



**Cátia Manuela  
Rodrigues Pinho**

**Visão de Profundidade em Microscopia Óptica para  
detecção de anomalias em Tecidos Biológicos**



**Cátia Manuela  
Rodrigues Pinho**

**Visão de Profundidade em Microscopia Óptica para  
Detecção de Anomalias em Tecidos Biológicos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação científica do Prof. Doutor António Rui Borges, Professor associado do Departamento de Electrónica, Telecomunicações e Informática da Universidade de Aveiro, do Prof. Doutor Augusto Ferreira da Silva, Professor auxiliar do Departamento de Electrónica, Telecomunicações e Informática da Universidade de Aveiro e do Prof. Doutor Sushil Kumar Mendiratta, Professor catedrático do Departamento de Física da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da FCT e do FSE no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio.

Dedico este trabalho a todos que partilham o dia a dia comigo pelo sincero apoio.

## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. Tomás António Mendes de Oliveira e Silva**  
professor associado da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Carlos Manuel Bolota Alexandre Correia**  
professor catedrático da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

**Prof. Dr. Sushil Kumar Mendiratta**  
professor catedrático da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. António Rui de Oliveira e Silva Borges**  
professor associado da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Augusto Marques Ferreira da Silva**  
professor auxiliar da Universidade de Aveiro

## agradecimentos

Sentindo como certo o apoio com que somos brindados nas diferentes etapas da nossa vida, gostaria de agradecer a todos que desde a colaboração mais empenhada à mais simples me facultaram na pesquisa e elaboração desta dissertação.

Começo então por destacar o apoio incontestável dos meus orientadores: Professor Doutor António Borges, Professor Doutor Sushil Kumar Mendiratta e Professor Doutor Augusto Silva, que de forma incansável e compreensiva me incentivaram e apoiaram durante todo o processo de elaboração, conclusão e revisão da dissertação.

Ao Doutor Carlos Seabra pelo interesse e dedicação na matéria em estudo, e pelo apoio na revisão da dissertação. À Doutora Letícia Ribeiro e Doutora Rosália Rodrigues, pelo fornecimento das amostras biológicas. Ao Doutor Jorge Monteiro e Engenheiro João Cascalheira pela amizade e apoio na execução da parte experimental. Aos colegas de gabinete, Mestre Pedro Almeida, Doutor António Neves e Doutora Dorabela Silva, pela amizade, encorajamento e conselhos úteis.

Aos Professores e colegas de Mestrado pelo aprendizado e ideias partilhadas, destacando a amizade da Mestre Liliana Pires.

Ao meu orientador e colegas de trabalho de Coimbra pelo apoio nesta fase nova da minha vida académica.

Aos colegas e amigos Pedro Almeida, Ana Remígio, e Ricardo Fernandes, pela amizade e projectos partilhados.

Aos amigos da casa Nosso Lar pela amizade, carinho e ensinamentos partilhados, destacando o trabalho admirável do Doutor Hélder Alexandre.

A finalizar, agradeço a todos os meus amigos e família, cujo amor e carinho me acompanha sempre. Referindo de forma singela apenas alguns nomes, Luís Filipe, Manuela, Salomé, Vitoria, Nuno Magalhães, Eliane Vasconcelos, Ana e Eunice Ramos. E aos meus pais cujo apoio incondicional e acreditar inabalável me acompanham desde o primeiro dia de vida.

Gostaria ainda de agradecer à Universidade de Aveiro pela oportunidade de aqui concluir mais uma etapa da minha vida académica.

## palavras-chave

**Microscopia óptica, desconvolução, problema inverso, resposta impulsional, processamento de imagem 3D.**

## resumo

A visualização tridimensional de uma anomalia num tecido biológico constitui um problema prático em diagnóstico clínico. A escolha de medidas terapêuticas depende do conhecimento mais preciso da localização e de outras características morfológicas da patologia. A informação tridimensional é produzida através do processamento de uma pilha de imagens digitalizadas do objecto em análise, obtidas a diferentes níveis de profundidade de campo, num microscópio óptico equipado com varrimento vertical.

Apesar de comercialmente se encontrarem disponíveis vários métodos de reconstrução tridimensional de objectos a partir de imagens bidimensionais adquiridas em planos axiais onde a dimensão linear do objecto é da gama do cm, pouca informação se encontra disponível nas condições limite de visualização de patologias a nível celular.

É de notar que a espessura típica do glóbulo vermelho é da ordem de grandeza do micrometro e dimensão de estruturas sub celulares da gama dos sub-micrometro. Este trabalho foi motivado pelo problema prático de interpretação clínica das inclusões citoplasmáticas em glóbulos vermelhos, denominadas de pontuado basófilo, observados em imagens de esfregaços de sangue de pacientes com patologia associada à deficiência de P5'N. As imagens foram obtidas em microscopia óptica de elevada resolução.

O principal objectivo da dissertação apresentada consiste na avaliação de desempenho de algoritmos de desconvolução para reconstrução tridimensional a partir de uma pilha de imagens referentes a planos axiais de células de glóbulos vermelhos com estruturas patológicas. Foram estudadas duas classes de algoritmos, algoritmos iterativos e não iterativos. O procedimento de desconvolução necessita do conhecimento prévio da resposta impulsional do sistema de formação de imagem (*Point-Spread-Function* - PSF). Foram testados dois procedimentos diferentes para determinação da PSF. Num dos casos, a PSF foi extraída de pequenas estruturas visíveis na própria imagem e, no outro, foram usadas PSFs teóricas de parâmetros variáveis. A eficiência dos algoritmos foi primeiro testada em dados obtidos por simulação do processo de formação de imagem sobre dados sintéticos, tendo em conta que objectos experimentais com estruturas na gama dos sub-micrometro não se encontravam disponíveis. Os resultados do estudo mostram que, apesar das estruturas analisadas serem da ordem de grandeza do comprimento de onda da luz, os algoritmos iterativos otimizados podem contribuir para a melhoria do contraste global das imagens e em alguns casos são conseguidas estimativas da profundidade relativa das estruturas anómalas. No sentido de fornecer informação adicional ao estudo foram efectuadas estimativas de parâmetros morfológicos do pontuado basófilo.

**keywords**

**Optic Microscopy, deconvolution, inverse problem, point spread function, 3D imaging.**

**abstract**

Visualization in three dimensions of an anomaly in the body or in the tissue is an important problem in clinical diagnostics; the choice of the therapeutic measures depends upon the reliable knowledge of the localization and other geometrical features of the pathology. The three-dimensional information is produced by processing a digitalized stack of 2-D images taken at different levels of depth through the sample, on an optical microscopy system. Though many methods are commercially available for reconstructing the object in 3-D from the two dimensional images taken at various axial sections, in the cases the typical linear dimension of the object is in the cm range, very little information is available when the challenge is to visualize the pathologies at the cellular level. It is to be recalled that the typical thickness of a red blood cell is in the micron range and the pathologies in the cell are in the submicron region. The work was motivated by a practical problem of understanding the clinical implications of geometrical features of basophilic stippling that is observed in the high resolution optical microscopy images of blood smear of patients with pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency.

The main objective of the thesis presented here is to analyse the effectiveness of some of the available deconvolution algorithms in reconstructing the pathological features of a red blood cell from a Z-stack of the X-Y images. Two classes, iterative and non iterative, of algorithms were studied. The deconvolution procedure necessitates the availability of Point Spread Function (PSF). Two different kinds of procedures for PSF were tested. In one case PSF was extracted from the smallest visible feature in the image itself and in another case a theoretical PSF with the possibility of varying the parameters was used. The effectiveness of the algorithms was tested on data obtained by simulating the imaging process on synthetic objects since suitable phantom objects with submicron features were not available.

The results of the study show that despite the fact that features are of the order of the wavelength of the probing light, optimised iterative algorithms can contribute to the enhancement of the global contrast of the images and some clinically useful estimates of the relative depths of the anomalies can also be made. Additionally, some relevant statistical parameters of the geometry of the stippling were also determined.

# Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Formulação do problema.....	3
1.2.	Definição de objectivos.....	4
1.3.	Metodologia adoptada.....	6
1.4.	Organização da dissertação.....	7
2.	Sistema óptico de formação de imagens.....	9
2.1.	Microscópio óptico: evolução histórica e descrição de componentes.....	9
2.1.1.	Sistema óptico.....	11
2.1.2.	Sistemas lineares e invariantes no espaço.....	12
2.1.3.	Difracção.....	13
2.2.	Microscopia tridimensional.....	14
2.2.1.	Fontes de degradação da imagem.....	16
2.2.2.	PSF do sistema óptico.....	18
2.2.2.1.	PSF teórica.....	20
2.2.2.2.	PSF experimental.....	21
2.2.2.3.	PSF extraída da amostra.....	24
2.3.	Descrição do sistema experimental de aquisição de imagem.....	25
2.3.1.	Microscópio óptico.....	25
2.3.2.	Limite de resolução do microscópio óptico.....	27
2.3.3.	Profundidade de campo e foco do microscópio óptico.....	29
2.3.4.	Varrimento vertical.....	31
2.3.4.1.	Intervalo de amostragem da imagem digital.....	31
2.3.5.	Dimensão do voxel.....	32
2.3.6.	Diagramas do sistema de formação de imagem.....	34
2.3.7.	Oscilações do sistema óptico.....	35
3.	Métodos de desconvolução.....	37
3.1.	Algoritmos de desconvolução.....	38
3.1.1.	Métodos não iterativos.....	40
3.1.1.1.	Filtro de Wiener.....	44
3.1.1.2.	Filtro óptimo segundo o critério do erro quadrático mínimo.....	46
3.1.2.	Métodos iterativos.....	47
3.1.2.1.	Método de Richardson-Lucy (RL).....	50
3.1.2.2.	Método de desconvolução cega.....	53
3.2.	Interpretação de imagens desconvoluídas.....	56



4.	Resultados.....	59
4.1.	Testes de Fluorescência.....	59
4.2.	Modelos sintéticos.....	60
4.2.1.	PSFs sintéticas.....	62
4.2.2.	Matrizes 3D sintéticas.....	64
4.2.3.	Avaliação dos resultados experimentais.....	68
4.2.3.1.	Algoritmo de desconvolução RL.....	68
4.2.3.2.	Algoritmo de desconvolução cega.....	73
4.2.3.3.	Desconvolução com os filtros de Wiener e “regularized filter”.....	75
4.3.	Amostras biológicas.....	75
4.3.1.	Algumas noções básicas de hematologia.....	76
4.3.1.1.	Eritrócitos.....	77
4.3.1.2.	Patologia da deficiência de pirimida 5’ nucleotidase.....	78
4.3.2.	Alinhamento da pilha 3D.....	80
4.3.3.	Avaliação dos resultados experimentais.....	83
4.3.3.1.	Resultados obtidos com PSFs sintéticas.....	84
4.3.3.2.	PSF extraídas.....	88
4.3.3.3.	Resultados obtidos com PSF extraídas.....	89
4.3.3.4.	Síntese.....	94
4.3.3.5.	Plot 3D.....	94
4.3.3.6.	Posição segundo Z do CM das estruturas basófilas.....	99
5.	Conclusão.....	101
5.1.	Dados sintéticos.....	101
5.2.	Dados biológicos.....	102
5.3.	Observações Finais e Avaliação crítica.....	104
	Bibliografia.....	107
	Apêndice A: Abreviaturas e Nomenclaturas.....	115
	Apêndice B: Figuras.....	117
1.	Dados Sintéticos.....	117
1.1.	Convolução.....	117
2.	Amostras Biológicas.....	120

# 1. Introdução

---

A inovação de ferramentas de imagem e paradigmas na metodologia de diagnóstico para uma melhor caracterização de patologias tornou cada vez mais importante, a nível celular, o desenvolvimento de técnicas de microscopia.

A microscopia óptica, que desde cedo contribuiu para o desenvolvimento da biologia e medicina, com o crescente aperfeiçoamento dos diversos componentes ópticos de aquisição de imagem, continua a ser uma ferramenta de uso frequente em ciências médicas. Não exigindo preparações demasiado complexas ou muito demoradas, permite analisar amostras de elevada relevância médica em processos de aquisição relativamente simples.

As necessidades de análise e avaliação de imagens microscópicas de amostras biológicas, não se encontram, no entanto, restritas apenas à representação bidimensional. Actualmente, são requisitadas medidas e avaliações tridimensionais (3D), que têm contribuído para o desenvolvimento de software específico, no sentido de responder a essas necessidades [30]. A desconvolução 3D introduziu um novo avanço na microscopia óptica. Neste sentido e não visando apenas a usual análise microscópica bidimensional, a microscopia 3D pode permitir aferir especificidades de estrutura e propriedades funcionais, ausentes em análises bidimensionais, facultando soluções de problemas proeminentes em ciências biomédicas.

O microscópio composto é um sistema óptico capaz de fornecer uma imagem ampliada do objecto, para observação de detalhes invisíveis a olho nu. A peça fundamental neste processo é a objectiva, lente principal do microscópio, que tem por função formar uma imagem real invertida ampliada do objecto, no plano do diafragma da ocular. A luminosidade da imagem depende essencialmente da luz colectada pela objectiva, caracterizada pela sua abertura numérica (AN), directamente proporcional ao índice de refacção do meio no qual a objectiva está imersa e ao seno do semi-ângulo máximo no interior do qual a objectiva colecta a energia luminosa [19]. O seu poder de resolução,

descrito pela separação mínima entre dois objectos pontuais discerníveis no sistema óptico, varia directamente com o comprimento de onda e inversamente com a abertura numérica [12], [19].

O aumento do semi-ângulo máximo no interior do qual a objectiva colecta a energia luminosa está limitado fisicamente pela manufactura da lente. Deste modo, para aumentar a resolução altera-se o índice de refração do meio de modo a que seja superior a um, valor expresso quando o meio entre a amostra e a objectiva é o ar. Assim, recorrendo a lentes de imersão em óleo pode conseguir-se uma AN máxima de 1.5 [34], [63].

Contudo, o limite de resolução associado às dimensões finitas das lentes produz, em objectos de dimensões de ordem de grandeza muito próxima do comprimento de onda [3], fenómenos de *difracção*, em que um ponto do objecto é transformado em discos na imagem (discos de *Airy*) [11], [19]. Deste modo, mesmo o melhor microscópio óptico é limitado a uma resolução de aproximadamente 0.2  $\mu\text{m}$ , para um comprimento de onda do visível [34], [63].

Neste sentido, e com o objectivo de caracterizar estruturas de dimensões na ordem das unidades de micron, é necessário a utilização de objectivas de elevada ampliação para uma melhor discriminação de pequenas estruturas. A consequente elevada abertura numérica destas lentes, implica uma profundidade de campo mais reduzida [3], [40], [64]. Que apesar de ser vantajosa para uma boa acuidade visual segundo o eixo dos ZZ, implica a utilização de amostras de reduzida espessura, para garantir uma boa focagem da amostra observada.

A *profundidade de campo* caracteriza a diferença máxima de cota entre dois pontos do objecto, de modo a que as respectivas imagens se apresentem focadas, directamente relacionada com a resolução ao longo do eixo Z. Ou seja, descreve o comprimento ao longo do eixo óptico do microscópio, no qual, para níveis de intensidade constante da imagem, a posição de foco da objectiva pode ser modificada sem provocar alterações na acuidade visual e nitidez da imagem de um ponto no centro do campo [40]. Para um dado sistema óptico, a profundidade de campo é inversamente proporcional à ampliação (M) [40]. No entanto, segundo estudos mais recentes de *I.T. Young* [64], para lentes de elevada AN a expressão da profundidade de campo não depende da ampliação, (como definido

anteriormente por *Piller* [40]), rescrevendo-se a expressão da profundidade de campo, equações apresentadas no segundo capítulo.

Contudo, para uma caracterização aproximada, e considerando a objectiva de maior abertura numérica de imersão em óleo, o mínimo de profundidade de campo possível ronda os  $0.2 \mu\text{m}$  [34], [52], [63].

De uma forma representativa poder-se-á, deste modo, assumir a imagem obtida como correspondente a um objecto com uma determinada espessura, determinada pela profundidade de campo de aproximadamente  $0.2 \mu\text{m}$ .

## **1.1. Formulação do problema**

O problema de fundo consiste em, a partir dum instrumento intrinsecamente bidimensional como o é o microscópio, obter informação 3D introduzindo no processo de aquisição de imagem varrimento segundo  $Z$  e técnicas desconvolutivas de pós-processamento.

Experimentalmente é introduzida uma técnica de varrimento vertical no microscópio óptico convencional, pela acoplagem de um motor  $Z'scan$  à objectiva, responsável pelo deslocamento da mesma, para aquisição de uma pilha de imagens em diferentes planos de foco. No entanto, é importante ter em conta que estas imagens para além de focar o objecto com a espessura da profundidade de campo vão ter associadas às mesmas as contribuições dos restantes planos adjacentes, designada de contribuição “out-of-focus”, [51], [55].

Neste sentido projectam-se dois problemas principais. A indiferenciação de acuidade visual dentro da distância da profundidade de campo, que não permite uma caracterização real da imagem segundo  $Z$ , para alturas inferiores a aproximadamente  $0.2 \mu\text{m}$ . E a desfocagem (*blurring*) introduzida pela contribuição dos planos adjacentes que reduzem o contraste [55], [56].

Deste modo, a visualização tridimensional de imagens está altamente condicionada à espessura do objecto real em análise, à profundidade de campo finita e ao limite de resolução do microscópio. A quantidade de ruído e a elevada contribuição dos planos

adjacentes em cada imagem axial (XY) adquirida traduz-se numa resolução espacial pobre, principalmente na direcção vertical, segundo Z [51].

Na aplicação experimental são analisadas tridimensionalmente amostras biológicas de eritrócitos portadores de patologia. Estas células com diâmetro de cerca de 8  $\mu\text{m}$  no plano axial apresentam estruturas internas de diâmetro na ordem de grandeza dos 0.5  $\mu\text{m}$ . Os eritrócitos de espessura compreendida entre 1 e 2  $\mu\text{m}$  encontram-se dispostos numa lâmina e cobertos por uma lamela.

A contribuição principal deste trabalho centra-se na tentativa de aferir discriminação vertical e aumento de contraste em situações de dimensão limite como a das amostras de esfregaços de sangue, de espessura inferior a 2  $\mu\text{m}$ , frequentemente usadas em análises de hematologia.

As aquisições experimentais foram efectuadas com a resolução mínima permitida pelo motor *Zscan* de 0.1  $\mu\text{m}$  segundo Z. Desta forma, está-se a trabalhar na gama de distâncias da mesma ordem de grandeza do comprimento de onda (c.d.o.) da luz visível, tendo intrínsecos, incontroláveis fenómenos de difracção, inerentes das dimensões físicas das estruturas associadas ao objecto.

## **1.2. Definição de objectivos**

Tendo em conta as limitações da técnica de microscopia tridimensional, o objectivo principal do trabalho reside na obtenção de discriminação em profundidade de amostras biológicas.

Nesse sentido procedeu-se à aquisição de imagens de amostras hematológicas, com patologia associada, sugeridas por médicos hematologistas, no sentido da análise tridimensional poder constituir uma mais valia na caracterização de parâmetros morfológicos. A descrição referente às amostras biológicas é apresentada na secção 4.3. - *Amostras biológicas*.

Um objectivo consequente recai, no facto de mostrando-se a técnica vantajosa, poder ser aplicada numa gama mais vasta de amostras microscópicas de relevância médica.

Às pilhas tridimensionais de imagens de amostras biológicas, são aplicados vários algoritmos de desconvolução no sentido se contornar as limitações da microscopia tridimensional, para obter nas imagens reconstruídas um ganho de discriminação em profundidade.

Foi projectado numa fase inicial, a validação dos resultados por métodos ortogonais de amostras compostas por microesferas sintéticas, situadas a diferentes planos segundo o eixo dos ZZs. Tal foi inviabilizado experimentalmente<sup>(1)</sup>, tendo-se alternativamente recorrido a dados sintéticos para testar os algoritmos de desconvolução.

*<sup>(1)</sup> Foram realizadas várias experiências em microscopia de fluorescência, com microesferas de poliestireno de diferentes tamanhos, que resultaram numa série de resultados com uma elevada taxa de irreprodutibilidade, que invalidou a sua utilização como método ortogonal de validação em amostras biológicas. Tendo ainda em conta o facto, do sistema de aquisição de imagens de amostras biológicas, ser diferente, a microscopia óptica de transmissão.*

Deste modo, o propósito final do trabalho foca-se na introdução de discriminação vertical nas imagens restauradas, por aumento de contraste e acuidade visual das diferentes estruturas do objecto segundo o eixo óptico.

Com este propósito, é fundamental a caracterização da resposta impulsional (PSF - “Point Spread Function”) do sistema óptico, para descrever e quantificar a distorção e degradação introduzida na imagem adquirida. Estas alterações podem ser de diferentes ordens: devido ao tipo de microscópio usado; devido à natureza das amostras, como índices de refração e espessura; ou ainda devido a parâmetros ópticos como a ampliação, abertura numérica, variação do índice de refração no caminho óptico, entre outros. Desta forma, não é de todo simples, a formulação da PSF. Mas, tendo em conta que a análise da distribuição de intensidade da PSF, nos dá a informação das características ópticas do sistema (resolução espacial, aberração óptica, etc.) e montagem experimental (erros de alinhamento, etc.), torna-se fundamental o seu conhecimento, para estabelecer um protocolo correcto de aquisição [6], [24].

Na caracterização da resposta impulsional (PSF) do sistema óptico de formação de imagem surgiram dois problemas, inerentes ao sistema de aquisição de imagens, fora do âmbito do projecto. A incapacidade de formular modelos matemáticos exactos do sistema de

formação de imagem, por falta de conhecimento de parâmetros característicos (que os fabricantes se recusaram a fornecer) dos componentes ópticos. E numa abordagem alternativa de obtenção da PSF do sistema óptico, a partir de dados experimentais (fluorescência de microesferas de poliestireno de diferentes diâmetros na gama das unidades de  $\mu\text{m}$ ) verificou-se uma irreprodutibilidade nos resultados obtidos, que invalidou o seu uso, como já foi referido.

### **1.3. Metodologia adoptada**

Na tentativa de desenvolver uma técnica de visão de profundidade em microscopia óptica, dividiu-se o trabalho em diferentes fases.

(1) Caracterização da resposta impulsional do sistema de aquisição de imagem, PSF.

Tendo em conta as problemáticas das abordagens referidas acima, optou-se por calcular PSFs (de parâmetros variáveis), baseados em modelos teóricos, que conduzissem no processo de desconvolução a uma optimização máxima da resolução de contraste em profundidade na pilha 3D de imagens digitalizadas das amostras biológicas. Designadas de PSFs teóricas ou sintéticas.

Testou-se ainda a extracção directa, da resposta impulsional do sistema a partir de sub-imagens pontuais identificadas nas imagens de amostras biológicas, que melhor caracterizam as condições experimentais em que as imagens são adquiridas. Designadas de PSFs extraídas.

(2) Teste do comportamento dos diferentes algoritmos de desconvolução tridimensional estudados, por aplicação em diferentes modelos sintéticos com as várias PSFs teóricas.

Nos modelos sintéticos criaram-se quatro matrizes tridimensionais, com esferas a diferentes planos de profundidade. De modo a caracterizar situações modelo de estruturas dispostas em diferentes planos de focagem, consideraram-se para os diferentes modelos de objectos (*phantoms*), esferas de diferentes diâmetros e posições distintas dentro da matriz tridimensional.

Nas PSFs teóricas variou-se principalmente a abertura cónica da resposta impulsional, que depende directamente do respectivo sistema de aquisição de imagem, como o tipo de microscópio (confocal ou convencional) e abertura numérica da objectiva em uso [6], [11]. Esta metodologia está detalhadamente descrita na secção (4.2.1. - *PSFs sintéticas*) do quarto capítulo.

(3) Aplicação dos vários algoritmos de desconvolução vertical nas pilhas de imagens de amostras biológicas, no sentido de identificar a progressão da discriminação vertical obtida com os mesmos. Estes algoritmos foram testados com as diferentes PSFs teóricas e PSFs extraídas das imagens experimentais.

(4) Análise e validação dos resultados obtidos em amostras biológicas, por hematologistas, conhecedores da patologia.

As amostras hematológicas com patologia associada foram fornecidas pelo Serviço de Hematologia do Hospital Pediátrico de Coimbra. Constituindo um estudo de relevância por se tratarem de células vitais no organismo humano, cuja patologia associada se encontra até à data pouco estudada.

## **1.4. Organização da dissertação**

Esta dissertação começa com um primeiro capítulo de carácter introdutório, seguido pela descrição do sistema óptico de formação de imagem, no segundo capítulo, onde é abordado de forma pormenorizada o sistema óptico experimental, o microscópio, e são caracterizadas as diferentes metodologias aplicadas na determinação da resposta impulsional do sistema (PSF).

No terceiro capítulo são descritos os métodos de desconvolução, as respectivas funções em *Matlab* usadas na sua aplicação e ainda são abordadas algumas noções relativas à interpretação de imagens desconvoluídas.

A avaliação dos resultados dos dados sintéticos e biológicos é descrita no capítulo quatro, bem como a explicação detalhada dos cálculos efectuados na elaboração dos diferentes modelos sintéticos e das várias PSFs teóricas aplicadas aos diferentes algoritmos de



desconvolução. É ainda apresentada uma breve descrição das amostras biológicas e caracterização da patologia presente nas amostras em questão.

A dissertação culmina no quinto capítulo referente às conclusões e algumas observações finais.

## 2. Sistema óptico de formação de imagens

---

Sendo o microscópio óptico o elemento fundamental do sistema experimental usado na aquisição de imagens, começa-se por efectuar neste capítulo uma breve introdução histórica do aparecimento do microscópio e descrição dos seus componentes. Dado o propósito deste trabalho de implementar uma capacidade de visualização de profundidade em pilhas tridimensionais de imagens digitalizadas é apresentado uma secção alusiva à microscopia tridimensional e metodologias de determinação da resposta impulsional (PSF - “Point Spread Function”) do sistema. Para finalizar é apresentada uma secção que descreve de forma mais detalhada o sistema óptico experimental usado.

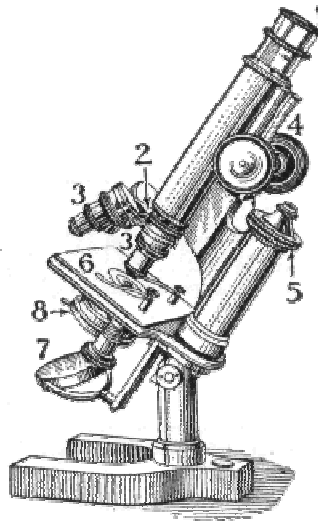
### 2.1. Microscópio óptico: evolução histórica e descrição de componentes

A invenção do microscópio composto foi atribuída ao holandês Zacarias Janssen, em 1590 [19]. Esta descoberta teve como precursor a evolução das lentes aquando da invenção dos primeiros óculos, em Itália a 1280, que permitiu o aparecimento das primeiras experiências de combinação de lentes para aplicação em instrumentos de ampliação de imagens. Apesar da popularidade do instrumento na época, a sua utilidade científica estava ainda por definir. Não se suspeitando que uma estrutura, como a célula, presente em todos os tecidos vivos estaria ao alcance da visão humana por meio do microscópio.

O microscópio óptico é constituído por uma *componente mecânica* que suporta e permite controlar a *componente óptica* de ampliação das imagens.

Dentro dos componentes da parte mecânica evidencia-se a *platina* onde se fixa a amostra a observar; o *revólver* peça giratória onde se inserem as objectivas de diferentes ampliações; e os *parafusos macrométrico* e *micrométrico* que permitem movimentar verticalmente a platina, os movimentos rápidos e de grande amplitude com parafuso macrométrico, e

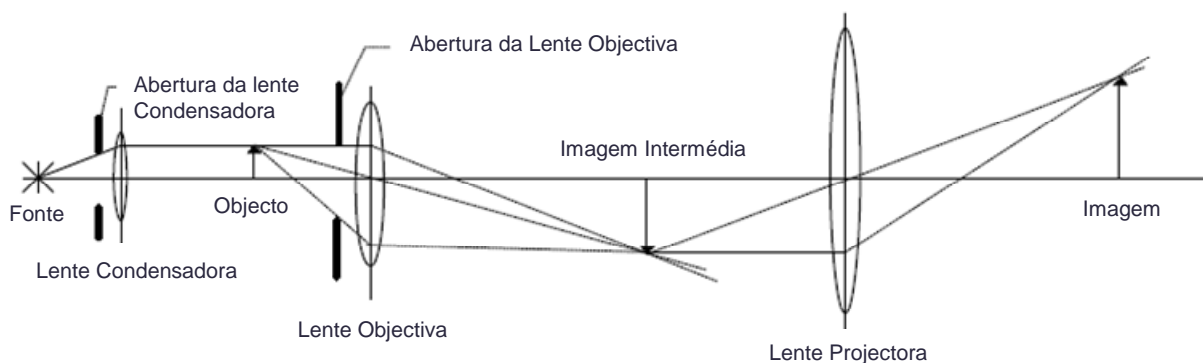
movimentos lentos de pequena amplitude que permitem aperfeiçoar a focagem com o parafuso micrométrico.



**Figura 1:** Desenho descritivo de um microscópio composto, precursor do microscópio óptico actual [65]; Legenda: 1-Ocular; 2-Revólver; 3-Objectiva; 4-Parafuso macrométrico; 5-Parafuso micrométrico; 6-Platina; 7-Espelho; 8-Condensador.

Na componente óptica tem-se o *condensador* composto por um conjunto de duas ou mais lentes convergentes que orientam e espalham isotropicamente a luz emitida pela fonte luminosa sobre o campo de visão do microscópio; o *diafragma* que permite ajustar a intensidade de luz que incide no campo de visão do microscópio; as *objectivas* responsáveis pela ampliação da imagem do objecto; e as *oculares* caracterizadas por um sistema de lentes que permite ampliar a imagem real fornecida pela objectiva, formando uma imagem virtual que se situa a aproximadamente 25 cm dos olhos do observador.

No século XIX foram desenvolvidas novas técnicas de fabrico de lentes e começaram a usar-se espelhos curvos para melhorar a capacidade de foco dos microscópios, o que levou a que em meados de 1880 os designados microscópios ópticos atingissem a resolução limite de aproximadamente  $0.2 \mu\text{m}$ , limite mantido até a actualidade [65]. Um esquema simplificado da trajectória da luz que atravessa a combinação de lentes de um microscópio composto, para a formação da imagem ampliada do objecto, é apresentado na *Figura 2*.



**Figura 2:** Esquema simplificado da trajetória da luz, para a formação de uma imagem ampliada, num microscópio óptico de Transmissão.

### 2.1.1. Sistema óptico

Como sistema de iluminação do microscópio tem-se uma fonte de luz que pode ser caracterizada como um emissor de ondas esféricas, a partir do qual os raios são emitidos radialmente na direcção do fluxo de energia. Se a onda esférica convergir para um ponto o feixe de raios luminosos que emanam da fonte pontual diz-se convergente. O ponto a partir do qual a onda esférica diverge, ou para o qual converge é o ponto focal do feixe de raios [19].

Num sistema óptico ideal cada ponto do espaço tridimensional tem uma imagem perfeita num outro espaço, sendo o primeiro, o espaço objecto e o segundo, o espaço imagem. A função geral do sistema óptico é colectar e reformatar uma parte da frente da onda incidente e assim formar a imagem de um objecto. No entanto, nenhum sistema real é capaz de colectar toda a luz emitida por um objecto, resultando num desvio inevitável da direcção de propagação rectilínea. Num sistema óptico real o grau máximo de perfeição possível na formação de imagens é limitado pela difracção (que forma sempre uma mancha mais ou menos difusa). À medida que o comprimento de onda ( $\lambda$ ) da radiação diminui, tendo como referência as dimensões físicas do sistema óptico, os efeitos de difracção são cada vez menos significativos. Em meios homogéneos, com o limite teórico em que  $\lambda_0 \rightarrow 0$  é possível recuperar a propagação rectilínea da luz, domínio da Óptica Geométrica.

Em resumo, a óptica geométrica preocupa-se com a manipulação controlada das frentes de onda, ou feixes de raios luminosos através de objectos reflectores e/ou refringentes, sem ter em consideração os efeitos de difracção [19].

As lentes actuam por refacção, introduzindo descontinuidades no meio em que a luz se propaga inicialmente, reconfigurando a distribuição da luz transmitida.

### 2.1.2. Sistemas lineares e invariantes no espaço

As técnicas de Fourier permitem construir uma explicação particularmente elegante do processo de formação de imagens. Um conceito chave nesta análise é o conceito de *sistema linear*, que se define em relação a um espaço inicial e um espaço final, entre uma entrada e uma saída, entre um objecto e uma imagem.

Considerando um sinal  $f(x, y)$  à entrada do sistema óptico que dá origem a uma imagem,  $g(X, Y)$ . O sistema diz-se *linear*, se:

- quando se multiplica a entrada  $f(x, y)$  por uma constante  $a$ , a saída vem também multiplicada por  $a$  :  $a \times g(X, Y)$ ;
- e quando o objecto é representado por uma soma ponderada de duas (ou mais) funções,  $a.f_1(x, y) + b.f_2(x, y)$ , a imagem tem a mesma forma,  $a.g_1(X, Y) + b.g_2(X, Y)$ , dando  $f_1(x, y)$  e  $f_2(x, y)$  origem a  $g_1(X, Y)$  e  $g_2(X, Y)$ , respectivamente.

Um *sistema linear* diz-se *invariante* (ou espacialmente invariante, no caso de sistemas ópticos) se for estacionário, isto é, se qualquer variação da posição do objecto se traduzir apenas numa alteração da posição da imagem e não da sua forma funcional. Deste modo, torna subjacente a ideia de que a imagem gerada por um sistema óptico, pode ser considerada como o resultado da sobreposição das imagens de cada um dos pontos individuais que constituem o objecto [19].

A melhor forma de compreender a distorção e degradação da imagem de um objecto, formada por um sistema óptico é caracterizando a PSF (“Point Spread Function”) do

microscópio ou a sua transformada de Fourier [12]. Ou seja, assumindo o microscópio como um instrumento linear, este pode ser caracterizado por uma PSF para todos os pontos do objecto [39].

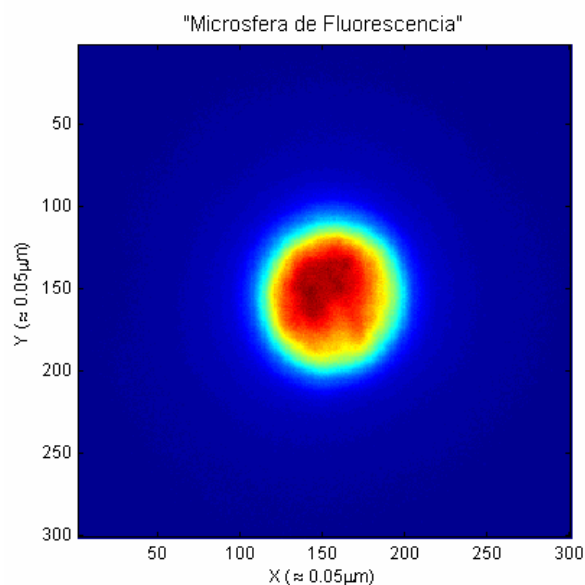
A consequência formal de se admitir que o processo de formação de imagem pode ser descrito por um sistema linear invariante (SLI) é que matematicamente as relações entrada/saída decorrem de operações convolutivas que no domínio de Fourier se transformam em operações multiplicativas muito mais atraentes do ponto de vista algébrico e computacional. No caso de um sistema não ser invariante deixa-se de verificar a validade do modelo convolutivo em consequência da variância espacial da PSF.

O modelo do sistema linear e espacialmente invariante pode ser igualmente aplicado em imagens adquiridas por microscopia de campo claro e microscopia de fluorescência, tendo em consideração o facto da formação de imagem ser igual para os dois tipos de microscópios [2].

### **2.1.3. Difracção**

A difracção pode ser definida como o desvio relativo à propagação rectilínea da luz que ocorre sempre que a fase ou amplitude de uma parte da frente de onda se altera, após a interacção com obstáculos da mesma ordem de grandeza ou inferior à do comprimento de onda do feixe incidente [1], [19]. Nesta situação em que a propagação da luz deixa de ser rectilínea observam-se franjas claras na região de sombra [12], ou seja nas áreas de contraste entre luz e sombra na imagem, aparecem padrões de interferência. Este fenómeno de interferência e difracção corrobora o carácter ondulatório da luz.

Os vários segmentos da frente de onda que se propagam para além do obstáculo ao interferirem dão origem a uma distribuição particular da densidade de energia, caracterizada pelo mencionado padrão de difracção [19], um exemplo da formação de um desses padrões de interferência é apresentado na *Figura 3*.

