 6] ou mesmo por aparatos eletro-mecânicos especialmente desenvolvidos para esse fim [5]. Mas se o movimento

do animal for muito intenso, como acontece em experimentos envolvendo o cérebro e a coluna espinhal, os artefatos produzidos podem ser bastante complexos e afetar vários quadros de vídeo em sequência, exigindo, então, a aplicação de técnicas de restauração de imagens para que o problema possa ser minimizado.

Dado tal problema, este trabalho realizou a aplicação e análise de duas técnicas de deconvolução cega para a correção de artefatos de movimento em vídeos de MI. Os resultados foram quantitativamente avaliados observando-se como tal correção afeta o desempenho de duas técnicas de detecção automática de leucócitos.

Materiais e métodos

Banco de imagens – As imagens de vídeo utilizadas neste trabalho exibem o recrutamento de leucócitos marcados com rodamina 6G nas vênulas pós-capilares da microcirculação cerebral de um camundongo. Para a aquisição, foi utilizado um microscópio Zeiss Imager M.2 (Thornwood, NY, com filtro de emissão/590 nm e excitação/510-560 nm), objetiva 20XLD. As imagens possuem 8 bits de profundidade, taxa de amostragem de 16 quadros por segundo e resolução espacial de 1,89 pixels/ μm . A matriz imagem possui 692 \times 520 pixels. O vídeo obtido possui, no total, 329 quadros. Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Núcleo de Neurociências (NNC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Pré-processamento – O filtro bilateral proposto em [7] foi usado para redução de ruído e melhoria de contraste nas imagens. A seguir, a perda de alinhamento espacial da sequência de quadros de vídeo foi reduzida utilizando uma técnica de co-registro de imagens¹ [6].

Detecção automática de leucócitos – Duas técnicas de detecção foram utilizadas neste trabalho: (a) o algoritmo de casamento de padrões (TM – *template matching*) [8], que se baseia na medida de correlação cruzada normalizada e realiza a detecção de objetos similares em uma imagem I tendo como entrada a própria imagem e o objeto w (padrão ou *template*) a ser detectado; e (b) uma técnica de avaliação da simetria de fase de estruturas locais (LPS – *local phase symmetry*), que realiza a convolução da imagem I com um banco de filtros 2D complexos do tipo log-Gabor [9] para obter mapas de energia $E_{s,\theta}$ e amplitude $A_{s,\theta}$ locais e, a partir deles, identificar na imagem estruturas claras e com alto grau de simetria em relação a seus centroides (tais como os leucócitos). A simetria de fase local é definida como

$$\kappa(x, y) = \frac{\sum_{s=1}^S M_{E_s}(x, y)}{\sum_{s=1}^S M_{A_s}(x, y)}, \quad (1)$$

sendo

$$M_{A_s}(x, y) = \text{mediana}_{\theta \in \Theta} \{A_{s,\theta}(x, y)\}, \quad (2)$$

$$M_{E_s}(x, y) = \text{mediana}_{\theta \in \Theta} \{E_{s,\theta}(x, y)\}, \quad (3)$$

¹ É importante observar que tal técnica não é capaz de corrigir degradações locais severas causadas por movimentos intensos e complexos do animal.

$$A_{s,\theta}(x, y) = \sqrt{\text{Re}_{s,\theta}^2(x, y) + \text{Im}_{s,\theta}^2(x, y)}, \quad (4)$$

$$E_{s,\theta}(x, y) = |\text{Re}_{s,\theta}(x, y)| - |\text{Im}_{s,\theta}(x, y)|. \quad (5)$$

$\text{Re}_{s,\theta}$ e $\text{Im}_{s,\theta}$ são, respectivamente, os componentes real e imaginário da convolução da imagem I com o filtro de log-Gabor em uma determinada escala s e orientação θ .

O projeto do banco de filtros de log-Gabor foi feito da seguinte maneira: S (número de escalas) = 2; $|\Theta|$ (número de orientações) = 6; ω_{\min} (frequência central mínima) $\approx 0,04$ ciclos/pixels; ω_{\max} (frequência central máxima) $\approx 0,08$ ciclos/pixels; σ_r (largura de banda de frequência) = 0,55 e σ_θ (desvio padrão angular) = 1,3.

