

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA  
COMPUTAÇÃO

**RESTAURAÇÃO DE IMAGENS DE MICROSCOPIA  
CONFOCAL UTILIZANDO TÉCNICAS POCS**

Murilo Stelzer

SÃO CARLOS - SP

2005

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S824ri

Stelzer, Murilo.

Restauração de imagens de microscopia confocal  
utilizando técnicas POCS / Murilo Stelzer. -- São Carlos :  
UFSCar, 2005.

72 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2005.

1. Processamento de imagens. 2. POCS. 3. Microscopia  
confocal. I. Título.

CDD: 006.42 (20ª)

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação**

***“Restauração de Imagens de Microscopia Confocal  
Utilizando Técnicas POCS”***

**MURILO STELZER**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência da Computação.

**Membros da Banca:**



---

Prof. Dr. Nelson Delfino d'Ávila Mascarenhas  
(Orientador – DC/UFSCar)



---

Prof. Dr. José Hiroki Saito  
(DC/UFSCar)



---

Prof. Dr. Luciano Vieira Dutra  
(INPE/SJC)

**São Carlos**  
**Setembro/2005**

## Resumo

A técnica de Microscopia de Seccionamento Óptico por Computador (COSM) é muito utilizada no estudo morfológico de estruturas celulares. Essa técnica apresenta um grande desafio para a área de processamento de imagens, pois os arquivos tridimensionais possuem grande volume de dados para serem processados.

O principal problema do COSM é o borramento existente, que praticamente inviabiliza a utilização dessa imagem sem o uso de técnicas de processamento de imagem.

Nesse trabalho, foram desenvolvidas técnicas de projeção em conjuntos convexos POCS (*Projection Onto Convex Sets*) de processamento de imagens para a restauração das imagens de COSM, obtidas por microscópio confocal. Embora os microscópios confocais apresentem menor borramento da imagem que os microscópios *wide field*, ele possuem um nível maior de ruído Poisson.

Para atenuar o ruído Poisson foi utilizada a Transformada de Anscombe (AT) e o filtro de Wiener pontual.

Os métodos POCS, foram avaliados através de simulações utilizando imagens sintéticas (*phantoms*), e os resultados foram avaliados através do ISNR (*Improvement Signal to Noise Ratio*) e do UIQ (*Universal Quality Index*).

Os algoritmos desenvolvidos, utilizando RAP (*Row Action Projection*) apresentaram bons resultados, mas o custo computacional para imagem tridimensional é bastante elevado.

## Abstract

Computer Optical Sectioning Microscopy (COSM) is widely used in morphological studies of cellular structures. COSM appears as a great challenge to digital image processing, because the large size of the three-dimensional files.

The major problem in COSM is the blurring, which practically turn the image unusable without the use of digital image processing techniques.

In this work, based on projection onto convex set were developed image processing techniques to restore COSM images, obtained by a confocal microscope. Although confocal microscope presents less blurring than the wide field microscope, it has a larger Poisson noise level.

To reduce the Poisson noise the Anscombe Transform (AT) was used as well a pointwise Wiener Filter.

The POCS methods were evaluated by means of simulations, using synthetic images (phantom), and the results was evaluated by ISNR (Improvement in Signal Noise Ratio) and UIQ (Universal Quality Index).

The developed algorithms, using RAP (Row Action Projection) present satisfactory results, but the computational costs were expensive.

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais Rubens e Nilce Bassetto Stelzer, pelo amor, carinho, apoio e dedicação dados a mim durante todos esses anos.

A minha Irmã Camila Helena por toda a paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda pelo incentivo e amizade.

Aos amigos do GAPIS, Moacir, Fabrício, Yuji, Diego, Gabriel, Alexandre, Gustavo, Luís e por todas as conversas, discussões e amizade durante esses anos de mestrado.

Ao amigo Murillo Rodrigo Petrucelli Homem por todo o auxílio e atenção.

Ao Prof. Dr. Nelson Delfino D'Ávila Mascarenhas pelos ensinamentos e grande paciência, além de todo o apoio dedicado durante o mestrado.

A Dra. Maria de Lourdes Higuchi do INCOR/USP por disponibilizar as imagens do microscópio Confocal.

Ao Martin Andreas Metzger pelo auxílio na obtenção das imagens.

Ao Prof. Dr. Helio Crestana Guardia e Prof. Dr. Célio Estevan Moron por disponibilizar o Cluster.

A todos os funcionários do departamento pela ajuda durante o período do mestrado.

Ao João Paulo Papa pela amizade e paciência na convivência nesses anos na *Kitnet* que chamávamos de casa em São Carlos.

# Sumário

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1.	OBJETIVOS .....	3
1.2.	ORGANIZAÇÃO DO TEXTO.....	4
<b>2.</b>	<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....</b>	<b>5</b>
2.1.	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE IMAGENS .....	5
2.2.	DISCRETIZAÇÃO DA IMAGEM.....	7
2.3.	TRANSFORMADA DE FOURIER.....	8
2.3.1.	<i>Transformada Discreta de Fourier(DFT)</i> .....	9
2.3.2.	<i>Transformada Rápida de Fourier (FFT)</i> .....	10
2.4.	CONVOLUÇÃO.....	10
<b>3.</b>	<b>MICROSCOPIA DE SECCIONAMENTO ÓPTICO .....</b>	<b>12</b>
3.1.	MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	12
3.2.	MICROSCOPIA CONFOCAL.....	14
3.3.	MODELO DE FORMAÇÃO DA IMAGEM .....	17
3.4.	MODELO DISCRETO DA FORMAÇÃO DA IMAGEM .....	20
3.5.	CARACTERIZAÇÃO DO RUÍDO EM COSM.....	21
3.6.	FUNÇÃO DE ESPALHAMENTO PONTUAL (PSF).....	22
<b>4.</b>	<b>RESTAURAÇÃO DE IMAGENS .....</b>	<b>25</b>
4.1.	MODELO DE DEGRADAÇÃO DA IMAGEM .....	25
4.2.	FILTRO INVERSO .....	30
4.3.	FILTRO DE WIENER .....	31
4.4.	REDUÇÃO DO RUÍDO POISSON .....	33
4.4.1.	<i>Estimação por Transformada de Anscombe</i> .....	33
<b>5.</b>	<b>PROJEÇÃO SOBRE CONJUNTOS CONVEXOS.....</b>	<b>36</b>
5.1.	NORMA .....	37
5.2.	PRODUTO INTERNO .....	37
5.3.	ESPAÇO DE HILBERT .....	38
5.4.	CONJUNTOS CONVEXOS.....	38
5.5.	PROJEÇÃO .....	39
5.6.	ALGORITMOS POCS .....	41
5.7.	CONJUNTOS DE RESTRIÇÕES CONVEXOS .....	44
5.7.1.	<i>Row Action Projection</i> .....	44
5.7.2.	<i>RAP3D</i> .....	45
5.7.3.	<i>Conjunto de Restrição de Não Negatividade</i> .....	46

5.7.4.	<i>Conjunto de Restrição de Amplitude Limitada</i> .....	47
5.7.5.	<i>Conjunto de Restrição de Imagem Referência</i> .....	47
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
6.1.	IMAGEM DE TESTE (PHANTOM) .....	49
6.2.	REDUÇÃO DO RUÍDO POISSON .....	53
6.3.	RAP.....	56
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>68</b>
7.1.	TRABALHOS FUTUROS .....	69
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>70</b>