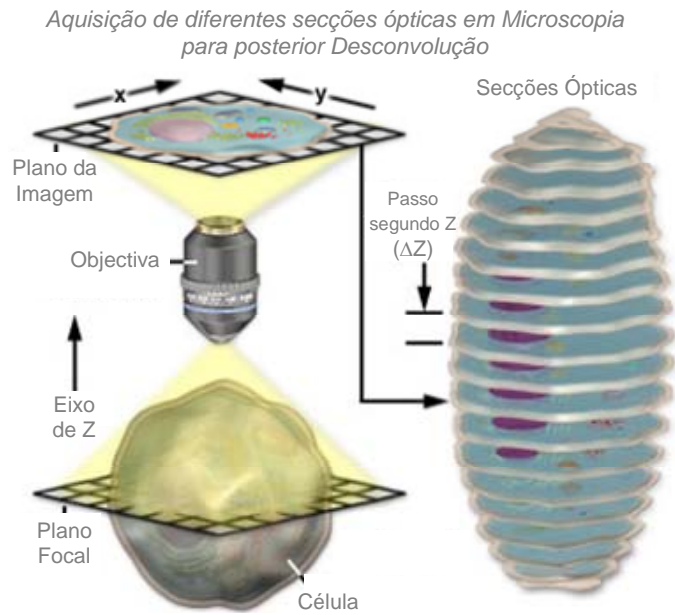


**Figura 3:** Imagem obtida por microscopia de fluorescência de uma microesfera fluorescente de  $4\mu\text{m}$  de diâmetro. (Fonte laser de 488nm; Objectiva de imersão com ampliação de 100x e  $\text{AN}=1.45$ ; Filtro de emissão  $\lambda(\text{emissão}) = 680\text{nm}$ ).

## 2.2. Microscopia tridimensional

Com o propósito de aferir discriminação longitudinal ao longo duma pilha de imagens adquiridas por microscopia óptica são, em seguimento, apresentados alguns dos fundamentos em que se baseia o conceito de microscopia tridimensional.

Baseada no seccionamento óptico a microscopia tridimensional é uma ferramenta poderosa na visualização de amostras biológicas de espessura passível de ser analisada [55]. Os dados 3D constituídos por uma pilha de imagens bidimensionais, são adquiridos a diferentes planos de foco na amostra, de modo a garantir que esta seja varrida verticalmente na sua totalidade [8], [55], [59], *Figura 4*.



**Figura 4:** Esquema da aquisição tridimensional de imagens de uma amostra biológica; baseado em [59].

No entanto, é fundamental ter em consideração que cada secção óptica bidimensional resulta da sobreposição da contribuição no plano “in-focus” e contribuição “out-of-focus” dos planos adjacentes, que degradam e reduzem o contraste da imagem [55], [56]. Para contornar estes efeitos são aplicados métodos desconvolutivos no sentido de extrair a contribuição “out-of-focus” da imagem final. Estes métodos são apresentados de forma detalhada no terceiro capítulo.

É de notar que, apesar de se tratar de técnicas deconvolutivas, se assume que o modelo convolutivo mesmo a 3 dimensões continua a ser válido e portanto todo o processo de aquisição 3D continua a ser modelado como um SLI.

Os efeitos de desfocagem ocorrem em qualquer processo de aquisição de imagem, mas são particularmente importantes em amostras biológicas, onde os detalhes de interesse são de dimensões comparáveis à da resolução do sistema [36]. A resolução obtida pela desconvolução não é inferior às dimensões do voxel (unidade elementar da imagem digital 3D) dos dados guardados, o que significa que a desconvolução é apenas justificada, se as dimensões do voxel forem inferiores à resolução do microscópio. Um voxel de “boas” dimensões para análise é da ordem de grandeza dos 100 nm, aproximadamente 1/5 do



c.d.o. da luz visível [39], valor da mesma ordem de grandeza da dimensão linear do voxel experimental, apresentado na secção 2.3.5. - *Dimensão do voxel*.

Os métodos de desconvolução têm-se tornado comuns em microscopia óptica, com a evolução da capacidade computacional de processar a elevada quantidade de informação contida na pilha 3D de imagens [36]. Tendo por propriedade de base o facto do processo de formação de imagem distorcer o objecto é efectuada a caracterização dessa distorção, de modo a que a imagem possa ser restaurada para um estado mais próximo do objecto original. Esta abordagem pode ser feita não só em microscópios ópticos de fluorescência, mas também de campo claro (“brightfield”) e até confocais [35].

Uma dificuldade associada ao processo de desconvolução é a falta de controlo preciso das condições experimentais de aquisição de imagens. Quando a luz é focada no interior de uma amostra complexa, podemos apenas esperar um conhecimento aproximado da PSF do sistema, informação crucial para a desconvolução [36]. A PSF descreve as propriedades de formação da imagem (fenómeno de difracção, aberrações ópticas, etc.), sendo deste modo vantajoso medi-la sob diferentes condições de aquisição [24]. Uma fonte de aberrações comum e difícil de suprimir é a profundidade de aquisição de imagens em situações em que o índice de refração da amostra e das camadas de imersão são diferentes. Esta variação resulta numa PSF não estacionária, com uma variabilidade mais evidente na direcção vertical, segundo  $z$  [57].

A aquisição de imagens de microscopia óptica é limitada principalmente por dois factores: *instrumentação*, dada a sua limitação de resolução e a possibilidade de introduzir ruído; e a própria *amostra*, com as suas propriedades ópticas e características de emissão frequentemente não ideais [57]. Quando se foca em profundidade numa amostra biológica, grande parte da luz é perdida por dispersão, em estruturas circundantes e várias distorções associadas às diferenças de índice de refração existentes ao longo da amostra [36].

### **2.2.1. Fontes de degradação da imagem**

As fontes de degradação da imagem podem ser divididas em três fenómenos principais: ruído, dispersão e “blurring” (desfocagem).

Na extracção de *ruído* os métodos de restauro podem ser baseados em modelos físicos efectivos de ruído, como por exemplo a estatística de Poisson, e na distribuição Gaussiana normalmente aplicada em ruído proveniente do sistema instrumental de aquisição de imagem [27], [59].

A *dispersão* é geralmente caracterizada por um *distúrbio aleatório* induzido pela passagem da luz através de regiões de índice de refacção heterogéneo dentro da imagem. O efeito da dispersão é um desarranjo aleatório no detalhe da imagem. Apesar de ainda nenhum método satisfatório ter sido desenvolvido para prever a dispersão numa determinada amostra, foi demonstrado que o grau de dispersão depende fortemente da espessura e propriedades ópticas da amostra e materiais circundantes [24], [57]. A dispersão aumenta com a espessura da amostra e heterogeneidade do índice de refacção presente nos componentes internos dentro da amostra [59].

O “*blurring*” é descrito por um espalhamento *não aleatório* da luz, que ocorre aquando da sua passagem pelo caminho óptico. A fonte mais significativa de desfocagem é a difracção, que representa o limite intrínseco de qualquer sistema de formação de imagem, factor determinante para estabelecer o limite de resolução do sistema óptico [59], [36]. Trata-se do único factor de degradação que conseguimos modelar linearmente através PSF.

Apesar do objectivo de base da desconvolução ser a remoção do “*blurring*” induzido na aquisição, não se deve descorar as outras formas de desfocagem produzidas pelo sistema de formação de imagem, como as induzidas pela amostra, ou acompanhadas pela electrónica instrumental [36], [57], [59], [62]. Facto que impede a possibilidade de remoção total dos efeitos de desfocagem pelas técnicas de desconvolução.

Como a dispersão é um fenómeno irregular que ocorre na amostra, este mostra-se de difícil modelação. No entanto, o “*blurring*” é uma função do sistema de aquisição de imagem (principalmente da lente objectiva), cujo modelo pode ser idealizado de forma aparentemente simples. Este modelo torna possível inverter matematicamente o processo de desfocagem por métodos desconvolutivos [59].

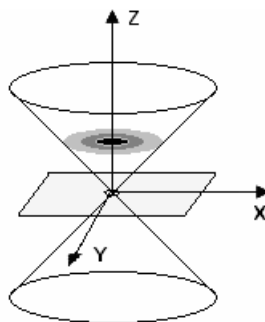
Podem ser identificadas nas problemáticas de processamento de imagem cinco categorias centrais: preparação, restauro, registo, segmentação e análise qualitativa/quantitativa da

imagem [57]. Nesta dissertação são focados, particularmente, o restauro e análise qualitativa e quantitativa da imagem restaurada pelos métodos desconvolutivos.

### 2.2.2. PSF do sistema óptico

O estudo da resposta impulsional do microscópio óptico é fundamental para descrever matematicamente o comportamento do sistema óptico, bem como para o estudo da resolução do sistema [6]. Numa aplicação tridimensional a caracterização da luz “out-of-focus” é baseada numa imagem 3D de um ponto de luz, designada PSF (“Point Spread Function”) ou resposta impulsional do sistema óptico. Mas, a imagem de um ponto de luz nunca é um ponto, por mais perfeitas que sejam as lentes usadas. Em consequência da limitação finita da abertura numérica das lentes não lhes é possível efectuar a aquisição da totalidade de luz emitida pelo ponto de luz [35]. Ou seja, o sistema de formação de imagem microscópica colecta apenas uma fracção da luz emitida por esse ponto de luz, que impossibilita a focagem perfeita da imagem tridimensional do ponto. Deste modo, o ponto aparece dilatado e espalhado num padrão de difracção tridimensional. A PSF é formalmente definida por um padrão de difracção tridimensional gerado por uma fonte pontual ideal de luz [59].

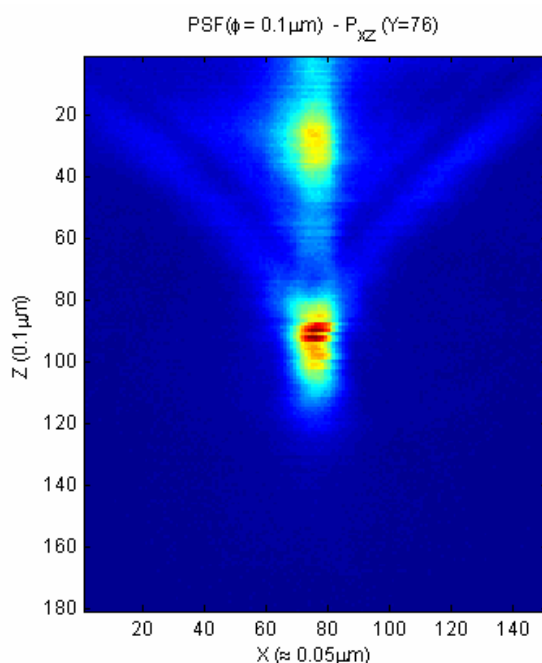
Desta forma, a imagem 3D resulta num cone duplo (espelhado) que se encontra centrado no ponto de luz (figurativamente pode ser comparado à imagem de uma ampulheta). A difracção introduzida pela abertura numérica finita leva à formação de padrões de anéis modulados na estrutura do duplo cone da PSF [35], [49], esquematicamente representado na *Figura 5*.



**Figura 5:** Diagrama do modelo da PSF sintética, baseado em [49].

Admitindo um SLI uma imagem da amostra resulta da convolução da PSF nesse ponto com toda a imagem. Conhecendo a PSF do sistema óptico usado, a desconvolução procura deduzir a distribuição original desses pontos de luz da amostra, que nos vão permitir chegar a uma aproximação do objecto real da imagem adquirida [35].

Dependendo do sistema de aquisição de imagem utilizado, a PSF apresenta um formato singular, com forma e contornos únicos [59], sendo um exemplo apresentado na *Figura 6*.



**Figura 6:** Imagem de um corte sagital (XZ) de uma pilha tridimensional de imagens de uma microesfera fluorescente de 0.1  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Obtida por microscopia de fluorescência, (Fonte: laser de 488nm; Objectiva de imersão: 100x e AN=1.45; Filtro de emissão:  $\lambda_{\text{(emissão)}} = 680\text{nm}$ ).

Em geral, a PSF tridimensional, pode ser obtida por três técnicas diferentes: *teoricamente* de forma analítica ou computacional; *experimentalmente* pela aquisição de uma pilha tridimensional de imagens de microesferas fluorescentes de tamanho reduzido (próximo da resolução do sistema) [28], [35], [37], [57] ou imagens de gotas de óleo ou pequenas esferas de látex [49]; ou ainda a partir da *extração directa* de uma pequena estrutura da imagem da amostra em análise [37].

### 2.2.2.1. PSF teórica

Nos métodos analíticos, a PSF é calculada tendo por base a difracção clássica, baseada no modelo de Gibson e Lani, [15], [24], [35], [47].

Uma das possíveis abordagens na modelação da PSF considera apenas os efeitos de difracção, assumindo que em relação aos restantes factores de limitação o sistema é perfeito [55]. No entanto, outros factores podem distorcer a imagem, como por exemplo a aberração esférica induzida por diferenças no índice de refração [55]. Esta variação conduz a um decaimento mais lento que leva a uma perda da simetria vertical da PSF, responsável pelo aumento de desfocagem e perda de resolução em profundidade [48].

Mesmo em condições ideais de geometria do sistema, as imagens apresentam aberração esférica residual, na sua maioria inerente da lente objectiva, no entanto, também podem depender da exacta localização da câmara (CCD) [58].

Desta forma surgiram várias metodologias para colmatar esta lacuna, como um modelo complexo de uma PSF com variação espacial ao longo do eixo vertical, tendo em conta aberrações esféricas provocadas por lentes de imersão de óleo, derivado por Gibson e Lanni, [13]. Recentemente, surge um modelo mais simples, desenvolvido por Hanser, Gustafsson et al, [18], baseado numa derivação da função característica da aberração, provocada por diferenças de índice de refração [55].

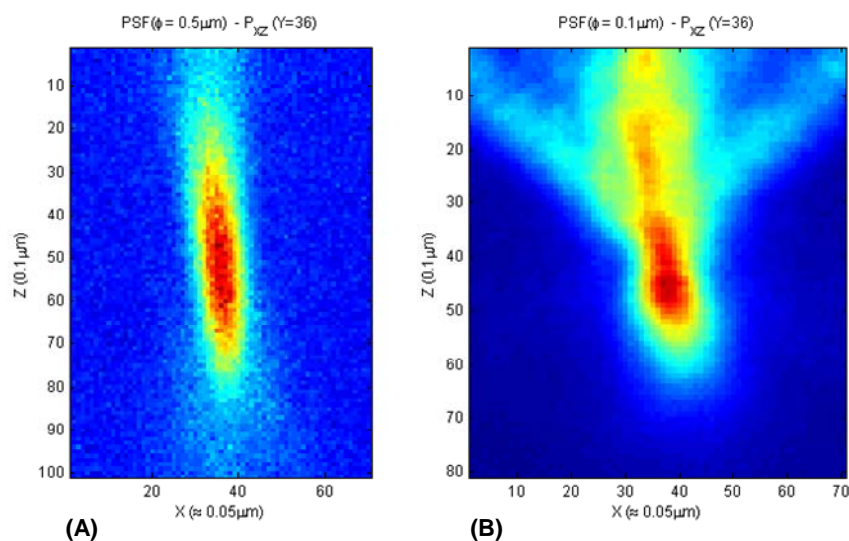
Outra abordagem sugerida para ao cálculo da PSF teórica é a emprego do software (*XCOSM - X-Windows interface to Computational Optical Sectioning Microscopy (COSM) algorithms for removing “out-of-focus” light in 3-D volumes collected plane by plane using either widefield or confocal fluorescence microscopy*) [24], [35], [47]. Mas mais importante que o software são os modelos teóricos que se pode seguir para deduzir uma PSF analítica.

O modelo teórico de PSF, usado neste trabalho, baseia-se em modelos teóricos conhecidos como o de Gibson e Lani que se apoiam na difracção clássica. Este modelo encontra-se descrito na secção 4.2.1. - *PSFs Sintéticas* do quarto capítulo.

### **2.2.2.2. PSF experimental**

Nos métodos experimentais, de obtenção da PSF, são adquiridas imagens de objectos aproximados a um ponto, como por exemplo microesferas fluorescentes [18], [28], [35], [36], [37], para a caracterização de um sistema de fluorescência, e pequenas esferas de látex ou uma gota de óleo [49], para a caracterização de um sistema de microscopia óptica por transmissão. Estes métodos em comparação com as abordagens teóricas têm a vantagem adicional da PSF corresponder de melhor forma à montagem experimental. Mesmo, que exista uma boa correlação entre a PSF teórica e a medida, apenas esta última permite caracterizar aberrações ópticas, como cromaticidade e assimetria do sistema [24]. No entanto, estas imagens têm uma razão sinal/ruído (SNR: “signal to noise ratio”) muito baixa, a menos que se consiga um sistema especialmente otimizado [47].

A obtenção da PSF empírica, nas condições ópticas experimentais é uma experiência fácil de compreender, mas difícil de implementar. Como compromisso, deve-se usar microesferas de diâmetro de cerca de  $1/3$  do limite de resolução fixado pela objectiva do microscópio. Este critério implica que o diâmetro da microesfera seja menor do que a distância mínima resolvida pelo microscópio [35]. Experimentalmente adquiriram-se pilhas tridimensionais de imagens de microesferas fluorescentes de 0.5 e 0.1  $\mu\text{m}$ , para tentar caracterizar a PSF experimental do sistema óptico, exemplos apresentados na *Figura 7*.



**Figura 7:** Imagens de cortes sagitais (XZ) de duas pilhas tridimensionais de imagens de microesferas fluorescentes de diâmetro de  $0.5 \mu\text{m}$  (A) e  $0.1 \mu\text{m}$  (B). Obtidas por microscopia de fluorescência. (A): (Fonte: lâmpada de HbO; Filtro de excitação:  $\lambda_{(\text{excitação})} = 380\text{nm}$ ; Objectiva de imersão: 63x e AN=1.2; Filtro de emissão:  $\lambda_{(\text{emissão})} = 580\text{nm}$ ); (B): (Fonte: laser de 488nm; Objectiva de imersão: 100x e AN=1.45; Filtro de emissão:  $\lambda_{(\text{emissão})} = 680\text{nm}$ ).

Apesar da PSF empírica ser preferível para aplicação em algoritmos de desconvolução, esta exibe uma aleatoriedade frequente, devido à natureza de Poisson nos processos de contagem de fótons e outras fontes de ruído dos componentes electrónicos de aquisição. Estes efeitos apresentam sérios obstáculos ao uso de PSF empíricas em algoritmos de desconvolução, pois uma PSF com ruído pode colocar em causa o resultado obtido, em consequência da ampliação do ruído resultante do processo de desconvolução [28].

Uma abordagem adoptada na redução de ruído e da contribuição dos componentes aleatórios na PSF experimental consiste na aplicação de métodos computacionais de suavização na PSF. Um método standard é a aplicação de um filtro Gaussiano na matriz 3D da PSF, mas como este processo é baseado numa média por pesos dos píxeis vizinhos, traduz-se numa perda de detalhes na PSF final [28]. Esta abordagem foi experimentalmente testada com filtros gaussianos mas não apresentou melhorias nos resultados finais após a aplicação dos métodos desconvolutivos.

Outra abordagem possível, para reduzir o ruído é proceder à aquisição de imagens de 20 a 30 microesferas, sendo a PSF final a resultante da média. A esta metodologia estão

associadas algumas dificuldades: o tempo que é necessário despendido para proceder à aquisição das imagens e o facto do alinhamento das diferentes PSFs não ser isento de problemas, bem como o facto da média radial eliminar quaisquer potenciais assimetrias na PSF [28]. Não tendo sido por esta razão aplicada nos testes experimentais.

Uma prática diferente, introduzida com o objectivo de obter uma PSF o mais próximo possível das condições de medição da amostra biológica, requer a injeção de microesferas na amostra biológica, procedendo depois à medição da PSF “in situ” [35]. Mas, esta metodologia nem sempre é passível de ser implementada, dada a complexidade da introdução de microesferas em algumas amostras biológicas. Apesar de se apresentar como uma metodologia interessante a adoptar, por dificuldades várias (como falta de microesferas de látex, para visualização em transmissão, com coloração suficientemente diferenciada das amostras biológicas analisadas, esfregaços de sangue, e da particularidade da introdução das microesferas ter de ser efectuada durante o processo de fixação do esfregaço de sangue) tal não foi possível de se implementar.

A PSF empírica deve ter ainda o objectivo adicional de aferir a qualidade óptica do microscópio, e melhorá-la se possível. Os melhores sistemas ópticos dão origem a PSFs simétricas em Z e com padrões de anéis simétricos. Quando as PSFs são assimétricas estão implícitas aberrações ópticas, que após identificadas podem em alguns casos ser corrigidas por alteração de elementos ópticos como lentes e espelhos dicróicos, componentes que mais directamente se encontram relacionados a esse tipo de assimetria. Ou em alguns casos, pequenas alterações no índice de refração do óleo de imersão [35]. Tendo-se concluído em alguns estudos, que pequenas variações do índice de refração do meio originam PSFs experimentais significativamente diferentes [21].

Nas aquisições experimentais não foi possível, por ajuste e calibração dos vários componentes ópticos de formação de imagem anular estes efeitos. No entanto de forma a compensar algumas dessas variações verificadas na pilha tridimensional final, foram adoptadas soluções alternativas descritas no quarto capítulo da dissertação.



### 2.2.2.3. PSF extraída da amostra

Apesar de ser possível obter uma PSF empírica de relativa precisão, esta precisão é inútil se a PSF obtida tiver uma correspondência global fraca com as condições experimentais. Ou seja, se a medição de uma PSF segundo as condições de design óptico do microscópio não conseguir reproduzir as condições experimentais que ocorrem “in situ”. A abordagem mais natural para resolver o problema, é extrair a PSF das próprias imagens adquiridas [37].

Este método centra-se numa abordagem prática, que consiste no corte de estruturas semelhantes a microesferas, que se apresentem na amostra e possam caracterizar a PSF. As estruturas seleccionadas devem ser de dimensões suficientemente reduzidas, de modo a que o seu comportamento se aproxime ao da resposta impulsional do sistema, e razoavelmente isoladas do ruído de fundo circundante, para permitir uma aproximação fíável da PSF. O tamanho e forma das estruturas devem, deste modo, aproximar-se a “pontos” de dimensões próximas da ordem de grandeza da resolução do sistema óptico [37].

Esta abordagem mostra-se de aplicação prática em vários casos, permitindo um restauro significativamente melhor do que com PSFs obtidas por imagens de fluorescência de microesferas embebidas em gel. Experimentalmente, verificou-se em estudos efectuados por Monvel [37], que a imagem desconvoluída com uma PSF extraída, apresenta melhor resolução e menos artefactos, do que em desconvoluções que usam medidas standard de microesferas.

Baseada nesta abordagem foi aplicada nas pilhas digitalizadas de amostras biológicas, a extracção de pequenas estruturas passíveis de serem usadas como PSFs, posteriormente aplicadas nos diferentes métodos desconvolutivos. Para reduzir o nível de ruído dessas PSFs extraídas foram aplicados algoritmos de desconvolução não iterativos, métodos descritos no capítulo quatro. Esta redução dá-se tendo em conta que a desconvolução é acompanhada por métodos de regularização matemática que têm efeitos “passa-baixo” e deste modo permitem minimizar o ruído.

## 2.3. Descrição do sistema experimental de aquisição de imagem

O sistema experimental utilizado é constituído por um microscópio da *Zeiss – Axioskop*, um filtro sintonizável de cristais líquidos (LCTF) *Varispec* e uma câmara CCD (SuperVGA) de elevada resolução. A câmara é de 12 bits com resolução de  $1024 \times 1280$  píxeis.

As imagens experimentais foram adquiridas em microscopia de transmissão em duas montagens diferentes, com e sem o filtro *Varispec*. Sem o filtro *Varispec* a imagem exibe a transmissão de toda a gama de comprimentos de onda abrangidos pelo objecto. Enquanto que com o filtro LCTF a imagem é adquirida através da selecção de um determinado comprimento de onda ( $\lambda$ ) da luz transmitida pelo objecto.

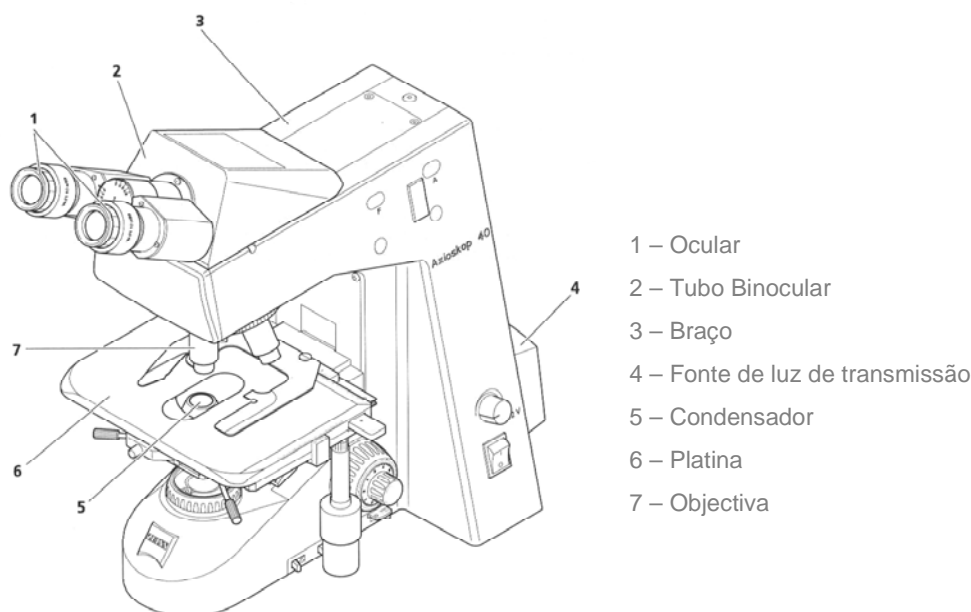
A selecção é feita por um filtro sintonizável de cristais líquidos (LCTF – “Liquid Crystal Tunable Filter”), que permite a aquisição de uma série de imagens numa vasta gama de comprimentos de onda, 400-720 nm. Este filtro transmite uma certa banda de  $\lambda$  (cerca de 10nm), sendo opaco às restantes. Os filtros sintonizáveis LCTFs mudam de  $\lambda$  em cerca de 50 milissegundos, sem provocar distorção da imagem. O tamanho da imagem é limitado apenas pela resolução do detector CCD.

Na montagem experimental, as imagens obtidas pela câmara ou detector CCD têm duas variáveis, o comprimento de onda da imagem adquirida, seleccionado pelo filtro LCTF, e o tempo de exposição para a aquisição da imagem. No caso da montagem sem o filtro, apenas é introduzido o tempo de exposição. Os tempos de exposição na montagem com o filtro rondaram os 300 ms, enquanto que para a montagem sem o filtro foi de apenas 1 ms. A imagem final adquirida é armazenada em *Matlab*, que a traduz numa matriz de intensidades.

### 2.3.1. Microscópio óptico

O microscópio óptico composto, também designado por microscópio óptico de campo total usado experimentalmente encontra-se esquematicamente apresentado na *Figura 8*.

A iluminação do objecto na microscopia de transmissão é obtida a partir de uma fonte de luz de transmissão e através de um sistema óptico designado por condensador que condensa os raios luminosos provenientes da fonte, de modo a projectar um cone de luz uniforme sobre o objecto [43]. Nos testes efectuados com a microscopia de fluorescência usou-se como fonte a lâmpada de mercúrio, HbO, e o laser de 488nm.

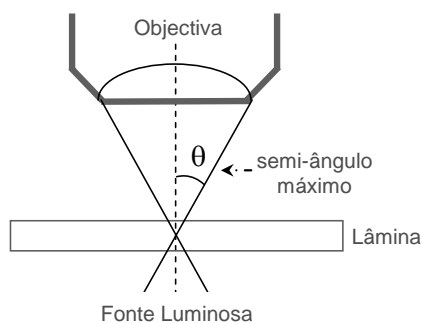


**Figura 8:** Figura esquemática do microscópio utilizado no laboratório, Zeiss – Axioskop [5].

A luminosidade da imagem depende essencialmente da luz colectada pela objectiva, caracterizada pela sua abertura numérica, equação (eq. 1).

$$AN = n_i \cdot \text{sen } \theta_{\max} \quad \text{eq. 1}$$

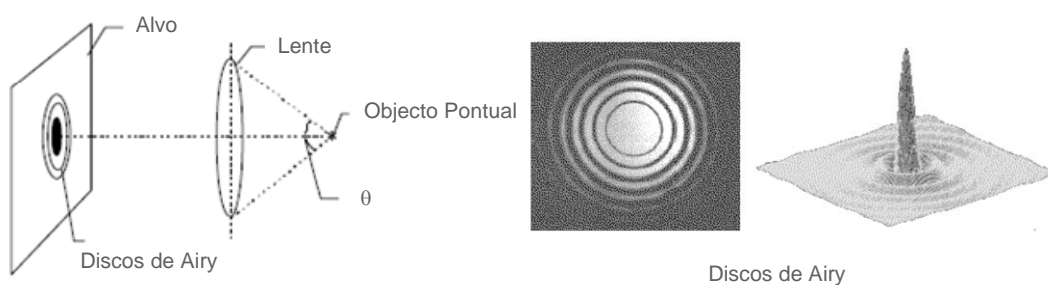
Em que  $n_i$  é o índice de refração do meio (ar, óleo, água, etc.) no qual a objectiva está imersa e  $\theta_{\max}$  o semi-ângulo máximo no interior do qual a objectiva colecta a energia luminosa, ou seja, o ângulo entre o raio marginal e o eixo óptico [19], diagrama descritivo apresentado na *Figura 9*.



**Figura 9:** Diagrama esquemático do semi-ângulo máximo no interior do qual a objectiva colecta a energia luminosa proveniente da amostra.

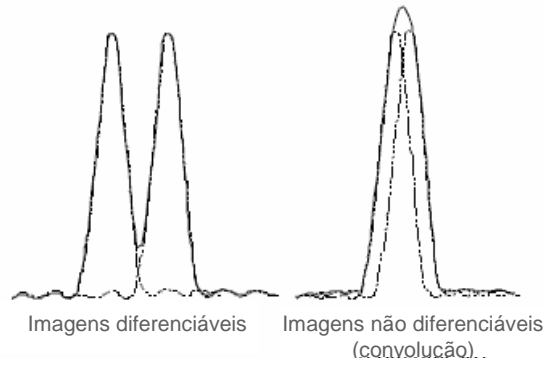
### 2.3.2. Limite de resolução do microscópio óptico

As dimensões finitas de lentes, idealmente perfeitas, limitam a resolução do microscópio por ocorrência de fenómenos de *difracção*, em que um ponto do objecto é transformado em discos na imagem (discos de Airy), *Figura 10*.



**Figura 10:** Diagrama esquemático da formação de uma imagem com discos de Airy.

Para dois pontos muito próximos no objecto, dá-se a sobreposição dos discos de Airy, caracterizados por imagens não diferenciáveis, *Figura 11*.



**Figura 11:** Perfil de intensidades de imagens diferenciáveis e não diferenciáveis.

A separação mínima entre dois objectos pontuais discerníveis por um sistema óptico, designado poder de resolução ou limite de resolução de um instrumento, varia directamente com o comprimento de onda e inversamente com a abertura numérica [19].

O Limite de Resolução ( $LR$ ) pode então ser descrito, pelo critério de Rayleigh, através da equação (eq. 2) [52], [60].

$$LR = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \text{sen}\theta} \quad ; \quad AN = n \cdot \text{sen}\theta \quad \rightarrow \quad LR = \frac{0,61 \cdot \lambda}{AN} \quad \text{eq. 2}$$

$\lambda$  - Comprimento de onda da radiação incidente;

$\theta$  - Abertura angular da lente;

$n$  - Índice de refração do meio entre a lente objectiva e o objecto;

$AN$  - abertura numérica da lente;

A equação (eq. 2) é útil para aferir informação da resolução de uma imagem planar (plano XY), mas não pode ser aplicada ao longo do eixo óptico (eixo vertical segundo Z), informação crítica para análises de desconvolução tridimensional. O padrão de difracção em planos segundo Z não apresentam a forma de discos (discos de *Airy*), mas a forma figurada de ampulheta ou cones espelhados nos planos XZ e YZ da PSF. Contudo, esta forma de ampulheta, “X”, tem uma região central brilhante, tal como nos discos de *Airy*. Deste modo o critério de *Rayleigh* é definido tendo em conta a distância entre o ponto de máxima intensidade e o ponto de intensidade mínima da região brilhante central, ao longo do eixo dos ZZ [60]. Este valor pode ser estimado através da equação (eq. 3):

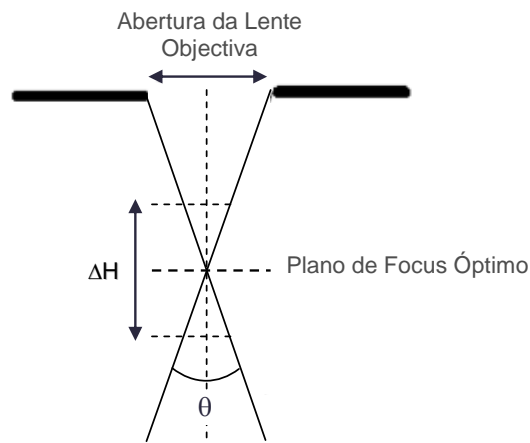
$$d = \frac{2 \cdot n \cdot \lambda}{AN^2} \quad \text{eq. 3}$$

É importante referir que o critério usado para o cálculo da resolução segundo  $Z$ , assume que as imagens são adquiridas em condições livres de aberrações, cenário irrealista na prática experimental.

### 2.3.3. Profundidade de campo e foco do microscópio óptico

A resolução na direcção  $Z$ , está relacionada, mas não é idêntica ao conceito de profundidade de campo. A profundidade de campo ( $\Delta H$ ) é classificada como a espessura da região da amostra, que aparece focada na imagem final do microscópio [60], podendo ser definida pela equação (eq. 4). Ou seja, é a diferença máxima de cota entre dois pontos do objecto, de modo que as respectivas imagens se apresentam focadas. A diferença entre a terminologia profundidade de campo e profundidade de foco reside no facto do primeiro dizer respeito ao espaço do objecto e o segundo ao espaço da imagem, no entanto estes dois termos são frequentemente confundidos [52].

$$\Delta H = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin \theta \cdot \tan \theta} \quad \text{eq. 4}$$



**Figura 12:** Diagrama esquemático da profundidade ( $\Delta H$ ) de campo num sistema óptico.

Para um dado sistema óptico, a profundidade de campo é inversamente proporcional à ampliação ( $M$ ).

No entanto, segundo estudos mais recentes de I.T. Young [64], para lentes de elevada abertura numérica a expressão da profundidade de foco não depende da ampliação, como definido anteriormente por Piller [40], rescrevendo-se a expressão da profundidade de foco (*PF*), equações apresentadas em seguida.

$$\text{Born \& Wolf} \rightarrow (1) \quad PF_{B.W.} = \frac{\lambda}{2 \cdot AN^2}; \quad [\mu\text{m}] \quad \text{eq. 5}$$

$$\text{H. Piller} \rightarrow (2) \quad PF_P = \frac{1000}{7AN \cdot M_1} + \frac{\lambda}{2 \cdot AN^2}; \quad [\mu\text{m}] \quad \text{eq. 6}$$

$$M_1 = M_o M_e M_s \approx M_o * 10$$

$$\text{I.T. Young} \rightarrow (3) \quad PF_{I.Y.} = \frac{\lambda}{4.n \left(1 - \sqrt{1 - (AN/2)^2}\right)}; \quad [\mu\text{m}] \quad \text{eq. 7}$$

$M_o, M_e, M_s$  – Ampliação da lente *objectiva*, das lentes *oculares* e lentes do *sensor*, respectivamente;

$M_1$  – Ampliação total do sistema de lentes;

$n$  – Índice de refração (do meio entre a lente e a amostra);

$AN$  – Abertura numérica;

$\lambda$  – Comprimento de onda de iluminação (excitação);

**Tabela 1** – Dados específicos da objectiva de imersão de óleo usada experimentalmente, para um comprimento de onda médio no visível (550 nm).

$M_o$	$AN$	$WD$ ( $\mu\text{m}$ )	$dF$ ( $\mu\text{m}$ )	$n$ (óleo)
<b>100 X</b>	1.45	100	1645	1.518
<b>Profundidade de Campo</b> ( <i>assumindo <math>\lambda = 550 \text{ nm}</math></i> )				
	<b><i>PF (B.W.)</i></b> ( $\mu\text{m}$ )	<b><i>PF (Piller)</i></b> ( $\mu\text{m}$ )	<b><i>PF (I.Young)</i></b> ( $\mu\text{m}$ )	
	0.1308	0.2293	0.1287	

(Nota:  $\lambda_{excitação} = 550\text{nm}$ ; lamela de borossilicato com espessura = 170  $\mu\text{m}$ )

$M_o$  – Ampliação da lente *objectiva*;

$AN$  – Abertura Numérica;

$WD$  – Working distance;

$dF$  – Distância focal = 164.5 (mm) /  $M_o$ ;

$n$  – Índice de refração (meio entre a lente e a amostra);

$PF$  – Profundidade de Foco de B.W. (Born & Wolf), H. Piller e I.T. Young.