Deconvolução cega – Deconvolução é o processo de remoção do borramento introduzido durante a aquisição da imagem, o qual normalmente ocorre devido a fatores tais como o movimento relativo entre o sensor de captura e o objeto imageado, o desajuste focal e a presença de deformidades nas lentes [10, 11]. O modelo de formação e degradação da imagem é matematicamente expresso pela equação

$$g(x, y) = (f * h)(x, y) + \eta(x, y), \quad (6)$$

na qual a função f representa a imagem latente (sem degradação) do objeto, η é o componente de ruído aditivo, h é a função de espalhamento de ponto (PSF – *point spread function*) do sistema ótico de imageamento e g representa a imagem degradada que se obtém como resultado final. O símbolo $*$ corresponde ao operador de convolução. A deconvolução visa reverter tal processo encontrando uma aproximação para f a partir de g , assumindo que h é um operador linear e invariante ao deslocamento [8, 10]. As técnicas de deconvolução cega são empregadas quando não se conhece a PSF h , pois elas iterativamente estimam tanto a imagem latente f como a própria PSF h a partir de uma determinada inicialização [10].

Foram testadas duas técnicas estatísticas de deconvolução cega neste trabalho: (a) o algoritmo *deconvblind* (DB), que se baseia na estimação por máxima verossimilhança de f e está implementado no software MATLAB®; e (b) o método de Shan-Jia-Agarwala (SJA) [11], que realiza uma estimação por máxima a posteriori de f e h utilizando um produto de prioris locais e globais. Sua formulação leva em conta a distribuição espacial aleatória do ruído no sentido de tomar estratégias para evitar o surgimento dos artefatos de *ringing*.

Descrição dos experimentos – Foram realizados os seguintes passos: (a) 15 quadros de vídeo de boa qualidade visual foram selecionados. Seja esse conjunto de imagens denominado Ω . (b) Os centroides dos leucócitos nas imagens em Ω foram manualmente marcados, originando um novo conjunto, Ω_0 , que constitui o padrão-ouro dos experimentos. (c) Cada imagem de Ω foi degradada artificialmente via convolução com uma PSF de borramento linear uniforme de tamanho 11 (movimento fraco), produzindo o conjunto de imagens Ω'_1 . Analogamente, produziu-se o conjunto Ω'_2 usando uma PSF de tamanho 21

(movimento forte). (d) Os dois algoritmos de detecção de leucócitos (TM e LPS) foram aplicados nas imagens de Ω'_1 e Ω'_2 , gerando assim os conjuntos $TM(\Omega'_i)$ e $LPS(\Omega'_i)$ para $i = 1, 2$. (e) Os quadros de Ω'_1 e Ω'_2 foram restaurados utilizando as técnicas de deconvolução cega DB e SJA, gerando os conjuntos $DB(\Omega'_i)$ e $SJA(\Omega'_i)$ para $i = 1, 2$. (f) Os dois algoritmos de detecção foram aplicados novamente, desta vez nas imagens restauradas, resultando nos conjuntos $TM(DB(\Omega'_i))$, $LPS(DB(\Omega'_i))$, $TM(SJA(\Omega'_i))$ e $LPS(SJA(\Omega'_i))$, para $i = 1, 2$. (g) Foram avaliadas as correspondências entre os centroides manualmente marcados no padrão-ouro Ω_0 e aqueles marcados automaticamente nas imagens resultantes dos passos (d) e (f), contando a quantidade de verdadeiros positivos (VP), falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN) em cada conjunto. A análise comparativa dos diferentes resultados obtidos permitiu estimar o quão mais eficazes as técnicas de detecção se tornam quando são aplicadas em imagens restauradas (em comparação ao que se consegue com imagens degradadas).

Forma de avaliação dos resultados – Os resultados foram avaliados por meio da análise de precisão *versus* revocação do sistema de detecção, sendo

$$\text{precisão} = VP / (VP + FP), \quad (7)$$

$$\text{recuperação} = VP / (VP + FN), \quad (8)$$

em que VP é o número de leucócitos reais corretamente detectados pela técnica, FP é o número de leucócitos detectados pela técnica mas que não correspondem a leucócitos reais, e FN é o número de leucócitos reais que a técnica não conseguiu detectar. Quanto mais próximas ambas, precisão e a revocação, estiverem do valor 1, melhor é a eficácia do sistema de detecção [12].