## Lista de Figuras

FIGURA 2-1: REPRESENTAÇÃO DE UM SENSOR FOTOSENSÍVEL - MODIFICADO DE GONZALEZ E WOODS [GONZALES E WOODS- 2001] .....	6
FIGURA 2-2: SISTEMA DE COORDENADAS UTILIZADO NA REPRESENTAÇÃO DE UMA IMAGEM.....	7
FIGURA 3-1: ESQUEMA ÓPTICO DE UM MICROSCÓPIO <i>WIDE FIELD</i> – EXTRAÍDA DA TESE DE DOUTORADO [HOMEM – 2003]. .....	13
FIGURA 3-2: ESQUEMA ÓPTICO DE UM MICROSCÓPIO CONFOCAL [NIKON].....	15
FIGURA 3-3: SISTEMA DE ESCANEAMENTO ÓPTICO DE UM MICROSCÓPIO CONFOCAL [NIKON].....	16
FIGURA 3-4: DIAGRAMA DE BLOCOS DE UM MICROSCÓPIO CONFOCAL [NIKON].....	16
FIGURA 3-5: SISTEMA SIMPLIFICADO DE FORMAÇÃO DE IMAGEM EM MICROSCÓPIO ÓPTICO [CASTLEMAN 1996] .....	17
FIGURA 4-1: MODELO DE DEGRADAÇÃO DE UMA IMAGEM. ....	25
FIGURA 5-1: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS CONJUNTOS C1 E C2.....	39
FIGURA 5-2: (A) RETA $L$ E A PERPENDICULAR A ELA PASSANDO PELO PONTO $X$ . (B) CÍRCULOS CENTRADOS EM $Y$ ONDE É POSSÍVEL VER QUE SOMENTE UM DELES TOCA O DISCO $D$ EM APENAS UM PONTO $Y^*$ .....	40
FIGURA 5-3: PROCESSO ITERATIVO DO ALGORITMO DE POCS SEQUÊNCIAL .....	41
FIGURA 5-4: (A) ALGORITMO PARALELO PARA CONJUNTOS COM INTERSECÇÃO (B) ALGORITMO PARALELO PARA CONJUNTOS SEM INTERSECÇÃO .....	42
FIGURA 6-1: TODAS AS FATIAS ( <i>SLICES</i> ) DO <i>PHANTOM</i> (ORDENADAS DA ESQUERDA PARA DIREITA E DE CIMA PARA BAIXO EM ORDEM DESCENDENTE) .....	50
FIGURA 6-2: PSF – MOSTRA DE TODAS AS FATIAS DO PLANO XY ORDENADOS DA ESQUERDA PARA DIREITA E DE CIMA PARA BAIXO EM ORDEM DESCENDENTE. ....	51
FIGURA 6-3: PSF TODAS AS FATIAS DO PLANO XZ ORDENADOS DA ESQUERDA PARA DIREITA E DE CIMA PARA BAIXO EM ORDEM DESCENDENTE.....	52
FIGURA 6-4: IMAGEM DEGRADADA PELA PSF MOSTRANDO TODAS AS FATIAS DO PLANO XY ORDENADOS DA ESQUERDA PARA DIREITA E CIMA PARA BAIXO ORDENADOS EM ORDEM DESCENDENTE.....	53
FIGURA 6-5: DIAGRAMA DE BLOCOS, REDUÇÃO DE RÚIDO POISSON .....	54
FIGURA 6-6: PHANTOM BORRADO E DEGRADADO COM RÚIDO POISSON. ACIMA CORTE NO PLANO XY E ABAIXO CORTE NO PLANO XZ.....	55
FIGURA 6-7: PHANTOM PROCESSADO PARA REMOÇÃO DO RÚIDO POISSON. ACIMA CORTE NO PLANO XY E ABAIXO CORTE NO PLANO XZ.....	56
FIGURA 6-8: (A) CORTE XZ RAP1D 100 ITERAÇÕES E RELAXAÇÃO 0.03 (B) CORTE XZ RAP1D 200 ITERAÇÕES E RELAXAÇÃO 0.04 (C) CORTE XZ RAP1D 100 ITERAÇÕES E RELAXAÇÃO 2 (D) CORTE XZ RAP1D 200 ITERAÇÕES E RELAXAÇÃO 2.....	59
FIGURA 6-9 : CORTES XY MOSTRANDO RESULTADOS OBTIDOS PELO RAP3D COM CRITÉRIO DE PARADA DE 10 ITERAÇÕES E UTILIZANDO VALORES DE RELAXAÇÃO DIFERENTES: (A) 0,0001 (B) 0,0004 (C) 0.0007 (D) 0,0009.....	60
FIGURA 6-10: IMAGENS RESTAURADAS UTILIZANDO (A)WIENER, (B)GOODMAN-BELSHER, (C)POCS1, (D)POCS2 .....	61

FIGURA 6-11: (A) PHANTOM RESTAURADO USANDO LLS (B) PHANTOM RESTAURADO USANDO EM COM 50 ITERAÇÕES (C) PHANTOM RESTAURADO USANDO EM COM 100 ITERAÇÕES. ....	63
FIGURA 6-12: (A)E(B) IMAGEM ORIGINAL, (C)(D) RAPID 100 ITERAÇÕES (E)(F) CORREÇÃO DE <i>PHOTO- BLEACH</i> E RAPID 100 ITERAÇÕES. ....	65
FIGURA 6-13: NAS IMAGENS (A) CORTE NO PLANO XY (B) CORTE NO PLANO FOI UTILIZADO O RAPID 200 ITERAÇÕES XZ. NAS IMAGENS(C) CORTE NO PLANO XY (D) CORTE NO PLANO XZ FORAM UTILIZADOS A CORREÇÃO DE <i>PHOTO-BLEACH</i> E RAPID 200 ITERAÇÕES. ....	66
FIGURA 6-14: (A) CORTE XY RESTAURADO PELO LLS (B) CORTE XZ RESTAURADO PELO LLS (C) CORTE XY RESTAURADO PELO EM COM 50 ITERAÇÕES (D)CORTE XZ RESTAURADO PELO EM COM 50 ITERAÇÕES (E) CORTE XY RESTAURADO PELO EM COM 100 ITERAÇÕES (F) CORTE XZ RESTAURADO PELO EM COM 100 ITERAÇÕES.....	67

## Lista de Tabelas

TABELA 6-1: REDUÇÃO DA VARIÂNCIA APÓS AT .....	54
TABELA 6-2: ISNR E UIQ – RAP1D, CRITÉRIO DE PARADA 100 ITERAÇÕES.....	57
TABELA 6-3: RESULTADOS UTILIZANDO RAP1D COM CRITÉRIO DE PARADA IGUAL A 200 ITERAÇÕES .....	58
TABELA 6-4: RESULTADOS UTILIZANDO RAP3D COM CRITÉRIO DE PARADA IGUAL A 10 ITERAÇÕES. ....	58
TABELA 6-5: RESULTADOS OBTIDOS POR MÉTODOS POCS .....	62
TABELA 6-6: RESULTADOS UTILIZANDO OS MÉTODOS DE REFERÊNCIA, LLS, EM COM 50 E 100 ITERAÇÕES COMO CRITÉRIO DE PARADA. ....	64

# 1. Introdução

O processamento digital de imagem é a técnica que diz respeito ao tratamento de imagens através de computadores digitais com o objetivo de se melhorar a imagem, segundo algum critério.

As técnicas de processamento digital de imagens são utilizadas nos mais diversos campos do conhecimento, como por exemplo: ciências da terra, astronomia, medicina, biologia, engenharia entre outras.

Em ciências da terra é possível citar como exemplo o processamento de imagens de satélites permitindo a confecção de melhores mapas e ainda obter mais informações sobre as áreas observadas.

Na medicina a grande utilidade está na melhoria da qualidade de imagens do corpo humano, as quais podem ser obtidas pelos mais diversos equipamentos existentes como, por exemplo: raios-X, tomografia, ressonância magnética, ultra-som, entre outras. Com imagens melhores é possível ter um diagnóstico mais rápido e preciso de doenças.

Na área da biologia o processamento de imagem vem sendo utilizado na melhoria de imagens de microscópios e também auxiliando o desenvolvimento de novas técnicas de obtenção de imagens, permitindo observar estruturas e detalhes impossíveis com as técnicas convencionais.

Uma das novas técnicas desenvolvidas na área biológica é a microscopia de fluorescência, a qual é utilizada para se obter detalhes de estruturas intra-celulares.

São utilizados vários tipos de microscópios com a técnica de fluorescência, mas destacam-se, principalmente pela sua relação custo/benefício favorável, os microscópios convencionais (também conhecidos como *wide-field*) e os microscópios confocais.

A técnica consiste basicamente em se dopar – “marcar” – a estrutura que será estudada com o um corante especial, de modo que seja possível observar somente a estrutura desejada.

O corante é denominado fluorocromo. O fluorocromo possui diversas propriedades especiais, como sua alta seletividade a qual permite que se marque somente a estrutura a ser estudada e ainda possui propriedades fluorescentes, ou seja, ao ser estimulado com um comprimento de luz específico, geralmente ultra-violeta, responde gerando luz em outro comprimento de onda, geralmente visível.

Os microscópios utilizados para fluorescência possuem um sistema de filtros ópticos capaz de separar a luz proveniente da fonte excitadora, da luz gerada pelo fluorocromo, permitindo desta maneira registrar somente a imagem originária do espécime, ou mais especificamente da estrutura dopada.

As imagens obtidas com a utilização do microscópio convencional possuem a característica de ter um grande borramento, praticamente impossibilitando o uso dessas imagens sem que haja um pós-processamento. Devido a essa necessidade do pós-processamento é chamada de microscopia de convolução.

Para tentar evitar essa necessidade de processamento é que o microscópio confocal foi desenvolvido, reduzindo em muito o borramento.