### 2.3.4. Varrimento vertical

A aquisição da pilha tridimensional, composta por imagens bidimensionais adquiridas a diferentes planos de focagem segundo o eixo vertical,  $Z$ , é experimentalmente efectuada movendo a objectiva através de um motor acoplado à mesma. O motor de varrimento segundo  $Z$  ( $Z'scan$ ) usado experimentalmente possui uma expansão nominal de  $100\ \mu\text{m}$  e uma resolução mínima de  $0.1\ \mu\text{m}$ .

#### 2.3.4.1. Intervalo de amostragem da imagem digital

Um intervalo de amostragem próprio para as direcções  $x$ ,  $y$ , e  $z$  é importante para bons resultados de desconvolução. Em conformidade com o teorema de amostragem de Nyquist, a quantidade de amostragens por unidade de tempo de um sinal, designada de frequência de amostragem, deve ser maior que o dobro da maior frequência contida no sinal a ser amostrado. De modo a obter uma aproximação razoável do sinal real adquirido por mecanismos discretos de amostragem. Uma elevada frequência de amostragem produz restauros superiores, especialmente quando aplicados a algoritmos tridimensionais [58].

Por exemplo, numa experiência efectuada num microscópio óptico com um comprimento de onda de emissão do visível compreendido entre  $400$  e  $700\ \text{nm}$ , abertura numérica da objectiva de  $1.45$  e índice de refração do óleo de  $1.518$ . Aplicando o critério de Rayleigh, (eq. 8), [58], a resolução limite segundo  $x$ - $y$  é  $\approx [168 - 294]\ \text{nm}$ , e segundo  $z$  é  $\approx [578 - 1011]\ \text{nm}$ .

$$LR_{xy} = \frac{0.61 \cdot \lambda}{AN} ; \quad LR_z = \frac{2 \cdot n \cdot \lambda}{AN^2} \quad \text{eq. 8}$$

Em que  $n$  é o índice de refração,  $\lambda$  o c.d.o. de emissão e  $AN$  a abertura numérica da lente objectiva.

Deste modo, para apresentar uma frequência de *Nyquist* segundo estas condições, o intervalo de amostragem deve ser metade dos valores obtidos, ou seja aproximadamente



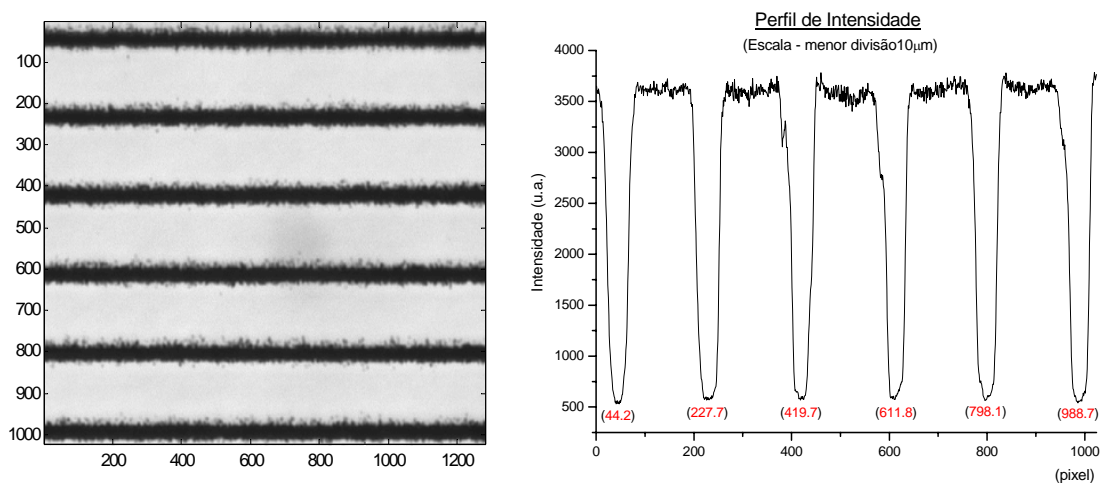
compreendida entre  $[0.084 \text{ e } 0.147] \mu\text{m}$  no plano x-y, e  $[0.289 \text{ e } 0.505] \mu\text{m}$  na direcção de z.

Contudo, experimentalmente utilizou-se a resolução mínima do passo do motor Z'scan, de  $0.1 \mu\text{m}$ , para aquisição dos vários planos bidimensionais, no sentido de obter uma informação mais detalhada possível.

### 2.3.5. Dimensão do voxel

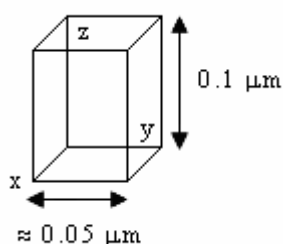
Para calibrar as dimensões da unidade elementar 3D da imagem digital, o voxel, utilizou-se como amostra bidimensional (x-y) uma escala de  $100 \mu\text{m}$ , com menor divisão  $10 \mu\text{m}$ , considerando como unidade elementar segundo Z, o passo de varrimento vertical aplicado de  $0.1 \mu\text{m}$ .

#### Objectiva 100x (imersão de óleo) – Montagem experimental com filtro LCTF



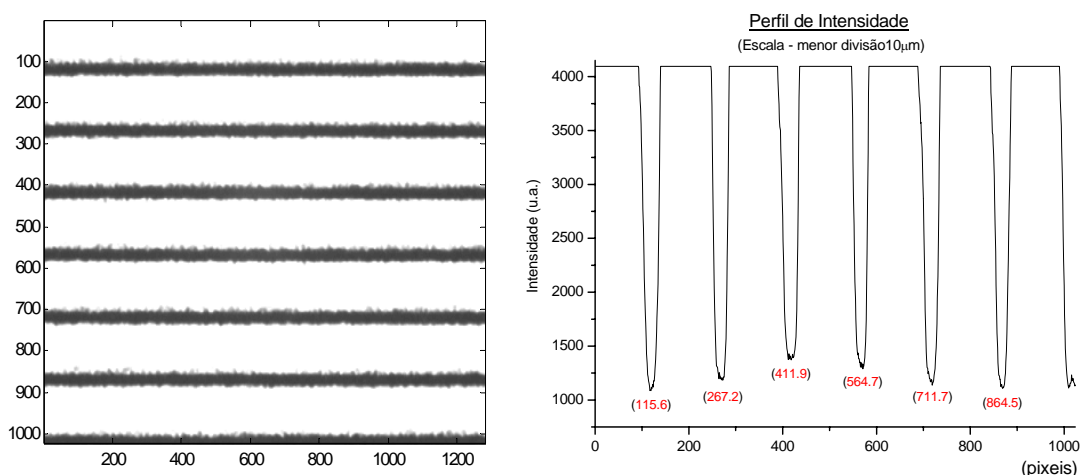
**Figura 13:** Esquerda: Imagem da escala de menor divisão  $10\mu\text{m}$ , obtida com objectiva ( $100\times$ ,  $\text{AN}=1.45$ ). Direita: Perfil de intensidade da imagem da esquerda, de todas as linhas ao longo da coluna de 600px. Montagem experimental (*setup*) com o filtro LCTF.

A distância média entre os picos que correspondem à escala de menor divisão ( $10\mu\text{m}$ ) foi de  $\approx 188,9 \text{ px}$ . A correspondência em nanómetros do valor real de cada píxel é  $53,0 \pm 1,0 \text{ nm}$ . O erro percentual de 1.8% foi obtido a partir do desvio padrão.



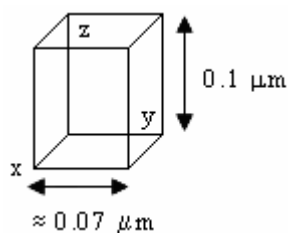
**Figura 14:** Diagrama do volume do voxel, para aquisições com a objectiva (100 $\times$ , AN=1.45), na montagem experimental com o filtro LCTF, tendo como varrimento vertical o passo mínimo do motor Z'scan de 0.1  $\mu\text{m}$ .

### Objectiva 100x (imersão de óleo) – Montagem experimental sem filtro LCTF



**Figura 15:** Esquerda: Imagem da escala de menor divisão 10 $\mu\text{m}$ , obtida com objectiva (100 $\times$ , AN=1.45). Direita: Perfil de intensidade da imagem da esquerda, de todas as linhas ao longo da coluna de 600px. Montagem experimental sem o filtro LCTF.

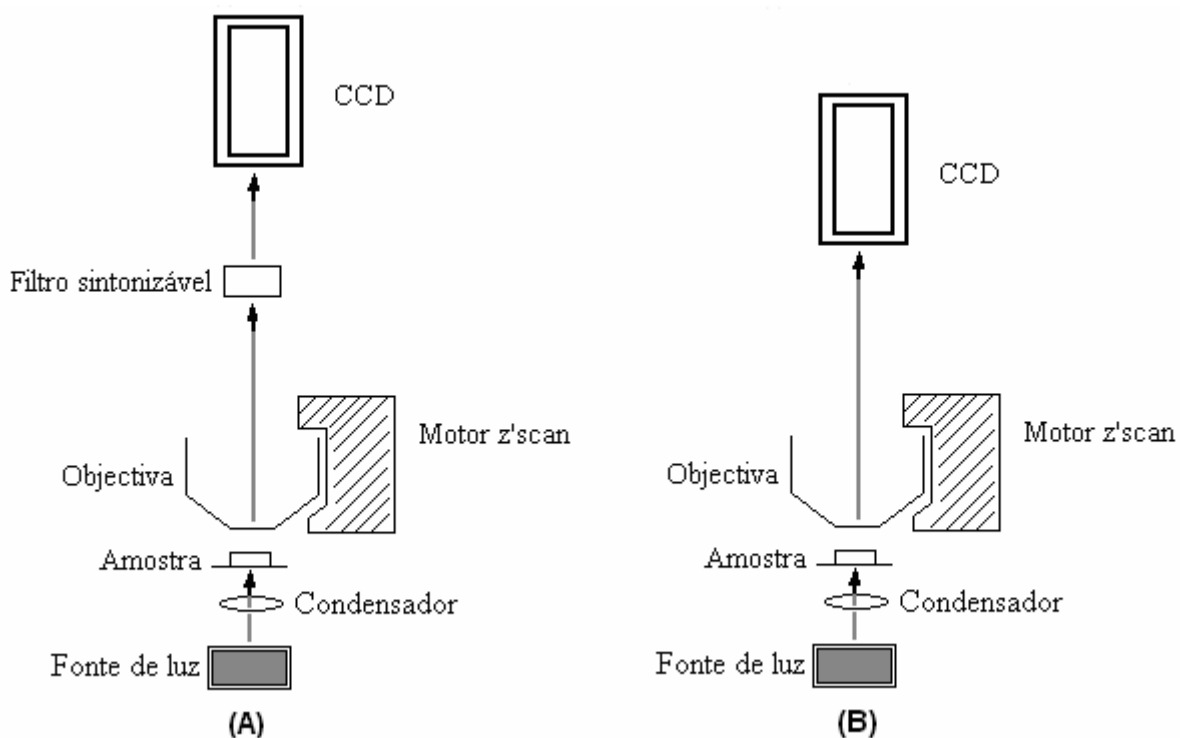
A distância média entre os picos que correspondem à escala de menor divisão (10 $\mu\text{m}$ ) foi de  $\approx 149,9$  px. A correspondência em nanómetros do valor real de cada píxel é  $66,7 \pm 1,3$  nm. O erro percentual de 1.9% foi obtido a partir do desvio padrão.



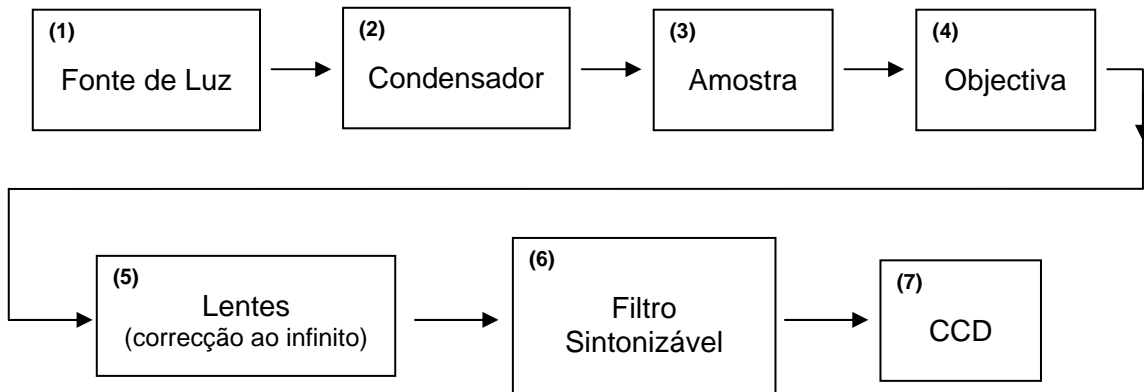
**Figura 16:** Diagrama do volume do voxel, para aquisições com a objectiva (100 $\times$ , AN=1.45) numa montagem experimental sem o filtro LCTF, tendo como varrimento vertical o passo mínimo do motor “Z'scan” de 0.1  $\mu\text{m}$ .

### 2.3.6. Diagramas do sistema de formação de imagem

Diagramas Esquemáticos:



**Figura 17:** Diagrama esquemático do dispositivo experimental do Microscópio Óptico de Transmissão: (A) com filtro LCTF; (B) sem o filtro LCTF.

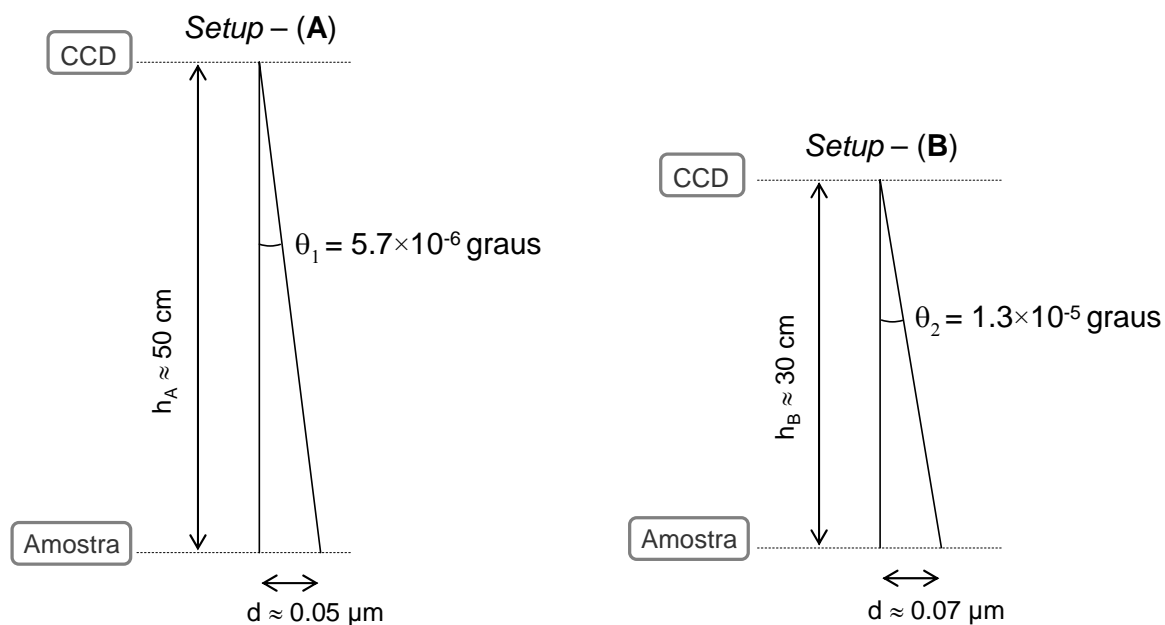


**Figura 18:** Diagrama de componentes do sistema de formação de imagem, para o Microscópio Óptico de Transmissão com filtro (LCTF), com o componente (6). No caso da montagem experimental de transmissão sem o filtro (LCTF), extrai-se o componente (6) do respectivo diagrama.

### 2.3.7. Oscilações do sistema óptico

Em consequência de se estar a trabalhar na discriminação de estruturas de dimensões muito próximas da ordem de grandeza do comprimento de onda foi necessário corrigir oscilações do sistema de aquisição de imagem extremamente sensível. Verificou-se que tendo em conta a geometria da montagem experimental de aquisição de imagem e a resolução mínima da imagem, oscilações da ordem de grandeza dos  $10^{-5}$  graus, muito difíceis de controlar, levam a deslocamentos relevantes na imagem final.

Estes cálculos podem ser mais facilmente compreendidos através diagrama esquemático apresentado na *Figura 19*, onde o parâmetro  $d$  corresponde à dimensão linear do píxel segundo XY e  $h$  à distancia média da CCD à amostra, para as diferentes montagens experimentais com e sem o filtro LCTF. Deste modo verificou-se que uma pequeníssima oscilação no eixo óptico, na ordem de grandeza dos  $10^{-5}$  graus, provoca um deslocamento de aproximadamente  $0.1\mu\text{m}$  em imagens de diferentes planos axiais.



**Figura 19:** Diagrama esquemático que descreve as diferentes montagens experimentais (*setup* – A, com o filtro LCTF e *setup* – B, sem o filtro LCTF) com referência ao ângulo mínimo de oscilação que provoca deslocamento na imagem adquirida em diferentes planos de Z.

Nas amostras biológicas analisadas com estruturas internas na célula de dimensões próximas dos 0.5  $\mu\text{m}$ , estes pequenos deslocamentos tornam-se críticos.

Para compensar estas oscilações foram aplicadas operações matemáticas de ajuste na pilha tridimensional de imagens digitalizadas, método detalhadamente descrito na secção 4.3.2. - *Alinhamento da pilha 3D* do quarto capítulo.

### 3. Métodos de desconvolução

---

Com a evolução das metodologias de visualização microscópica 3D de amostras biológicas têm vindo a ser exploradas várias técnicas desconvolutivas no sentido de conferir discriminação vertical a pilhas tridimensionais de imagens. Nas imagens adquiridas por microscopia óptica o aparecimento de desfocagens (“blurring”) e imprecisões deve-se principalmente à PSF do microscópio e ruído aleatório. Ou seja, as distorções obtidas nas pilhas 3D de imagens resultam sobretudo da luz “out-of-focus”, dos efeitos geométricos e das flutuações espaciais na iluminação da amostra, e do ruído de Poisson na detecção [47]. Neste tipo de sistemas existem três técnicas de desconvolução possíveis a adoptar: óptica, computacional e híbrida [47], [55].

Os métodos *ópticos* procuram reduzir a distorção por rejeição da luz “out-of-focus” antes desta atingir o detector, como por exemplo através da utilização do microscópio confocal de varrimento (CLSM: “Confocal Laser Scanning Microscope”) [55]. A microscopia confocal é caracterizada pela introdução de um “pinhole” em frente do detector com a função de garantir que a luz que passa por este é apenas relativa ao plano focal (“in-focus”) e não de regiões adjacentes [59].

Na desconvolução *computacional* a pilha tridimensional de dados é processada computacionalmente de modo a reduzir a contribuição “out-of-focus” da intensidade medida em cada píxel da imagem. Estes métodos determinam a quantidade de luz “out-of-focus” esperada na óptica em uso, procurando matematicamente redistribuir essa luz nos pontos de origem da amostra [35]. Aos métodos computacionais está associado um compromisso entre o custo computacional, propriedades de convergência e capacidade de aplicação em diferentes sistemas de formação de imagem [47], [55].

Existem ainda os métodos *híbridos* compostos pelas duas técnicas, óptica e computacional. Por exemplo, a combinação de métodos ópticos e computacionais pode ser efectuada na desconvolução de uma pilha 3D de imagens colectadas por um microscópio confocal. Esta

combinação pode permitir atingir uma resolução superior do que apenas com um único método [55].

Nesta dissertação são apenas aplicadas as técnicas de desconvolução computacionais. Para descrever essas metodologias vai ser apresentada neste capítulo uma introdução genérica aos vários métodos desconvolutivos existentes, sendo focados com maior detalhe os algoritmos de desconvolução aplicados neste trabalho.

Experimentalmente foram testados quatro algoritmos de desconvolução na reconstrução da pilha tridimensional, dois iterativos e dois não iterativos. Nos métodos não iterativos foram aplicados os métodos lineares do filtro de Wiener e do filtro óptimo segundo o critério do erro quadrático mínimo. Enquanto, nos processos iterativos, se aplicou o método estatístico do algoritmo de Richardson-Lucy e o método de desconvolução cega.

### 3.1. Algoritmos de desconvolução

Os algoritmos de desconvolução derivam da fórmula matemática que descreve o processo de formação de imagem do microscópio [35]. A fórmula que descreve a imagem microscópica incorpora duas quantidades conhecidas, a PSF  $h(x, y, z)$ , a medição da imagem 3D  $g(x, y, z)$ , e uma terceira quantidade desconhecida denominada distribuição da luz na amostra 3D, que representa a imagem ideal do objecto  $f(x, y, z)$ . Estas quantidades são relacionadas pela equação (eq. 9).

$$g(x, y, z) = f(x, y, z) \otimes h(x, y, z) \quad \text{eq. 9}$$

O símbolo  $\otimes$  representa a operação matematicamente conhecida como *convolução*. A convolução consiste essencialmente na soma do produto da imagem pela PSF deslocada ao longo de toda a imagem. As quantidades  $h(x, y, z)$  e  $g(x, y, z)$  podem ser ambas determinadas, ficando desta forma o processo de cálculo de  $f$ , conhecido como *desconvolução*. O aparecimento de diferentes algoritmos de desconvolução resulta do cálculo de  $f$  com métodos de desconvolução distintos [35].

Os algoritmos de restauro ou reconstrução trabalham segundo a lógica de que uma boa estimativa do objecto pressupõe que a imagem do mesmo resulta da sua convolução com a PSF. Ou seja, admitindo que o processo de formação de imagem é essencialmente convolutivo, é deste modo possível determinar uma estimativa real da imagem. Uma vantagem desta formulação é que a convolução de matrizes de grandes dimensões (como pilhas 3D de imagens) podem ser processadas de forma simples recorrendo às transformadas de Fourier. Se a imagem e a PSF são transformadas no espaço de Fourier, (ou seja, no domínio das frequências), a convolução da imagem com a PSF pode ser processada simplesmente pela multiplicação das suas transformadas de Fourier. A imagem de Fourier resultante pode ser de novo transformada nas coordenadas tridimensionais reais [61].

Matematicamente a desconvolução é um problema inverso frequentemente mal posto, dada a complexidade de parâmetros envolvidos no processo óptico de aquisição de imagem. Neste sentido é difícil garantir 100% de fiabilidade da estimativa real obtida da imagem pelos processos de desconvolução, mas de uma forma geral e não absoluta, os métodos que requerem mais tempo de processamento computacional conduzem a uma reconstrução de qualidade superior da imagem. Contudo, em alguns casos o tempo de processamento pode ser crítico, como por exemplo na avaliação de imagens em tempo real e aquisição de grandes quantidades de dados. Assim, é sempre aconselhável testar vários algoritmos de desconvolução, sabendo à partida que as características específicas da imagem são normalmente optimizadas por um algoritmo em particular [35].

Na implementação do algoritmo de desconvolução é necessário ter em conta que a forma como este é implementado pelo software afecta o seu desempenho e velocidade de processamento. Assim, o algoritmo pode ser aplicado de modo a reduzir o número de iterações e acelerar a convergência para produzir uma estimativa estável. Isto pode ser conseguido por pré filtragem da imagem real para minimizar ruído ou aplicação de um filtro de suavização em números sequenciais de iterações com o propósito de reduzir a amplificação de ruído. Em geral, quanto mais fiel com a pilha 3D de imagens adquiridas é a representação dos dados, mais memória e tempo de processamento são requeridos para desconvoluir a imagem final. Tratando-se, por esta razão, de estabelecer um compromisso entre o tempo de processamento computacional e a qualidade do restauro da imagem [61].



### 3.1.1. Métodos não iterativos

Nos métodos não iterativos podem diferenciar-se os métodos dos “não vizinhos”, dos “vizinhos” e os filtros: inverso, de Wiener, de Tikhonov e otimizado segundo o critério do erro quadrático mínimo.

Os métodos dos “não vizinhos” são caracterizados por processarem cada plano bidimensional separadamente, encontrando-se restringidos a objectos de elevadas frequências espaciais [47]. Desta forma o método é aplicado independentemente a cada plano focal. Estes métodos bidimensionais baseiam-se no facto de que a luz “out-of-focus” tende a ser composta por frequências espaciais mais baixas, como por exemplo o facto da intensidade da luz variar lentamente ao longo do campo de visão [35]. Assim, estes métodos bidimensionais centram o seu processamento nas altas-frequências espaciais da amostra, abordagem razoavelmente eficaz, apenas, para certos tipos de amostras, principalmente as compostas por altas-frequências (ex.: estruturas com variações abruptas de intensidade no plano axial, como pontos e filamentos). Para estas amostras, a remoção das baixas frequências extrai a maioria da luz “out-of-focus” [23], [35]. Contudo, a maioria das amostras é traduzida por uma complexa mistura de baixas e altas frequências espaciais, e assim, estes métodos de filtragem 2D correm o risco de eliminar componentes de interesse da amostra [35].

As abordagens que incorporam alguma, mas não a totalidade da informação 3D das imagens a desconvoluir, utilizando apenas a informação dos planos focais mais próximos, são denominadas de métodos de desconvolução dos “próximos-vizinhos” [35], [47]. No fundo está-se a trincar segundo Z o universo de dados. É necessário ter em conta que esta truncatura tem consequências ao nível do espectro 3D e consequentemente na pilha de imagens resultante. Nestes métodos cada plano bidimensional é desfocado, tendo em consideração a informação dos dois planos adjacentes. Os planos focais acima e abaixo do de interesse são desfocados por utilização de um filtro digital de *blurring*. A desconvolução é feita por subtracção dos planos desfocados, que permite a remoção de alguma da quantidade de desfocagem no plano focal de interesse, este procedimento tem como objectivo prevenir os efeitos da truncatura segundo Z [47], [61]. Este método é no entanto limitado, pois cada plano focal contém luz “out-of-focus” de todos os restantes

planos focais, apesar das contribuições mais fortes advirem dos planos adjacentes [35]. Desta forma, estes métodos, apenas trabalham de modo satisfatório quando uma quantidade significativa de desfocagem no plano focal se deve apenas à contribuição dos planos adjacentes [47].

O método dos “multi-vizinhos” é uma extensão do método dos “próximos-vizinhos” por considerar um número superior, mas ainda restrito, de planos. Apesar destes métodos tornarem as imagens 3D mais nítidas, do que os anteriores, têm várias desvantagens, associadas à ineficiência na redução de ruído e o facto de introduzirem artefactos, sendo por esta razão necessário precaução no uso destes métodos, especialmente em medidas morfológicas e quantitativas de intensidade [47].

A principal vantagem destas abordagens é a reduzida velocidade processamento. Contudo, este género de aplicação falha na categoria de algoritmo de redução de desfocagem e por essa definição não é na realidade uma desconvolução, pois não se baseia na estimativa ideal da totalidade da pilha de imagens. Em vez disso, o restauro da imagem final reduz-se à tentativa de tornar mais nítidos os limites das estruturas [23].

No caso dos métodos lineares (como por exemplo os filtros: inverso, de Wiener, de Tikhonov e optimizado segundo o critério do erro quadrático mínimo) são empregues todos os planos focais no processo computacional de desconvolução 3D e a desfocagem é aplicada deterministicamente. Alguns métodos lineares assumem a adição de um ruído Gaussiano na operação de desconvolução da imagem 3D [47]. No método computacional da desconvolução, é aplicada a equação (eq. 9), convertida numa simples multiplicação de transformadas de Fourier. Calculando  $F$ , que representa a transformada de Fourier da imagem ideal do objecto, pela equação (eq. 10). Onde  $F$ ,  $G$ , e  $H$  são respectivamente as transformadas de Fourier: da imagem ideal do objecto ( $F$ ), da medição da imagem ( $G$ ) e da PSF ( $H$ ).

$$F = G/H \tag{eq. 10}$$

No entanto, esta equação, aparentemente simples, não é eficaz na presença de ruído na imagem. Intuitivamente, as complexidades introduzidas pelo ruído podem ser

compreendidas tendo novamente em consideração que os métodos de desconvolução procuram restaurar a luz de “out-of-focus” nos pontos de origem. Quando um destes métodos trabalha com a intensidade de um determinado píxel da imagem, este vai harmonizar a contribuição relativa da luz “in-focus” e “out-of-focus” de cada ponto [35].

No método de Fourier descrito pela equação (eq. 10):  $F = G/H$ , o ruído das medidas efectuadas torna-se problemático para valores onde o denominador ( $H$ ), correspondente à PSF, é muito pequeno ou nulo. Para altas-frequências espaciais da imagem, como por exemplo as associadas a contornos muito acentuados, o denominador tem valores baixos.

Para resolver este problema todas as abordagens de Fourier na desconvolução adoptam uma estratégia de redução da ampliação de ruído. Desta forma, estabelece-se um compromisso entre a redução da contribuição das altas-frequências, responsáveis pelos efeitos de amplificação do ruído, e a redução dos níveis de contraste associados. Consequentemente estes métodos têm pelos menos um parâmetro variável que controla quando são eliminadas as altas-frequências [35], [61].

Por exemplo, na formulação básica do filtro inverso, a PSF tem uma limitação de banda, ou seja, para altas-frequências em que o denominador de  $G(w_x, w_y, w_z) / H(w_x, w_y, w_z)$  é próximo de zero e o método do filtro inverso sofre uma ampliação considerável de ruído [47]. Este problema pode ser resolvido truncando o filtro inverso, equação (eq. 11).

$$\hat{f}(x, y, z) = \begin{cases} F^{-1} \left\{ \frac{G(w_x, w_y, w_z)}{H(w_x, w_y, w_z)} \right\} & \text{se } |H(w_x, w_y, w_z)| \geq \varepsilon \\ 0 & \text{se } |H(w_x, w_y, w_z)| \leq \varepsilon \end{cases} \quad \text{eq. 11}$$

Onde  $\varepsilon$  representa uma constante positiva baixa e  $F^{-1}$  a inversa da transformada de Fourier [47].

Para cada pilha de imagens 3D, deve estudar-se a eliminação da contribuição da ampliação de ruído em função da redução dos níveis de contraste, através da variação do parâmetro de corte de elevadas frequências [35].

Estes métodos lineares não iterativos são deste modo de processamento rápido, tendo sido Agard, em 1989, o primeiro a aplicá-los em microscopia óptica [23].

Em alguns filtros que operam segundo o critério de minimização da média quadrática do erro entre a imagem original e a estimativa restaurada, é assumindo que a imagem adquirida é distorcida por adição de ruído Gaussiano, como por exemplo no filtro de Wiener. A aplicação de filtros clássicos de convolução, como o filtro Wiener e de Tikhonov podem ser descritos da seguinte forma matricial:  $\hat{f} = Wg$ , sendo  $W$  o filtro linear de restauro. Deste modo  $\hat{f}$  é o resultado da convolução do filtro de Wiener pela imagem adquirida ( $g$ ) [27].

Os filtros dos erros quadráticos mínimos assumem que a imagem é distorcida pelo modelo descrito pela eq. 9 ( $g(x, y, z) = f(x, y, z) \otimes h(x, y, z)$ ), cuja forma vector-matricial pode ser descrita segundo a eq. 12. Onde  $H$  é a matriz que caracteriza o “blurring”, i.e. a amostragem da PSF,  $g$  é a forma matricial da imagem 3D adquirida, e  $f$  a forma matricial do objecto discreto [47].

$$g = H \cdot f \quad \text{eq. 12}$$

Tendo por base a equação matricial eq. 12, a solução dada pelos mínimos quadráticos pode ser descrita segundo a eq. 13. Onde  $\hat{f}$  é a estimativa matricial da imagem tridimensional após a operação de desconvolução [47].

$$\hat{f} = (H^T H)^{-1} H^T \cdot g \quad \text{eq. 13}$$

Deste modo, os filtros dos erros quadráticos mínimos, através da minimização da média quadrática do erro, propõem um método de restauro da imagem, baseado na minimização da diferença entre a média quadrática do erro da imagem adquirida e da estimativa desfocada do objecto original. No entanto, esta minimização directa produz resultados contraproducentes, no sentido em que não tem em conta os componentes de elevada frequência para os quais a convolução com a PSF ( $H$ ) assume valores nulos. Encontrar uma estimativa de  $\hat{f}$ , é conhecido por ser um problema de formulação difícil (por falta

conhecimento correcto de alguns parâmetros). No entanto, existem critérios de ajuste da média erro do quadrático caracterizados por estabelecer parâmetros limite que penalizam soluções de  $\hat{f}$  que oscilam descontroladamente, devido a componentes espectrais dominadas pelo ruído. Um exemplo, deste tipo de aplicação surge na solução regularizada de  $\hat{f}$  conhecida como função de *Tikhonov* [27].

Os filtros de *Wiener*, de *Tikhonov* e segundo o critério do erro quadrático mínimo não restauram frequências da imagem original além do limite de banda da PSF. Estes métodos lineares têm a desvantagem de poder estimar intensidades negativas na imagem desconvoluída e serem muito sensíveis a erros da PSF usada na estimativa, provocando artefactos de anéis na imagem tridimensional desconvoluída [47]. Estes artefactos podem confundir as análises quantitativas e qualitativas do restauro obtido [35].

Tendo em conta a aplicação efectiva, nos resultados deste trabalho, dos filtros de *Wiener* e segundo o critério do erro quadrático mínimo, estes vão ser descritos com maior detalhe nas duas secções seguintes (3.1.1.1 e 3.1.1.2). Estes dois métodos lineares, por serem não iterativos têm um tempo de processamento computacional significativamente mais rápido do que no caso das aplicações iterativas [23].

### 3.1.1.1. Filtro de Wiener

O principal objectivo do *filtro de Wiener* é filtrar o ruído que corrompe o sinal, baseado numa abordagem estatística. Na desconvolução de *Wiener* trabalha-se no domínio da frequência, com o propósito de minimizar o impacto do ruído desconvoluído para frequências com uma fraca razão de sinal/ruído.

Num sistema linear e invariante com sinal de entrada  $f(t)$ , resposta impulsional conhecida  $h(t)$ ,  $v(t)$  um ruído desconhecido, independente de do sinal de entrada,  $f(t)$ , e o sinal observado  $g(t)$ . O sinal observado  $g(t)$  pode ser traduzido pela equação (eq. 14), [14].

$$g(t) = h(t) * f(t) + v(t) \quad \text{eq. 14}$$

O objectivo, do método desconvolutivo  $\hat{f}(t) = w(t) * g(t)$  é determinar  $w(t)$  para estimar  $f(t)$ , de modo a minimizar os desvios médios quadráticos. O filtro de Wiener que fornece  $w(t)$  é mais facilmente descrito no domínio das frequências, equação (eq. 15).

$$W(f) = \frac{H(f) * F(f)}{|H(f)|^2 F(f) + N(f)} \quad \text{eq. 15}$$

Onde  $W(f)$  e  $H(f)$  são respectivamente as transformadas de Fourier de  $w$  e  $h$ , para a frequência  $f$ .  $F(f)$  e  $N(f)$  são as potências médias da densidade espectral respectivamente do sinal de entrada  $f(t)$  e do ruído  $v(t)$ .

A formulação de Wiener pode deste modo ser reescrita pela equação (eq. 16).

$$W(f) = \frac{1}{H(f)} \left[ \frac{|H(f)|^2}{|H(f)|^2 + \frac{N(f)}{F(f)}} \right] = \frac{1}{H(f)} \left[ \frac{|H(f)|^2}{|H(f)|^2 + \frac{1}{SNR(f)}} \right] \quad \text{eq. 16}$$

Onde,  $1/H(f)$  é o inverso da resposta impulsional do sistema de formação de imagem, e  $SNR(f)$  a razão sinal/ruído. Quando o ruído é nulo (i.e.  $SNR$  infinito), o termo dentro de parêntesis rectos é 1, o que implica que o filtro de Wiener se comporte como um simples filtro inverso. No entanto, à medida que o ruído para certas frequências aumenta, a razão sinal/ruído diminui, implicando um decréscimo do termo entre parêntesis. Isto significa, que o filtro de Wiener atenua frequências em função do comportamento espectral da relação sinal/ruído [14].

A equação (eq. 16) requer um conhecimento espectral do conteúdo típico da imagem, e também do ruído. Frequentemente, não se tem acesso a essas quantidades exactas, mas podem ser feitas estimativas aproximadas da razão sinal ruído, através do cálculo da razão entre a potência espectral do ruído e do sinal, respectivamente  $P_n/P_f$  [14], [39].

No processo de desconvolução com o filtro de Wiener o algoritmo devolve a imagem desconvoluída assumindo que a imagem  $I$  é criada pela convolução da imagem real com a  $PSF$  e por uma possível adição de ruído. O algoritmo otimizado no sentido dos desvios quadráticos mínimos entre a imagens estimada e real utiliza também uma correlação de

matrizes entre a imagem e ruído. Deste modo, na ausência de ruído o filtro de Wiener é reduzido a um filtro inverso ideal [31], como descrito atrás. Como se trata de um filtro linear, o filtro de Wiener não consegue restaurar informação para além da largura de banda da PSF [27].