Cada técnica de detecção foi testada em sete conjuntos distintos de imagens: (a) sem degradação (Ω); (b) degradadas por movimento fraco (Ω'_1) e (c) movimento forte (Ω'_2); (d) e (e) restauradas pelo algoritmo *deconvblind* (DB) em cada tipo de degradação ($DB(\Omega'_1)$ e $DB(\Omega'_2)$); e (f) e (g) restauradas pelo método de Shan-Jia-Agarwala (SJA) em cada tipo de degradação ($SJA(\Omega'_1)$ e $SJA(\Omega'_2)$). As comparações com o padrão-ouro Ω_0 foram realizadas pela verificação da correspondência entre as posições dos centroides nas imagens, tolerando-se uma diferença de até 9 pixels nas direções horizontal e vertical. Ao final, calcularam-se os valores médios de precisão e revocação para cada conjunto de imagens.

Resultados

As Figuras 1 e 2 exibem, respectivamente, os gráficos de precisão *versus* revocação média para as técnicas de detecção TM e LPS em cada conjunto de imagens avaliado.

A Figura 3 mostra uma comparação das distâncias euclidianas D de cada ponto (*precisão, recuperação*) ao ponto de máxima eficácia (1,1) para cada uma das técnicas de detecção e em cada conjunto de imagens.

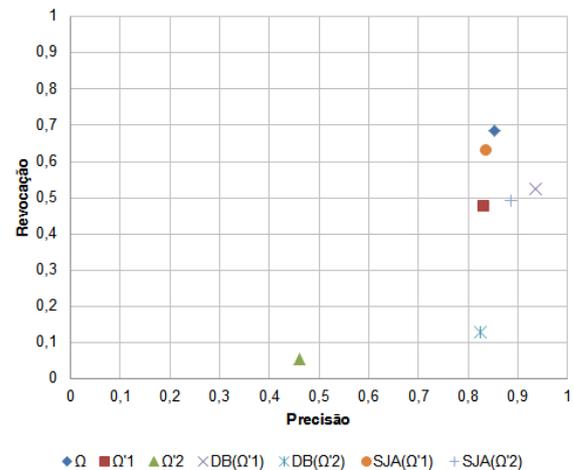


Figura 1: Gráfico de precisão *versus* revocação médias para a técnica de detecção TM em cada conjunto de imagens testado.

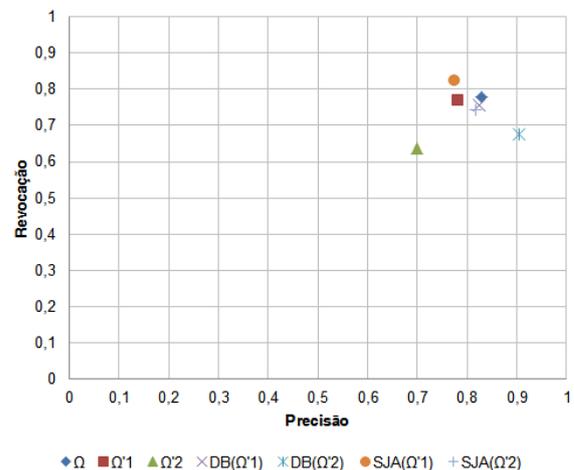


Figura 2: Gráfico de precisão *versus* revocação médias para a técnica de detecção LPS em cada conjunto de imagens testado.

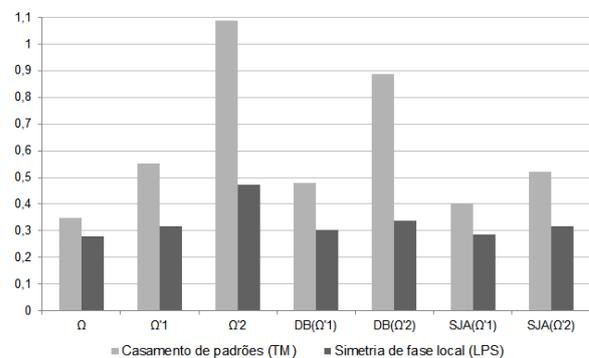


Figura 3: Distâncias euclidianas do ponto de máxima eficácia (1,1) aos pontos (*precisão, recuperação*) de cada técnica em cada conjunto de imagens.

Discussão

Analisando a redução que cada técnica de restauração proporciona ao valor da distância D , em relação aos valores nas imagens degradadas por movimento fraco e forte, pode-se constatar que o método de Shan-Jia-Agarwala (SJA) apresenta, em geral, melhores resultados do que o algoritmo *deconvblind* (DB), considerando que a redução em D é maior em todos os casos para tal técnica. Em outras palavras, o método SJA consegue estimar melhor a PSF que degrada a imagem e controlar o surgimento de artefatos, consequentemente realizando uma melhor restauração, devolvendo o formato original dos leucócitos de maneira mais precisa e, assim, possibilitando que a técnica de detecção seja mais eficaz.