O microscópio confocal possui diferenças significativas em relação ao *wide-field*. Pode-se destacar a fonte de luz, o sistema óptico e também o sistema de detecção.

Como fonte de luz o microscópio confocal utiliza um sistema de laser com comprimento de onda específico. Atualmente já existem sistemas lasers que permitem alterar o comprimento de onda para utilizar os mais diversos tipos de fluorocromos.

Utilizando um sistema de lentes e diafragmas consegue-se excitar apenas uma pequena porção do espécime estudado, e permite também que apenas a luz gerada pelo fluorocromo no plano focal chegue ao detector.

O sistema detector é formado geralmente por uma fotomultiplicadora, isso se deve a baixa quantidade de fótons que conseguem passar pelo sistema óptico.

Por causa dessa grande limitação de fótons o microscópio confocal, embora reduza o borramento de forma acentuada, tem problema com ruído, que é muito mais intenso que o convencional.

O ruído é bem modelado por uma distribuição Poisson, pois é dependente da contagem de fótons.

Além desse ruído Poisson, existe mais um ruído o qual é gerado pelos sistemas eletrônicos que é modelado por uma distribuição gaussiana, que além de representar bem esse ruído, é mais fácil de ser tratada.

A microscopia de fluorescência é atualmente ferramenta indispensável para as áreas de microanatomia e histologia permitindo o estudo da estrutura e função dos espécimes fisiológicos. Muitas vezes, no estudo de espécimes, é desejável se obter imagens tridimensionais, de modo a evitar interpretações duvidosas da forma do espécime a partir de imagens bidimensionais.

Atualmente sabe-se, de maneira geral, que a forma das estruturas está fortemente relacionada com sua função, por exemplo, nos estudos neuromorfométricos a descrição de cada forma do espécime é importante, pois a forma da membrana de um neurônio está relacionada com suas propriedades funcionais.

Para a obtenção de imagens tridimensionais normalmente é utilizada a técnica de seccionamento óptico [Agard – 1984 ] [Streibl – 1985].

A técnica consiste basicamente de se variar o plano focal do microscópio de modo a se obter “fatias” do espécime estudado.

Inicialmente essas imagens eram registradas em filmes fotográficos, os quais geralmente eram digitalizados para permitir a utilização de técnicas de processamento digital de imagens.

Atualmente são utilizados sensores eletrônicos como CCD (*Coupled Charged Device*) ou fotomultiplicadora, os quais são acoplados a computadores. O computador não é apenas utilizado para armazenar as imagens, mas também é utilizado no controle do microscópio ajustando os controles de foco, diafragmas e outros recursos, aumentando a qualidade das imagens obtidas e reduzindo o tempo necessário para se obter as imagens. Esse sistema de obtenção de imagens com auxílio de computador é conhecido como COSM (*Computer Optical Sectioning Microscopy*).

## **1.1. Objetivos**

O processamento digital de imagens COSM apresentam até hoje um grande desafio em termos computacionais. Isso se deve ao grande volume de dados que devem ser processados para se obter as imagens tridimensionais

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos para tentar resolver esses problemas comuns à técnica de COSM, mas a utilização de métodos de projeção em conjuntos convexos (POCS – *Projection on Convex Sets*) é raramente utilizada para esse objetivo.

Assim pode-se dizer que o principal objetivo desse trabalho é se obter um método de restauração de imagens utilizando técnicas POCS

## **1.2. Organização do Texto**

O texto está dividido em seis capítulos, organizados da seguinte forma:

- Capítulo 1: Oferece uma introdução ao trabalho.
- Capítulo 2: Apresenta fundamentos de processamento de imagens como técnicas de obtenção de imagem, FFT, convolução.
- Capítulo 3: Apresenta fundamentos de COSM, da técnica de seccionamento óptico, descrição do microscópio confocal, método de obtenção das imagens, obtenção da função de espalhamento, caracterização do ruído.
- Capítulo 4: Apresenta técnicas de restauração de Imagem – teoria de restauração de imagens como filtro inverso, filtro de Wiener e métodos para a redução de ruído.
- Capítulo 5: Apresenta técnicas de POCS – teoria de projeção em conjuntos convexos, teoria de conjuntos convexos, operações fundamentais, algoritmos de POCS e alguns conjuntos de restrições.
- Capítulo 6: Apresenta os resultados obtidos durante a realização desse trabalho.
- Capítulo 7: Apresenta as conclusões do trabalho e a sugestão de trabalhos futuros.

## 2. Fundamentos Teóricos

De modo a permitir o entendimento do trabalho, é necessário fazer um levantamento dos fundamentos teóricos do processamento de imagens, abordando vários assuntos relacionados:

- Processo de obtenção de imagem
- Discretização dos dados
- Transformada de Fourier
- Convolução

### 2.1. *Processo de Obtenção de Imagens*

Uma imagem é uma função bidimensional  $f(x, y)$  onde  $f$  é um valor ou ainda uma amplitude nas coordenadas  $(x, y)$ .

Por ser uma medida de energia, essa função é necessariamente positiva e possui um valor finito, ou seja:

$$0 < f(x, y) < \infty \quad \text{Equação 2.1}$$

A função  $f(x, y)$  pode ser caracterizada por duas componentes:

- Luminância
- Reflectância

A luminância  $i(x, y)$  é a quantidade de luz incidente na cena que está sendo observada.

A reflectância  $r(x, y)$  é a quantidade de energia refletida ou transmitida pelos objetos que compõe a cena.

De posse dessas informações nota-se que:



$$f(x, y) = i(x, y) \cdot r(x, y) \quad \text{Equação 2.2}$$

onde

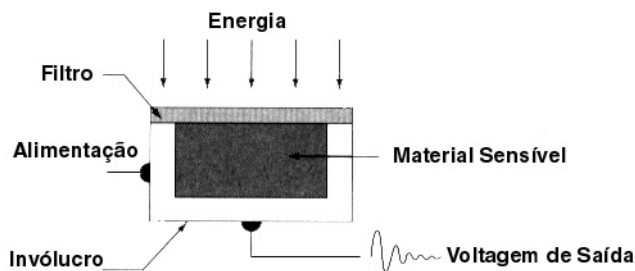
$$0 < i(x, y) < \infty \quad \text{Equação 2.3}$$

e

$$0 < r(x, y) < 1 \quad \text{Equação 2.4}$$

Para se obter os valores de uma imagem  $f(x, y)$ , utiliza-se algum tipo de sensor, o qual pode ser uma fotomultiplicadora, um fotodiodo, ou ainda algum outro sensor desenvolvido especificamente para o tipo de energia a ser detectada.

Na Figura 2-1, é possível ver o esquema básico de um sensor, o qual é basicamente formado por um material especial, sensível à energia que deve ser detectada para a formação da imagem.



**Figura 2-1: Representação de um Sensor Fotosensível - Modificado de Gonzalez e Woods [Gonzales e Woods- 2001]**

Para se obter melhores resultados, pode ser utilizado um filtro entre o sensor e a fonte de energia, de modo a obter uma melhor sensibilidade a um determinado comprimento de onda.

Pode-se reparar que na saída do sensor temos uma voltagem, a qual é proporcional à energia incidente sobre o material sensível, ou seja, quanto maior a intensidade dessa energia, maior a voltagem de saída.

No caso de se utilizar um único sensor, é utilizado um sistema de varredura, o qual acaba deslocando ou o sensor, ou o objeto ou ainda apenas o feixe de energia, de modo que todo o objeto seja analisado.

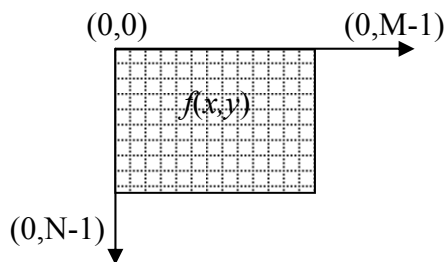
Na microscopia confocal a abordagem mais utilizada atualmente é a de deslocamento do feixe de luz, devido à maior velocidade de varredura que esse método fornece.

## 2.2. Discretização da Imagem

A imagem adquirida por um sensor, como já foi observado é dada por uma função contínua,  $f(x,y)$ , que para ser utilizada em um computador e tornar possível o processamento digital desta imagem, precisa ser devidamente representada de forma discreta, ou seja, de maneira descontínua.

Desse modo, as coordenadas  $(x,y)$  passam a ser agora discretas e normalmente representadas na forma de uma matriz, onde as linhas representam as posições sobre o eixo  $x$  e as colunas as posições sobre o eixo  $y$ .

A fim de facilitar os cálculos e o processamento por computadores digitais, as dimensões da matriz geralmente são dadas por:  $M \times N$  onde  $M$  e  $N$  são potências de 2 de modo a facilitar os cálculos.