A função, da *toolbox* de processamento de imagem do *Matlab*, usada para efectuar o restauro da imagem através o filtro Wiener, foi a *deconvwnr*, traduzida pela expressão (func. 1).

$$J = \text{DECONVWNR}(I, \text{PSF}, \text{NSR}) \quad \text{func. 1}$$

Onde  $J$  é a imagem desconvoluída da imagem real  $I$ , com a  $\text{PSF}$ , assumindo uma taxa da razão sinal ruído ( $\text{NSR}$  - “noise to signal ratio”), [32]. Dada a dificuldade de conhecer a quantidade  $\text{NSR}$  [39], foi efectuada uma estimativa do seu valor, através do quadrado do sinal máximo de intensidade e o quadrado da variância do sinal de fundo. Deste modo testaram-se experimentalmente valores de  $\text{NSR}$  compreendidos entre o intervalo de  $1/[10$  e  $200]$ , para os diferentes testes efectuados, método descrito na secção 4.3.3 - *Avaliação dos resultados experimentais*.

### 3.1.1.2 Filtro óptimo segundo o critério do erro quadrático mínimo

No filtro optimizado segundo o critério do erro quadrático mínimo (também denominado “regularized filter”), o algoritmo aplica uma restrição optimizada dos erros dos desvios quadráticos mínimos entre a imagem estimada e a real sob a condição de preservar a *suavização* (“smooth”) da imagem [31]. Esta abordagem, também designada por “regularized inverse filter”, pode ser descrita por uma estimativa estatística caracterizada pela atribuição de restrições relativas às possíveis estimativas do objecto [61]. Como por exemplo, restrições relativas ao “smooth” permitem ao algoritmo seleccionar uma estimativa razoável dentro do elevado número de possíveis estimativas associadas à variabilidade de ruído [61].

O restauro da imagem usando o “regularized filter”, foi efectuado com a função *deconvreg* da *toolbox* de processamento de imagem do *Matlab*, descrita pela expressão (func. 2).

$$J = DECONVREG(I, PSF) \quad \text{func. 2}$$

A imagem  $I$  é desconvoluída pelo algoritmo “regularized filter” que devolve a imagem desconvoluída  $J$ . Esta abordagem assume que a imagem  $I$  resulta da convolução da imagem real com uma  $PSF$ , e por possível adição de ruído. No sentido de melhorar o restauro, é introduzido o parâmetro suplementar, opcional, relativo à adição de ruído (NP-“additive noise power”). Experimentalmente testaram-se valores de  $NP$  compreendidos entre 10 e 100, para os diferentes testes efectuados. Deste modo os parâmetros de entrada para a função reescrevem-se segundo a expressão (func. 3).

$$J = DECONVREG(I, PSF, NP) \quad \text{func. 3}$$

Deste modo a principal diferença entre a aplicação do filtro de Wiener e o “regularized filter” no método de desconvolução prende-se ao facto de no primeiro caso (filtro de Wiener) ser aplicado quando características de frequência e o ruído da imagem são conhecidos, pelo menos em determinado grau. O “regularized filter” é usado quando a informação conhecida relativamente ao ruído da imagem é ainda mais limitada.

Este método pode ser descrito pela equação (eq. 13) apresentada atrás na secção 3.1. - *Algoritmos de desconvolução*.

### 3.1.2. Métodos iterativos

Os métodos iterativos comuns com aplicação de restrições começam por efectuar uma estimativa inicial do objecto, que normalmente é a própria imagem real. Esta estimativa é convoluída com a  $PSF$  e a imagem desfocada resultante comparada com a imagem real. O resultado desta comparação é empregue para definir um critério que representa o grau de similaridade entre a imagem desfocada e a imagem real, frequentemente referida como “figura de mérito”. Este critério é então utilizado para alterar a estimativa, de modo a que o ruído seja reduzido. O processo é repetido, para um número determinado de iterações, até o critério de erro ser minimizado ou atingir um limite predefinido. A imagem restaurada final é o objecto estimado na última iteração [61].



Uma restrição frequentemente empregue é a suavização (“smoothing”) ou regularização. À medida que são processadas as várias iterações o ruído tem tendência a ser amplificado, por isso a maioria das implementações suprimem-no por suavização ou filtros de regularização (segundo o critério do erro quadrático mínimo) [61].

Outra restrição, comum, é a imposição de que a intensidade da imagem seja positiva, de modo a que quando o valor de um píxel estimado é negativo, durante o processo de iteração, este é automaticamente estabelecido como nulo. Esta imposição é importante, tendo em conta que os valores dos píxeis podem frequentemente tornar-se negativos por aplicação das transformadas de Fourier e operações de subtracção no algoritmo [61]. Geralmente, este compromisso de positividade conduz a imagens desconvoluídas de qualidade superior, por providenciar informação adicional que ajuda o método de desconvolução a determinar as diferenças entre “in-focus”, “out-of-focus” e ruído [35]. Outros tipos de restrições incluem condições limite na saturação da intensidade dos píxeis, restrições na estatística do ruído e outras restrições estatísticas [61].

Estes algoritmos iterativos não lineares tentam resolver as limitações das abordagens não iterativas, em troca de um aumento considerável da complexidade computacional [27].

Os métodos iterativos com restrições (como por exemplo: Janson-van Cittert; Critério não linear segundo o erro quadrático mínimo e Algoritmo de Tikhonov-Miller) não são procedimentos de passo único, como no caso dos métodos lineares. Em vez disso, possuem operações que são repetidas várias vezes à medida que a solução do problema é gradualmente melhorada. Estes métodos iterativos convergem para uma solução a partir de um determinado número de iterações. O tempo dispendido no processamento depende na quantidade de iterações que são necessárias para a convergência, bem como tempo necessário para processar cada iteração [23], [35]. Por exemplo, para o método iterativo de duas restrições, o número de iterações requeridas varia entre 10 e 200 e o tempo computacional por iteração é correspondente ao do processamento de duas transformadas de Fourier tridimensionais rápidas [35].

A maioria destes algoritmos baseia-se na hipótese de que a função geral de distorção se deve ao ruído e pode ser modelada considerando a adição de ruído Gaussiano. No entanto, estes métodos não possuem uma estratégia directa de redução de ruído.

Por outro lado, em processamentos estatísticos, com aplicação das necessárias restrições físicas, é possível a eliminação da luz “out-of-focus” e do ruído aleatório, melhorando significativamente a performance da desconvolução [47]. Estes algoritmos utilizam um critério de erro aditivo ou multiplicativo, para actualizar a estimativa do objecto em cada iteração [61]. Alguns exemplos destes processamentos estatísticos são os métodos: Verosimilhança máxima (“maximum likelihood”), Probabilidade máxima à posteriori (“maximum a posteriori probability”) e Imposição de verosimilhança máxima (“maximum penalized likelihood.”) [35].

Os algoritmos estatísticos requerem um processamento computacional mais intenso do que os métodos clássicos, podendo demorar significativamente mais tempo até atingir uma solução. No entanto, estas aplicações permitem um restauro de qualidade superior. Estes algoritmos também têm a vantagem de impor restrições à estatística de ruído esperada, por distribuições de Poisson ou Gaussianas [61]. Como consequência caracterizam o ruído de forma mais subtil do que nos métodos de regularização, podendo produzir melhores resultados em imagens com ruído [47]. A escolha de uma estatística apropriada de ruído depende, no entanto, das condições de aquisição de imagem [61].

Adicionalmente aos métodos de imposição de positividade, os métodos estatísticos de restauro de imagem fornecem informação adicional ao método de desconvolução, procurando restaurar as degradações introduzidas não apenas pela óptica mas também pelo ruído. Como é de esperar, estes métodos são especialmente valiosos para amostras cuja intensidade do sinal é fraca e com um ruído significativo na imagem [35].

Estes métodos iterativos estatísticos necessitam tipicamente de mais iterações do que os métodos iterativos comuns com restrições, cerca de 100 a 3000 iterações. O tempo despendido por iteração é aproximadamente duas vezes superior ao dos métodos iterativos comuns com restrições. Assim estes métodos despendem, frequentemente, várias horas para processar satisfatoriamente a imagem. Apesar deste tempo de processamento tão elevado estes métodos mostram-se de qualidade significativamente superior para muitas amostras [35].

Uma metodologia alternativa de abordar o problema de desconvolução tridimensional de amostras heterogéneas, nas quais é possível modelar diferentes PSF para diferentes porções

da pilha 3D de imagens da amostra, consiste na aplicação de operações de desconvolução por partições, ou seja, diferentes secções da pilha 3D são desconvoluídas com diferentes PSFs. A imagem final restaurada é constituída pela concatenação destas diferentes desconvoluções [26]. Neste sentido é necessário um mapeamento correcto do índice de refração da amostra, e modelação das aberrações por análise dos desvios dos feixes de luz, para uma caracterização correcta das diferentes PSFs, permitindo deste modo, efectuar uma desconvolução espacialmente invariante de sub-volumes da pilha 3D de imagens digitais da amostra, com as diferentes PSFs [26].

Em função da aplicação efectiva, nos resultados deste trabalho, dos algoritmos de Richardson-Lucy e de desconvolução cega, estes vão ser descritos com maior detalhe nas secções seguintes (3.1.2.1 e 3.1.2.2).

### **3.1.2.1 Método de Richardson-Lucy (RL)**

O método de **Richardson-Lucy (RL)** é um método iterativo que determina uma solução de verosimilhança máxima (“maximum likelihood”), através do algoritmo de maximização da *esperança* matemática (“Expectation Maximization” - EM), quando a imagem adquirida é distorcida por ruído de Poisson [27]. Este algoritmo foi introduzido independentemente por Richardson (em 1972) e Lucy (em 1974). O algoritmo conjugado é descoberto em Dempster, por Laird et al. (em 1977). Este método foi primeiro aplicado por Shepp e Vardi (1982) em tomografia de emissão, que conduziu a um algoritmo equivalente ao RL. Em 1988, foi introduzido por Holmes na microscopia de fluorescência [55].

Em contraste com outros algoritmos, Richardson-Lucy não deriva do modelo de formação de imagem que assume adição de ruído Gaussiano. Em vez disso, a função geral de ruído de distorção é assumida como sendo dominada pelo ruído de Poisson [27], [28]. Sendo portanto um ruído de média proporcional ao sinal.

Este algoritmo iterativo pertence ao grupo dos métodos estatísticos, nos quais as medidas das imagens podem ser corrompidas por dois tipos de ruído, intrínseco e extrínseco. O ruído intrínseco obedece ao modelo de Poisson. Introduzido quando o processo aleatório associado à probabilidade dum determinado fóton ser contado num dado píxel pela CCD

obedece à distribuição de Poisson, i.e. processo de Poisson. Sabendo que na CCD se definem as acumulações de carga eléctrica decorrentes do número de fotões que atingem uma região definida como píxel. Em adição, outras fontes introduzem ruído aleatório extrínseco caracterizado por várias estatísticas, (ex.: Poisson, Gaussianas, uniformes, etc.), durante o processo de aquisição de imagem [47].

A maioria dos sistemas microscópicos usa como detector de imagem um dispositivo de carga acoplada (CCD), que resulta na produção de numa pequena taxa de ruído extrínseco. Apesar da estatística de Poisson providenciar um modelo realista do ruído estatístico, em algumas aplicações é assumido um modelo de adição de ruído Gaussiano, para simplificar a computação numérica [47]. Estes dois modelos de ruído são descritos de forma simplificada em seguida.

No *modelo de Poisson*, a natureza quântica da luz é modelada segundo Poisson, quer no sinal emitido pelo objecto quer no “background” do sinal, equação (eq. 17).

$$o g(x, y, z) = P(o [f(x, y, z) \otimes h(x, y, z)]) + P(o [b(x, y, z)]), \quad x, y, z \in R \quad \text{eq. 17}$$

Onde  $o$  é o recíproco do factor de conversão do fotão,  $o g(x, y, z)$  o número de fotões medidos pelo detector,  $P$  o processo de Poisson, e  $b(x, y, z)$  o sinal de “background” [47].

O *modelo Gaussiano* de ruído pode ser caracterizado pela equação (eq. 18).

$$g(x, y, z) = f(x, y, z) \otimes h(x, y, z) + w(x, y, z), \quad x, y, z \in R \quad \text{eq. 18}$$

Onde o  $w(x, y, z)$  é o ruído Gaussiano aditivo. O termo de “background” não é modelado na abordagem Gaussiana, tendo em conta que este pode ser estimado e removido da imagem adquirida antes de iniciar a operação de desconvolução [47].

Sob uma razão sinal ruído baixa, o modelo de adição de ruído Gaussiano fornece uma descrição frágil do sistema de formação de imagem em relação ao modelo de Poisson. Os casos com uma razão sinal ruído elevada podem ser traduzidos pela aplicação do teorema de limite central para um vasto número de medições, onde o modelo de adição de ruído

Gaussiano é satisfatório. Tem, no entanto, vindo a ser afirmado na literatura, que o desempenho da desconvolução com o modelo de ruído Gaussiano é inferior do que com o modelo físico de ruído de Poisson. Estes estudos são, no entanto, principalmente direccionados para sistemas de Fluorescência, onde é ainda assumido que o modelo de ruído de Poisson conduz a uma convergência mais rápida da função do objecto [47].

Tendo em conta que o algoritmo de *Richardson-Lucy* (RL) é um algoritmo iterativo que determina a solução de verosimilhança máxima (ML – “Maximum Likelihood”), quando a imagem adquirida é distorcida por ruído de Poisson [27], [55]. Para obter a estimativa ML de  $f(x, y, z)$ , é maximizada a função de verosimilhança (“likelihood”) para o modelo de aquisição de imagem de Poisson, segundo a equação (eq. 19).

$$J(f) = \sum_x \sum_y \sum_z \left\{ g(x, y, z) \log [ f(x, y, z) \otimes h(x, y, z) + b(x, y, z) ] - \right. \\ \left. - (f(x, y, z) \otimes h(x, y, z)) \right\} \quad \text{eq. 19}$$

Para aplicar a estimativa clássica de ML, ambos os termos  $h(x, y, z)$  e  $f(x, y, z)$  tem que se apresentar na forma paramétrica. Quando  $h(x, y, z)$  é conhecido e  $b(x, y, z)$  omitido, é aplicada uma procura iterativa baseada no gradiente que maximiza  $J(f)$ , conduzindo ao algoritmo apresentado na equação (eq. 20).

$$\hat{f}_{i+1}(x, y, z) = \left\{ \left[ \frac{g(x, y, z)}{\hat{f}_i(x, y, z) \otimes h(x, y, z)} \right] - \otimes h(-x, -y, -z) \right\} \times \hat{f}_i(x, y, z) \quad \text{eq. 20}$$

Onde  $\hat{f}_i(\cdot)$  é a estimativa do objecto para a iteração número  $i$  [47].

É de notar que o algoritmo standard de EM, não inclui regularização, sendo o ruído limitado apenas pelo facto de manter a média total da intensidade constante e os valores nulos a zero. Um problema do método de ML é gerado por uma falta de informação de  $f(x)$ , em particular para frequências correspondentes a valores baixos da função óptica de transferência (“Optical Transfer Function” – OTF) da PSF, ou seja a transformada de Fourier da PSF. Uma solução reside no uso de informação determinística adicional na  $f(x, \text{restrições})$  ou na forma de propriedades estatísticas de  $f(x)$ . Estes podem ser os métodos Bayesianos de regularização [55]. Outra abordagem é proposta por Conchello,

pela derivação de um algoritmo que incorpora a regularização de Tikhonov no algoritmo de RL, de forma a suprir soluções indesejáveis [27].

Tal como nos métodos anteriores (*deconvnr* e *deconvreg*), o algoritmo RL devolve a imagem desconvoluída assumindo, que a imagem  $I$  é criada pela convolução do objecto real com a  $PSF$  e por uma possível adição de ruído. O algoritmo é baseado na aplicação de ML, que processa a imagem  $J$ , assumindo que a imagem adquirida  $I$  está sob a estatística de Poisson [31].

A função, da *toolbox* de processamento de imagem do *Matlab*, usada para efectuar o restauro da imagem através do método de RL, foi *deconvlucy*, é descrita pela expressão func. 4.

$$J = DECONVLUCY(I, PSF, NUMIT) \quad \text{func. 4}$$

Onde  $J$  é a imagem desconvoluída da imagem real  $I$ , com a  $PSF$ , e o número de iterações ( $NUMIT$ ) definido para o processo de desconvolução. Experimentalmente testaram-se entre 10 e 5000 iterações, para os diferentes testes efectuados.

### 3.1.2.2. Método de desconvolução cega

Independentemente da eficácia dos métodos já descritos, a utilização de uma  $PSF$  imprecisa nos métodos de desconvolução irá reproduzir-se negativamente nos resultados da imagem desconvoluída. Contudo, uma determinação realmente precisa da  $PSF$  é praticamente impossível para qualquer situação real de formação de imagem, isto porque, é sempre introduzido ruído nas medições da  $PSF$  [25]. Tendo em consideração o facto adicional de que uma  $PSF$  não é caracterizada por um ponto de luz sob uma lamela, mas deveria ser antes representada por um ponto de luz dentro da amostra. Mesmo que seja usada uma  $PSF$  teórica, esta não consegue ter em consideração a presença de subtis aberrações do sistema óptico. Deste modo a  $PSF$  é virtualmente impossível de medir e é com alguma dificuldade estimada teoricamente [35], [55].

Na sequência destas problemáticas foi formulada uma abordagem em que a PSF é vista como desconhecida pelo problema de desconvolução, designada de desconvolução cega [35].

O algoritmo foi desenvolvido por alteração do procedimento de estimativa do método de verosimilhança máxima, para que não apenas o objecto mas também a PSF seja estimada durante a operação de desconvolução [39], [61]. Neste processo, o algoritmo produz uma estimativa simultânea da PSF,  $h(x)$  e de  $f(x)$  (objecto real), a partir dos dados de  $g(x)$  (imagem adquirida), e assumindo uma PSF inicial teórica calculada a partir de parâmetros do sistema óptico de aquisição de imagem [23]. A estimativa desfocada resultante de cada iteração é comparada com a imagem real, e é processada uma correcção, aplicada para gerar uma nova estimativa. Esta mesma correcção é também aplicada à PSF, gerando uma nova estimativa da PSF. Ao longo das várias iterações a PSF e objecto são actualizados em conjunto pelo algoritmo [23], [61].

Procurando garantir que o método de desconvolução não se encontre restringido a uma PSF imprecisa, o algoritmo de desconvolução cega visa conseguir uma determinação, mais precisa, da imagem original. Este método tem, no entanto, como desafio adicional o facto da informação total fornecida para o processo de desconvolução ser menor [35]. Para colmatar esta falta de informação, o algoritmo incorpora duas propriedades importantes, o facto da PSF ser sempre positiva, e a função óptica nunca nula, para uma região bem definida do domínio das frequências espaciais [55]. Acredita-se, ainda, que a informação da PSF se encontra confinada nos dados adquiridos, pois frequentemente se identificam espalhamentos de luz provenientes de pequenos pontos da amostra, espalhamentos, estes, usados pelo algoritmo na criação da PSF estimada [23]. A desconvolução cega foi primeiro introduzida por Ayers e Dainty, fora da microscopia óptica, e introduzida na microscopia óptica por T. Holmes (1992) [23].

Existe ainda uma nova abordagem, mais exigente, de parametrização da PSF na desconvolução cega, na qual são introduzidos parâmetros restritivos na PSF, que limitam a sua convergência com o decorrer do processamento iterativo do algoritmo [55].

O método de desconvolução cega (BD – “Blind Deconvolution”) baseado no algoritmo de RL (Richardson-Lucy, descrito na equação, eq. 20) segundo o modelo de ruído de Poisson [47], pode deste modo descrito da pela equação (eq. 21).

$$\hat{h}_{i+1}^k(x, y, z) = \left\{ \left[ \frac{g(x, y, z)}{\hat{h}_i^k(x, y, z) \otimes \hat{f}^{k-1}(x, y, z)} \right] - \otimes \hat{f}^{k-1}(-x, -y, -z) \right\} \times \hat{h}_i^k(x, y, z) \quad \text{eq. 21}$$

$$\hat{f}_{i+1}^k(x, y, z) = \left\{ \left[ \frac{g(x, y, z)}{\hat{f}_i^k(x, y, z) \otimes \hat{h}^{k-1}(x, y, z)} \right] - \otimes \hat{h}^{k-1}(-x, -y, -z) \right\} \times \hat{f}_i^k(x, y, z)$$

Onde a iteração  $k$  é assumida como sendo aquela em que a PSF conhecida é referente à iteração  $(k-1)$ . O objecto  $\hat{f}_i^k(x, y, z)$  é então calculado para um número específico de iterações de RL, segundo (eq. 21), onde o índice  $i$  representa a iteração de RL. A PSF  $\hat{h}_i^k(x, y, z)$  é deste modo calculada para o mesmo número de iterações de RL. Este algoritmo satisfaz automaticamente *a priori* as restrições no domínio da imagem (i.e.: positividade, conservação da energia e restrições de suporte) enquanto converge para a para a solução de ML [47].

Numa tentativa de reduzir a elevada sensibilidade do algoritmo RL ao ruído, as medidas de elevadas frequências (i.e.: potencialmente amplificadoras de ruído, em função dos métodos de desconvolução se comportarem como filtros “passa-alto”) do objecto podem ser suprimidas por convolução da imagem adquirida com uma função Gaussiana. Esta operação de pré-convolução que provoca uma suavização no algoritmo RL pode ser posteriormente compensada pela convolução da PSF com a mesma função Gaussiana [47].

Deste modo, no método de desconvolução cega a imagem  $I$  é desconvoluída pela aplicação de ML, que devolve a imagem desconvoluída  $J$ , e a função da resposta impulsional restaurada,  $PSF$ . Como parâmetros de entrada é necessário introduzir a matriz desfocada  $I$ , e PSF de partida ( $INIPSF$ ) [31]. A função, da *toolbox* de processamento de imagem do *Matlab*, usada para efectuar o restauro da imagem pela desconvolução cega, foi *deconvblind*, traduzida pela expressão (func. 5).

$$[J, PSF] = DECONVBLIND(I, INIPSF, NUMIT) \quad \text{func. 5}$$



Experimentalmente testaram-se entre 5 e 1000 iterações, para os diferentes testes efectuados.

### **3.2. Interpretação de imagens desconvoluídas**

Um obstáculo associado ao restauro de imagens é a dificuldade em avaliar o grau de recuperação/restauro conseguido com algoritmos de desconvolução. Deste modo, é necessário adquirir uma capacidade de medição do ganho de resolução que garanta um elevado grau de confiança na imagem restaurada em comparação com a inicialmente adquirida. Permitindo determinar qual o melhor restauro possível em função do respectivo algoritmo de desconvolução [36].

A principal dificuldade consiste no facto da única informação disponível corresponder à imagem degradada (desfocada e com ruído) e ao conhecimento da PSF, apenas aproximada, do sistema de aquisição de imagem. Torna-se, desta forma evidente, a impossibilidade de medir a qualidade do restauro proposto, a menos que seja conhecido *a priori* a solução, o que raramente acontece. Até a data, a única forma de contornar a questão foi desenvolver experiências em imagens desfocadas com modelos conhecidos. Através do estudo destes modelos artificiais, tornou-se possível otimizar parâmetros, como por exemplo o número de iterações [36].

Contudo, para adquirir completa confiança na imagem restaurada, é vital estar atento ao tipo de artefactos que podem surgir e o que pode ser feito para melhorá-los, ou quando tal não é possível, saber como ignorá-los [35]. Os artefactos podem ser caracterizados, tendo em conta uma série de eventos.

1) Um defeito muito comum é o aparecimento alternado de listas claras e escuras em cortes XZ ou YZ da imagem desconvoluída. Este artefacto pode advir de flutuações na fonte de luz de excitação que não se encontra completamente corrigida. Estas flutuações que corrompem os dados da imagem adquirida, são frequentemente ampliadas pela desconvolução [35], [58]. As listas verticais, também podem aparecer por falta de aquisição de luz “out-of-focus” acima e abaixo da região de interesse. Idealmente é

desejável a aquisição da máxima quantidade de luz “out-of-focus” possível, de forma a fornecer a maior quantidade de informação para a desconvolução [35].

As linhas verticais, também podem ser interpretadas pela variação de resposta dos píxeis individuais. Cada píxel tem um ganho e *offset*, ligeiramente diferente dos seus vizinhos. Frequentemente, este mesmo píxel desvia-se sistematicamente dos vizinhos numa pilha de imagens, conduzindo à formação da linha vertical. O problema pode ser corrigido por especialização de rotinas que procurem estes píxeis erróneos e os substituam pelo valor médio entre os vizinhos mais próximos [58].

2) Outros padrões periódicos podem surgir com a desconvolução, principalmente, em métodos lineares. Caracterizados por artefactos em forma de anel que surgem em torno de objectos claros, tomando a forma de anéis claros concêntricos à volta do objecto brilhante. Estes padrões podem ser dissipados, em determinado grau, por alteração dos parâmetros de afinação do método de desconvolução, mas se possível, outro método deve ser usado para tentar eliminar este artefacto [35], [58].

3) Outro defeito, comum, surge em imagens desconvoluídas com a aplicação de PSFs incompatíveis. Manifesta-se, tipicamente, como uma assimetria dos objectos dentro da imagem de desconvolução, quando visualizada segundo cortes verticais, esta assimetria exhibe normalmente mais luz “out-of-focus” que emana do topo ou do fundo da imagem. Isto ocorre geralmente, porque a PSF não tem em conta, as condições específicas de formação de imagem da amostra, particularmente se as regiões de interesse da amostra se encontram a uma determinada profundidade e o índice de refacção do meio de imersão e da amostra não for compatível [35], [57]. O uso de uma objectiva de imersão em água pode atenuar este problema, pois em alguns casos, a diferença de índice de refacção entre a água e a amostra é menor do que entre a amostra e o óleo [35].



## 4. Resultados

Este capítulo está dividido em três secções principais, a primeira referente aos testes de fluorescência, realizados com o propósito de modelar o sistema óptico de formação de imagem e caracterizar a resposta impulsional, a segunda referente aos modelos sintéticos e a última relativa à aplicação dos métodos de desconvolução em amostras biológicas.

Os modelos sintéticos constituíram a abordagem alternativa à primeira modelação, cuja irreprodutibilidade de resultados e incapacidade de formulação de modelos matemáticos exactos do sistema de formação de imagem, por falta de conhecimento de parâmetros característicos dos componentes ópticos, impediu a sua aplicação. Optou-se, deste modo, por sintetizar PSFs (de parâmetros variáveis), que conduzissem no processo de desconvolução, a uma optimização máxima da resolução de contraste em profundidade na pilha 3D de imagens digitalizadas das amostras biológicas. Os testes efectuados em amostras biológicas foram por esta razão precedidos pelos testes sintéticos.

### 4.1. Testes de Fluorescência

Nessa fase procedeu-se à aquisição de imagens digitalizadas de microesferas de poliestireno de diferentes diâmetros na gama das unidades de micrometro ( 0.1, 0.5 e 4.0)  $\mu\text{m}$  para análise microscópica em profundidade. As microesferas de diâmetro 0.5 e 0.1  $\mu\text{m}$  foram usadas na tentativa de caracterização experimental da resposta impulsional do sistema óptico, a designada PSF experimental.

O comportamento da intensidade de emissão de fluorescência das microesferas foi caracterizado através da análise do perfil horizontal, que atravessa o centro da microesfera, para os vários planos bidimensionais x-y adquiridos ao longo o eixo vertical. Aproximando este perfil a uma curva de *Gauss* verificou-se experimentalmente em testes consecutivos, obtidos com um passo de varrimento em Z de 0.1  $\mu\text{m}$ , desvios significativos no plano axial de maior intensidade na matriz tridimensional total da amostragem, *Figura 20*.

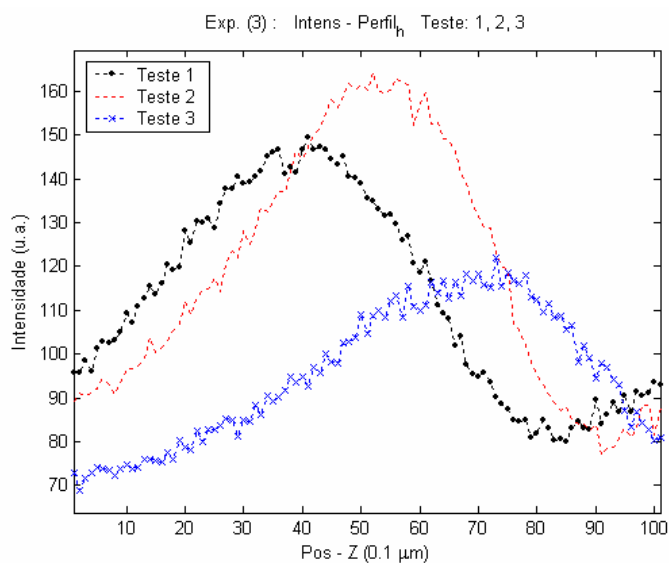


Figura 20: Gráficos dos valores de intensidade máxima das Gaussianas, correspondentes ao perfil horizontal da microesfera (4 μm de diâmetro) de 101 imagens adquiridas segundo o eixo vertical (z), respectivamente para os testes 1, 2, 3, realizados com intervalos de tempo de aproximadamente 2h. Estes testes foram realizados no microscópio de fluorescência, com a objectiva de 63x e AN=1.2, tendo como fonte uma lâmpada de HbO, um filtro de excitação de 380 nm, e o λ de emissão de 580 nm, correspondente a um dos picos de emissão característico das microesferas analisadas.

Em função da dificuldade de produzir resultados reproduzíveis com sistema de aquisição de imagens em microscopia de fluorescência e à redução significativa da taxa de emissão das microesferas de fluorescência existentes no laboratório, os resultados obtidos mostram demasiadas incoerências para poderem ser usados.

## 4.2. Modelos sintéticos

Da incapacidade de formular modelos matemáticos exactos do sistema de formação de imagem surgiu a solução alternativa de sintetizar PSFs (de parâmetros variáveis) tendo por base modelos teóricos conhecidos, como o de Gibson e Lani, apoiado na difracção clássica [35], [47]. Para testar o comportamento dessas PSFs teóricas foram também sintetizadas quatro matrizes tridimensionais (M1, M2, M3 e M4), caracterizando situações padrão de estruturas dispostas em diferentes planos de focagem numa amostra. Recorreu-se

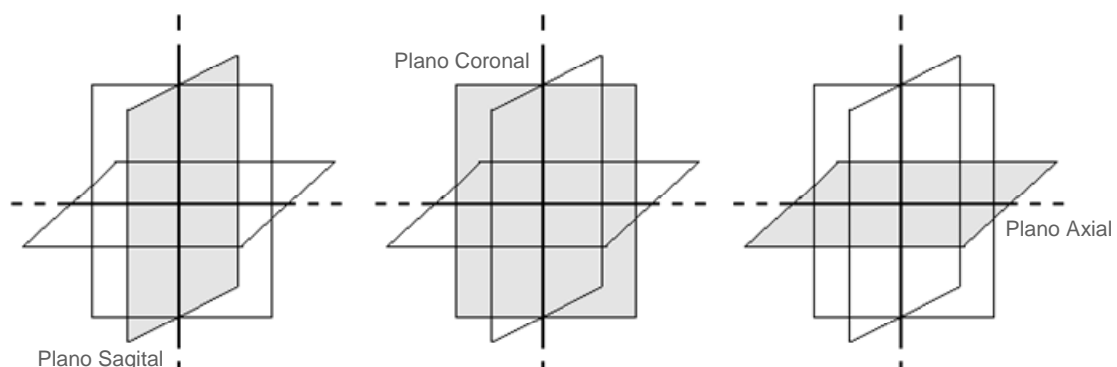
geometricamente a esferas para caracterizar essas estruturas por se tratar de um objecto tridimensional perfeitamente simétrico e matematicamente fácil de analisar.

As matrizes M1, M2 e M3 representam diferentes modelos, nos quais se varia a posição das esferas dentro da matriz 3D e o raio das mesmas, por forma a abranger um grupo de testes mais vasto que permita uma melhor caracterização do comportamento dos diferentes algoritmos de desconvolução e PSFs sintéticas. Na matriz M4 o diâmetro das esferas e disposição das mesmas procurar mimetizar uma possível situação padrão das amostras biológicas observadas experimentalmente, assumindo-se como raio das esferas um valor próximo do esperado nas estruturas presentes nas células analisadas.

O modelo relativo à contribuição “out-of-focus” do sistema de aquisição da imagem foi introduzido nos diferentes objectos tridimensionais *M1*, *M2*, *M3* e *M4*, por *convolução* destes com as diferentes PSFs sintéticas.

Matematicamente a convolução foi efectuada por transformadas de Fourier discretas (DFT-“Discret Fourier Transform”), computacionalmente efectuadas com o algoritmo de transformada de Fourier rápida multi-dimensional. A função de *Matlab* usada foi a *fftn* [32]. No apêndice B são apresentadas figuras do resultado da convolução das várias matrizes 3D com as diferentes PSFs sintéticas, *Figura(B) 1* à *Figura(B) 4*, págs. 117 - 119.

Para melhor identificar os vários planos na matriz tridimensional é apresentado na *Figura 21* um diagrama com a denominação dos diferentes planos analisados nas pilhas tridimensionais.

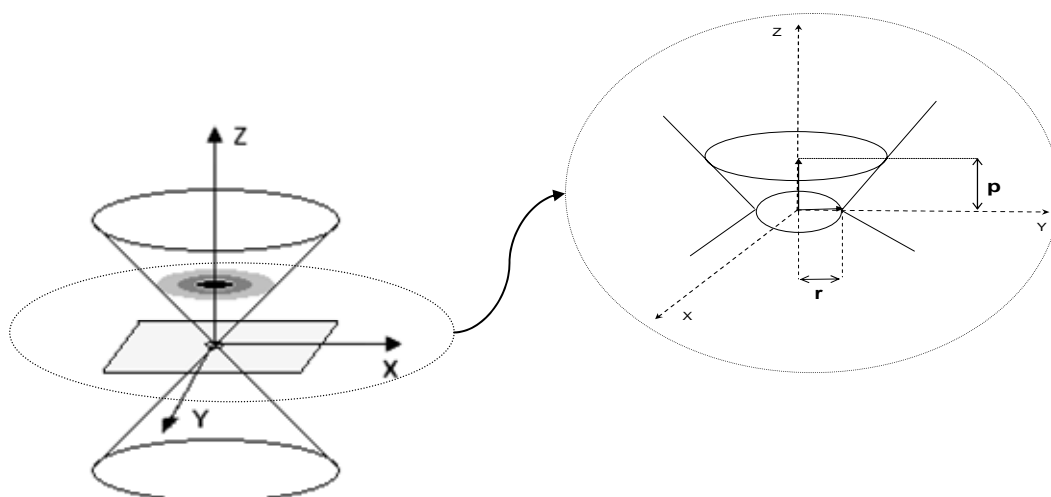


**Figura 21:** Diagrama esquemático com a nomenclatura atribuída aos diferentes planos tridimensionais: Plano Sagital (XZ), Plano Coronal (YZ) e Plano Axial (XY).

### 4.2.1. PSFs sintéticas

O modelo usado para sintetizar a PSF visa descrevê-la como um ponto de luz centrado em  $Z$ , que se vai tornando mais difuso à medida que ao longo do eixo óptico se afasta do plano central segundo  $Z$ , apresentando segundo o plano sagital e coronal a forma de “X” [35], [49], também designada de duplo cone. Com o objectivo de reproduzir as condições de aquisição de imagem do microscópio óptico de transmissão normalizou-se para um valor constante a intensidade de cada plano focal de  $XY$ , plano axial, [35].

Foram testadas seis PSFs, com dois parâmetros variáveis, o raio do ponto de luz central,  $r$ , e o passo,  $p$ , segundo  $Z$ , que influencia a abertura dos cones espelhados da PSF. Este efeito pode ser mais facilmente visualizado através do diagrama da *Figura 22*.



**Figura 22:** Diagrama ilustrativo do modelo usado para o cálculo da PSF sintética. Onde  $r$  corresponde ao raio do ponto de luz central, e  $p$  ao passo segundo  $Z$ .

Os parâmetros  $r$  e  $p$  atribuídos também podem ser assumidos como o ângulo arcotangente de  $(p/r)$ . No entanto os resultados apresentados seguem a primeira nomenclatura atribuída de  $r$  e  $p$ .

Inicialmente testou-se uma PSF de  $p = 1.2$  px e  $r = 5$  px, nomeada **P5sint**, que mais se aproximava do diâmetro das microesferas laboratorialmente usadas na caracterização experimental da PSF empírica. No entanto, tendo em consideração que a PSF é

caracterizada por um ponto de luz infinitamente pequeno, optou-se, na fase seguinte, por sintetizar PSF's de raio inferior, igual a 1 px, variando apenas o passo,  $p$ . Para cálculos com o mesmo valor de  $r$ , a “abertura” da PSF torna-se mais evidente com o aumento valor de  $p$ .

