

TÉCNICA DE ESTABILIZAÇÃO DE MOVIMENTO EM MICROSCOPIA INTRAVITAL UTILIZANDO MÉTODOS DE CO-REGISTRO DE IMAGENS

Bruno C. Gregório da Silva*, Paulo G. Freire*, Rodrigo F. Mello***, Danielle Bernardes**, Juliana C. Tavares** e Ricardo J. Ferrari*

* Departamento de Computação - Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brasil

** Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG - Brasil

*** Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação - Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP - Brasil

e-mail: bruno.silva@dc.ufscar.br

Resumo: A detecção e o rastreamento automáticos de leucócitos em imagens de vídeo de MI podem garantir análises mais precisas e, consequentemente, auxiliar os pesquisadores no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes. Entretanto, na análise *in vivo*, a respiração e a atividade cardíaca do animal ocasionam a perda momentânea do foco dos vasos, gerando imagens borradas e distorcidas. Esse fato dificulta consideravelmente a detecção e o rastreamento dos leucócitos. Portanto, este trabalho propõe um método multirresolução para a estabilização de sequências de imagens de MI que utiliza a técnica *demons* simétrica, com transformações afins e deformáveis. Os resultados obtidos da aplicação do método proposto indicam uma melhoria visual significativa na estabilização das imagens, quantificada pelo aumento no valor médio da métrica PSNR de 35 para 40dB, aplicada sobre os resíduos resultantes da subtração de imagens consecutivas do vídeo.

Palavras-chave: estabilização de imagem, microscopia intravital, co-registro de imagens, detecção e rastreamento de leucócitos.

Abstract: The automatic detection and tracking of leukocytes in intravital microscopy images can ensure more accurate analysis and consequently help researchers in the development of more effective therapeutic strategies. However, in *in vivo* analysis, the respiration and cardiac activity of the animal cause momentary loss of focus of the vessels, causing blurred and distorted images. This fact considerably hinders the detection and tracking of leukocytes. Therefore, this paper proposes a multiresolution method for the stabilization of intravital microscopy image sequence using symmetric demons technique, with affine and deformable transformations. The results obtained from proposed method indicate a significant visual improvement in image stabilization, quantified by the increase of average value of the PSNR metric from 35 to 40dB, applied over the residuals from subtraction of consecutive video frames.

Keywords: image stabilization, intravital microscopy, image registration, detection and tracking of leukocytes.

Introdução

O estudo das interações leucócito-endotélio na microcirculação de tecidos e em condições inflamatórias pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes [1]. Nesse contexto, a microscopia intravital (MI) [2] torna-se uma ferramenta essencial para estudos experimentais *in vivo*.

Atualmente, a forma de análise das imagens é a observação visual dos eventos leucocitários. Tal análise permite a contagem e a avaliação dos leucócitos rolando e aderidos nas paredes dos vasos sanguíneos. No entanto, a análise visual é uma tarefa que consome muito tempo e que pode afetar a precisão das medições devido à fadiga visual do observador [3].

Um dos principais desafios no desenvolvimento de métodos automáticos em MI é a estabilização dos movimentos do vídeo, ocasionados principalmente pela respiração e batimento cardíaco do animal [4]. Tais movimentos causam mudanças momentâneas no plano focal do microscópio e, consequentemente, geram borramentos e distorções nas imagens. Para solucionar tal problema, algumas pesquisas têm sido realizadas a fim de melhorar as imagens obtidas, tanto via técnicas de processamento de imagens [5] [6], quanto no processo de aquisição das mesmas, como é o caso da criação de novos componentes mecânicos [7] para a fixação do animal. Uma desvantagem dessa última abordagem é que as forças aplicadas na estabilização do animal podem interferir no processo leucocitário, que é extremamente sensível.

Neste trabalho, o problema de estabilização de movimento em vídeos de MI é corrigido através de técnicas de co-registro de imagens, aplicadas a pares consecutivos de quadros do vídeo.

Materiais e métodos

Nesta seção são descritas as características das imagens utilizadas no trabalho e do método desenvolvido.