**Figura 2-2: Sistema de coordenadas utilizado na representação de uma imagem**

O valor da função  $f(x,y)$  também é discretizado, isto é, quantizado. Esse processo consiste em converter o valor contínuo da função em um valor discreto representado geralmente no intervalo  $[0, 2^k - 1]$  onde  $k$  é um número natural e  $2^k$  é chamado normalmente de número de níveis de cinza da imagem. Se uma imagem possui  $2^4$  níveis de cinza, significa que os valores contínuos da imagem serão representados através de 16 níveis de cinza.

Desse modo, todos os valores utilizados na imagem serão representados por valores inteiros e de forma discreta, permitindo que a imagem seja passível de processamento em um computador digital.

### 2.3. Transformada de Fourier

A transformada de Fourier foi proposta por Jean Baptiste Joseph Fourier, no começo do século XIX e só recentemente, a partir da segunda metade do século XX, teve seu uso difundido.

Fourier afirmou que um sinal periódico pode ser representado por uma soma de senos e cossenos – a série de Fourier.

Mesmo sinais não periódicos, mas desde que a área abaixo da curva que representa esse sinal seja finita, podem ser representados por uma soma de senos e cossenos, utilizando para isso a transformada de Fourier (FT), a qual é representada por  $\mathfrak{F}\{f(x)\}$ . Essa abordagem é até mais útil que o a própria série de Fourier.

A FT de um sinal contínuo unidimensional e representado por  $f(x)$  é dada pela seguinte equação:

$$F(u) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x)e^{-j2\pi ux} dx \quad \text{Equação 2.5}$$

Onde  $j = \sqrt{-1}$

A grande vantagem da FT é que ela pode ser revertida facilmente, utilizando para isso a transformada inversa de Fourier (IFT):

$$f(x) = \int_{-\infty}^{\infty} F(u)e^{j2\pi ux} du \quad \text{Equação 2.6}$$

O conjunto de equações que representa a FT e a IFT é comumente chamado de “Par de Fourier”.

A FT pode ser estendida facilmente para o caso bidimensional bastando acrescentar as variáveis necessárias.

A FT de um sinal bidimensional, contínuo e representado por  $f(x, y)$  é fornecida por:

$$F(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y)e^{-j2\pi(ux+vy)} dx dy \quad \text{Equação 2.7}$$

De maneira análoga ao caso unidimensional, a FT pode ser revertida pela IFT

$$f(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(u, v) e^{j2\pi(ux+vy)} du dv$$

**Equação 2.8**

Contudo, a FT não é interessante, pois como já foi exposto no tópico anterior, para uma imagem ser processada em um computador é necessário se utilizar representações discretas dessa imagem.

### 2.3.1. Transformada Discreta de Fourier(DFT)

A transformada discreta de Fourier (DFT) de um sinal discreto unidimensional  $f(x) | x = 0, 1, 2, \dots, M-1$  é dada por

$$F(u) = \frac{1}{M} \sum_{x=0}^{M-1} f(x) e^{-j2\pi ux/M} \text{ para } u = 0, 1, 2, \dots, M-1$$

**Equação 2.9**

Do mesmo modo que no caso contínuo, é possível, a partir de  $F(u)$  encontrar  $f(x)$  para o caso discreto através da transformada discreta inversa de Fourier(IDFT)

$$f(x) = \frac{1}{M} \sum_{u=0}^{M-1} F(u) e^{j2\pi ux/M} \text{ para } x = 0, 1, 2, \dots, M-1$$

**Equação 2.10**

Freqüentemente o multiplicador  $\frac{1}{M}$  é removido da Equação 2.10.

É possível também estender o caso discreto unidimensional para o caso bidimensional, de modo que imagens discretas possam ser computadas.

Assim sendo, para o caso de uma imagem discreta e bidimensional  $f(x, y)$  para  $x = 0, 1, 2, \dots, M-1$  e  $y = 0, 1, 2, \dots, N-1$  a DFT bidimensional é dada por:

$$F(u, v) = \frac{1}{MN} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) e^{-j2\pi(ux/M+vy/N)}$$

**Equação 2.11**

E, como no caso unidimensional, a DFT é calculada para valores de  $u$  e  $v$  nos intervalos:  $u = 0, 1, 2, \dots, M-1$  e  $v = 0, 1, 2, \dots, N-1$ .

A operação inversa, ou seja, a que permite calcular  $f(x, y)$  a partir de  $F(u, v)$  é feita pela transformada discreta inversa de Fourier (IDFT) a qual é fornecida por:

$$f(x, y) = \sum_{u=0}^{M-1} \sum_{v=0}^{N-1} F(u, v) e^{j2\pi(ux/M+vy/N)}$$

**Equação 2.12**

### 2.3.2. Transformada Rápida de Fourier (FFT)

A complexidade computacional para se calcular uma DFT é grande. Para um sinal unidimensional de comprimento  $M$ , são necessárias aproximadamente  $M^2$  operações de soma e multiplicação.

O algoritmo FFT é um dos principais motivos para a grande importância da transformada de Fourier, pois permite calcular a mesma DFT do caso anterior com apenas  $M \log_2 M$  operações de soma e multiplicação.

Utilizando como exemplo um sinal com comprimento  $M=1024$ , o método de DFT irá executar aproximadamente  $10^6$  operações, por outro lado utilizando-se o algoritmo FFT esse mesmo cálculo é feito com aproximadamente  $10^4$  operações.

Aparentemente essa diminuição é pequena (1 para 100), mas no caso de se utilizar sinais de maiores comprimentos essa vantagem aumenta, por exemplo utilizando  $M=8192$  a redução no volume dos cálculos é de aproximadamente 600 vezes.

Vale lembrar que esse desempenho obtido em sinais unidimensionais também é observado com maior intensidade em sinais bidimensionais – imagens – pois a abordagem que o algoritmo utiliza para esses sinais é a de decomposição desse sinal bidimensional em um outro unidimensional e o volume de dados é geralmente bem maior.

## 2.4. Convolução

Para que seja possível utilizar técnicas de filtragem linear espacial, é necessária a utilização de uma operação matemática fundamental, a convolução, que é denotada por:

$$g(x,y) = f(x,y) * h(x,y) \quad \text{Equação 2.13}$$

Onde  $f(x,y)$  é a imagem original,

$h(x,y)$  é o filtro

e o operador  $*$  representa a convolução espacial.

Essa operação, envolvendo funções bidimensionais, pode ser descrita também como uma integral dupla:

$$g(x, y) = f(x, y) * h(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(\alpha, \beta) \cdot h(x - \alpha, y - \beta) d\alpha d\beta \quad \text{Equação 2.14}$$

A convolução também pode ser efetuada no domínio da frequência, através de uma multiplicação ponto a ponto das matrizes, como é possível ver:

$$f(x, y) * h(x, y) \Leftrightarrow F(u, v) \cdot H(u, v) \quad \text{Equação 2.15}$$

Essa propriedade da convolução poder ser representada no domínio da frequência como uma multiplicação pontual é uma das principais propriedades convolução.

Embora possa parecer dispendioso calcular a FFT de um sinal, efetuar a multiplicação e depois finalmente resolver a IFFT, isso não é verdade devido à redução do custo computacional, a qual foi discutida na seção anterior.

### **3. Microscopia de Seccionamento Óptico**

Este capítulo tem como objetivo cobrir os fundamentos utilizados na técnica de seccionamento óptico, mas para isso é preciso cobrir a técnica de microscopia de fluorescência e ainda os princípios de funcionamento do microscópio confocal.

Não é objetivo dessa dissertação e nem pretensão do autor fazer um estudo completo sobre microscopia de fluorescência e nem sobre o microscópio confocal, mas sim fornecer subsídios para que o leitor se interesse dessas técnicas de modo a poder acompanhar o desenvolvimento desta dissertação em restauração de imagens tridimensionais.

#### **3.1. Microscopia de Fluorescência**

Microscopia de fluorescência é uma técnica utilizada por ser capaz de fornecer informações específicas de materiais orgânicos e estruturas celulares vivas [Davidson e Abramowitz (2002)].

A técnica consiste em se utilizar um corante fluorescente (fluorocromo) que, quando excitado com uma fonte de luz com comprimento de onda específico, responde emitindo luz em outro comprimento de onda. A principal função do fluorocromo é “dopar”, isto é, marcar a célula ou estrutura a ser estudada. Esse corante é extremamente seletivo, agregando-se somente a estruturas específicas, delineando regiões fluorescentes e não fluorescentes, as quais permitem um estudo detalhado da estrutura dopada.

Na Figura 3-1 é possível ver o esquema de um sistema *wide field*.