Os parâmetros das diferentes PSFs estão descritos da *Tabela 2*:

**Tabela 2** – Tabela de parâmetros variáveis das diferentes PSFs teóricas calculadas.

PSF sintética	r (px)	p (passo segundo Z)
P1 sint	1	0.5
P2 sint	1	0.1
P3 sint	1	0.01
P4 sint	1	0.001
P5 sint	5	1.2
P6 sint	1	6

O modelo da PSF teórica foi baseado nos cálculos descritos em seguida, equações (eq. 22).

Raio das *Gaussianas* 2D para os  $\neq_s$  planos axiais:

$$R(z) = \begin{cases} R_{1..Cz} = [(Cz * p + r - p), \dots, r] & ; \Delta R_{1..Cz} = -p \\ R_{Cz+1,.., Nz} = [(r + p), \dots, (Cz * p + r - p)] & ; \Delta R_{Cz+1,.., Nz} = +p \end{cases}$$

Matriz 3D das *Gaussianas* 2D ao longo do eixo dos ZZ:

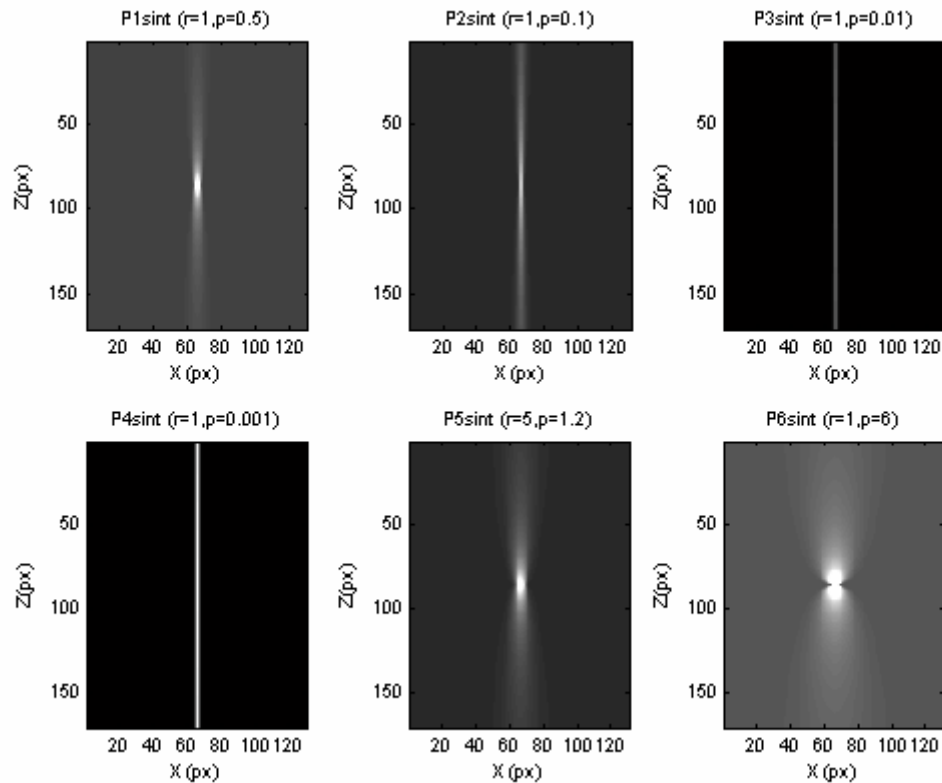
$$G_{XY}(z) = \exp \left[ - \left( \frac{(x - Cx)^2}{R(z)} \right) + \left( \frac{(y - Cy)^2}{R(z)} \right) \right] ;$$

$$PSF_{x,y,z} = G_{XY}(z) \times \left\{ \frac{I_{\max}(G_{XY})}{\sum G_{XY}(z)} \right\} \text{Factor que garante o valor constante do integral nos planos axiais} \quad \text{eq. 22}$$



Onde  $C_x$ ,  $C_y$  e  $C_z$  correspondem às posições centrais relativas aos eixos  $x$ ,  $y$  e  $z$  da matriz 3D total. Todas as matrizes 3D foram normalizadas para valores de intensidade compreendidos entre [0 e 1].

As imagens referentes aos planos sagitais das diferentes PSFs sintéticas são apresentadas na *Figura 23*.

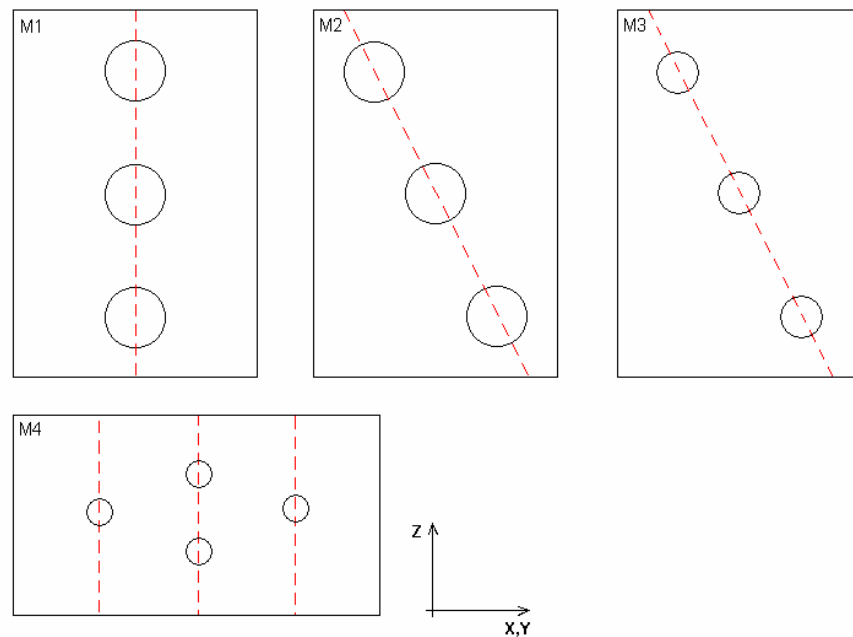


**Figura 23:** Planos sagitais das diferentes PSFs teóricas, [ P (1, 2, 3, 4, 5, 6) sint ] e respectivos parâmetros (indicados nos títulos de cada imagem).

#### 4.2.2. Matrizes 3D sintéticas

As matrizes 3D sintetizadas são respectivamente  $M1$ ,  $M2$ ,  $M3$  e  $M4$ . A matriz  $M1$ , é composta por três esferas, de raio 20 px, centradas em diferentes planos de  $Z$  e alinhadas segundo  $XY$ . A matriz  $M2$  e  $M3$ , é constituída por três esferas centradas em diferentes planos de  $Z$ , e com centros de diferentes coordenadas segundo  $XY$ , dispostas diagonalmente segundo  $Z$ , o raio das esferas é de 20 px para a matriz  $M2$  e de 10 px para

*M3*. A matriz *M4* apresenta quatro esferas de raio 6 px dispostas em diferentes planos de *Z*, segundo o diagrama da *Figura 24*. O tamanho das matrizes tridimensionais criadas é de ( $N_x=61$ ,  $N_y=61$ ,  $N_z=101$ ) respectivamente para as matrizes *M1*, *M2* e *M3* e de ( $N_x=101$ ,  $N_y=101$ ,  $N_z=51$ ) para a matriz *M4*. Um diagrama representativo destes objectos sintéticos é apresentado na *Figura 24*.



**Figura 24:** Diagrama esquemático do plano vertical XZ da matriz *M1* ( $r = 20\text{px}$ ); *M2* ( $r = 20\text{px}$ ); *M3* ( $r = 10\text{px}$ ); e *M4* ( $r = 6\text{px}$ ). O tamanho das matrizes 3D é respectivamente ( $N_x=61$ ,  $N_y=61$ ,  $N_z=101$ ) px para as matrizes *M1*, *M2*, *M3*, e ( $N_x=101$ ,  $N_y=101$ ,  $N_z=51$ ) px para *M4*.

As equações que estão na base dos cálculos das matrizes 3D de *M1*, *M2*, *M3* e *M4*, e as respectivas posições são descritas em seguida, equações (eq. 23; eq. 24; eq. 25).

**M1:**

$N_x, N_y, N_z$ : dimensões da matriz 3D & posições centrais:  $C_x, C_y, C_z$ .

$M1$ :  $r = 20$ ;

$N_x = 61$ ;             $N_y = 61$ ;             $N_z = 101$ ;

$C_x = 31$ ;             $C_y = 31$ ;             $C_z = 51$ ;

Posição dos centros das esferas:

$C_{x_1} = C_x$ ;             $C_{x_2} = C_x$ ;             $C_{x_3} = C_x$ ;

$C_{y_1} = C_y$ ;             $C_{y_2} = C_y$ ;             $C_{y_3} = C_y$ ;

$C_{z_1} = C_z - 30$ ;     $C_{z_2} = C_z$ ;             $C_{z_3} = C_z + 30$ ;

$$\text{Esferas: } E_1 = \exp \left[ - \left( \frac{(x - C_x)^2}{r} + \frac{(y - C_y)^2}{r} + \frac{(z - C_{z_1})^2}{r} \right) \right];$$

$$E_2 \rightarrow C_{z_2} \quad \& \quad E_3 \rightarrow C_{z_3} \quad \text{eq. 23}$$

Matriz 3D final:  $M = E_1 + E_2 + E_3$ ;

**M2 & M3:**

$N_x, N_y, N_z$ : dimensões da matriz 3D & posições centrais:  $C_x, C_y, C_z$ .

$M2$ :  $r = 20$ ;             $M3$ :  $r = 10$ ;

$N_x = 61$ ;             $N_y = 61$ ;             $N_z = 101$ ;

$C_x = 31$ ;             $C_y = 31$ ;             $C_z = 51$ ;

Posição dos centros das esferas:

$C_{x_1} = C_x - 10$ ;     $C_{x_2} = C_x$ ;             $C_{x_3} = C_x + 10$ ;

$C_{y_1} = C_y - 10$ ;     $C_{y_2} = C_y$ ;             $C_{y_3} = C_y + 10$ ;

$C_{z_1} = C_z - 30$ ;     $C_{z_2} = C_z$ ;             $C_{z_3} = C_z + 30$ ;

Esferas:

$$E_1 = \exp \left[ - \left( \frac{(x - C_{x_1})^2}{r} + \frac{(y - C_{y_1})^2}{r} + \frac{(z - C_{z_1})^2}{r} \right) \right];$$

$$E_2 \rightarrow (C_{x_2}, C_{y_2}, C_{z_2}) \quad \& \quad E_3 \rightarrow (C_{x_3}, C_{y_3}, C_{z_3}) \quad \text{eq. 24}$$

Matriz 3D final:  $M = E_1 + E_2 + E_3$ ;

**M4:**

$N_x, N_y, N_z$ : dimensões da matriz 3D & posições centrais:  $C_x, C_y, C_z$ .

$M4$ :  $r = 6$ ;

$N_x = 101$ ;             $N_y = 101$ ;             $N_z = 51$ ;

$C_x = 51$ ;             $C_y = 51$ ;             $C_z = 26$ ;

Posição dos centros das esferas:

$C_{x_1} = C_x$ ;             $C_{x_2} = C_x$ ;             $C_{x_3} = C_x$ ;             $C_{x_4} = C_x$ ;

$C_{y_1} = C_y - 25$ ;       $C_{y_2} = C_y$ ;             $C_{y_3} = C_y + 25$ ;       $C_{y_4} = C_y$ ;

$C_{z_1} = C_z$ ;             $C_{z_2} = C_z - 6$ ;       $C_{z_3} = C_z$ ;             $C_{z_4} = C_z + 6$ ;

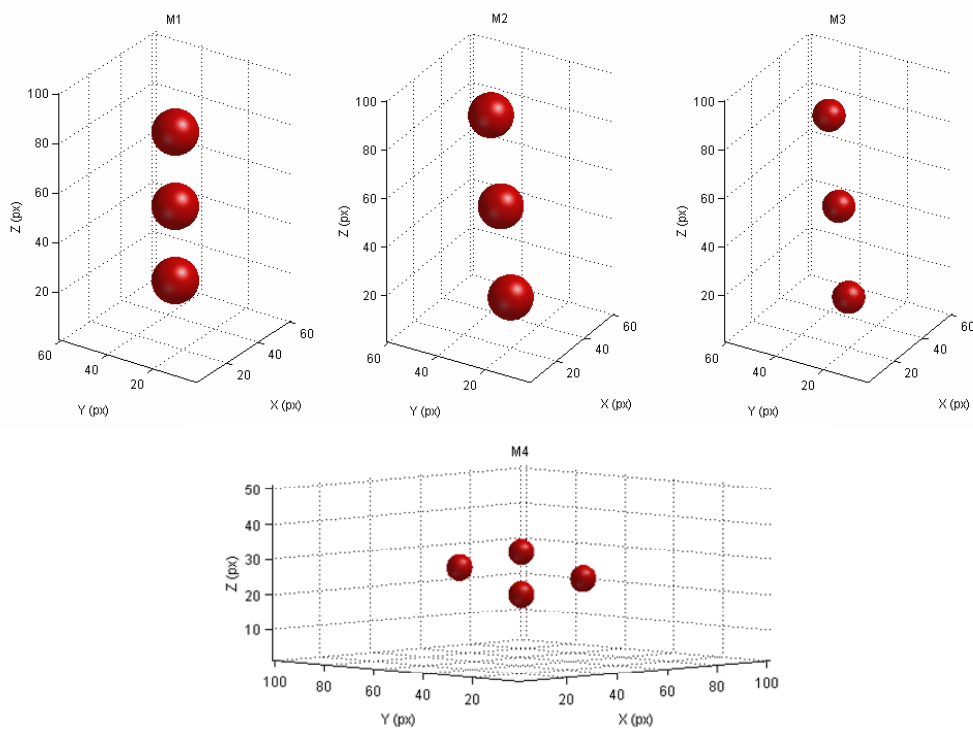
Esferas:

$$E_1 = \exp\left[-\left(\frac{(x-C_x)^2}{r} + \frac{(y-C_x)^2}{r} + \frac{(z-C_x)^2}{r}\right)\right]; \quad \text{eq. 25}$$

$E_2 \rightarrow (C_{x_2}, C_{y_2}, C_{z_2})$  &  $E_3 \rightarrow (C_{x_3}, C_{y_3}, C_{z_3})$  &  $E_4 \rightarrow (C_{x_4}, C_{y_4}, C_{z_4})$

Matriz 3D final:  $M = E_1 + E_2 + E_3 + E_4$ ;

Na *Figura 25* são apresentados os plots 3D das respectivas matrizes M1, M2, M3, M4.



**Figura 25:** Plot tridimensional das diferentes matrizes sintéticas, respectivamente M1, M2, M3 e M4.

### 4.2.3. Avaliação dos resultados experimentais

Numa primeira avaliação genérica pode-se diferir que quanto maior é a abertura do cone que descreve da PSF, mais rápida é a convergência da desconvolução nas diferentes soluções possíveis, pois a capacidade da resposta impulsional distinguir estruturas a diferentes profundidades segundo  $Z$  é superior do que, por exemplo, considerando uma PSF de cone muito fechado, que por esta razão não consegue aferir discriminação vertical em  $Z$ , considerando a imagem igual em todos os planos axiais.

#### 4.2.3.1. Algoritmo de desconvolução RL

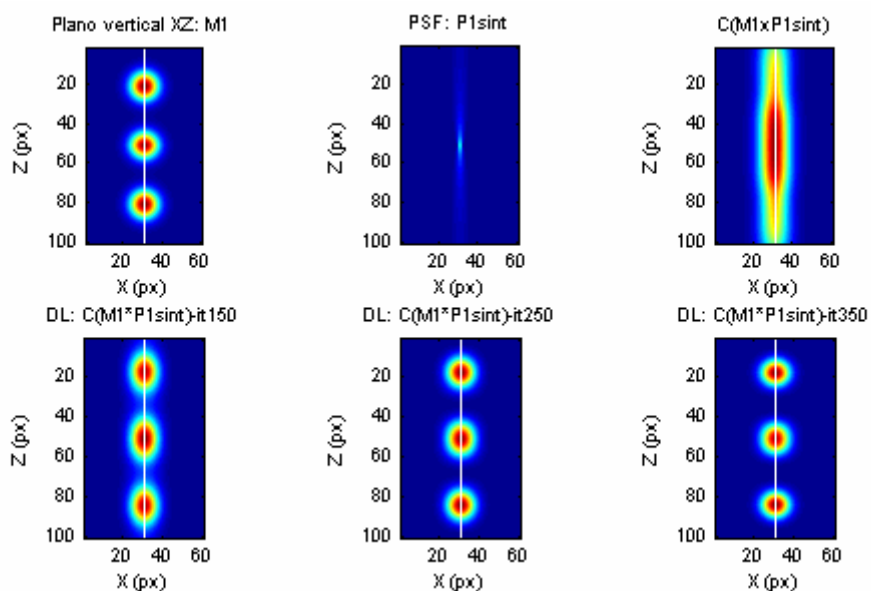
Usando no algoritmo de desconvolução uma PSF mais “estrita”, como a P2sint, o número de iterações necessárias para atingir uma convergência otimizada, na matriz  $M1$ , ronda as 1500 iterações, enquanto que para uma PSF mais aberta, como a P1sint, a convergência óptima ocorre para aproximadamente 350 iterações.

No caso de uma PSF com o cone muito fechado como a PSF teórica P3sint e P4sint verifica-se uma convergência muito lenta, chegando a ser impraticável, ou nunca convergindo para solução esperada, o que se verificou no caso na matriz  $M1$ , com as três esferas alinhadas. Como a abrangência da PSF era menor, neste caso, o algoritmo não conseguiu obter discriminação vertical.

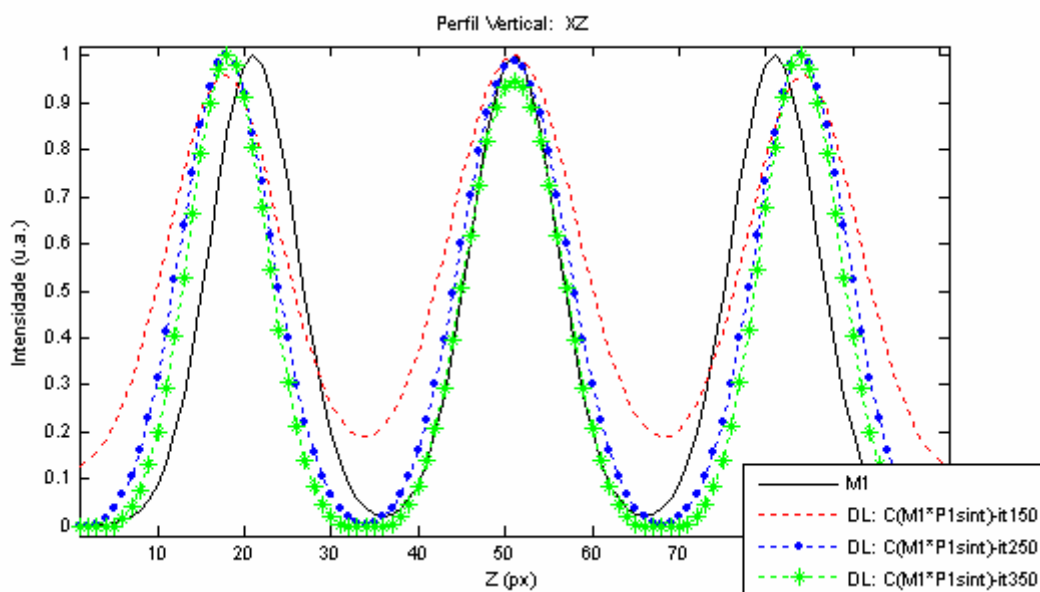
O raio das esferas e a sua posição nas matrizes 3D influencia de forma relevante o resultado da desconvolução, verificando-se no caso da matriz  $M2$ , em que as esferas laterais não se encontram dispostas simetricamente com o eixo óptico, que a partir de um determinado número de iterações o resultado converge num maior número de soluções, criando esferas virtuais inexistentes, com uma disposição simétrica na matriz desconvoluída.

Neste sentido, dada a simetria da matriz  $M1$ , a desconvolução converge para uma única solução possível, aproximando-se com o aumento do número de iterações na desconvolução da matriz original. Obtém-se, deste modo, na desconvolução com o algoritmo RL, da matriz  $M1$ , de  $\text{Conv}(M1*P1\text{sint})$  e  $\text{Conv}(M1*P2\text{sint})$ , resultados

otimizados, muito próximos da matriz 3D original para um número de iterações compreendido entre 250 e 350 para a PSF P1sint e entre 1000 e 1500 para a PSF P2sint. Uma figura ilustrativa dos resultados obtidos com a PSF sintética P1sint é apresentada na *Figura 26* e *Figura 27*.

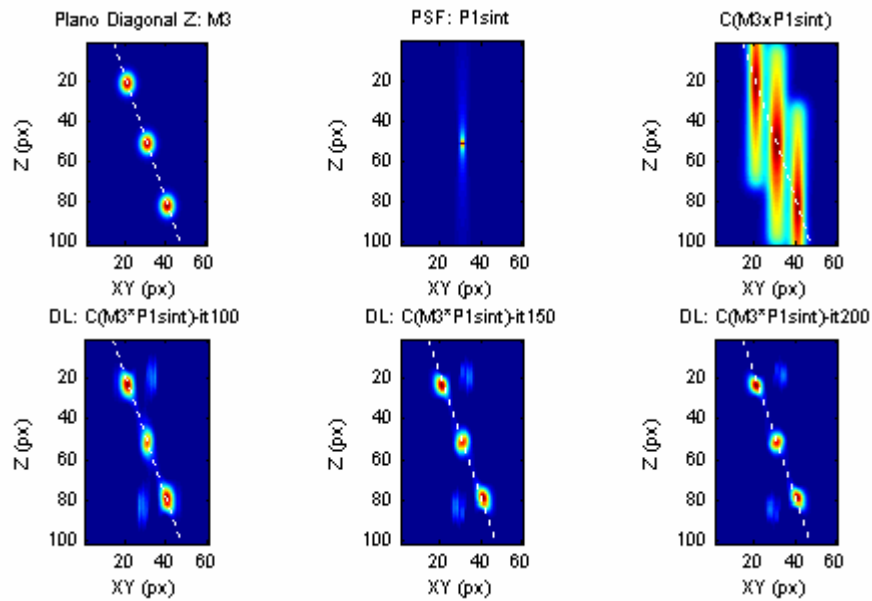


**Figura 26:** Representação dos planos sagitais da matriz M1, da PSF P1sint e da convolução de  $M1*P1sint$ ,  $Conv(M1*P1sint)$ , respectivamente nas figuras, na primeira linha, da esquerda para a direita. As figuras, na segunda linha da esquerda para a direita, correspondem aos planos sagitais da matriz de desconvolução, com o algoritmo RL, de  $Conv(M1*P1sint)$ , e a PSF P1sint, respectivamente para os diferentes números de iterações 150, 250 e 350.

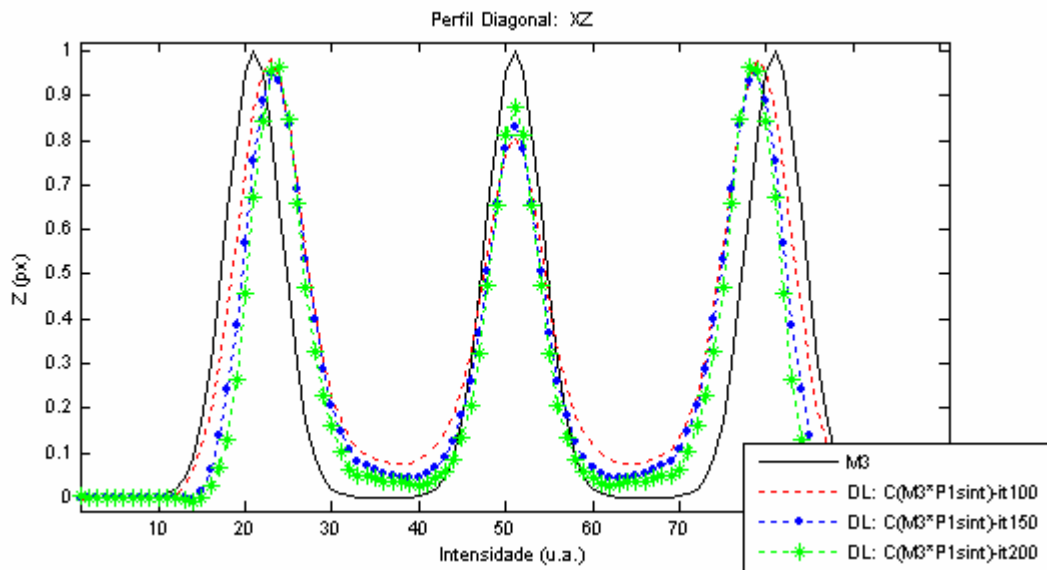


**Figura 27:** Gráfico da variação de intensidade dos perfis verticais da matriz  $M1$ , e da matriz de desconvolução com algoritmo RL de  $\text{Conv}(M1*P1sint)$  com a PSF  $P1sint$ , para os diferentes números de iterações, 150, 250, 350,  $\{\text{DeconvLucy}(\text{Conv}(M1*P1sint), P1sint, \text{it} = 150; 250; 350)\}$ . O perfil vertical passa nas coordenadas x-y do centro das esferas de  $M1$ , respectivamente  $C_{XY} = (31, 31)$ .

Entre as matrizes  $M2$  e  $M3$ , em que a disposição das esferas não é simétrica, aplicando as PSFs  $P1sint$  e  $P5sint$ , obtém-se uma convergência bem mais próxima do resultado original na matriz  $M3$ , devido ao facto do diâmetro das respectivas esferas ser inferior, o que leva a que a contribuição das esferas adjacentes no processo de convolução seja menor, traduzindo-se posteriormente num restauro da imagem mais eficaz. Ou seja, no processo de convolução resulta uma menor contribuição de desfocagem por introdução de “out-of-focus” das esferas adjacentes, originando no processo de desconvolução num número menor de soluções possíveis, exemplo ilustrativo apresentado na *Figura 28* e *Figura 29*.



**Figura 28:** Legenda análoga à da **Figura 26**, respectivamente para a matriz  $M3$  e PSF  $P1sint$ , e número de iterações no algoritmo RL de 100, 150, 200.

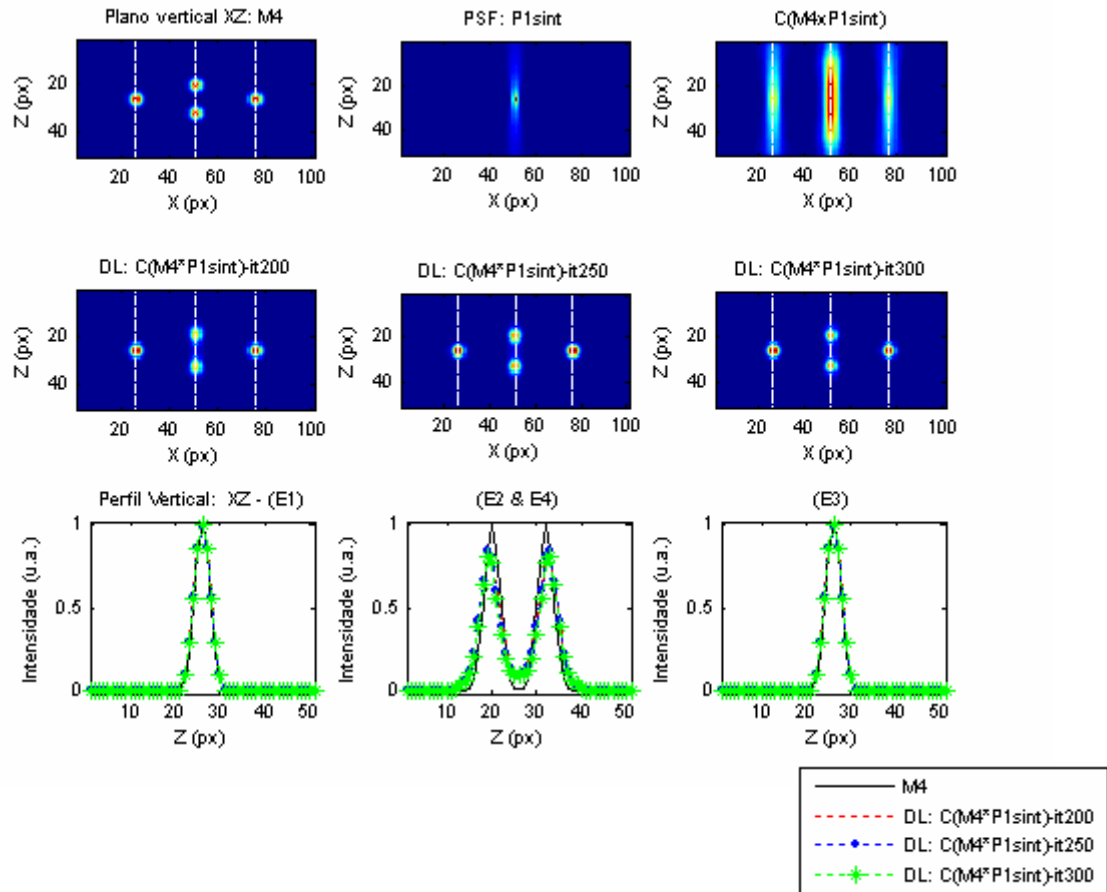


**Figura 29:** Gráfico da variação de intensidade dos perfis diagonais, (que passam no centro das três esferas), da matriz  $M3$ , e da desconvolução com algoritmo RL de  $Conv(M3*P1sint)$  com a PSF  $P1sint$ , para os diferentes números de iterações, 100, 150, 200, {DeconvLucy ( $Conv(M3*P1sint)$ ,  $P1sint$ ,  $it = 100; 150; 200$ )}.

Na matriz  $M4$ , composta por esferas de diâmetro inferior (12 px) verifica-se na desconvolução com o algoritmo RL, um melhor resultado quando é aplicada a PSF  $P1sint$ ,



obtendo-se uma convergência otimizada com o objecto original para um número de iterações compreendido entre 200 e 300, *Figura 30*.



**Figura 30:** Representação dos planos sagittais da matriz  $M4$ , da PSF  $P1sint$ , e da convolução de  $M4$  com a PSF  $P1sint$ ,  $Conv(M4*P1sint)$ , respectivamente as figuras na primeira linha da esquerda para a direita. As figuras na segunda linha, da esquerda para a direita, correspondem aos planos sagittais da matriz desconvolução de  $Conv(M4*P1sint)$ , com a PSF  $P1sint$ , respectivamente para os diferentes números de iteração 200, 250 e 300. Na última linha estão representados as variações de intensidade dos perfis verticais, (que passam no centro das diferentes esferas,  $E1$ ;  $E2$  &  $E4$ ; e  $E3$ ), da matriz  $M4$ , e da matriz de desconvolução com algoritmo RL, para os diferentes números de iterações aplicados {DeconvLucy ( $Conv(M4*P1sint)$ ,  $P1sint$ ,  $it = 200; 250; 300$ )}.

Os melhores resultados obtidos com o algoritmo de desconvolução RL ocorreram com as PSFs teóricas  $P1sint$  e  $P2sint$ , verificando-se, contudo, que a posição das esferas laterais sofre um deslocamento segundo  $Z$ , afastando-se do plano central na desconvolução de  $M1$ ,

e aproximando-se do plano central na desconvolução de  $M2$ , respectivamente exemplificado na *Figura 27* e *Figura 29*.

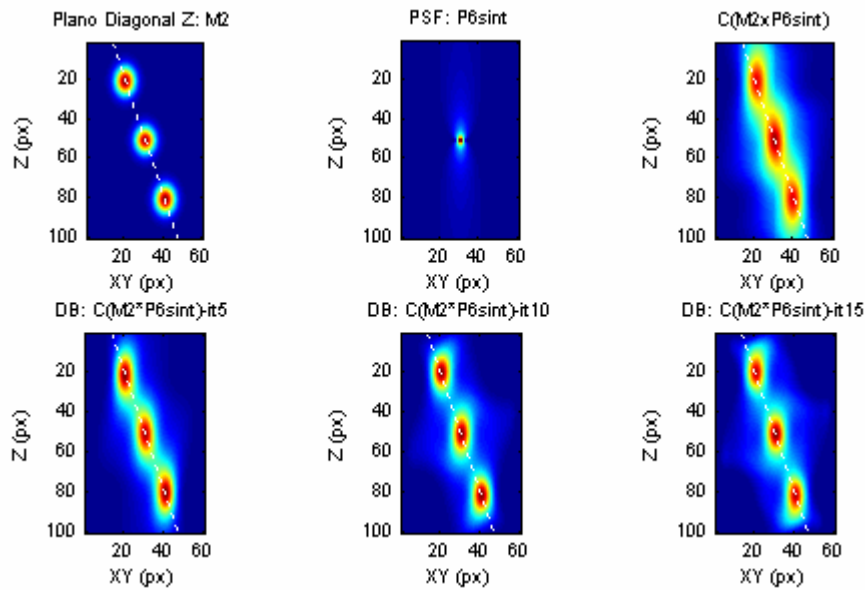
#### **4.2.3.2. Algoritmo de desconvolução cega**

Usando o algoritmo de desconvolução cega, no qual se assume como PSF inicial, as diferentes PSFs teóricas  $P(1..6)_{\text{ sint}}$ , todas as matrizes desconvoluídas apresentaram vários artefactos. Com o aumento do número de iterações e consoante o número de soluções possíveis, a PSF é alterada de forma a convergir para essas soluções, aumentando, deste modo o número de soluções possíveis com o incremento de iterações. A PSF restaurada pelo algoritmo tomou formas muito díspares do comportamento da resposta impulsional esperado, conduzindo desta forma a imagens restauradas muito diferentes do objecto real. No caso da matriz  $M1$  verificou-se uma convergência em várias esferas virtuais alinhadas segundo o eixo óptico e no caso da matriz  $M2$  a esfera central convergiu em duas esferas virtuais dispostas simetricamente na diagonal contrária à da matriz original.

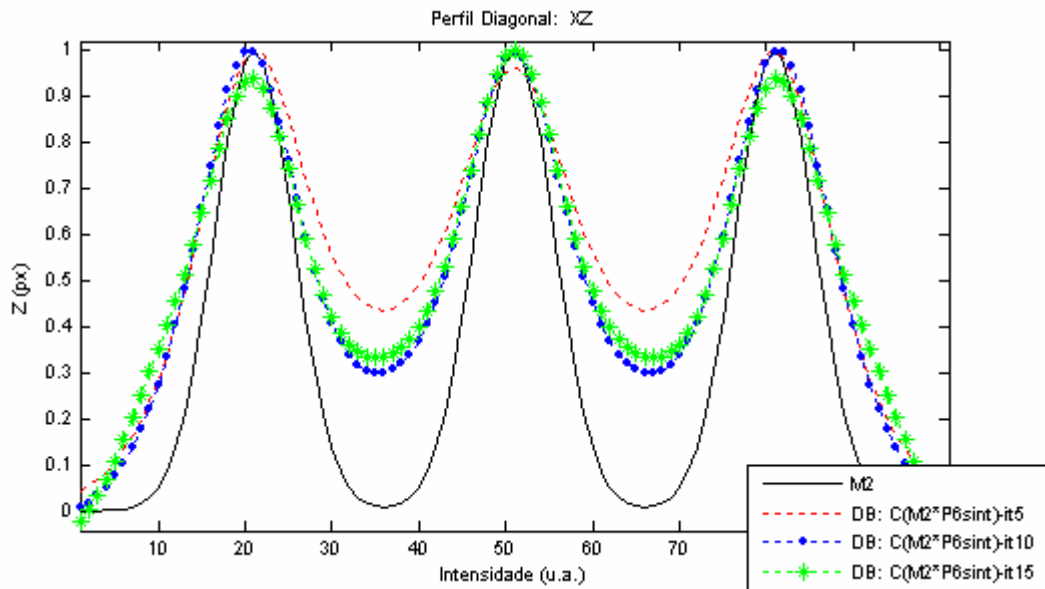
Apesar de se esperar melhores resultados com a aplicação do algoritmo de desconvolução cega, tal não se verificou dada a convergência não controlada da PSF restaurada pelo método de desconvolução e consoante o aumento do número de soluções possíveis. Deste modo o aumento do número de iterações torna o resultado bastante imprevisível, verificando-se na matriz final desconvoluída uma série de artefactos criados matematicamente pelo processo de desconvolução.

Os únicos resultados obtidos com o algoritmo de desconvolução cega que apresentaram resultados mais próximos do objecto real foram conseguidos com a PSF  $P6_{\text{ sint}}$ . Por se tratar de uma PSF com uma taxa de espalhamento (abertura do cone representativo da forma da PSF) muito elevada a intensidade máxima encontra-se fundamentalmente centrada no ponto central de luz, o que leva a que o “blurring” introduzido pela operação de convolução não seja muito significativo. Deste modo, se a imagem “blurred” é relativamente próxima do objecto real, o método de desconvolução converge mais facilmente para esse mesmo objecto real, não se verificando neste caso a criação de artefactos. Estes resultados foram atingidos com um número relativamente reduzido de

iterações, compreendido entre 10 e 30. Um exemplo ilustrativo destes resultados é apresentado na *Figura 31* e *Figura 32*.