Banco de imagens – As imagens de vídeo do recrutamento *in vivo* de leucócitos, marcados com rodamina 6G nas vênulas pós-capilares da

microcirculação cerebral de camundongos, foram obtidas utilizando 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/*m*. A matriz imagem possui 592×420 pixels.

Pré-processamento – Com o objetivo de aumentar a estabilidade do processo de co-registro das imagens de vídeo, a técnica de correspondência de histograma [8] foi utilizada para corrigir possíveis variações de intensidade entre os diferentes quadros do vídeo causadas pelo efeito *photobleaching* [3]. Em adição, o filtro bilateral [9] foi utilizado para a redução de ruído e realce de contraste das imagens.

Técnica de co-registro – O método proposto, cujas etapas estão indicadas no diagrama da Figura 1, envolve a determinação de uma transformação $T(p)$ capaz de corrigir o desalinhamento das imagens causado pelo movimento do animal. Os parâmetros da transformação $T(p)$ são obtidos de maneira iterativa mapeando os pixels da imagem móvel $M(x)$ para os seus correspondentes na imagem fixa $F(x)$ usando uma métrica de similaridade $S(p|F, M, T)$. A métrica S utilizada foi a informação mútua [10], que é uma medida da dependência estatística entre duas variáveis aleatórias que, no caso, correspondem às distribuições dos níveis de cinza das imagens F e M . Um otimizador, baseado no método do gradiente descendente, busca o melhor conjunto de parâmetros p que resulta no mínimo valor da função de similaridade S entre as imagens F e M . O método utiliza um esquema de pirâmide Gaussiana de multirresolução, no qual cada nível das pirâmides na Figura 1 representa uma resolução diferente das imagens processadas. O processo de estimação dos parâmetros é então iniciado na imagem

de menor resolução (topo de cada pirâmide). Os parâmetros obtidos nos níveis mais altos das pirâmides são propagados para os níveis inferiores. Essa abordagem resulta tanto na redução do tempo de processamento do algoritmo quanto no aumento da estabilidade do método, pois o menor detalhamento das imagens nos níveis superiores das pirâmides aumenta as chances do algoritmo gradiente descendente convergir para um ponto de mínimo global e, conseqüentemente, a uma boa estimação para os parâmetros em cada iteração.

Para o cálculo inicial dos parâmetros foi aplicada uma transformação rígida, responsável por mover o centro de massa da imagem M (quadro móvel) para a mesma posição espacial do centro de massa da imagem F (quadro fixo). Esse procedimento permite a obtenção de um conjunto inicial de parâmetros mais adequado para uso nas transformações subsequentes. Após o alinhamento inicial, uma transformação afim [11] é realizada para corrigir os desalinhamentos mais aparentes. Para cada tipo de transformação aplicada, o algoritmo calcula iterativamente os componentes ilustrados dentro da área pontilhada da Figura 1.

Após o processamento iterativo da transformação afim, inicia-se o processo de co-registro deformável, realizado neste trabalho pela transformação *demons* simétrica. A ideia principal dessa técnica é a determinação, a partir das imagens $F(x)$ e $M(x)$, de uma “grade” regular de forças que deforma a imagem $M(x)$, deslocando seus pixels na direção normal às forças presentes e resultando no seu alinhamento com a imagem $F(x)$. A orientação e a magnitude do deslocamento são derivadas da equação do fluxo óptico instantâneo.

No método do fluxo óptico, $D(x)$ representa a velocidade, uma vez que as imagens processadas