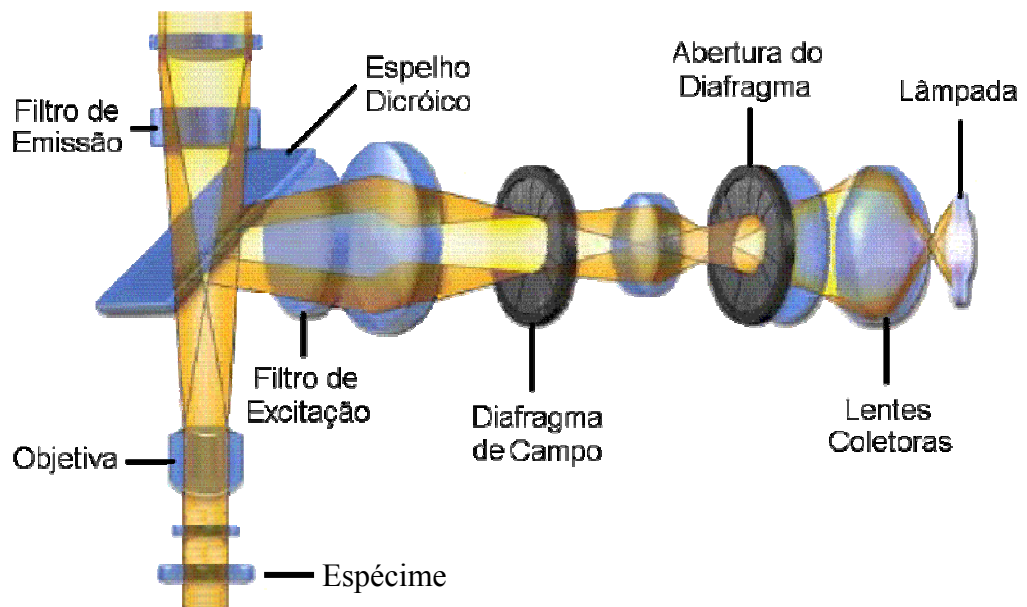
A fonte de luz (normalmente ultravioleta) consiste geralmente de uma lâmpada de vapor de mercúrio (HBO). A luz gerada é guiada por um conjunto de espelhos, diafragmas, filtros e lentes até o espécime.

Um filtro é utilizado para permitir que apenas o comprimento de luz específico de excitação seja projetado sobre o espécime.

Como é possível observar na Figura 3-1 as objetivas possuem também a função de condensadores.

A luz que incide no espécime excita o fluorocromo que responde emitindo luz em um comprimento de onda muito maior, geralmente no espectro visível. Esta luz é irradiada de forma esférica em todas as direções, independente da fonte de excitação, sendo então captada pela objetiva.

A luz captada pela objetiva passa então pelo espelho dicróico, sendo então separada da luz excitadora, permitindo apenas a passagem da luz gerada pelo espécime a qual é então novamente filtrada, garantindo que somente a luz gerada chegue a ocular ou então ao sensor que irá registrar a imagem.



**Figura 3-1: Esquema Óptico de um Microscópio *wide field* – Extraída da Tese de Doutorado [Homem – 2003].**



### 3.2. **Microscopia Confocal**

A microscopia de fluorescência utilizando o microscópio confocal tem os mesmos princípios gerais da *wide field*, mas possui diferenças funcionais importantes devido a características de construção do equipamento.

O microscópio confocal foi desenvolvido e patenteado em 1955 por Marvin Minsky. O sistema era bastante simples, principalmente a parte de aquisição da imagem, que era registrada em um osciloscópio de radar de longa persistência de uso militar, o que permitia visualizar o espécime por aproximadamente dez segundos [Minsky 1988].

A Figura 3-2 permite ver o caminho óptico de um microscópio confocal.

A fonte de luz normalmente é formada por um *laser*, o qual muitas vezes possui um sistema que permite, de maneira simples, alterar o comprimento de onda do feixe de luz emitido, permitindo que vários tipos de fluorocromos sejam utilizados.

Novamente a luz é direcionada até o espécime através de espelhos, diafragmas, filtros e lentes.

A principal diferença do *wide field* está na abertura utilizada nos diafragmas, que é muito menor, permitindo que a luz excitadora seja localizada quase que exclusivamente sobre o plano focal, evitando desse modo a excitação do fluorocromo fora dessa região, reduzindo de maneira drástica a geração do borramento.

A luz emitida pelo espécime, que tem o comprimento de onda diferente da excitadora, é coletada pela objetiva e passa pelo espelho dicróico, mas antes de chegar à fotomultiplicadora passa por um outro diafragma com abertura bem reduzida, de modo a ser considerada quase que somente a luz proveniente do plano focal.

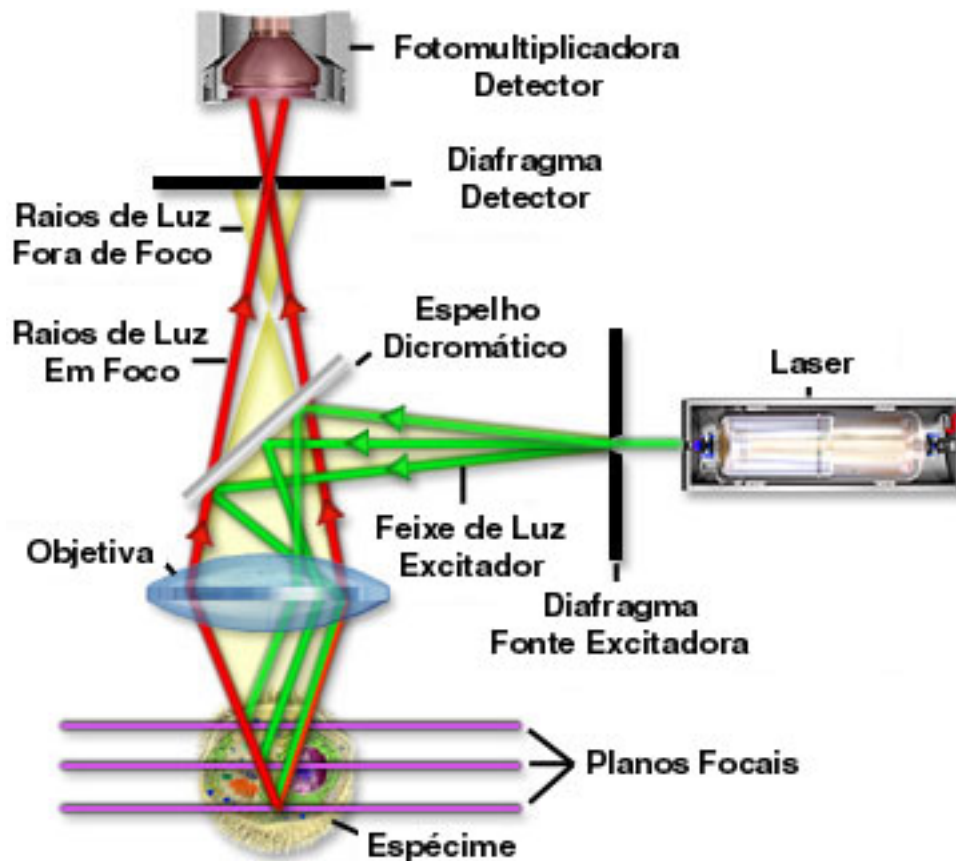


Figura 3-2: Esquema óptico de um Microscópio Confocal [Nikon]

A microscopia confocal também é conhecida como microscopia de escaneamento. Isto se deve ao processo utilizado para se obter uma imagem integral do espécime, pois, como somente o ponto focal é detectado pela fotomultiplicadora, é necessário utilizar um sistema de varredura de modo que seja possível registrar todo o espécime.

No início, utilizava-se o deslocamento do espécime, mantendo a fotomultiplicadora e toda a óptica do microscópio estática, mas essa abordagem foi sendo abandonada devido ao grande tempo necessário para se obter uma imagem completa, muitas vezes impossibilitando a realização de um experimento.

Atualmente utilizam-se conjuntos de espelhos, lentes móveis e também discos perfurados, de modo a percorrer o espécime apenas com o deslocamento dos raios de luz, não alterando a posição do espécime e nem da fonte de luz ou da fotomultiplicadora.

A Figura 3-3 ilustra uma das várias montagens possíveis para o sistema de varredura óptico.