**Figura 31:** Legenda correspondente à da *Figura 26*, respectivamente para a matriz M2 e PSF P6sint, utilizando neste caso o algoritmo de desconvolução cega, para 5, 10 e 15 iterações.



**Figura 32:** Legenda análoga à da *Figura 29*, respectivamente para a matriz M2 e PSF P6sint, utilizando neste caso o algoritmo de desconvolução cega, com 5, 10 e 15 iterações.

### 4.2.3.3. Desconvolução com os filtros de Wiener e “regularized filter”

Aplicando os algoritmos de desconvolução não iterativos: filtro de *Wiener* e o filtro ótimo segundo o critério do erro quadrático mínimo, também designado de “*regularized filter*”, apenas se verificou uma convergência em soluções satisfatórias com a aplicação da PSF sintética de maior abertura,  $P6_{\text{sint}}$ . Assumindo como taxas de ruído associadas valores compreendidos entre 20 e 200.

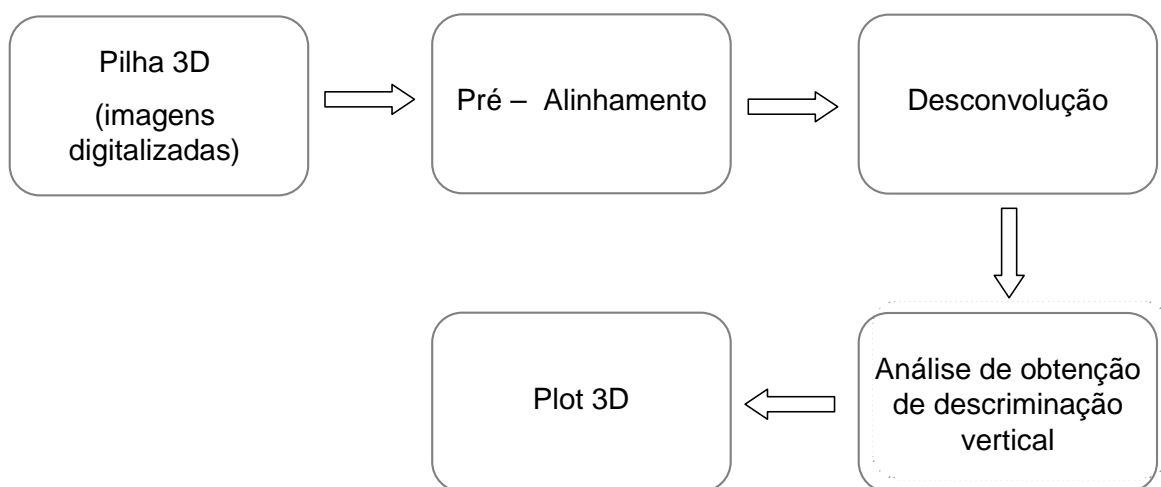
Esta ocorrência deve-se ao facto do resultado da convolução do objecto real ( $M1$ ,  $M2$ ,  $M3$ , e  $M4$ ) com a respectiva PSF  $P6_{\text{sint}}$  ser mais próximo do objecto real, do que a convolução com as restantes PSFs teóricas (Apêndice B: *Figura(B) 1* à *Figura(B) 4*, págs. 117 - 119). Deste modo, para respostas impulsivas do sistema óptico com estas características, torna-se possível a obtenção de restauros satisfatórios com métodos menos poderosos como este tipo de filtros, em comparação com os métodos iterativos mais robustos como o algoritmo RL. Estes métodos lineares não iterativos, não mostram no entanto, resultados viáveis com a aplicação das PSFs teóricas  $P1_{\text{sint}}$ ,  $P2_{\text{sint}}$ ,  $P3_{\text{sint}}$ ,  $P4_{\text{sint}}$  e  $P5_{\text{sint}}$ .

## 4.3. Amostras biológicas

Nos testes realizados em dados biológicos adquiriu-se uma sequência de imagens de esfregaços de sangue com patologia associada, deficiência de P5N. Este distúrbio patológico é caracterizado morfológicamente pelo aparecimento de estruturas sob a forma de pontos dentro do glóbulo vermelho, designado de pontuado basófilo. A estas pilhas tridimensionais de imagens digitalizadas aplicaram-se diferentes métodos desconvolutivos de reconstrução tridimensional, com o propósito de otimizar uma técnica de discriminação vertical que permita uma melhor caracterização morfológica da patologia específica associada às amostras.

Deste modo o enquadramento dos passos seguidos no processo de reconstrução da pilha 3D de imagens da amostra biológica pode ser esquematizado pela *Figura 33*. Na qual a etapa do “Pré-alinhamento” visa corrigir desalinhamentos identificados em imagens de

diferentes planos de profundidade nas pilhas tridimensionais. Este método encontra-se descrito detalhe na secção 4.3.2. - *Alinhamento da pilha 3D*.



**Figura 33:** Diagrama de blocos que descreve as principais etapas efectuadas no processamento das amostras biológicas.

Para melhor compreender as amostras biológicas em análise são apresentadas algumas noções básicas de hematologia especificamente associadas a essas amostras, na secção 4.3.1. - *Algumas noções básicas de hematologia*.

### 4.3.1. Algumas noções básicas de hematologia

A análise de amostras biológicas (esfregaços) vai concentrar-se na observação de glóbulos vermelhos com pontuado basófilo associado, alteração morfológica caracterizada por uma série de estruturas semelhantes a pontos, que se encontram dispersas por toda a célula.

A preparação de filmes de sangue, designados esfregaços, consiste na colocação de uma pequena gota de sangue na linha central da lâmina a cerca de 1 ou 2 cm de uma das extremidades. Em seguida, coloca-se uma lamela (espalhador) sobre a gota com um ângulo de aproximadamente 45% e efectua-se um movimento rápido ao longo da linha de contacto entre o espalhador e a lamina. Um esfregaço hematológico típico é apresentado na *Figura 34*.



**Figura 34:** Esfregaço de sangue.

Um esfregaço em boas condições, tem um comprimento de 3 a 4 cm e uma espessura tal que se verifique uma separação entre os glóbulos vermelhos, sem distorções significativas [10], aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ .

#### **4.3.1.1. Eritrócitos**

Os glóbulos vermelhos, também designados de eritrócitos são células não nucleadas constituídas por hemoglobina (Hb), proteína que possuem em grandes quantidades e que é responsável pelo transporte de oxigénio na circulação arterial, e enzimas responsáveis pela manutenção dos processos celulares básicos, como a produção de energia, o equilíbrio hidroelectrolítico e de oxidação/redução. Estas células vitais do nosso organismo têm uma vida média de 120 dias e são eliminadas e recicladas no baço [22].

A morfologia padrão dos eritrócitos saudáveis é caracterizada por uma variação muito pequena em tamanho e forma. Num esfregaço bem espalhado e seco, a maioria dos glóbulos vermelhos tem contornos arredondados e diâmetros entre 6 e 8.5  $\mu\text{m}$  e uma espessura compreendido entre 1 e 2  $\mu\text{m}$ . No entanto, um elevado número de patologias provoca alterações morfológicas nos eritrócitos, neste trabalho vai ser analisado especificamente o pontuado basófilo [22].

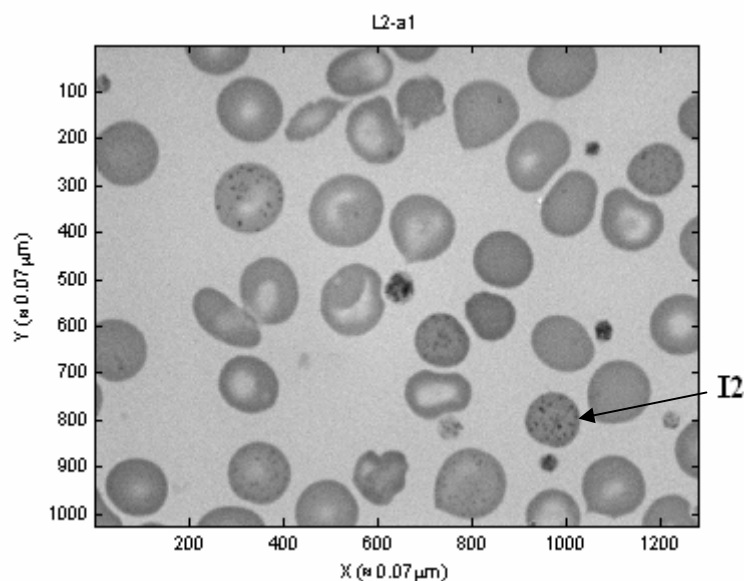
O pontuado basófilo deve-se à precipitação de nucleótidos de ácido ribonucleico (RNA – “ribonucleic acid”) quando estes se acumulam em excesso no citoplasma, verificando-se microscopicamente a existência de numerosos grânulos distribuídos de forma dispersa no interior da célula [20], [42]. O pontuado basófilo está relacionado com distúrbios da eritropoiese, ocorrendo em várias doenças sanguíneas, como por exemplo: talassémia, anemia megaloblástica, infecções e doenças do fígado, envenenamento por chumbo ou outros metais pesados, hemoglobinas instáveis e deficiência de pirimidina 5 nucleotidase [9].



A deficiência da P5N provoca uma anemia hemolítica hereditária autossómica recessiva, caracterizada pela acumulação de altas concentrações de nucleótidos de pirimidina nos eritrócitos e pela existência de pontuado basófilo [42]. Na *Figura 35*, é apresentado um diagrama da actividade da P5N num reticulócito, célula precursora do eritrócito.

A enzima P5N permite que os glóbulos vermelhos libertem nucleótidos de pirimidina indesejáveis, enquanto preservam o valor de nucleótidos de purina. Pensa-se que esta enzima é particularmente importante durante a eritropoiese (processo de formação dos eritrócitos), prevenindo a acumulação de nucleótidos resultantes do colapso de ribossomas e RNA nos reticulócitos. Na diferenciação dos eritroblastos (células precursoras dos eritrócitos) existe uma pequena actividade de *puritina nucleotidase*, que é gradualmente perdida à medida que aumenta a actividade da P5N [9], [38], [42].

Para ilustrar a morfologia do pontuado basófilo é apresentado na *Figura 36*, uma imagem de um esfregaço de sangue que apresenta vários eritrócitos com pontuado basófilo evidente. Esta imagem foi adquirida em microscopia de transmissão.



**Figura 36:** Imagem do plano segundo Z de melhor focagem de um esfregaço de sangue com eritrócitos com pontuado basófilo associado. Esta imagem cobre a área total da câmara CCD (1280×1024) px. A célula assinalada como I2 foi a apresentada nos resultados desta dissertação, para os testes de desconvolução com os diferentes algoritmos.

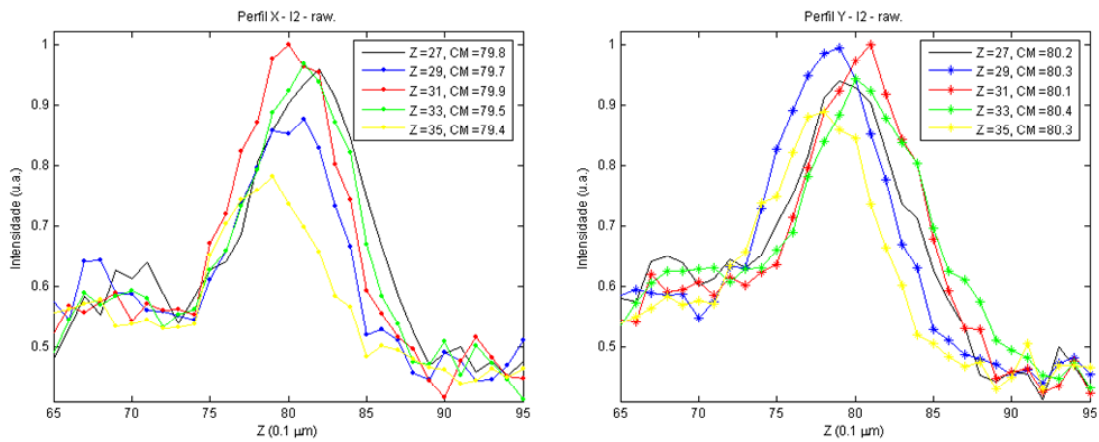


Seleccionou-se a célula I2, assinalada na *Figura 36*, como objecto de estudo para apresentação dos resultados nesta dissertação.

### 4.3.2. Alinhamento da pilha 3D

Tendo em conta que o sistema de aquisição de imagem é sensível ao ponto de oscilações no eixo óptico da ordem de grandeza  $10^{-5}$  graus provocarem um deslocamento de  $0.1\mu\text{m}$  (pormenorizado no sub secção 2.3.7. - *Oscilações do sistema óptico* do segundo capítulo), foi formulado um algoritmo de correcção que visa alinhar os diferentes planos da matriz 3D. Este algoritmo baseia-se numa primeira operação de deslocamento do centro de massa (CM) e uma segunda de ajuste fino por interpolação para uma melhor aproximação do CM.

O desalinhamento das imagens na pilha 3D, devido a estas oscilações, é facilmente identificado pelo deslocamento do CM de diferentes perfis de intensidade horizontais segundo X e segundo Y de diferentes planos axiais, *Figura 37*.

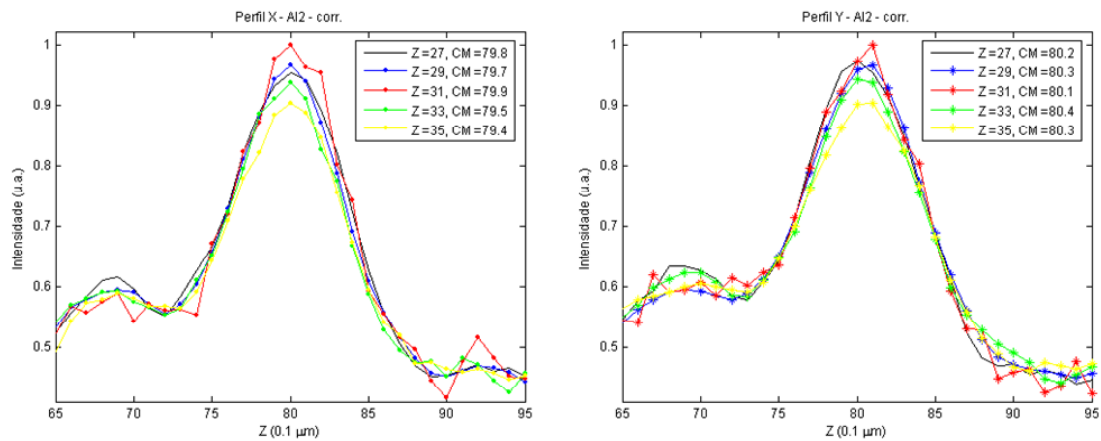


**Figura 37:** Imagens de Perfis horizontais segundo o eixo de X e Y, da Matriz 3D de I2 (antes da correcção do alinhamento). Estes perfis atravessam uma estrutura de um ponto basófilo ( $X=80$ ,  $Y=81$ ); de cinco planos axiais distintos ( $Z = 27, 29, 31, 33, 35$ ).

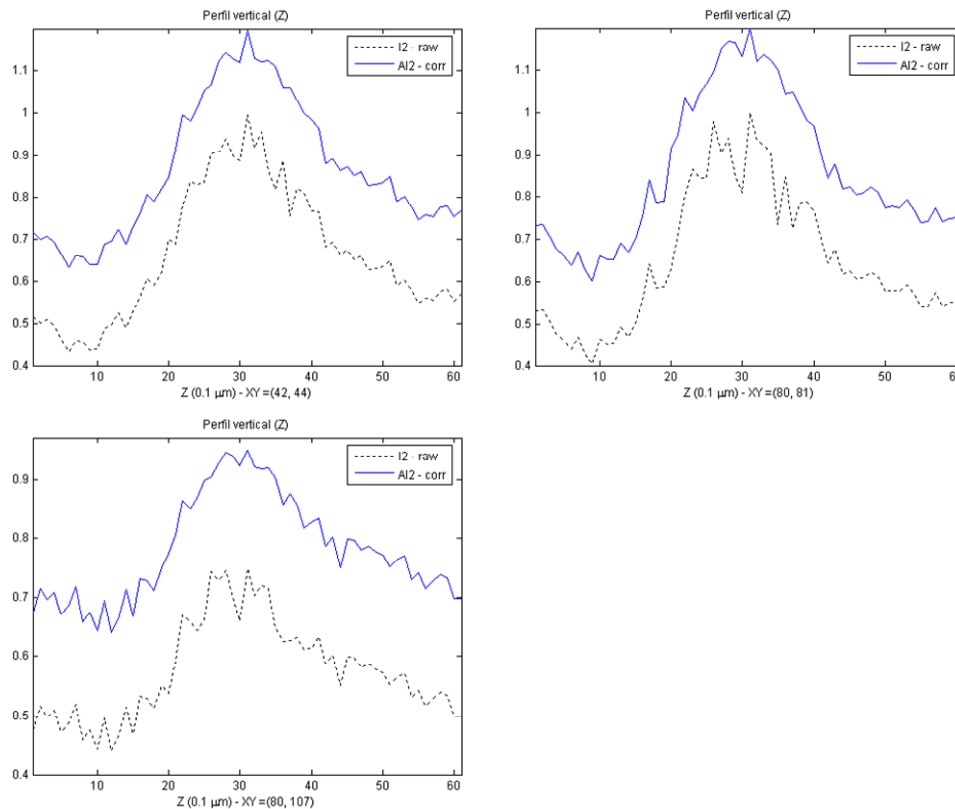
Descrição do algoritmo de alinhamento da Pilha 3D:

1. Determinar o CM:
  - a. Seleccionar um ponto de referência na célula (estrutura basófila); Traçar os perfis de intensidade horizontais segundo X e segundo Y, que o atravessam, e determinar CMs;
  - b. Sobrepor o *plot* de perfis de intensidade horizontais segundo X e segundo Y de diferentes planos de Z (e verificar se existem deslocamentos);
  - c. Identificados os deslocamentos, calcular o CM (x, y) para os diferentes planos de Z. Neste cálculo assumiu-se um intervalo de x e y [73:87] e intensidades superiores ao valor de 0.6 u.a. (unidades arbitrárias), para garantir que não se estava a considerar estruturas vizinhas ao ponto de referência em análise.
  
2. Alinhamento do CM:
  - a. Considerar como referência o CM do plano de melhor focagem segundo Z (plano central, Z = 31);
  - b. Deslocamento: aplicar operação de deslocamento da posição do plano em função da diferença entre o CM calculado e CM de referência (ajuste a valores inteiros);
  - c. Interpolação: operação de ajuste fino por interpolação linear do CM, deslocado na operação precedente.

O ajuste matemático aplicado permitiu corrigir desalinhamentos nas imagens, que apresentavam uma variabilidade máxima de posição na ordem dos 0.3  $\mu\text{m}$ . Assim após o alinhamento da pilha 3D verifica-se na *Figura 38*, como pretendido, CMs coincidentes ao longo de eixo de Z.



**Figura 38:** Legenda análoga à da **Figura 37**, relativa à matriz tridimensional alinhada de I2, denominada de AI2\_corr.



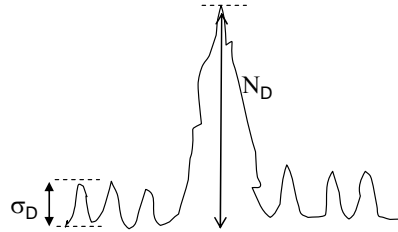
**Figura 39:** Imagens de perfis verticais que passam no centro de três pontos basófilos distintos [(42,44); (80,81); (80,107)]. Linha a tracejado e a cheio corresponde respectivamente à matriz 3D antes e depois do alinhamento.

O resultado da aplicação deste método, implementado em Matlab, da pilha 3D pode ser comprovado pela visualização de diferentes perfis verticais que passam no centro de diferentes estruturas basófilas da pilha 3D antes e depois do alinhamento. No exemplo apresentado na *Figura 39*, para que visualmente fosse mais fácil de distinguir os perfis das duas matrizes foi somado ao perfil de intensidade da matriz corrigida (AI2-corr) um factor constante de  $0.2 \mu\text{m}$ .

### **4.3.3. Avaliação dos resultados experimentais**

Com o objectivo de otimizar uma técnica de visão de profundidade que conduza a um aumento de contraste e obtenção de discriminação vertical, foram aplicados à pilha tridimensional de imagens adquiridas por microscopia, após a correcção de alinhamento, diferentes métodos de desconvolução. Com o propósito dessa reconstrução tridimensional vir a permitir uma melhor caracterização morfológica da patologia específica associada às amostras. Como foi descrito na secção 4.3.1., a análise destas amostras vai focar-se na observação de pequenas estruturas patológicas presentes em eritrócitos.

Os métodos desconvolutivos testados para a reconstrução da pilha tridimensional dividem-se em dois grupos principais: iterativos e não iterativos. Nos métodos iterativos testou-se o algoritmo de Richardson-Lucy (RL ou *DeconvLucy*) e de desconvolução Cega (*DeconvBlind*), e nos métodos não iterativos testou-se a desconvolução com o filtro de Wiener (*DeconvWnr*) e com o filtro otimizado segundo o critério do erro quadrático mínimo (“*regularized filter*” ou *DeconvReg*). Nos métodos não iterativos o parâmetro relativo à razão sinal ruído (nsr) atribuído foi testado entre um intervalo de [18, 53]. Estes valores foram calculados a partir da razão entre quadrado do sinal máximo de intensidade ( $N_D$ ) e o quadrado da variância do sinal de fundo ( $\sigma_D$ ), equação (eq. 26), ilustrado na *Figura 40*. Os valores, máximo e mínimo correspondem a dois picos de menor e maior intensidade.



**Figura 40:** Figura ilustrativa do cálculo da razão sinal ruído (nsr), descrito pela equação (eq. 26).

$$nsr = \frac{N_D^2}{\sigma_D^2} \quad \text{eq. 26}$$

Como resposta impulsional do sistema de formação de imagem, testaram-se as seis PSFs sintéticas, e também PSFs directamente extraídas das amostras em análise, denominadas de PSF extraídas.

As matrizes dos dados tridimensionais foram normalizadas num intervalo de intensidades compreendido entre [0 e 1].

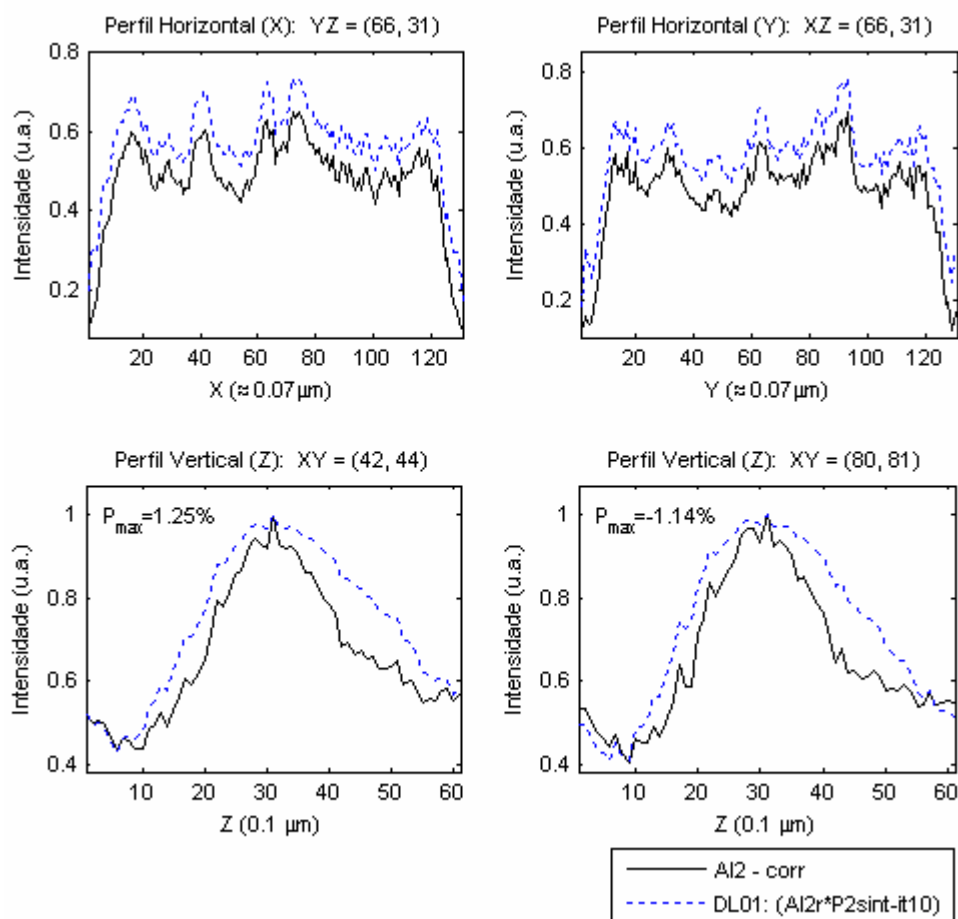
Para minimizar o tempo de processamento nas operações de desconvolução foram apenas analisados 61 planos de Z de cada pilha tridimensional, adquiridos com um passo em Z de  $0.1\mu\text{m}$ , com o plano de melhor focagem centrado em  $Z = 31$ . Garantindo, no entanto, que toda a informação vertical de relevância, relativa à célula, estava contida nessa matriz 3D. Com este procedimento, para além de se garantir um tempo de processamento inferior, em alguns casos verificou-se que o número de iterações necessário para obter uma convergência semelhante da conseguida no processo de desconvolução com uma matriz 3D de maior dimensão, era inferior, ou seja a convergência para a mesma solução mostrou-se mais rápida.

Para mais facilmente compreender os perfis horizontais segundo X e segundo Y, e perfis verticais segundo Z, apresentados das figuras que se seguem é apresentado no apêndice B um diagrama exemplificativo, *Figura(B) 5*, pág. 120.

#### 4.3.3.1. Resultados obtidos com PSFs sintéticas

Aplicando os diferentes algoritmos de desconvolução iterativos (*DeconvLucy* e *DeconvBlind*) não se verificou aumento da discriminação vertical, identificando-se

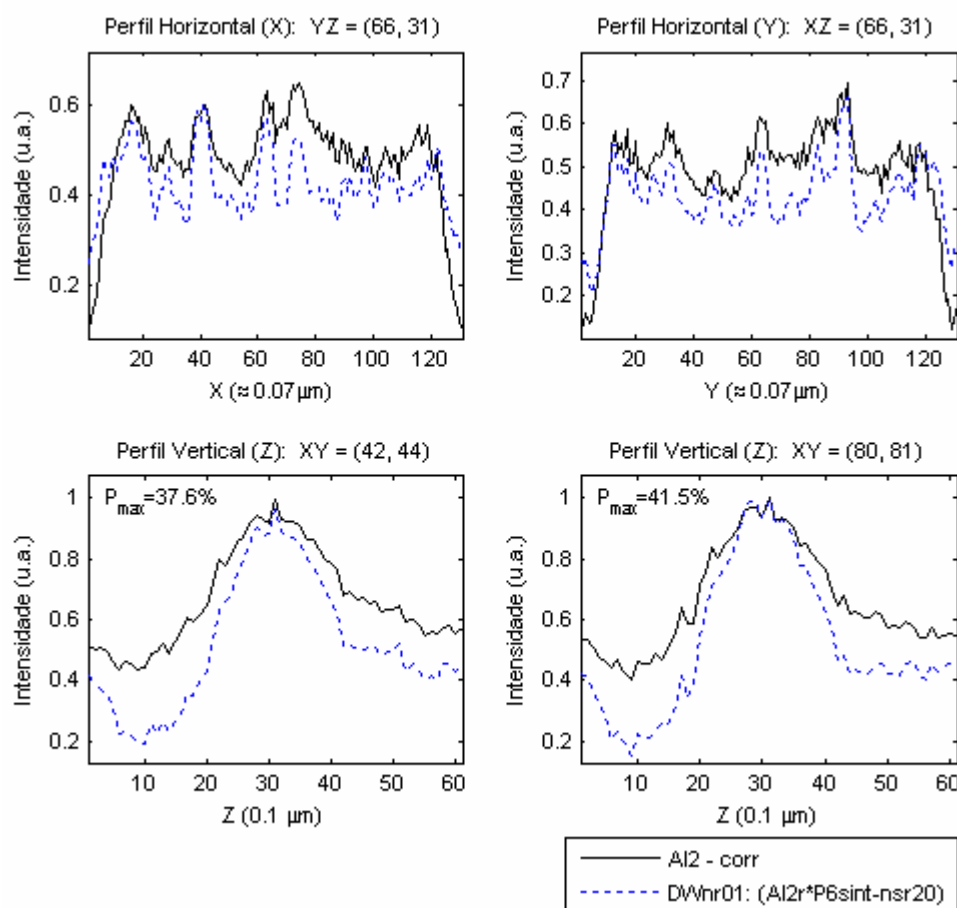
inclusive um alargamento do perfil vertical de intensidade ao longo do eixo de Z. Como exemplo é apresentado na *Figura 41* o resultado da aplicação do algoritmo de desconvolução *DeconvLucy* (DL) com a PSF sintética P1sint, para 10 iterações.



**Figura 41:** Os gráficos do topo mostram a variação de intensidade ao longo dos dois eixos perpendiculares que atravessam o plano axial de melhor focagem. Estes perfis passam no centro da célula sendo o da esquerda correspondente do eixo X, e o da direita do eixo Y. As figuras dispostas na segunda linha caracterizam a variação de intensidade ao longo do eixo dos ZZ, que passam no centro de dois pontos basófilos distintos, existentes na célula. A linha a cheio corresponde à imagem real e a linha a tracejado à imagem desconvoluída, com o algoritmo RL, e a PSF P2sint, para 10 iterações, {DL01: (AI2r, P2sint) – it = 10}.

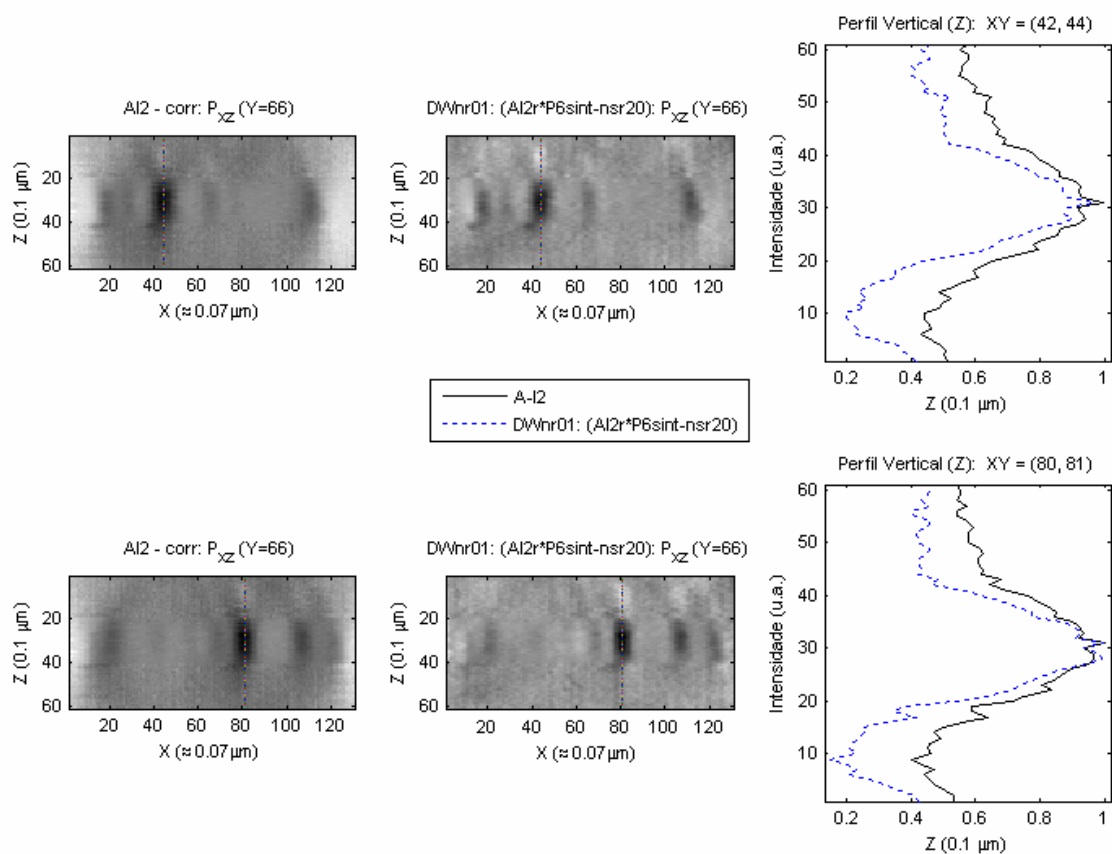
No entanto, com a aplicação dos algoritmos de desconvolução não iterativos (*DeconvWnr* e *DeconvReg*) verificou-se um aumento de discriminação vertical, identificando-se um estreitamento do perfil vertical ao longo do eixo de Z quando aplicada a PSF de “maior

abertura” – P6sint. No entanto, aplicando o algoritmo *DeconvReg*, verificou-se um contraste ligeiramente inferior. A título de exemplo é apresentado na *Figura 42* e *Figura 43* o resultado da aplicação do algoritmo de desconvolução *DeconvWnr* (DWnr) e PSF sintética P6sint, para uma razão sinal ruído de 20.



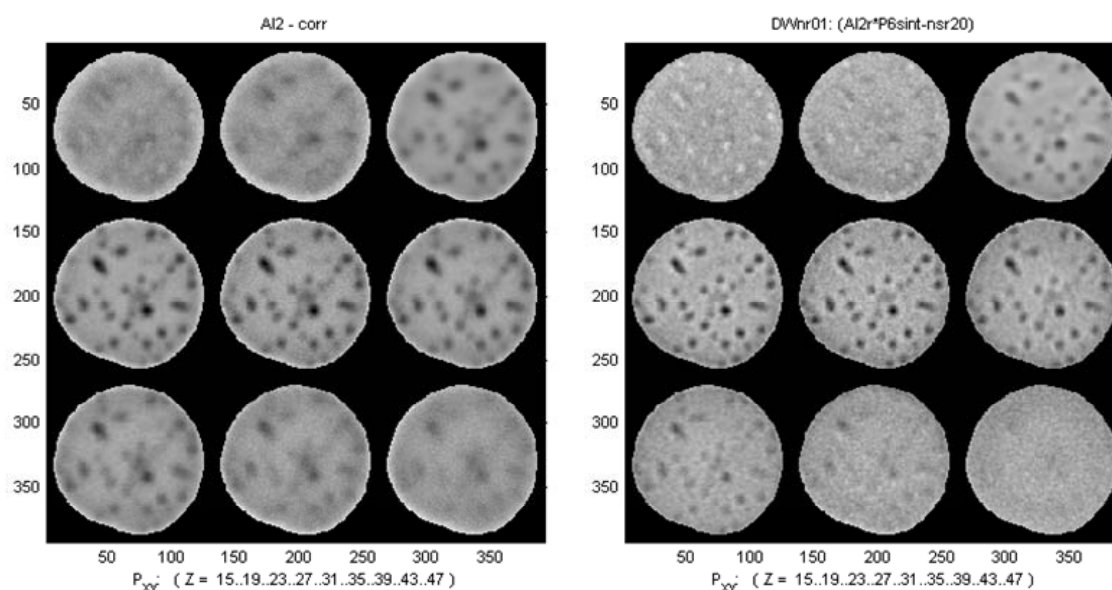
**Figura 42:** Legenda análoga à da *Figura 41*, aplicando o algoritmo do filtro de Wiener (DWnr) com a PSF P6sint, para uma razão de sinal ruído (nsr) igual a 20, {DWnr01: (AI2r, P6sint) – nsr = 20}.

Deste modo verifica-se um aumento de contraste médio superior a 37% e um aumento de discriminação vertical por estreitamento do perfil vertical. Podendo-se identificar na *Figura 44*, que planos equivalentes entre a matriz real e a desconvoluída apresentam nesta última o desaparecimento de estruturas “out-of-focus”, característica da evidência de discriminação vertical, para além de se verificar um aumento de contraste nos contornos das estruturas basófilas.



**Figura 43:** Figuras dos planos sagitais da matriz real (à esquerda) e matriz desconvoluída (à direita) e respectivos perfis verticais que atravessam dois pontos basófilos distintos. O algoritmo aplicado foi o de Wiener (DWnr) com a PSF P6sint, para uma razão de sinal ruído (nsr) igual a 20.