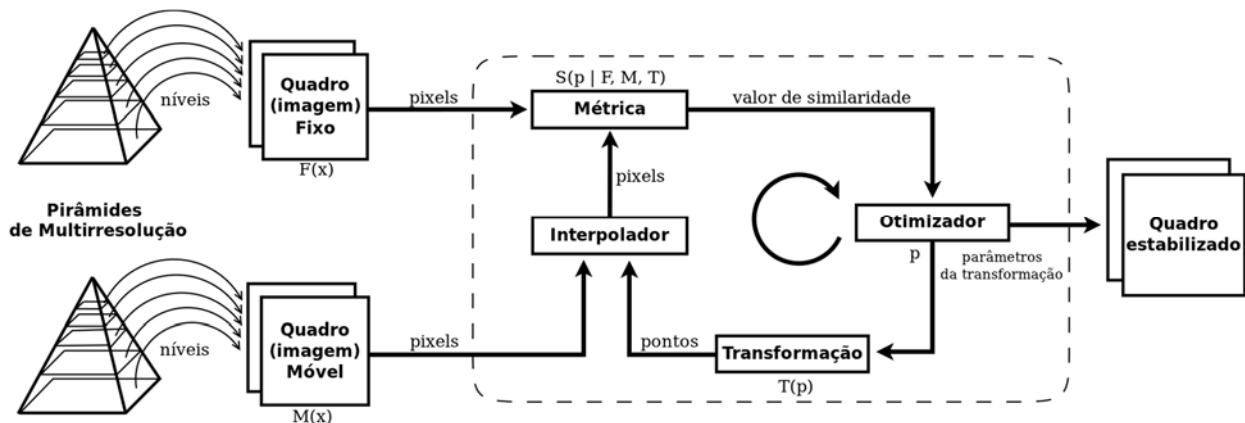


Figura 1: Diagrama ilustrativo do método proposto.

correspondem a quadros sucessivos do vídeo, ou seja, $D(x)$ é o deslocamento durante o intervalo de tempo entre os dois quadros [12]. Para o co-registro, consideramos $D(x)$ como a projeção do vetor direção do gradiente da intensidade no espaço de coordenadas da imagem móvel $M(x)$ e, após uma renormalização, temos:

$$D(x) = -\frac{(M(x)-F(x))\nabla F(x)}{\|\nabla F\|^2 + (M(x)-F(x))^2/K}, \quad (1)$$

onde K é o fator de normalização, calculado como valor quadrático médio do espaçamento dos pixels. Como as imagens processadas provêm de vídeos de MI, eventualmente teremos leucócitos (em movimento)

presentes em uma imagem de entrada e ausentes na imagem de saída. Como resultado, teremos uma situação de assimetria, que não é propriamente tratada pela Equação 1. Para a restauração da simetria, a Equação 1 é modificada levando-se em consideração o gradiente de ambas as imagens durante uma iteração. Isso resulta na equação deformável de *demons* simétrica, definida por:

$$D(x) = -\frac{2(M(x)-F(x))(\nabla F(x)+\nabla M(x))}{\|\nabla F+\nabla M\|^2+(M(x)-F(x))^2/K} \quad (2)$$

Para cada iteração, o gradiente descendente (otimizador) é usado para determinar o conjunto de parâmetros da transformação que minimiza os valores de projeção $D(x)$. A seguir, a transformação geométrica é aplicada à imagem móvel $M(x)$ usando o conjunto de parâmetros obtidos no estágio anterior do algoritmo. Para o mapeamento da imagem $M(x)$ na imagem $F(x)$ é utilizada a interpolação linear.

Análise dos resultados – Para a avaliação dos resultados foram utilizados três métodos: (a) método de “Projeção de Linha”, que gera uma imagem para análise retirando as linhas centrais de cada quadro do vídeo e empilhando-as sequencialmente; (b) método “Padrão Tabuleiro de Xadrez”, que combina de forma alternada blocos consecutivos de duas imagens de entrada para produzir uma imagem de padrão quadriculado como saída. Ambas as técnicas, (a) e (b), geram uma nova imagem que permite visualizar possíveis desalinhamentos entre os quadros do vídeo causados por movimento; (c) medida de relação sinal ruído de pico (PSNR - *peak signal-to-noise ratio*), que é calculada para a “imagem resíduo” resultante da subtração entre quadros consecutivos do vídeo. Essa medida define a relação entre a máxima energia possível de um sinal e o ruído que afeta a sua representação entre os quadros do vídeo. Nesse caso, se o resíduo for pequeno, indicando bom alinhamento entre os dois quadros consecutivos, então o valor do PSNR, medido em decibéis (dB), será alto. De outra forma, se o resíduo for alto, indicando um alto grau de desalinhamento, então o valor do PSNR será baixo.

Resultados

A Figura 2 apresenta um resultado gerado pelo método de Projeção de Linha. A Figura 2(a) refere-se aos quadros originais do vídeo (afetados pelo movimento) e a Figura 2(b) ilustra o resultado após a aplicação do método de estabilização das imagens.