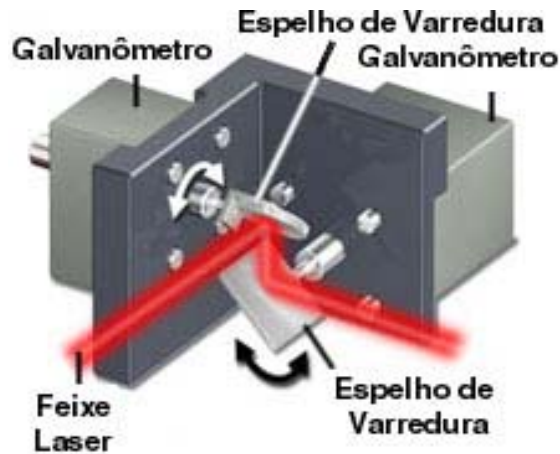


Figura 3-3: Sistema de escaneamento óptico de um Microscópio Confocal [Nikon]

É possível observar na Figura 3-3 que os espelhos são controlados por galvanômetros, de modo a permitir o deslocamento preciso do feixe óptico, fazendo o escaneamento do espécime tanto no sentido X quanto no Y.

Para controlar o plano focal, com o intuito de se fazer o seccionamento no eixo Z, normalmente é utilizado um motor de micro-passo no controle do ajuste de foco do microscópio, permitindo deslocar o plano focal com resolução maior que 10µm.

Como já foi possível perceber, o microscópio confocal é normalmente controlado por um computador de modo que todos os ajustes e todo o processo de aquisição de imagens sejam otimizados.

A Figura 3-4 é um diagrama de blocos de um microscópio confocal controlado por computador.

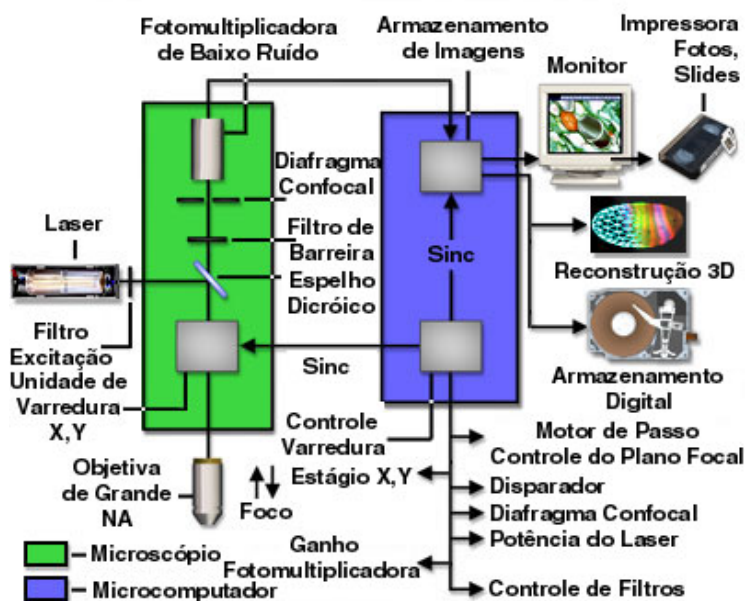


Figura 3-4: Diagrama de Blocos de um Microscópio Confocal [Nikon]

### 3.3. Modelo de Formação da Imagem

A imagem é representada por um sistema de coordenadas tridimensional, o qual possui a origem no centro da base do espécime tridimensional  $f(x,y,z)$  – função do espécime – com uma espessura  $T$  e com o eixo  $z$  coincidindo com o eixo óptico do microscópio.

Essa função, no caso da microscopia de fluorescência, representa a distribuição de intensidade óptica do espécime, correspondendo à resposta luminosa do fluorocromo.

A Figura 3-5 é um esquema simplificado de um microscópio óptico, onde pode-se notar que a distância entre o plano de observação e a lente (objetiva) é fixa e representada por  $d_i$ .

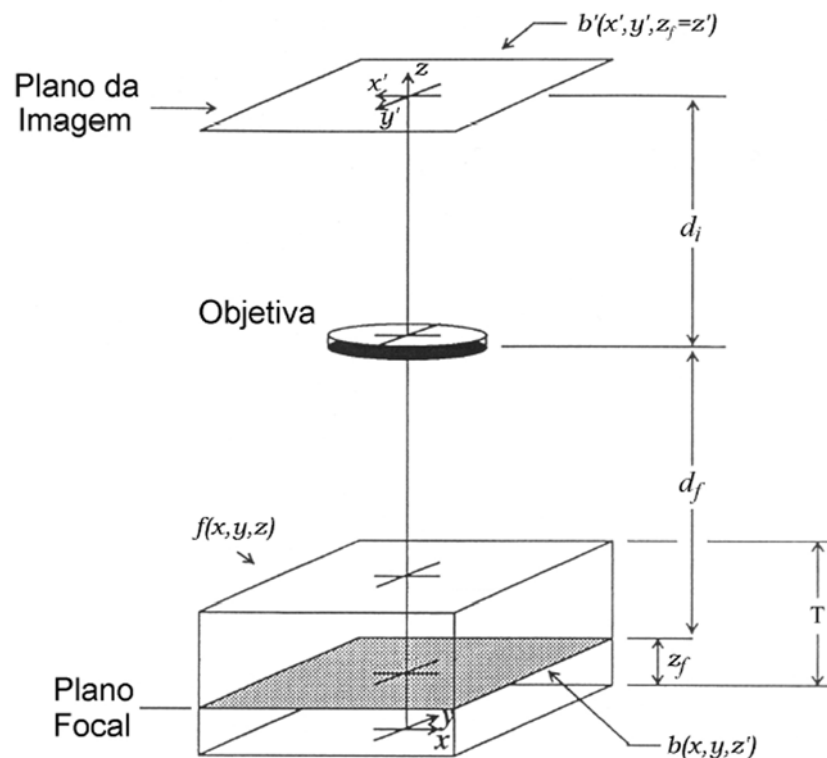


Figura 3-5: Sistema Simplificado de Formação de Imagem em Microscópio Óptico [Castleman 1996]

A secção do espécime que está sobre o foco da lente recai sobre  $z = z'$  e se encontra a uma distância  $d_f$  da lente, na direção oposta ao plano da imagem observada.

Como se pode notar, a imagem observada também possui seu sistema de coordenadas  $(x', y')$  com o início no eixo  $z$ .

A distância focal da lente  $d$  determina através da equação da lente a distância  $df$ :

$$\frac{1}{d} = \frac{1}{df} + \frac{1}{di} \quad \text{Equação 3.1}$$

O aumento fornecido pela objetiva é dado por:

$$M = \frac{di}{df} \quad \text{Equação 3.2}$$

A lente, ao aumentar a imagem, rotaciona a mesma em  $180^\circ$  de modo que um ponto  $(x,y)$  no plano do espécime é levado para  $(-Mx,-My)$  no plano da imagem.

A distância  $di$  é normalmente fixada em 160 mm em microscopia, desse modo para se variar o plano focal do espécime basta deslocá-lo no eixo  $z$  aproximando ou afastando da objetiva.

De modo a facilitar a descrição do modelo de formação de imagem e com o intuito de simplificar a notação, será utilizado como referência apenas o sistema de coordenadas do espécime e não o sistema da imagem gerada pelo microscópio.

É interessante definir uma projeção ideal, livre de distorções, do plano da imagem no plano focal. [Presma – 1990]

Essa projeção é desenvolvida de forma a permitir neutralizar os efeitos do aumento e rotação introduzidos pela lente e dessa forma criar uma imagem correspondente à observada no sistema de coordenadas da imagem  $(x',y')$  no sistema de coordenadas do espécime  $(x,y)$ .

A imagem observada é denotada por  $b'(x',y',z')$  e a sua projeção de volta ao plano focal é denotada por  $b(x,y,z')$ . Devido ao tamanho do espécime em relação ao  $df$  é possível ignorar o aumento produzido pela lente.

Pelo modelo de COSM um espécime  $f(x,y,z)$  com espessura  $T$  pode ser modelado como uma pilha  $J$  de imagens bidimensionais ao longo do eixo  $z$ :

$$T = (J - 1)\Delta z \quad \text{Equação 3.3}$$

onde  $\Delta z$  é a distância entre as imagens.

Segundo Preza [Preza – 1990], a  $k$ -ésima imagem observada quando o microscópio está focado em  $z_k$ , para um sistema sem ruído é dado por:

$$b_k(x, y) = \sum_{j=0}^{J-1} f_j(x, y) * h_{k-j}(x, y) \quad \text{Equação 3.4}$$

onde:

$f_j(x, y)$  a  $j$ -ésima secção do espécime

\* denota a operação de convolução bidimensional

$h_{k-j}(x, y)$  é a imagem de uma fonte pontual (sobre a origem do plano focal) na  $j$ -ésima secção do espécime quando o objeto está focado sobre o  $k$ -ésimo plano em  $z_k$

É possível escrever  $h_{k-j}(x, y)$  como:

$$h_{k-j} = h(x, y, z_d) \quad \text{Equação 3.5}$$

onde  $z_d = z_k - j.\Delta z$  e essa função é chamada de função de espalhamento pontual PSF (Point Spread Function) bidimensional desfocada.