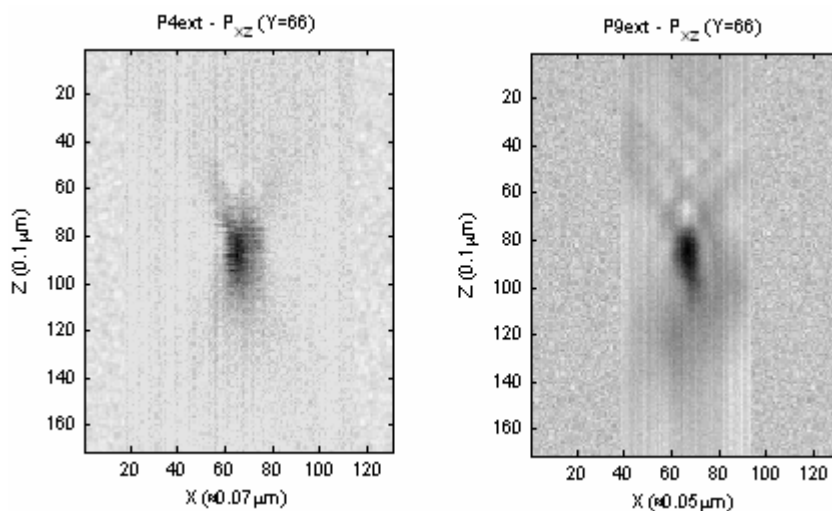


**Figura 44:** Planos axiais apresentados com um espaçamento de  $0.4 \mu\text{m}$  cada. A imagem da esquerda corresponde à matriz 3D real e a da direita à matriz desconvoluída com algoritmo de Wiener (DWnr) e a PSF P6sint, para uma razão de sinal ruído (nsr) igual a 20.

Foi também testada uma abordagem alternativa de adição de ruído de fundo às PSFs sintéticas. Ruído baseado numa distribuição de Poisson tendo como valor de base a intensidade mínima da amostra original a desconvoluir, contudo os resultados obtidos mostraram-se pouco satisfatórios verificando-se um escurecimento das imagens e perda de discriminação vertical, identificada pelo alargamento segundo  $z$  da estrutura do ponto basófilo.

#### 4.3.3.2. PSF extraídas

Na tentativa de caracterizar, de forma mais fiel, a resposta impulsional do sistema de aquisição de imagem experimental extraíram-se pequenas estruturas da imagem real, que dadas as suas reduzidas dimensões se aproximassem do comportamento característico da resposta impulsional do sistema óptico experimental, sendo designadas de PSF experimentais extraídas. Com este objectivo, extraíram-se 12 PSFs experimentais, no entanto os resultados apresentados vão focar-se essencialmente na aplicação das PSFs P4ext e P9ext, cujo padrão se mostrava mais coerente com o esperado, *Figura 45*.



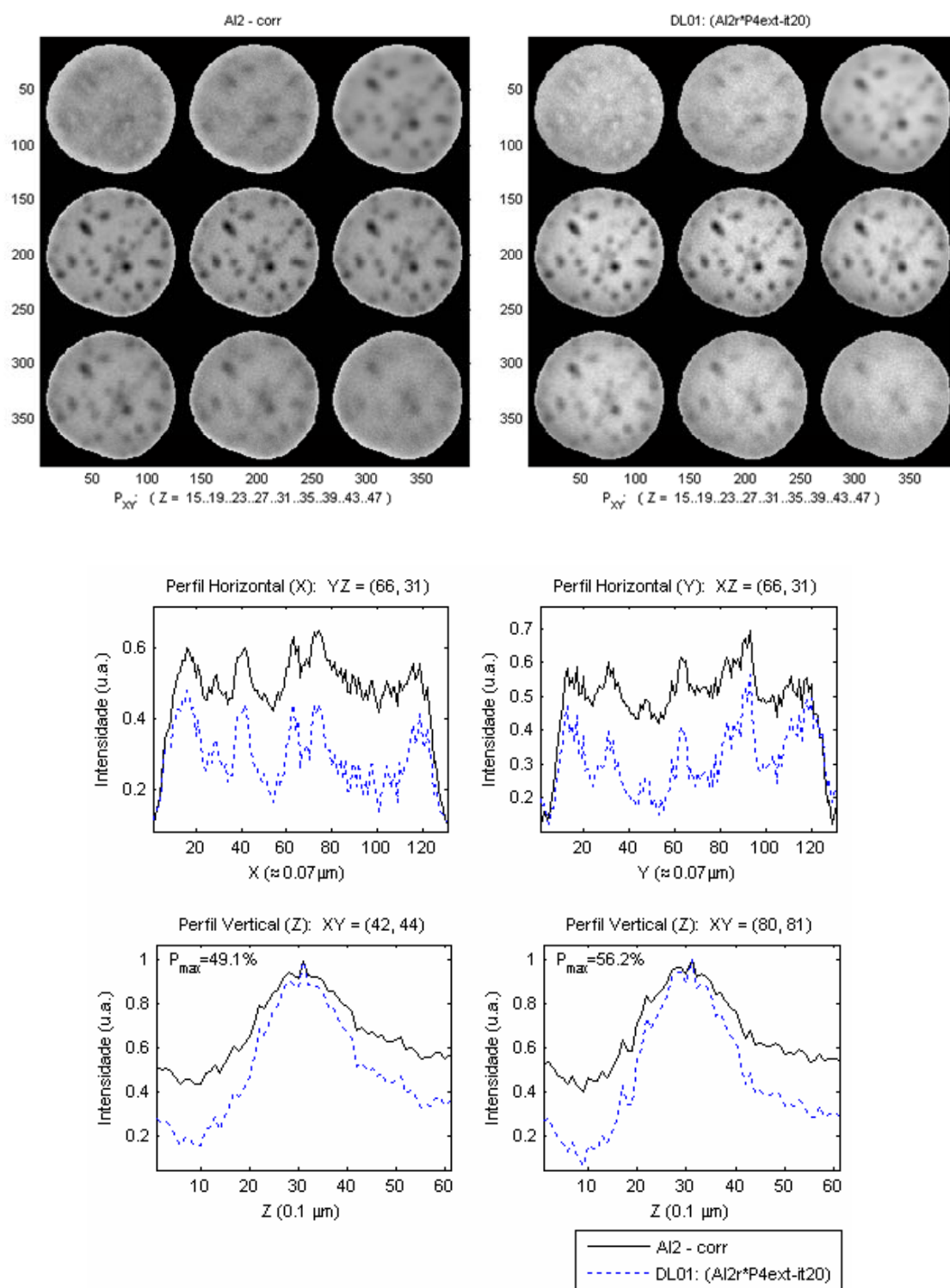
**Figura 45:** Planos Sagitais nas PSFs extraídas P4ext e P9ext, respectivamente as figuras da esquerda para a direita.

Estas PSFs experimentais foram extraídas por aplicação de um cilindro de corte de modo a eliminar a informação adicional não desejada na resposta impulsional, correspondente ao meio envolvente à estrutura seleccionada. As matrizes tridimensionais das PSFs extraídas apresentam as mesmas dimensões da pilha 3D original a desconvoluir. Deste modo, para preencher os restantes píxeis da Matriz 3D da PSF extraída, foram introduzidos valores baseados numa distribuição de Poisson com um valor de partida relativo a intensidade mínima da pilha 3D original.

#### 4.3.3.3. Resultados obtidos com PSF extraídas

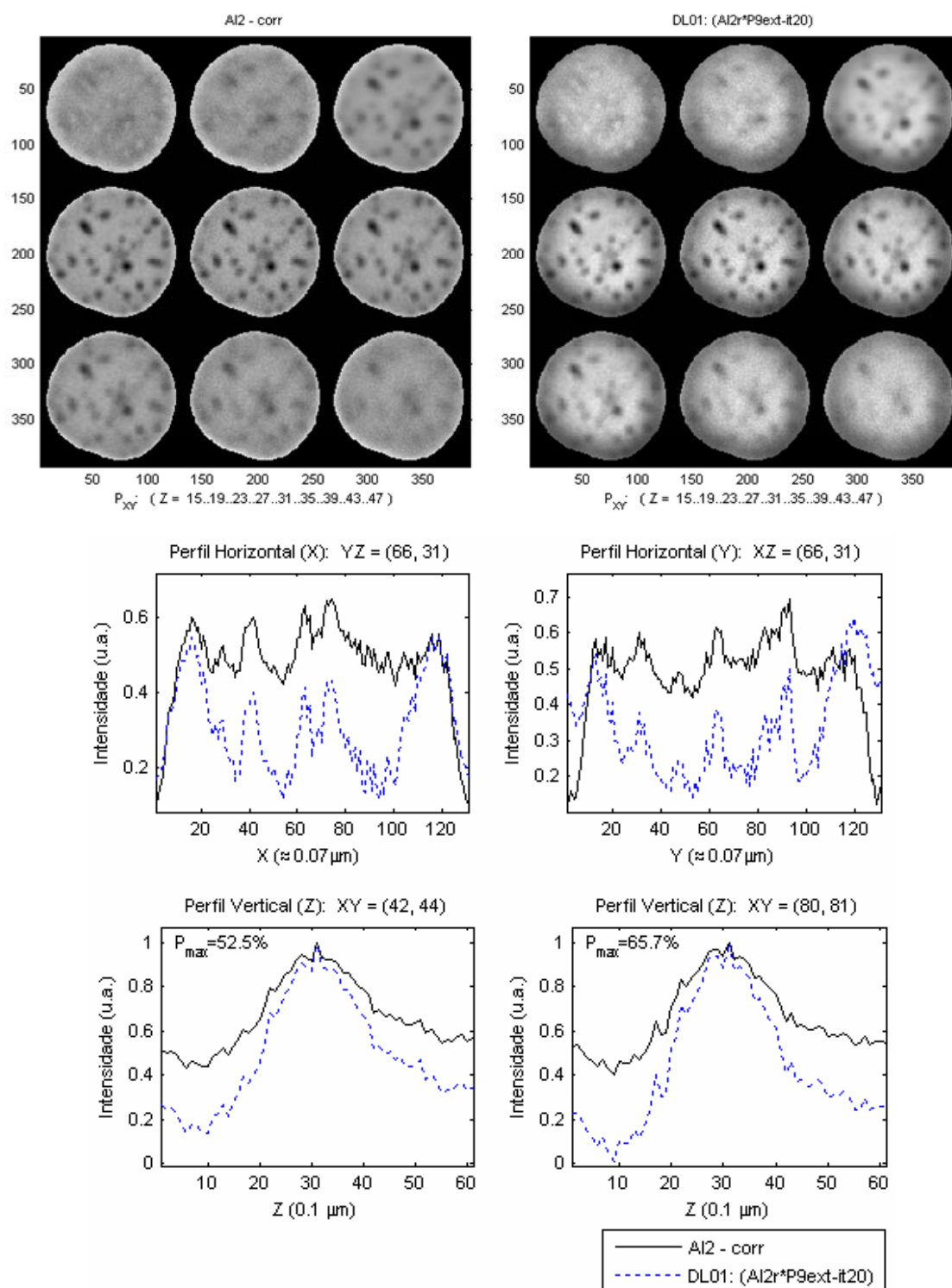
Introduzindo nos algoritmos de desconvolução as PSFs extraídas directamente da pilha de imagens 3D, apenas se obteve aumento de contraste e discriminação vertical com o algoritmo *DeconvLucy*, verificando-se um estreitamento do perfil vertical. Aplicando o algoritmo de desconvolução Cega e métodos não iterativos, a matriz desconvoluída apresentava imagens mais escuras e com um contraste geral inferior ao da imagem de partida. Também nos métodos não iterativos se verificou um decréscimo da acuidade visual, mostrando-se as imagens desconvoluídas nitidamente mais desfocadas do que as imagens originais de partida.

Na *Figura 46* é apresentado um exemplo da obtenção de discriminação vertical, aquando da aplicação do algoritmo *DeconvLucy* com PSF extraída P4ext, para 20 iterações.



**Figura 46:** Legendas análogas à da *Figura 41* e *Figura 47*, relativas à aplicação do algoritmo RL, com a PSF P4ext, e 20 iterações.

Outro exemplo é apresentado na *Figura 48*, mas neste caso com PSF extraída P9ext e igualmente 20 iterações.

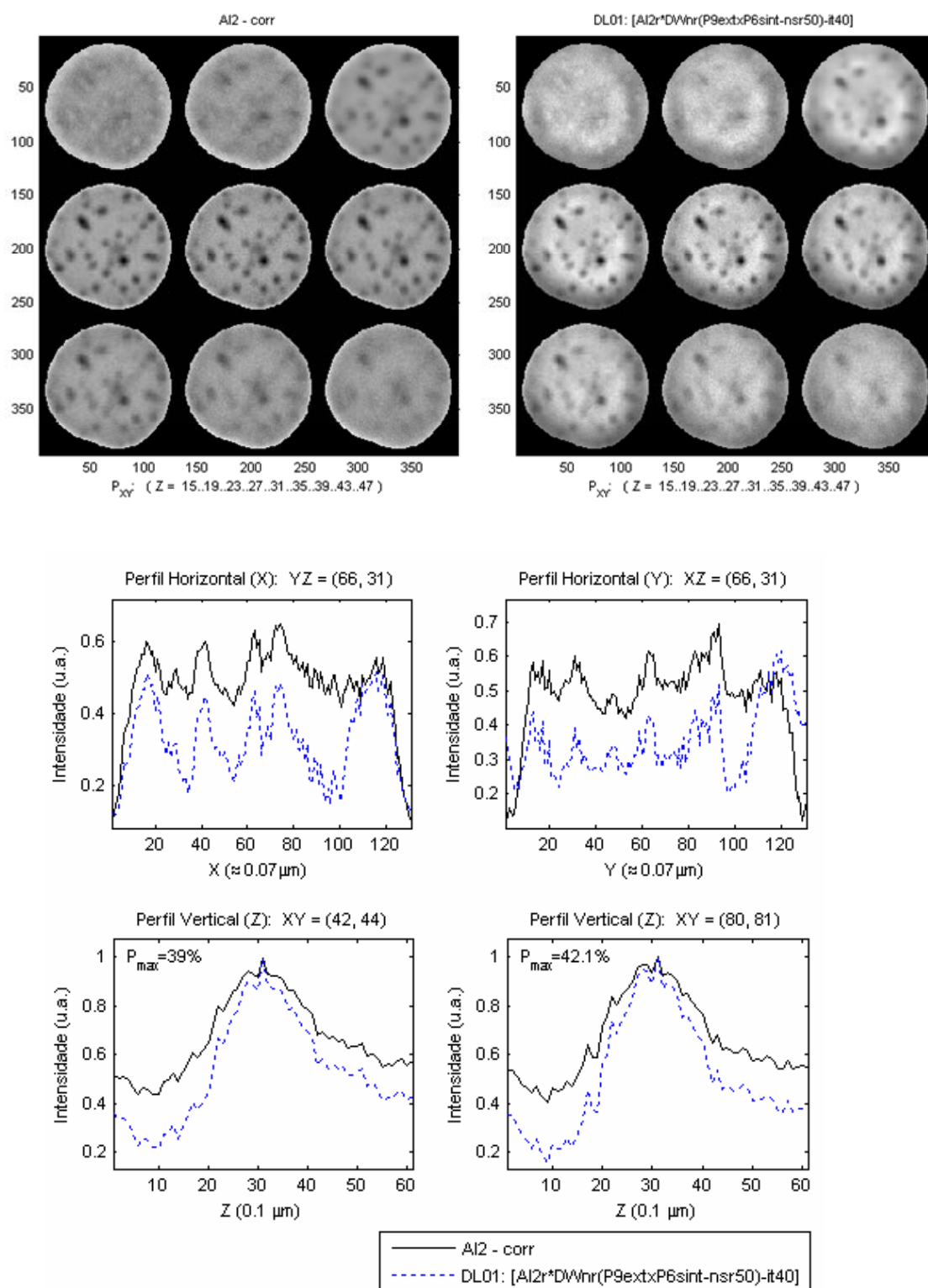


**Figura 48:** Legendas análogas à da *Figura 41* e *Figura 49*, relativas à aplicação do algoritmo RL, com a PSF P9ext, e 20 iterações.

Verifica-se deste modo um aumento do contraste médio superior a 50% e evidência de discriminação vertical, mas também se observa a perda de contraste nos limites da célula nas imagens planares da pilha 3D. Este aumento máximo de contraste verifica-se essencialmente para estruturas localizadas na zona central da célula, não se verificando a mesma convergência nos seus limites, ou seja não existe homogeneidade em toda a imagem desconvoluída.

Na tentativa de reduzir o ruído da PSF extraída, foi ainda aplicada a esta PSF o método desconvolutivo não iterativo que melhores resultados de discriminação vertical obteve com as amostras biológicas, (DeconvWnr e DeconvReg) com a PSF sintética P6sint.

Com esta abordagem verificou-se uma diminuição dos artefactos identificados com aplicação das PSFs extraídas não restauradas. Verificando-se na matriz desconvoluída um aumento médio de contraste de cerca de 40% e obtenção de discriminação vertical. É apresentado um exemplo na *Figura 50*, da aplicação da PSF extraída P9ext restaurada com o algoritmo do filtro de Wiener - DWiener e a PSF sintética - P6sint com razão sinal ruído  $nsr = 50$ . O algoritmo *DeconvLucy* correu para 40 iterações.



**Figura 50:** Legendas análogas à da *Figura 41* e *Figura 51*, relativas à aplicação do algoritmo RL, com a PSF P9ext (restaurada com o algoritmo do filtro de Wiener, a P6sint e nsr = 50) para 40 iterações.

#### 4.3.3.4. Síntese

Com objectivo de efectuar uma síntese dos resultados obtidos mais relevantes é apresentada a *Tabela 3*.

Onde os métodos de desconvolução são: DL - algoritmo RL, DB - desconvolução cega; DWnr - desconvolução com filtro de Wiener. O factor adicional corresponde ao número de iterações (it) para os métodos iterativos e razão sinal ruído para os métodos não iterativos (nsr). As PSFs sintéticas estão identificadas com o sufixo “sint.”; e as extraídas com o sufixo “ext.”. No contraste em Z é apresentada a percentagem média aproximada obtida pela análise dos perfis verticais dos diferentes pontos basófilos estudados.

**Tabela 3** – Dados descritivos das diferentes PSFs aplicadas aos vários métodos de desconvolução nas amostras biológicas apresentadas nos resultados.

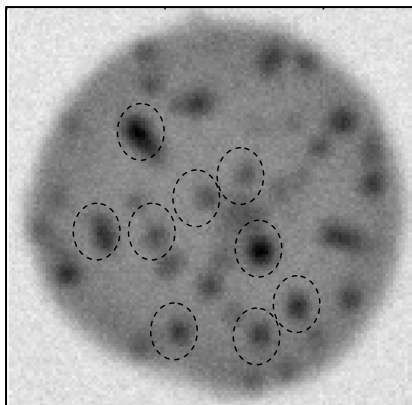
Método de Desconvolução	Factor adicional	PSF	Contraste Médio (aprox.) em Z (%)
DWnr	nsr = 20	P6 sint.	37
DL	it = 20	P4 ext.	50
DL	it = 20	P9 ext.	52
DL	it = 40	P9 ext. Rest-DWnr (P6sint, nsr = 50)	40

#### 4.3.3.5. Plot 3D

Para melhor identificar/visualizar a morfologia das estruturas patológicas presentes nas células seleccionaram-se 9 pontos basófilos da célula analisada para efectuar um *plot* tridimensional que permitisse uma visão mais clara da morfologia das estruturas em profundidade.

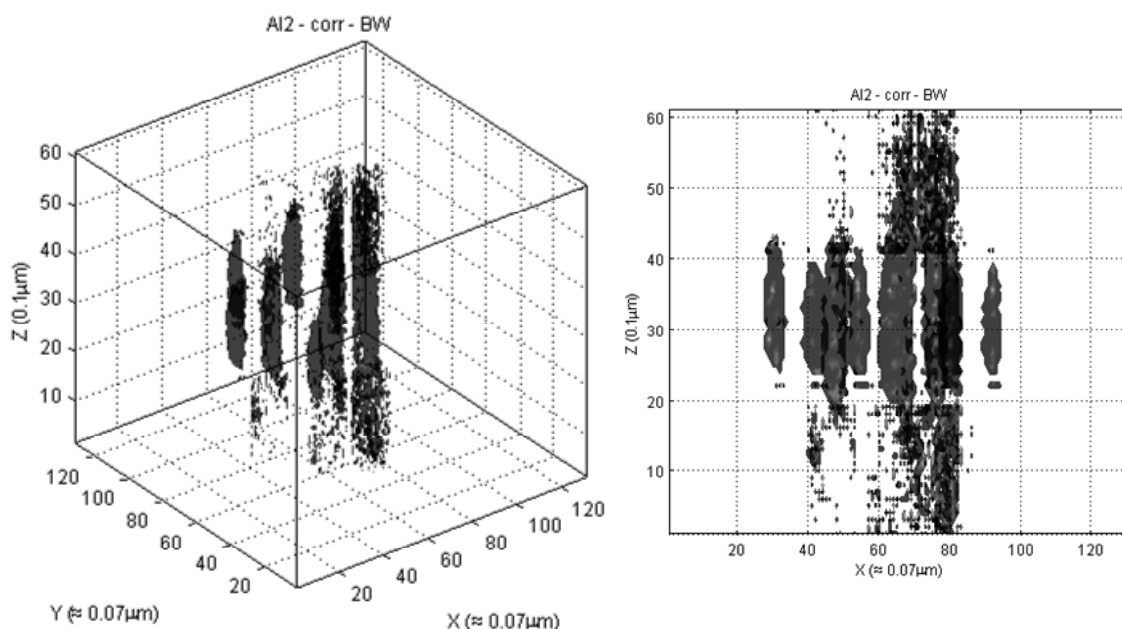
O método baseou-se na selecção de 9 estruturas basófilas na célula analisada, seguido de um corte cilíndrico de cada uma delas, às quais separadamente se aplicou um limiar de corte correspondente a 20% da intensidade máxima da matriz dessa estrutura basófila, para criar uma matriz de 0 e 1s, em que a intensidade 1 corresponde à estrutura patológica.

Estas operações foram repetidas para os 9 pontos distintos de modo a obter uma matriz tridimensional final de 0s e 1s do mesmo tamanho da matriz original. Na *Figura 52* está apresentado um esquema onde estão identificadas as nove estruturas seleccionadas para o *plot* tridimensional.



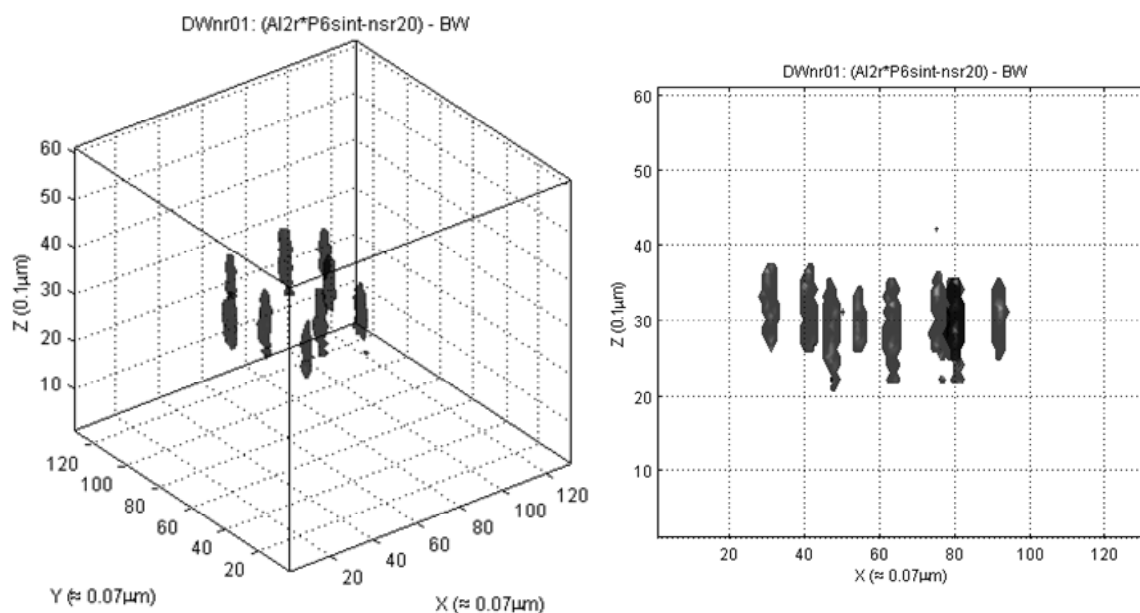
**Figura 52:** Figura do plano axial na matriz real, para  $Z = 31$ , com identificação dos nove pontos basófilos seleccionados para o *plot* 3D.

É apresentado em sequência os diferentes *plots* tridimensionais das matrizes de 9 pontos, relativas à pilha 3D antes da aplicação dos métodos desconvolutivos e após a aplicação dos métodos de desconvolução que apresentaram discriminação vertical evidente.

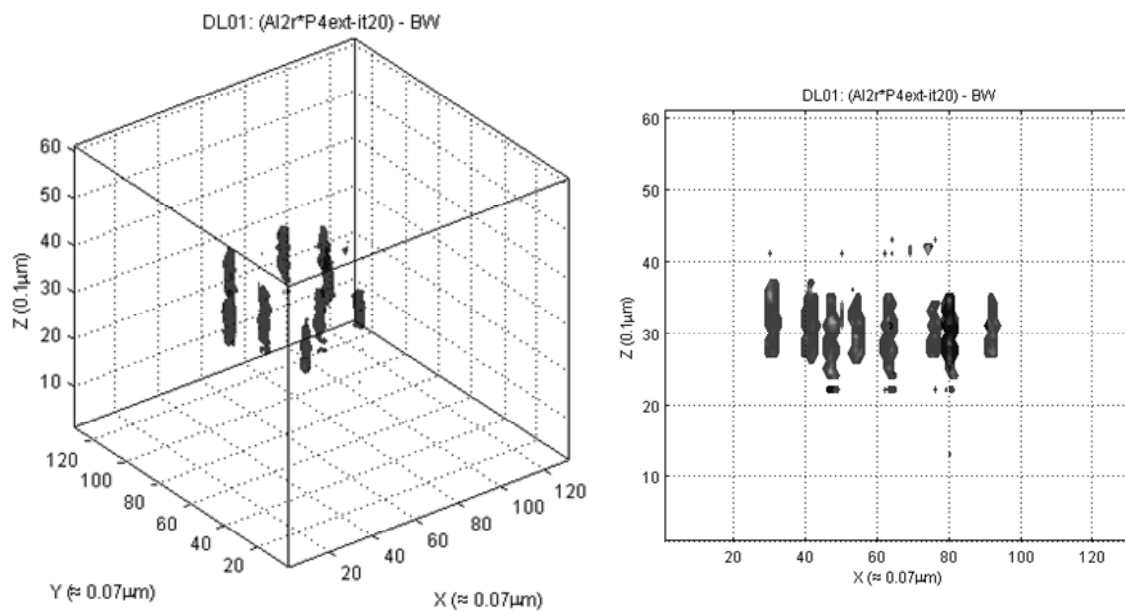


**Figura 53:** Imagens do *plot* tridimensional da matriz de 9 pontos basófilos, relativa à pilha 3D da imagem real (AI2-corr) antes da aplicação dos métodos desconvolutivos. Na imagem da esquerda é apresentada uma vista de XYZ, e na da esquerda apenas XZ.

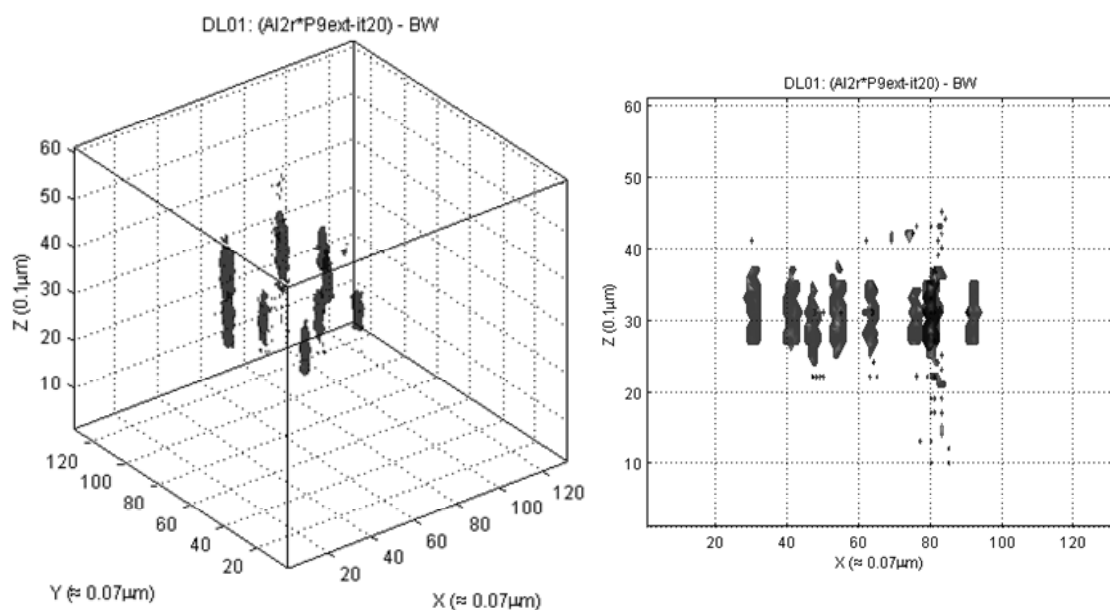




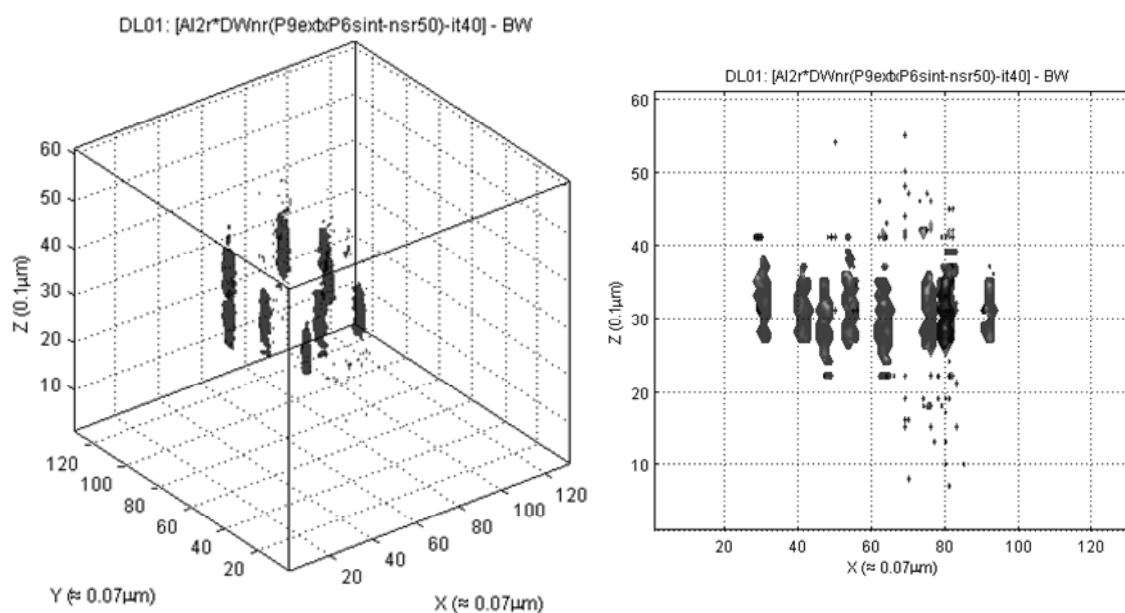
**Figura 54:** Legenda análoga à da **Figura 53**, relativa à matriz 3D desconvoluída com o algoritmo do filtro de Wiener, com a PSF sintética P6sint e  $\text{nsr} = 20$ .



**Figura 55:** Legenda análoga à da **Figura 53**, relativa à matriz 3D desconvoluída com o algoritmo RL, com a PSF extraída P4ext e  $\text{it} = 20$ .



**Figura 56:** Legenda análoga à da **Figura 53**, relativa à matriz 3D desconvolvida com o algoritmo RL, com a PSF extraída P9ext e it = 20.



**Figura 57:** Legenda análoga à da **Figura 53**, relativa à matriz 3D desconvolvida com o algoritmo RL para it = 40, com a PSF P9ext restaurada com o algoritmo do filtro de Wiener e a PSF sintética P6sint nsr = 50.

Nestas figuras dos *plots* 3D verifica-se, como era esperado, com a aplicação dos métodos desconvolutivos um aumento evidente do contraste em profundidade, para além de permitir visualizar diferenças de posição das estruturas basófilas segundo o eixo dos ZZ dentro da célula.

Para ter uma informação mais detalhada dessas estruturas patológicas evidenciadas na célula é efectuado um cálculo simples de alguns parâmetros morfológicos, como volume, área, diâmetro e altura das estruturas. Nesta operação, para o cálculo do diâmetro e altura do ponto basófilo, estabeleceu-se uma aproximação da sua forma a um elipsóide. Na *Tabela 4* são apresentados os valores médios para os nove pontos basófilos obtidos nas diferentes matrizes tridimensionais analisadas.

**Tabela 4** – Valores médios de diferentes parâmetros morfológicos obtidos para as pilhas 3D, relativas à matriz AI2-corr, e matrizes restauradas com diferentes métodos de desconvolução.

<b>Matriz 3D</b>	<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Diâmetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Volume (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	<b>Altura (Z) (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
AI2 - corr	0.1855	0.4860	0.3861	1.5607
DWnr (P6sint), nsr = 20	0.0898	0.3381	0.0805	0.6725
DL (P4ext), it = 20	0.0848	0.3286	0.0653	0.5779
DL (P9ext), it = 20	0.0908	0.3400	0.0687	0.5674
DL [DWnr (P9ext, P6sint), nsr=50], it =40	0.0923	0.3428	0.0778	0.6320

Como se tratam de medidas pioneiras neste tipo de amostras e com esta patologia associada, não existem valores de referência para comparação, no entanto verifica-se que estes valores estão coerentes com o que seria esperado de estruturas dentro de uma célula de glóbulo vermelho, tendo como referência as dimensões do eritrócito de diâmetro (6 a 8.5  $\mu\text{m}$ ) e uma espessura (1 a 2  $\mu\text{m}$ ).

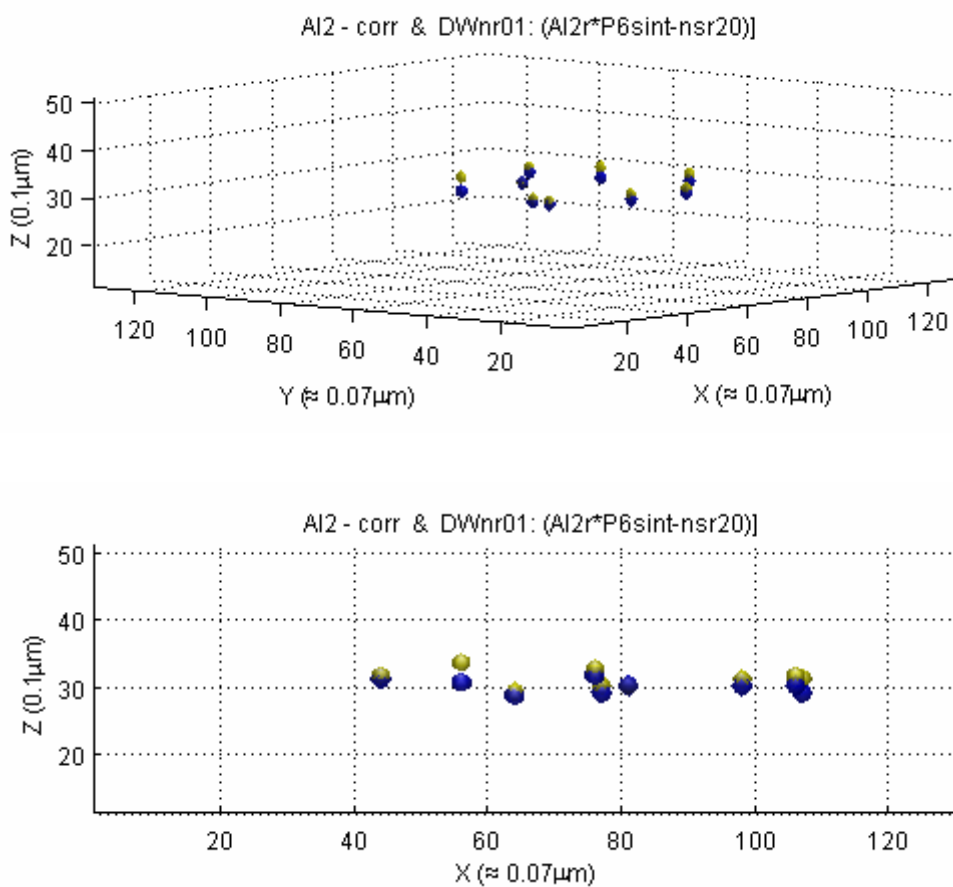
#### 4.3.3.6. Posição segundo Z do CM das estruturas basófilas

Os dados das matrizes 3D dos 9 pontos basófilos, apresentados na secção anterior, foram também usados na tentativa de determinar a posição relativa segundo Z do centro de massa (CM) das diferentes estruturas basófilas. No entanto, as oscilações máximas obtidas dos valores dos CM foram de aproximadamente dois planos axiais, o que corresponde a apenas 0.2  $\mu\text{m}$ , valor próximo da profundidade de campo do sistema. Deste modo e tendo em conta os erros associado a estes cálculos trata-se de uma medida de fiabilidade reduzida, mas dificilmente melhorada em estruturas de dimensões tão reduzidas. Os resultados obtidos com as diferentes matrizes são apresentados na *Tabela 5*.