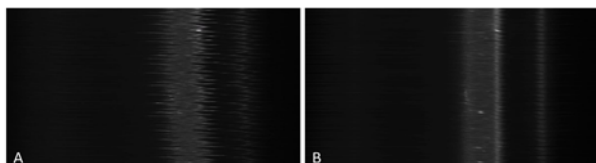


Figura 2: Método de “Projeção de Linha”. (a) Vídeo original sem estabilização; (b) vídeo estabilizado.

Comparando as duas projeções observa-se que a Figura 2(a) apresenta um padrão em “dente de serra”, indicando um acentuado desalinhamento dos quadros do vídeo. Na Figura 2(b), que corresponde aos quadros do vídeo processado, esse padrão é bastante suavizado, indicando que a projeção das linhas possui uma maior continuidade e, consequentemente, um maior alinhamento dos quadros.

Um resultado do método Padrão Tabuleiro de Xadrez é apresentado na Figura 3. A primeira linha dessa imagem ilustra dois quadros consecutivos do vídeo (colunas a e b) e a imagem resultante (coluna c), antes da aplicação do método de estabilização. A segunda linha da Figura 3 ilustra os mesmos dois quadros de entrada anteriores (colunas a e b) e a respectiva imagem resultante (coluna c) após a estabilização das imagens. A escolha dos quadros de entrada foi realizada visando a melhor visualização do efeito do método de estabilização. Símbolos (cruz) igualmente espaçados foram inseridos nas imagens para facilitar a análise visual. Analisando as imagens resultantes (coluna c) na Figura 3, observa-se claramente nas regiões de borda dos vasos sanguíneos o desalinhamento dos blocos, resultante do movimento do animal, que neste caso é muito maior nas imagens sem estabilização. Em comparação, na coluna (c) da segunda linha observa-se que após o co-registro das imagens, apenas os movimentos dos leucócitos são perceptíveis.

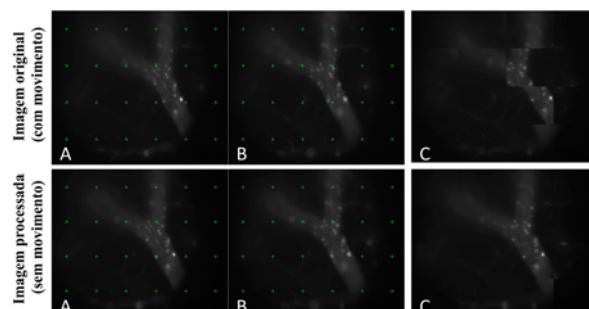


Figura 3: Resultado da aplicação do Padrão Tabuleiro de Xadrez. (Linha Superior) (a)-(b) quadros consecutivos do vídeo antes da estabilização, (c) resultado da avaliação; (Linha Inferior) (a)-(b) quadros consecutivos do vídeo após estabilização, (c) resultado da avaliação.

Os resultados do método de estabilização de imagens proposto também foram analisados quantitativamente. Para isso, a métrica PSNR foi calculada para as imagens resultantes da subtração entre quadros consecutivos do vídeo, ou seja, dos resíduos resultantes. Os gráficos da Figura 4 ilustram os valores da PSNR calculados para todos os pares de quadros do vídeo. Esse resultado permite uma análise temporal do co-registro, quando processado para todas as transições dos quadros. O valor médio para os quadros originais – antes da estabilização – (painel esquerdo) é de 35dB, enquanto para os quadros estabilizados (painel direito) é de 40dB, demonstrando a eficácia do método. Apenas em duas sequências de quadros (indicadas pelas setas) a

correção do movimento pelo método proposto não foi eficaz. Esses dois casos correspondem a movimentos demasiadamente intensos do animal. Nessa condição, o uso de técnicas de restauração de imagens se faz necessário.