A partir da Equação 3.4, considerando que a luz emitida por todas as secções do espécime contribuem para a imagem formada no  $k$ -ésimo plano, resulta dessa forma uma versão borrada da imagem verdadeira, graças as contribuições das secções superiores e inferiores do plano focal.

Nota-se que o conjunto de imagens  $J$  obtidas com a variação do plano focal do microscópio é o resultado de uma convolução tridimensional de  $f(x, y, z)$  com  $h(x, y, z)$ , sendo que  $h(x, y, z)$  é a PSF tridimensional do microscópio.

Isto é fácil de mostrar reescrevendo a Equação 3.4:

$$b(x, y, z_k) = \sum_{j=0}^{J-1} f(x, y, j.\Delta s).h(x, y, z_k - j.\Delta s) \quad \text{Equação 3.6}$$

Substituindo-se  $z = j.\Delta z$  e considerando  $\Delta z \rightarrow 0$  temos:

$$b(x, y, z_k) = f(x, y, z) * h(x, y, z) \quad \text{Equação 3.7}$$

Sob a hipótese que o espécime não emite luz fora da área de aquisição e nem fora do intervalo  $[0, T]$ , é possível reescrever a Equação 3.7:

$$b(x, y, z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x', y', z').h(x - x', y - y', z - z') dx' dy' dz' \quad \text{Equação 3.8}$$

Desse modo o problema pode ser expresso na seguinte forma

$$b(x, y, z) = f(x, y, z) * h(x, y, z) \quad \text{Equação 3.9}$$

Onde o operador \* representa agora uma convolução tridimensional.

Pode-se ainda escrever a Equação 3.9 no domínio de Fourier:

$$B(u, v, w) = H(u, v, w).F(u, v, w) \quad \text{Equação 3.10}$$

Onde:

$B(u, v, w)$  é a transformada de Fourier(FT) de  $b(x, y, z)$

$H(u, v, w)$  é a transformada de Fourier(FT) de  $h(x, y, z)$

$F(u, v, w)$  é a transformada de Fourier(FT) de  $f(x, y, z)$

### 3.4. Modelo Discreto da Formação da Imagem

Sem perder a generalidade pode-se considerar as versões discretas das funções  $f(x, y, z)$ ,  $b(x, y, z)$ ,  $h(x, y, z)$ , como sendo a discretização das funções contínuas em matrizes tridimensionais de dimensões  $M \times N \times J$ , assumindo que as secções bidimensionais tenham tamanho  $M \times N$  e que ainda foram registradas  $J$  secções.

As funções discretas serão denotadas como  $f[x, y, z]$ ,  $b[x, y, z]$ ,  $h[x, y, z]$  e agora  $x, y, z \in Z$ .

Em COSM, e em microscopia confocal, a imagem obtida é discreta devido ao processo de escaneamento utilizado na obtenção da imagem e das secções. Dessa forma pode-se representar a Equação 3.9 de forma discreta:

$$b[x, y, z] = f[x, y, z] * h[x, y, z] \quad \text{Equação 3.11}$$

É possível representar a Equação 3.11 no domínio de Fourier:

$$B[u, v, w] = F[u, v, w].H[u, v, w] \quad \text{Equação 3.12}$$

### 3.5. Caracterização do Ruído em COSM

No microscópio confocal, o registro das imagens é feito utilizando-se geralmente uma fotomultiplicadora, devido à baixa contagem de fótons e ainda devido à eletrônica utilizada no processamento desses dados.

Existem várias fontes de ruído em microscópios, mas nos ateremos a apenas dois tipos principais de ruído, o ruído Poisson e o ruído Gaussiano.

Devido às características do microscópio confocal e da necessidade de se utilizar tempos de exposição baixos, devido ao efeito do *photobleaching* [Concello-1995], existe uma baixa contagem de fótons pelo sensor, o que acaba gerando na imagem um ruído dependente do sinal o qual é bem modelado pelo ruído Poisson.

Outro ruído que é relevante para COSM é o ruído térmico presente nos dispositivos eletrônicos utilizados na amplificação e detecção do sinal.

Esse ruído é independente do sinal e bem modelado por um modelo gaussiano [Snyder – 1993] e pode ser adicionado ao modelo de formação de imagem como um ruído aditivo e independente do sinal

$$b = h * f + n$$

**Equação 3.13**

Assim a imagem degradada obtida pelo sistema é formada pela soma da imagem borrada, degradada pelo ruído Poisson e com um termo independente relativo ao ruído Gaussiano independente do sinal.



### 3.6. Função de Espalhamento Pontual (PSF)

Segundo a teoria da óptica geométrica, a imagem produzida de uma fonte luminosa pontual produzida por uma lente convergente é exatamente um ponto [Mateev – 1988], no entanto como todo sistema óptico possui uma distorção inerente, a imagem no plano focal é uma versão borrada deste ponto [Halliday – 1995].

Essa distorção ocorre devido ao processo de difração, causado pela abertura finita do sistema de lentes [Born e Wolf – 1999].

Os estudos de sistemas ópticos, onde não se podem desprezar os efeitos da difração, são freqüentemente relacionados com métodos de Fourier e fazem parte da disciplina conhecida como “Óptica de Fourier” [Goodman (1996)].

Desse modo é possível dizer que um sistema limitado pela difração é visto como um sistema linear.

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

$$p(x_a, y_a) = \begin{cases} 1 & \text{se } -\frac{a}{2} \leq \sqrt{x_a^2 + y_a^2} \leq \frac{a}{2} \\ 0 & \text{caso contrário} \end{cases} \quad \text{Equação 3.14}$$

A função pupila indica explicitamente como a distribuição da amplitude de uma frente de onda é alterada ao passar por uma lente.

Para o caso da fonte de luz ser incoerente com um comprimento de onda médio  $\lambda$ , a PSF bidimensional no plano da imagem é dada pelo espectro de potência da função pupila, sendo expressa como uma função de Bessel:

$$h(r) = \left[ 2 \cdot \frac{J_1 \pi \frac{r}{r_0}}{\pi \frac{r}{r_0}} \right]^2 \quad \text{Equação 3.15}$$

Onde  $J_1$  é a função de Bessel de primeira espécie e primeira ordem [Bertero e Boccacci – 1998]. Observa-se que a PSF bidimensional no plano da imagem é uma função com simetria radial, onde o fator  $r_0$  é um fator de escala dado por:

$$r_0 = \frac{\lambda \cdot d_i}{a} \quad \text{Equação 3.16}$$

e  $r$  é a distância radial medida a partir do eixo óptico, fornecida por:

$$r = \sqrt{x_i^2 + y_i^2} \quad \text{Equação 3.17}$$

A função de transferência óptica (OTF) é definida como sendo a transformada de Fourier da PSF (Equação 3.15). A OTF pode ser considerada como uma forma de especificar a qualidade de uma lente.

Como a PSF é o espectro de potência da função pupila (considerando que a iluminação é incoerente), pelo teorema da autocorrelação, a OTF é a função de autocorrelação normalizada da função pupila, sendo assim:

$$H(u, v) = \frac{R_p(u, v)}{R_p(0, 0)} \quad \text{Equação 3.18}$$

Onde  $u$  e  $v$  são variáveis de frequência espacial

Deste modo, é possível mostrar que para uma lente com abertura circular com diâmetro  $a$  e luz incoerente com comprimento  $\lambda$ , a OTF no plano focal pode ser descrita como: [Hopkins – 1955]

$$H(q) = \frac{2}{\pi - 2} \cdot \left\{ \cos^{-1} \left( \frac{q}{fc} \right) - \text{sen} \left[ \cos^{-1} \left( \frac{q}{fc} \right) \right] \right\} \quad \text{Equação 3.19}$$

Onde  $q$  é a frequência radial dada por:

$$q = \sqrt{u^2 + v^2} \quad \text{Equação 3.20}$$

O parâmetro  $fc$  representa a mais alta frequência que pode passar pelo sistema, e é chamado de frequência de corte, sendo determinado por:

$$fc = \frac{1}{r_0} = \frac{a}{\lambda \cdot d_i} \quad \text{Equação 3.21}$$

Através da transformada inversa de Fourier da Equação 3.19 é possível obter a PSF bidimensional.

Particularmente no caso da microscopia de fluorescência, a luz emitida pelo espécime é espacialmente incoerente e a PSF tridimensional corresponde à imagem de uma fonte pontual fluorescente, após passar pelo sistema óptico do microscópio.