Comparando-se os desempenhos médios das duas técnicas de detecção, é possível observar que o método baseado em simetria de fase local (LPS) é mais robusto e portanto apresenta, em geral, melhores resultados do que a técnica de casamento de padrões (TM). Esta última tem seu desempenho mais negativamente afetado em todas as situações, principalmente quando há movimento forte, devido à sua maior sensibilidade a erros. Também convém notar que nenhum método de restauração foi efetivo o suficiente para que alguma técnica de detecção pudesse igualar, nas imagens restauradas, o mesmo desempenho médio que havia tido nas imagens sem degradação. Tal fato acontece apenas em alguns poucos quadros isolados, e mais devido à eliminação de falsos positivos presentes no caso sem degradação do que pela inclusão de acertos efetivos.

Como os movimentos respiratórios e cardíacos do animal em observação são inevitáveis no contexto da MI, e como nem sempre é viável descartar os quadros de vídeo degradados, podemos então concluir que o uso de técnicas de deconvolução cega para restauração dos quadros degradados pode ser bastante útil como forma de pré-processamento dos vídeos de MI antes da aplicação de uma técnica de detecção automática de leucócitos. Isso é válido especialmente quando se utiliza uma técnica de detecção mais sensível a erros, como é o caso do casamento de padrões.

Conclusão

Visto que os movimentos respiratórios e cardíacos do animal em observação são inevitáveis e nem sempre é viável descartar os quadros de vídeo degradados, o uso de métodos de deconvolução cega em MI para restauração dos quadros de vídeo mostra-se útil como forma de pré-processamento antes da aplicação de uma técnica de detecção automática de leucócitos. Dessa forma, é possível obter maior precisão e rapidez na contagem dessas células.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo 2012/17772-3 – e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – processo 481923/2010-1 – pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] Santos AD, Barsante M, Arantes R, Bernard C, Teixeira M, Tavares JC. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis an intravital microscopy study. *Journal of Neuroimmunology*. 2005; 162(1-2):122-129.
- [2] Santos AD, Roffe E, Arantes R, Juliano L, Pesquero JL, Pesquero JB, Bader M, Teixeira M, Tavares JC. Kinin B2 receptor regulates chemokines CCL2 and CCL5 expression and modulates leukocyte recruitment and pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 2008; 5:49-58.
- [3] Zimmer C, Zhang B, Dufour A, Thébaud A, Berlemont S, Meas-Yedid V, Marin J-CO. On the digital trail of mobile cells. *IEEE Signal Processing Magazine*. 2006; 23:54-62.
- [4] Lorenz KS, Salama P, Dunn KW, Delp EJ. Digital correction of motion artefacts in microscopy image sequences collected from living animals using rigid and nonrigid registration. *Journal of Microscopy*. 2012; 245:148-160.
- [5] Vinegoni C, Lee S, Gorbatov R, Weissleder R. Motion compensation using a suctioning stabilizer for intravital microscopy. *IntraVital*. 2012; 1:115-121.
- [6] Silva BCG, Freire PGL, Bernardes D, Tavares JC, Mello RF, Ferrari RJ. Estabilização de imagens de vídeo de microscopia intravital aplicado à detecção e rastreamento automático de leucócitos. In: XII Workshop de Informática Médica; 2012 Jul 16-17; Curitiba, PR, Brasil. 2012. p. 1-4.
- [7] Tomasi C, Manduchi R. Bilateral Filtering for Gray and Color Images. In: *Proceedings of the Sixth International Conference on Computer Vision*; 1998 Jan 4-7; Washington, DC, USA. p. 839-846.
- [8] Gonzalez RC, Woods RE. *Digital Image Processing*. 3^a ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall; 2006.
- [9] Boukerroui D, Noble JA, Brady M. On the choice of band-pass quadrature filters. *Journal of Mathematical Imaging and Vision*. 2004; 21:53-80.
- [10] Sibarita JB. Deconvolution microscopy. 2005, *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. 2005; 95:201-243.
- [11] Shan Q, Jia J, Agarwala A. High-quality Motion Deblurring From a Single Image. *ACM Transactions on Graphics*. 2008; 27:10.
- [12] Fawcett T. An Introduction to ROC Analysis. *Pattern Recognition Letters*. 2006; 27:861-874.