**Tabela 5** – Variação CM, segundo Z, da matriz real AI2-corr e as quatro matrizes desconvoluídas com os métodos analisados na secção anterior.

BW	Centro de Massa segundo Z de 9 pontos basófilos distintos								
<b>AI2-corr</b>	31.5	32.5	30.0	30.9	31.1	31.4	30.1	29.1	33.4
<b>DWnr (AI2r*P6sint-nsr20)</b>	31.0	31.5	30.0	30.0	28.9	30.0	28.9	28.5	30.5
<b>DL (AI2r*P4ext-it20)</b>	30.5	32.0	30.5	31.0	30.0	30.5	28.9	29.3	30.5
<b>DL (AI2r*P9ext-it20)</b>	31.0	32.0	30.5	31.0	30.6	30.5	28.5	29.3	30.5
<b>DL(AI2r*Rest(P9ext-it40)</b>	31.0	32.5	30.5	31.0	30.6	31.0	29.3	28.9	30.5

Para melhor visualizar estes resultados é apresentado a título de exemplo a *Figura 58*, representada por esferas de dois píxeis de diâmetro que figurativamente caracterizam os CM dos diferentes pontos basófilos, na matriz real antes na aplicação do método desconvolutivo (AI2-corr) e na matriz desconvoluída. Neste caso, relativa à aplicação do filtro de Wiener com a PSF sintética P6sint e  $\text{nsr} = 20$ .



**Figura 58:** Figura representativa da variação da posição segundo Z do centro de massa (CM) de nove pontos basófilos distintos na célula, AI2-corr (esfera mais clara) e da matriz desconvoluída (esfera mais escura). O CM é representado como uma esfera de 2px de diâmetro, assumindo um erro associado à variação de posição de  $\pm 1$ px.

## 5. Conclusão

---

Como conclusões finais relativamente aos resultados apresentados no quarto capítulo e aos objectivos propostos por este trabalho, são aqui apresentadas duas secções, referentes respectivamente à análise dos dados sintéticos e dados biológicos, culminando com uma secção relativa à avaliação crítica final.

### 5.1. Dados sintéticos

Os testes efectuados nos dados sintéticos, para além de permitirem testar os modelos das PSFs teóricas, na tentativa de compreender e formular a resposta impulsional do sistema de formação de imagem, possibilitaram também uma melhor compreensão do comportamento dos algoritmos de desconvolução. Deste modo, verificou-se, para as diferentes matrizes sintéticas, que a convergência nos processos de desconvolução não é de todo linear.

De uma forma geral, pode concluir-se que o algoritmo RL, método iterativo bastante robusto, se comportou de melhor forma com a aplicação das PSFs teóricas P1sint e P2sint, nas matrizes sintéticas com esferas alinhadas verticalmente (ex.: M1). Onde, matematicamente as soluções possíveis se restringiam a um único eixo, não criando artefactos, e permitindo a obtenção de uma matriz desconvoluída muito próxima do objecto 3D de partida. O número de iterações necessárias para a convergência aumentou significativamente com a diminuição da abertura do “cone espelhado” da PSF, pois neste caso, a capacidade da resposta impulsional distinguir estruturas a diferentes planos de profundidade segundo Z é proporcional à abertura relativa da PSF. Deste modo, para uma PSF “muito fechada”, na qual não é possível aferir discriminação vertical segundo Z, a imagem é identificada como sendo aproximadamente igual nos diferentes planos axiais. Este facto traduziu-se numa baixa produtividade dos métodos de desconvolução quando aplicadas as PSFs P3sint e P4sint, “mais estreitas”, que não conseguiram convergir na solução esperada.

Outro facto importante aferido foi que, ao contrário do esperado, o algoritmo de desconvolução cega, não teve um desempenho tão satisfatório como o algoritmo RL, pois à medida que se processavam as diferentes iterações, e consoante o número de soluções possíveis, a PSF teórica, inicialmente atribuída, era restaurada no sentido da convergência dessas soluções, aumentando deste modo o número de soluções, responsáveis pela formação de vários artefactos na imagem final. Apenas com a aplicação da PSF de “maior abertura” se obtiveram convergências mais satisfatórias com o algoritmo de desconvolução cega. Tendo em conta que neste caso a resposta impulsional impõe no processo de convolução uma contribuição de desfocagem baixa.

Este resultado também se verificou nos algoritmos lineares não iterativos, que só apresentaram uma convergência satisfatória nos métodos desconvolutivos aquando da aplicação da PSF de “maior abertura”, P6sint.

## **5.2. Dados biológicos**

Nos resultados obtidos com o método de desconvolução iterativo RL aplicando as PSFs teóricas não se obteve aumento da discriminação vertical, verificando-se pelo contrário um alargamento dos perfis verticais de intensidade ao longo do eixo de Z. Contraditoriamente aos resultados obtidos com os dados sintéticos. Uma explicação provável reside no facto das PSFs sintéticas se basearem em formulações matemáticas rígidas que não modelam correctamente o comportamento real da resposta impulsional do sistema óptico de formação de imagem, funcionando apenas satisfatoriamente nos modelos das matrizes sintéticas, que seguem os mesmos formalismos matemáticos. Experimentalmente o sistema de óptico de formação de imagem funcionou como uma caixa preta, cuja insuficiência de informação relativa aos diferentes componentes que o compõem não permitiu uma modelação matemática exacta da sua resposta impulsional.

No entanto, verificou-se com na aplicação das PSF sintéticas de “maior abertura” (ex.: P6sint), quando empregues os métodos desconvolutivos não iterativos, um ganho de discriminação em profundidade. Esta redução de “blurring” esperada no processo de desconvolução é caracterizado por um estreitamento dos perfis verticais de intensidade ao

longo do eixo de Z. Este ganho de discriminação pode ser fundamentado tendo em conta que matematicamente os processos desconvolutivos não iterativos são mais simples do que os métodos estatísticos iterativos, que repetem várias operações durante o processamento computacional do algoritmo. Deste modo, PSFs que não reproduzam correctamente o comportamento da resposta impulsional do sistema óptico podem produzir artefactos francamente ampliados durante o processamento iterativo.

Por outro lado a aplicação de PSFs directamente extraídas dos dados adquiridos, apesar do ruído associado, caracterizam de forma mais fiel o sistema óptico de formação de imagens. Tratando-se de estruturas adquiridas exactamente nas mesmas condições da imagem original, caracterizam de forma real a resposta impulsional do sistema óptico. Na sua aplicação, com o algoritmo RL, identificou-se um aumento significativo do contraste vertical, no entanto o comportamento da convergência nos limites da célula decaiu. Dada a elevada sensibilidade do algoritmo para altas-frequências e tendo em conta a incompleta homogeneidade da matriz 3D da PSF extraída.

Este aumento de discriminação em profundidade foi conseguido apenas com a aplicação do algoritmo iterativo RL, por se tratar de um método mais robusto. No método de desconvolução cega tal como nos dados sintéticos, foram introduzidas durante o processo iterativo variações significativas na PSF restaurada, convergindo a solução final num resultado de contraste e acuidade inferior à da imagem original.

Com o objectivo de reduzir o ruído da resposta impulsional extraída das pilhas 3D de imagens, foi aplicado às PSF extraídas os métodos de desconvolução não iterativos e as PSFs teóricas que melhores resultados de desconvolução tinham apresentado nas amostras biológicas. Deste modo, as PSFs extraídas foram restauradas com o filtro de Wiener, aplicando a PSF sintética de maior abertura ( $P_{6sint}$ ).

Os resultados desta desconvolução (do algoritmo RL com PSF extraída restaurada) mostraram de igual modo um ganho de discriminação vertical, melhorando no entanto a convergência nos limites da célula em relação aos resultados obtidos com a PSF extraída não restaurada.



Os resultados das matrizes desconvoluídas que apresentaram ganho de discriminação vertical mostraram um aumento médio de contraste superior a 40%.

No *plot* tridimensional das matrizes restauradas, verificou-se especificamente para as nove estruturas basófilas analisadas um aumento de contraste vertical significativo, permitindo aferir informação morfológica vertical das estruturas patológicas presentes na célula de dimensões da ordem de grandeza próxima dos 0.5  $\mu\text{m}$ . Nos cálculos dos parâmetros morfológicos obtiveram-se valores, que apesar de não terem referências de comparação, são coerentes com as dimensões da célula e do que seria de esperar de estruturas dentro de um eritrócito de diâmetro (6 a 8.5  $\mu\text{m}$ ) e espessura (1 a 2  $\mu\text{m}$ ). Estas estruturas apresentaram nos dados desconvoluídos um diâmetro inferior a  $\approx 0.34 \mu\text{m}$  e uma altura inferior a  $\approx 0.67 \mu\text{m}$ .

A tentativa de determinar a posição segundo *Z* do centro de massa dessas estruturas basófilas mostrou-se mais crítica, tendo em conta a reduzida espessura das amostras e o facto do erro associado à sua determinação se encontrar no mesmo nível dos desvios da posição de *Z* dos CM, em relação plano de melhor focagem na matriz 3D segundo *Z*.

Os ganhos obtidos no processamento de imagens tridimensionais das amostras em questão suscitou interesse por parte dos hematologistas, tendo sido sugerida pela sua parte a implementação da técnica em ambiente hospitalar, para daí lhe extrair resultados de diagnóstico em tempo real.

### **5.3. Observações Finais e Avaliação crítica**

Tendo como objectivo principal deste trabalho desenvolver uma técnica de visão em profundidade que pudesse ser implementada de forma relativamente simples como metodologia de apoio à análise patológica na área clínica, penso que a abordagem apresentada nesta dissertação se mostra bastante proveitosa.

Dada a reduzida espessura das amostras biológicas analisadas os significativos ganhos de contraste de intensidade conseguidos em *Z*, podem fornecer parâmetros de análise

adicionais aos especialistas da área, no sentido, de poderem caracterizar de forma mais fiel a patologia e facultar uma diferenciação de diagnóstico.

Contudo, para aumentar a produtividade da metodologia é necessário tornar mais eficaz o método de extracção da PSF experimental, no sentido de que esta apresente uma maior homogeneidade/suavização entre os dados extraídos e o “background” introduzido.

Uma optimização do processo de desconvolução tridimensional pode ser conseguida com uma correcta selecção da pilha 3D de imagens, seleccionando apenas os planos de Z de maior relevância. Deste modo são reduzidas as dimensões da pilha tridimensional a desconvoluir e por consequência reduzido o tempo de processamento computacional, factor muito importante para uma aplicação corrente da técnica.

Numa prática alternativa ou de comparação deve-se também recorrer às PSFs teóricas de maior abertura, e aplicar os algoritmos lineares não iterativos como o filtro de Wiener para desconvoluir a pilha de imagens 3D. Neste caso a dimensão da matriz tridimensional não é tão crítica, pois como se trata de um algoritmo não iterativo de processamento rápido, pode desconvoluir-se uma matriz com mais planos axiais. Nestes casos, a utilização de uma PSF teórica, exibindo padrões de cones simétricos acima e abaixo do ponto de luz central, mostra-se viável, tendo em consideração que a reduzida espessura das amostras em análise e o facto de se usar uma lente objectiva de imersão em óleo, são factores que induzem um maior grau de simetria vertical.

Como proposta de trabalho futuro corroboro a sugestão de aplicação deste sistema de microscopia de varrimento vertical em ambiente hospitalar, no sentido de possibilitar a obtenção de discriminação vertical para um número diferenciado de amostras, permitindo a aplicação da técnica em diferentes células e patologias associadas. Esta prática possibilitaria a validação, de forma mais abrangente, da metodologia e facultaria ainda a implementação e aperfeiçoamentos da técnica em função de eventuais novas problemáticas.



## Bibliografia

---

- [1] Abramowitz M., Spring K. R., Parry-Hill M., Flynn B.O., Tchourioukanov K. I., Fellers T. J. & Davidson M. W., “The Physics of Light and Color”, Microscopy Resource Center, Olympus.  
(<http://www.olympusmicro.com/primer/lightandcolor/index.html>)
- [2] Booddeke F. R., “Quantitative Fluorescence Microscopy”; PhD in Delft University of Technology, 1999.
- [3] Born M., & Wolf E., “Principles of Optics - Electromagnetic theory of propagation Interference and Diffraction of Light”; Sixth edition, Oxford, England, 1980.
- [4] Butkov E., “Mathematical Physics”, St. John’s University, New York, 1968.
- [5] Carl Zeiss, “Operating Manual Axioskop 40 / 40 Fl, Routine microscope”, 2001.
- [6] Carlsson K., “Light Microscopy”; Physics of Biomedical Microscopy, Physics Dept., KTH, Stockholm, 2005.
- [7] Cascalheira J., Mendiratta S. K. & Costa M. C., “Simultaneous (almost) imaging of intracellular Ca<sup>2+</sup> and Na in Sea-urchin oocyte by using a tunable liquid crystal filter” D.F. University of Aveiro, Portugal, October 2003.
- [8] Conchello J.-A., “Fluorescence photobleaching correction for expectation-maximization algorithm”; Institute for Biomedical Computing, Washington University; SPIE 2412-21, 1994.
- [9] Corrons J.-L. V., “Chronic non-spherocytic haemolytic anaemia due to congenital pyrimidine 50 nucleotidase deficiency: 25 years later”; Baillière's Clinical Haematology; Vol. 13, No. 1, pp. 103-118, 2000.

- 
- [10] Dacie J. V. & Lewis S. M., “Practical Haematology”, 1995.
- [11] Ellenberger S. L., “Influence of defocus on measurements in microscope images”; PhD in Delft University of Technology, 2000.
- [12] Ferreira M., “Óptica e Fotónica”; ed. Lidel, Universidade de Aveiro, 2003.
- [13] Gibson S. F. & Lanni F., “Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy”; Optical Society of America A, Vol. 8, n.10, October 1991.
- [14] Gonzalez R., Woods R. & Eddins S., “Digital Image Processing Using Matlab”, Prentice Hall, 2003; *Wikipedia*.  
([http://en.wikipedia.org/wiki/Wiener\\_deconvolution](http://en.wikipedia.org/wiki/Wiener_deconvolution))
- [15] Haeberlé O., “Focusing of light through a stratified medium: a practical approach for computing microscope point spread functions. Part I: Conventional microscopy”; Elsevier Science; Optics Communications 216 (2003), 55-63; November 2002.
- [16] Haeberlé O., Ammar M., Furukawa H., Tenjimbayashi K. & Török P., “Point spread function of optical microscopes imaging through stratified media”; Optics Express 2964, Vol. 11, No. 22; November 2003.
- [17] Haemopoiesis, “Formation of blood cells (Haemopoiesis)”, 1999.  
(<http://www.fortunecity.com/greenfield/rattler/46/intro.htm>)
- [18] Hanser B. M., Gustafsson M. G. L., Agard D. A., & Sedat J. W., “Phase-retrieved pupil functions in wide-field fluorescence Microscopy” ; Journal of Microscopy, Vol. 216, pp. 32–48; May 2004.
- [19] Hecht E., “Óptica”, 2ª edição, Versão traduzida por Rebordão J. M. N.V., Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.
- [20] Hematovision 4, Abx diagnostics, [Opus.species@wanadoo.fr](mailto:Opus.species@wanadoo.fr).

- [21] Hiraoka Y., Sedat J. W., & Agard D. A., “Determination of three-dimensional imaging properties of a light microscope system Partial confocal behaviour in epifluorescence microscopy”; *Biophysics Journal and Biophysical Society*, Vol.57, 325-333; February 1990.
- [22] Hoffbrand A. V., Pettit J. E., “Essential Haematology”, third edition, 1993.
- [23] Holmes T. J., “Background of Deconvolution”; *AutoQuant Imaging*, 2004.
- [24] Hueber N., Colicchio B., Dieterlen A. & Jacquy S., “Zernike polynomial applications in 3-D fluorescence microscopy”; *Lab.EL, Equipe MIPS, Université de Haute Alsace*; 2003.
- [25] Jianga M. & Wang G., “Development of blind image deconvolution and its applications”; *Journal of X-Ray Science and Technology* 11 (13–19); 2003.
- [26] Kam Z., Hanser B., Gustafsson M. G. L., Agard D. A. & Sedat J. W., “Computational adaptive optics for live three-dimensional biological imaging”; *PNAS*, 3790–3795, Vol. 98, no.7; March 2001.
- [27] Kempen G. M. P., “Image Restoration in Fluorescence Microscopy”; PhD, Delft University, The Netherlands, 1999.
- [28] Lai X., Lin Z., Ward E. S. & Ober R. J., “Noise suppression of point spread functions and its influence on deconvolution of three-dimensional fluorescence microscopy image sets”; *Journal of Microscopy*, Vol. 217, pp. 93–108; January 2005.
- [29] Laksameethanasan D., Brandt S. S. & Engelhardt P., “A Three-Dimensional Bayesian Reconstruction Method with the Point Spread Function for Micro-Rotation Sequences in Wide-Field Microscopy”; *IEEE*, 2006.
- [30] Malkusch W., “Trends in Quantitative Image Analysis”, *tolls&techniques*, Carl Zeiss Vision GmbH, Eching, Germany. ([www.bioprodmag.com](http://www.bioprodmag.com))

- 
- [31] Matlab 7, s.p.1, “Imaging Processing Toolbox: Deconvolution Algorithms”, Matlab Help, The MathWorks, Inc, 2004.
- [32] Matlab 7, s.p.1, “Matlab Function reference”, Matlab Help, The MathWorks, Inc, 2004.
- [33] Matsumoto E. Y., Matlab 6.5 – Fundamentos de Programação, São Paulo, 1ª edição, 2002.
- [34] McDonald J., “Optical Microscopy”, Microelectronics Failure Analysis, p. 542, ASM International. 2004; *Wikipedia*.  
([http://en.wikipedia.org/wiki/Light\\_microscope](http://en.wikipedia.org/wiki/Light_microscope))
- [35] McNally J.G., Karpova T., Cooper J. & Conchello J. A., “Three-Dimensional Imaging by Deconvolution Microscopy”; *Methods* 19, 373-385, 1999.
- [36] Monvel J. B., Scarfone E., Calvez S. & Ulfendahl M., “Image Restoration for Confocal Microscopy: Improving the Limits of Deconvolution, with Application to the Visualization of the Mammalian Hearing Organ”; *Biophysical Journal*, Vol.80, 2455-2470, May 2001.
- [37] Monvel J. B., Scarfone E., Calvez S. & Ulfendahl M., “Image-Adaptive Deconvolution for Three-Dimensional Deep Biological Imaging”; *Biophysical Journal*, Vol. 85, 3991–4001; December 2003.
- [38] Paglia D. E. & Valentine W. N., “Characteristics of a pyrimidine-specific 5'-nucleotidase in human erythrocytes”; *Journal of Biological Chemistry*; Vol. 250, No. 20, Issue of October 25, pp. 7973-7979, 1975.
- [39] Philip J., & Carlsson K., “3D image deconvolution in light microscopy: theory and practice”; Royal Institute of Technology; Sweden; 2000.
- [40] Piller H., “Microscope Photometry”; Heidelberg, Berlin, 1977.
- [41] Preza C., & Conchello, J.-A., “Image estimation accounting for point-spread function depth variation in three-dimensional fluorescence microscopy”; 3D

- and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing X, Proc. SPIE, vol. 4964, 27, 2003.
- [42] Rees D., & Duley J., & Marinaki A., “Review: Pyrimidine 5’ Nucleotidase deficiency”; British Journal of Haematology, 120, 375-383, 2003.
- [43] Reis C. M. G., “Microscopia”, Biologia Celular, Instituto Politécnico de Castelo Branco, 2003.
- [44] Rubbi C. P., “Light Microscopy (Essential Data), D. Rickwood and B.D. Hames, Department of Biology” University of Essex, Colchester, UK, 1994.
- [45] Russ J. C., “The Image Processing Handbook”; Second edition., Materials Science and Engineering Department North Carolina State University Raleigh, North Carolina; 1995.
- [46] Santos R. E., “Microscópio Óptico”, RA: 001148.
- [47] Sarder P., & Nehorai A., “Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images”; IEEE, Signal Processing Magazine, May 2006.
- [48] Scalettar B., Swedlow J., Sedat J. & Agard D, “Dispersion, aberration and deconvolution in multi-wavelength fluorescence images”; Journal of Microscopy, vol.182, pp. 50–60, April 1996; November 1995.
- [49] Schlecht J., Barnard K. & Pryor B., “Statistical Inference of Biological Structure and Point Spread Functions in 3D Microscopy”; Third International Symposium on 3D Data Processing, Visualization and Transmission, June 2006; IEEE.
- [50] Slavík J., “Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes”; Czech Academy of sciences, Prague, Czech Republic, 1996.
- [51] Sotthivirat S., “Statistical Image Recovery Techniques for Optical Imaging Systems”; PhD, Electrical Engineering: Systems, in University of Michigan, 2003.



- [52] Spring K. R., Davidson M.W., “Depth of Field and Depth of Focus”; Basic Concepts and Formulas in Microscopy, Microscopy tutorials. (<http://www.microscopyu.com/articles/formulas/formulasfielddepth.html>)
- [53] Taylor D.L., & Yang Y.-L., “Fluorescence Microscopy of living cells in culture, Part B – Quantitative Fluorescence microscopy and Spectroscopy”; Department of Biological Sciences University of California, Santa Barbara, California, 1989.
- [54] Valdecasas A., Marshall D., Becerra J. & Terrero J., “On the extended depth of focus algorithms for bright field microscopy”; Micron 32 (2001) 559-569; Elsevier Science; August 2000.
- [55] Vicidomini G., “3D Image Restoration in Fluorescence Microscopy”; PhD Computer Science Proposal Thesis; University of Genoa, Italy 2005.
- [56] Vitrià J. & Llacer J., “Reconstructing 3D light microscopic images using the EM algorithm”; Elsevier Science; Pattern Recognition Letters 17, 1491-1498; September 1996.
- [57] Vonesch C., Aguet F., Vonesch J.-L., & Unser M., “The Colored Revolution of Bioimaging”; IEEE, Signal Processing Magazine, May 2006.
- [58] Wallace W., Schaefer L. H., Swedlow J. R., “Artefacts and Aberrations in Deconvolution Analysis”; Deconvolution in Optical Microscopy, Microscopy Resource Center, Olympus. (<http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/deconvolution/deconartifacts.html>)
- [59] Wallace W., Schaefer L. H., Swedlow J. R., “Introduction: Deconvolution in Optical Microscopy”, Microscopy Resource Center, Olympus. (<http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/deconvolution/deconintro.html>)
- [60] Wallace W., Schaefer L. H., Swedlow J. R., “Resolution Criteria and Performance Issues”; Deconvolution in Optical Microscopy, Microscopy

Resource Center, Olympus.

(<http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/deconvolution/deconresolution.html>)

- [61] Wallace W., Schaefer L. H., Swedlow J. R., Biggs D., “Algorithms for Deconvolution Microscopy”; Deconvolution in Optical Microscopy, Microscopy Resource Center, Olympus.

(<http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/deconvolution/deconalgorithms.html>)

- [62] Wallace W., Schaefer L. H., Swedlow J. R., Fellers T. J., & Davidson M. W., “Deconvolution in Optical Microscopy”, Microscopy Resource Center, Olympus.

(<http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/deconvolution/deconvolutionhome.html>)

- [63] *Wikipedia*, “[Microscopy](http://en.wikipedia.org/wiki/Microscopy)”, *Wikipedia*. ([arranjar artigo ou livro.. da referencia e tb – \[14\] e \[34\]\) \(http://en.wikipedia.org/wiki/Microscopy\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Microscopy)

- [64] Young I.T., Zagers R., Vliet L. J., Mullikin J., Boddeke F., Netten H., “Depth-of-Focus in Microscopy”; Pattern Recognition Group of the Faculty of Applied Physics, Delft University of Technology; 8th Scandinavian Conference on Image Analysis, Tromso, Norway, 493-498, 1993.

- [65] G & C Miriam Co. Springfield, MA S, "Webster's New International Dictionary of the English Language", 1911.

(<http://srufaculty.sru.edu/david.dailey/public/machines.html>)



## Apêndice A: Abreviaturas e Nomenclaturas

---

AN – abertura numérica;

*Background* – “imagem de fundo”;

*Blurring* – desfocagem da imagem, por aparecimento de manchas difusas;

c – velocidade da luz no vácuo ( $c = 3 \cdot 10^8$  m/s);

c.d.o. – comprimento de onda;

CCD: *Charge Couple Detector* – detector de carga acoplada;

CM – centro de massa;

*Deblurring* – eliminação/extracção da desfocagem (*blurring*);

h – Constante de Planck ( $h = 6,63 \cdot 10^{-34}$  J.s);

Hb – Hemoglobina;

i.e. – isto é, derivado do latim “*id est*”;

*In situ* – no seu meio de origem;

*In vivo* – em organismos vivos;

*In-focus* – imagem focada;

LCTF: “Liquid Crystal Tunable Filter” – filtro sintonizável de cristais líquidos;

*Out-of-focus* – imagem desfocada, contribuição do desfoco da imagem;

P5N – *pirimidina 5 nucleotidase*;

*Phantom* – modelos criados sinteticamente;

PSF: “Point Spread Function” – resposta impulsional de um sistema óptico;

px – píxel;

RNA: “ribonucleic acid” – ácido ribonucleico;

*Setup* – montagem experimental;

SLI – Sistema Linear Invariante;

*Smooth* – métodos de suavização;

SNR: *Signal Noise Ratio* – razão sinal/ruído;

u.a. – unidades arbitrárias;

Voxel – unidade elementar da imagem 3D adquirida;

*Z'scan* – varrimento vertical (segundo o eixo *Z*), para obtenção de diferentes planos de profundidade da amostra;

$\lambda$  – comprimento de onda;

$\sigma$  – Desvio padrão;

$\nu$  – frequência da luz;

$\neq_s$  – diferentes;

2D – bidimensional;

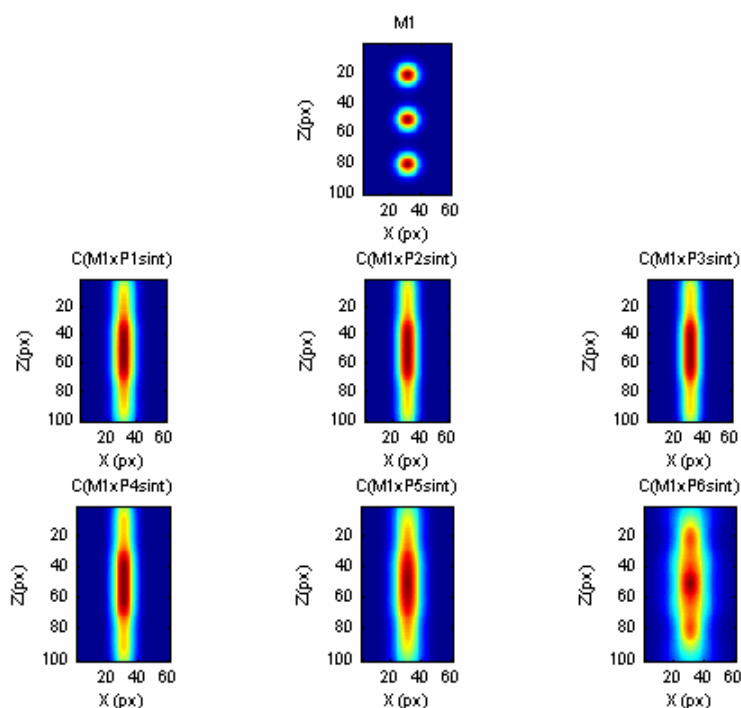
3D – tridimensional.

## Apêndice B: Figuras

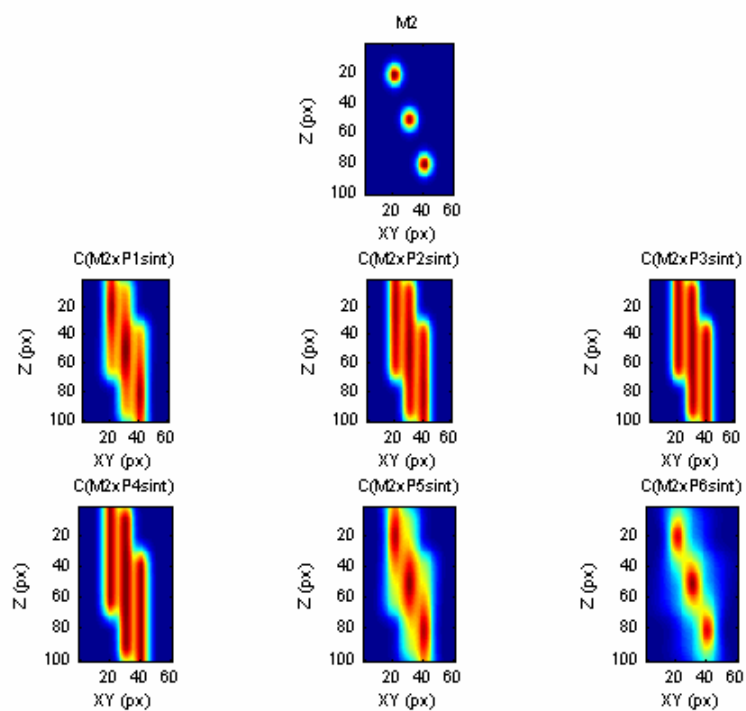
### 1. Dados Sintéticos

#### 1.1. Convolução

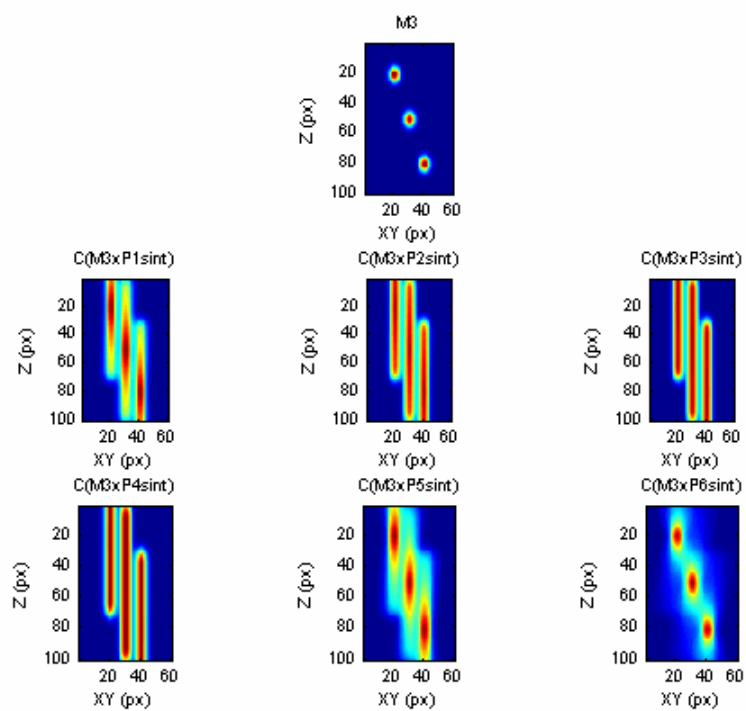
A operação de convolução foi efectuada por aplicação de transformadas de Fourier (FFT) dos diferentes objectos virtuais (M1, M2, M3 e M4) respectivamente com as diferentes PSF teóricas: [ (P1, P2, P3, P4, P5, P6) sint ] .



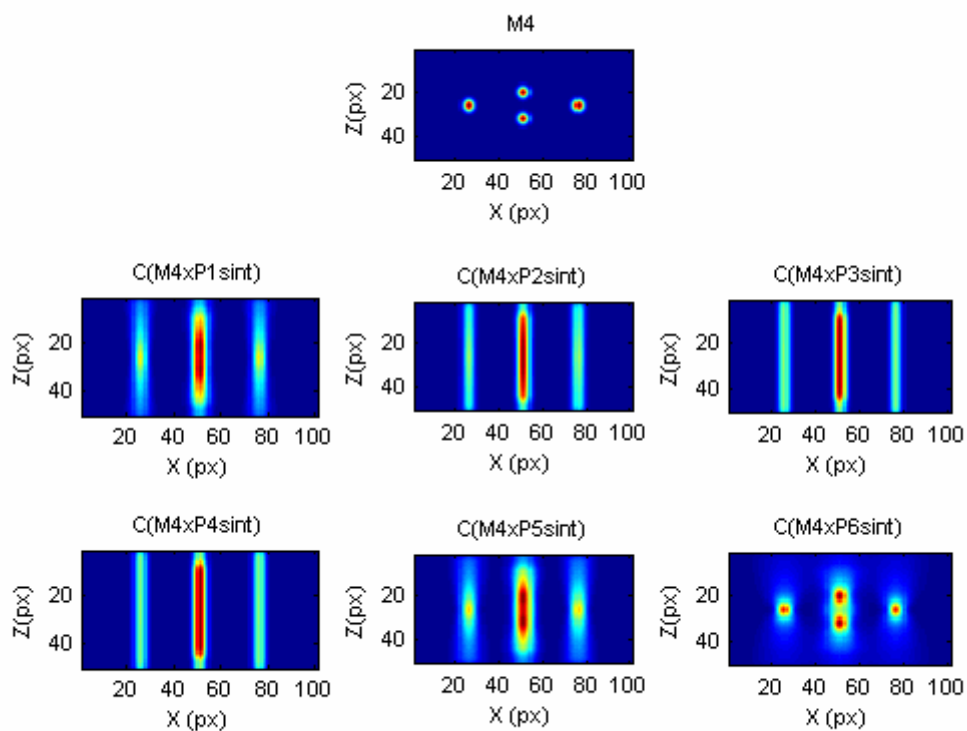
**Figura(B) 1:** Sequência de imagens dos planos sagitais da matriz M1, e da convolução de M1 com as diferentes PSF teóricas: Conv [  $M1 * (P(1,2,3,4,5,6)sint)$  ], identificadas no título de cada plano. O método de convolução foi matematicamente efectuado por transformadas de Fourier.



**Figura(B) 2:** Legenda correspondente à da **Figura(B) 1**, respectivamente para a Matriz sintética M2.



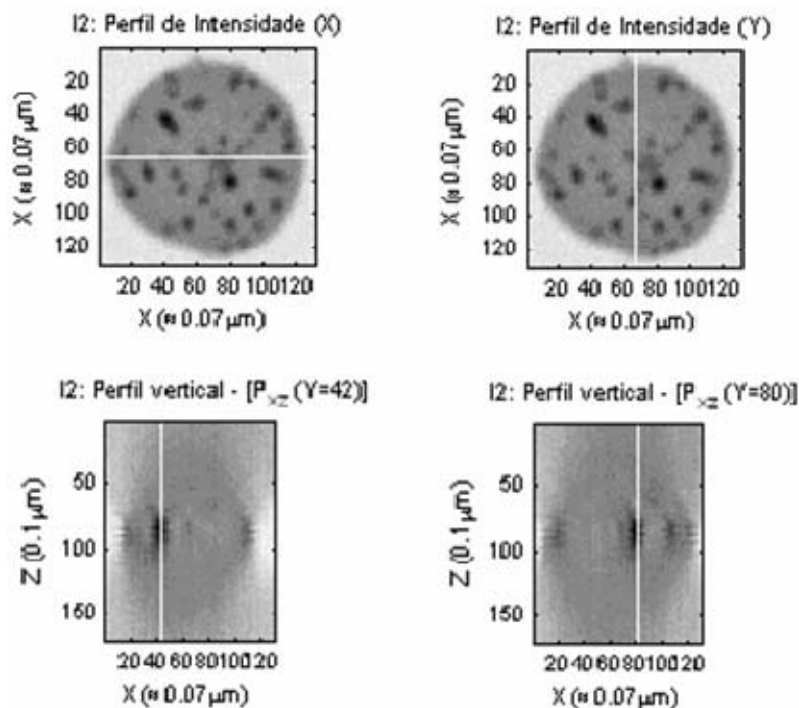
**Figura(B) 3:** Legenda correspondente à da **Figura(B) 1**, respectivamente para a Matriz sintética M3.



**Figura(B) 4:** Legenda correspondente à da *Figura(B) 1*, respectivamente para a Matriz sintética M4.



## 2. Amostras Biológicas



**Figura(B) 5:** Diagrama exemplificativo dos perfis analisados em diferentes figuras no capítulo dos *Resultados*, relativos à amostras biológicas. Nos planos axiais do topo, apresenta-se o perfil horizontal ao longo eixo X na imagem da direita, e à esquerda o perfil horizontal ao longo eixo Y. Os planos sagitais que aparecem nas imagens de fundo caracterizam os perfis verticais de intensidade ao longo do eixo dos ZZ, que passam no centro de dois pontos basófilos distintos na célula.