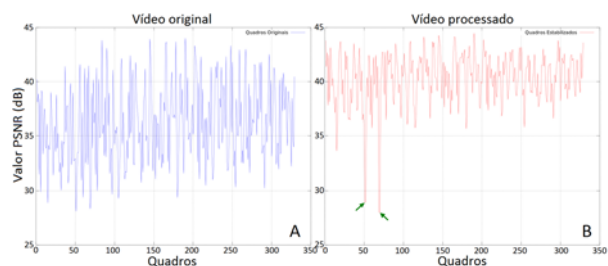


Figura 4: Análise pela métrica PSNR. (a) Quadros sem estabilização; (b) quadros estabilizados.

Discussão

Os resultados deste trabalho sugerem que o método proposto demonstrou-se capaz de corrigir grande parte dos movimentos oriundos da respiração e batimento cardíaco do animal. Para algumas sequências de quadros, o efeito do borramento e da distorção causados pelo movimento do animal é ainda excessivo e, mesmo após a estabilização do vídeo, observou-se que o método proposto não conseguiu recuperar completamente a continuidade do movimento. De fato, nesses casos específicos existe a necessidade da restauração dos quadros previamente à aplicação do método de estabilização.

Algumas técnicas foram propostas na literatura [10] [7] [6] [5] com o intuito de resolver o problema de movimento em MI. No entanto, uma comparação direta com essas técnicas é bastante difícil devido a alguns fatores, dos quais podemos citar: (a) indisponibilidade de código, (b) diferentes bases de dados, (c) imagens de diferentes órgãos. Uma vantagem da técnica apresentada neste trabalho para a estabilização das imagens de MI é o uso da abordagem multiresolução, que garante maior estabilidade ao processo de alinhamento das imagens.

Apesar das transformações afins resolverem de maneira satisfatória movimentos suaves, elas não foram efetivas para os movimentos complexos que causam distorções e borramentos intensos nas imagens. Nesse caso, o uso de transformações deformáveis foi mais eficaz, embora a falha em alguns poucos casos.

Conclusão

Apesar das dificuldades inerentes da técnica de MI, o método proposto foi capaz de fornecer imagens de vídeo com qualidade muito superior ao original para a análise visual ou automática. Assim, os resultados obtidos ganham grande importância, pois a análise de imagens com melhor qualidade proporcionará maior precisão na contagem de células.

Agradecimentos

Os autores agradecem o CNPq (Processos 481923/2010-1, 152885/2011-0, 139179/2011-9 e 303280/2011-5) e a CAPES pelo suporte financeiro.

Referências

- [1] dos Santos AAC, Roffe E, Arantes RME, Juliano L, Pesquero JL, Pesquero JB, Bader M, Teixeira MM e 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.
- [2] Pittet MJ, Weissleder R. Intravital Imaging - *Cell*. 2011; 147(5):983-991.
- [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(3):54-62.
- [4] Soulet D, Paré A, Coste J, Lacroix S. Automated Filtering of Intrinsic Movement Artifacts during Two-Photon Intravital Microscopy - *PLOS One*. 2013; 8(1):e53942:1-9.
- [5] Dunn KW, Lorenz KS, Salama P, Delp EJ. IMART software for correction of motion artifacts in images collected in intravital microscopy - *IntraVital*. 2014; 3:e28210:1-10.
- [6] Lee S, Vinegoni C, Sebas M, Weissleder R. Automated motion artifact removal for intravital microscopy, without a priori information - *Scientifica Reports*. 2014; 4:4507:1-9.
- [7] Vinegoni C, Lee S, Gorbato R, Weissleder R. Motion compensation using a suctioning stabilizer for intravital microscopy - *IntraVital*. 2012; 1:115-121.
- [8] Nyul LG, Udupa JK, Zhang X. New Variants of a Method of MRI Scale Standardization - *IEEE Trans. on Medical Imaging*. 2000; 19(2): 143-150.
- [9] 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.
- [10] Viola P, Wells WM. Alignment by maximization of mutual information - *International Journal of Computer Vision*. 1997; 24(2):137-154.
- [11] Mattes D, Haynor DR, Vesselle H, Lewellen TK, Eubank W. Non-rigid multi-modality image registration - In *Medical Imaging 2001: Image Processing*. 2001; 4322:1609-1620.
- [12] Thirion J-P. Image matching as a diffusion process: an analogy with maxwell's demons - *Medical Image Analysis*. 1998; 2(3):243-260.