Para ser possível o processamento das imagens de COSM, é necessário se conhecer a PSF tridimensional do microscópio. Essa PSF pode ser calculada através de

um conjunto de funções bidimensionais, espaçadas de maneira uniforme ao longo do eixo óptico, com intervalos de espaço  $\Delta z$  a partir do plano focal.

Essas funções são fornecidas pela Equação 3.5, a qual representa a imagem da fonte pontual na *j-ésima* secção quando o microscópio está focado sobre o *k-ésimo* plano em  $z_k$  e é chamada de PSF desfocada.

## 4. Restauração de Imagens

A restauração de imagens é um dos processos mais importantes dentro da área de processamento digital de imagens e tem como principal objetivo remover distorções e ruído, causados pelos sistemas ópticos e sensores, de uma imagem.

De modo geral, o problema de restauração consiste em recuperar a imagem original da melhor maneira possível. [Mascarenhas e Velasco – 1984]

A abordagem utilizada para a restauração de uma imagem degradada, consiste basicamente em utilizar informações conhecidas *a priori* sobre as degradações de modo a ser possível aplicar um processo inverso para remover essa distorção.

### 4.1. Modelo de Degradação da Imagem

Pode-se ver na Figura 4-1 um diagrama que representa o modelo de degradação de uma imagem.

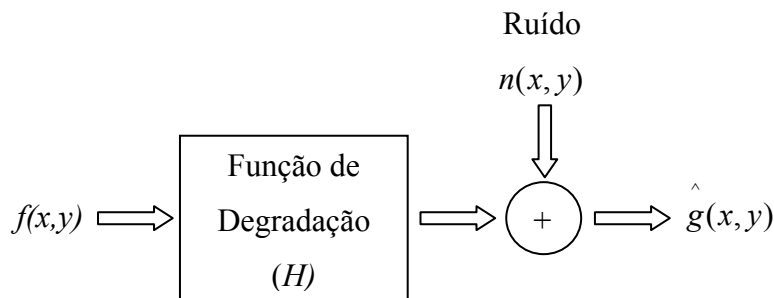


Figura 4-1: Modelo de Degradação de uma Imagem.

A função de degradação pode ser calculada através da dependência entre a imagem de saída e a de entrada no sistema.

Essa relação pode ser descrita da seguinte forma:

$$g(x, y) = H[f(x, y)] + n(x, y)$$

Equação 4.1

Ainda considerando-se que o ruído seja nulo:

$$g(x, y) = H[f(x, y)] \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde  $H$  é linear somente se

$$H[k_1 f_1(x, y) + k_2 f_2(x, y)] = k_1 H[f_1(x, y)] + k_2 H[f_2(x, y)] \quad \text{Equação 4.3}$$

Onde  $k_1$  e  $k_2$  são constantes e  $f_1(x, y)$  e  $f_2(x, y)$  são duas imagens de entrada quaisquer.

Se  $k_1 = k_2 = 1$ , então a Equação 4.3 pode ser escrita como:

$$H[f_1(x, y) + f_2(x, y)] = H[f_1(x, y)] + H[f_2(x, y)] \quad \text{Equação 4.4}$$

a qual é chamada de propriedade da aditividade, que expressa que se  $H$  é um operador linear, a resposta para a soma de duas entradas é igual à soma de duas saídas.

Ainda utilizando a Equação 4.4, mas considerando o termo  $f_2(x, y) = 0$ :

$$H[k_1 f_1(x, y)] = k_1 H[f_1(x, y)] \quad \text{Equação 4.5}$$

Sendo considerada a propriedade da homogeneidade, a qual diz que: a resposta de uma entrada multiplicada por uma constante é igual à multiplicação da resposta por essa mesma constante.

Para um operador ser invariante no espaço em relação entre a entrada e a saída  $g(x, y) = H[f(x, y)]$  é necessário que

$$H[f_1(x - \alpha, y - \beta)] = g(x - \alpha, y - \beta) \quad \text{Equação 4.6}$$

Para quaisquer valores de  $f(x, y)$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ . Isto demonstra que a resposta de saída depende única e exclusivamente do valor de entrada no mesmo ponto e não de sua posição.

Utilizando a função impulso, a qual é também conhecida como função delta de dirac e representada por  $\delta(t)$ , que apresenta largura infinitesimal e altura infinita de modo que sua integral possui valor unitário.[Weinsstein - 2004]

$$\int_{-\infty}^{\infty} \delta(t) dt = 1 \quad \text{Equação 4.7}$$

Utilizando a definição da função impulso, tem-se que  $f(x, y)$  pode ser escrita como:

$$f(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(\alpha, \beta) \delta(x - \alpha, y - \beta) d\alpha d\beta \quad \text{Equação 4.8}$$

Considerando o caso onde o ruído é nulo, e utilizando a função de impulso, a Equação 4.2 torna-se:

$$g(x, y) = H[f(x, y)] = H \left[ \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(\alpha, \beta) \delta(x - \alpha, y - \beta) d\alpha d\beta \right] \quad \text{Equação 4.9}$$

Se  $H$  for um operador linear, estendendo a propriedade da aditividade para integrais:

$$g(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} H[f(\alpha, \beta) \delta(x - \alpha, y - \beta)] d\alpha d\beta \quad \text{Equação 4.10}$$

Considerando  $f(\alpha, \beta)$  independente de  $x$  e  $y$ , e utilizando a propriedade da homogeneidade:

$$g(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(\alpha, \beta) H[\delta(x - \alpha, y - \beta)] d\alpha d\beta \quad \text{Equação 4.11}$$

O termo

$$h(x, \alpha, y, \beta) = H[\delta(x - \alpha, y - \beta)] \quad \text{Equação 4.12}$$

é denominado resposta ao impulso de  $H$ , ou seja,  $h(x, \alpha, y, \beta)$  é a função de espalhamento pontual (PSF).

Substituindo, na Equação 4.11, a função PSF, tem-se:

$$g(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(\alpha, \beta) h(x, \alpha, y, \beta) d\alpha d\beta \quad \text{Equação 4.13}$$

Que é comumente denominada integral de superposição (ou ainda Fredholm) de primeiro tipo.

Se  $H$  for invariante no espaço, então

$$H[\delta(x - \alpha, y - \beta)] = h(x - \alpha, y - \beta) \quad \text{Equação 4.14}$$

Desse modo é possível reescrever a Equação 4.13 da seguinte maneira:

$$g(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(\alpha, \beta) h(x - \alpha, y - \beta) d\alpha d\beta \quad \text{Equação 4.15}$$

a qual é a integral de convolução definida pela Equação 2.14.

Considerando a presença de ruído aditivo, a Equação 4.15 pode ser escrita como:

$$g(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(\alpha, \beta) h(x - \alpha, y - \beta) d\alpha d\beta + n(x, y) \quad \text{Equação 4.16}$$

O ruído é considerado independente da posição na imagem.

Todas as formulações mostradas até agora dizem respeito a funções contínuas, o que não corresponde à realidade para o caso de imagens digitais. Desse modo pode-se escrever a Equação 4.16 da seguinte forma:

$$g(x, y) = \sum_{\alpha=0}^{M-1} \sum_{\beta=0}^{N-1} f(\alpha, \beta) h(x - \alpha, y - \beta) + n(x, y) \quad \text{Equação 4.17}$$

onde  $f$  representa a imagem original, amostrada numa grade de dimensões  $M \times N$ ,  $g$  é uma imagem degradada e  $n$  representa um ruído aditivo.

Essa equação pode ser escrita também da seguinte forma:

$$g(x, y) = h(x, y) * f(x, y) + n(x, y) \quad \text{Equação 4.18}$$

Onde:

$h(x, y)$  é a representação espacial da função de degradação

$f(x, y)$  é a imagem sem degradação

$n(x, y)$  é a função do ruído

$g(x, y)$  é a imagem degradada e ruidosa

\* representa a convolução espacial circular

A convolução discreta, descrita pela Equação 4.17, considera que as funções amostradas são periódicas, com período  $M \times N$ .

Para se evitar a superposição nos períodos individuais da convolução resultante é feita a escolha de  $M \times N$  de tal modo que:

$$M = A + C - 1 \quad \text{Equação 4.19}$$

$$N = B + D - 1 \quad \text{Equação 4.20}$$

Se  $A \times B$  e  $C \times D$  as dimensões de  $f(x, y)$  e  $h(x, y)$  respectivamente, e pela extensão das funções com zero, de modo que seus tamanhos sejam iguais a  $M \times N$ . Desse modo é garantido que a convolução circular é equivalente à convolução linear.

Considerando que  $f_e(x, y)$  e  $h_e(x, y)$  representam as funções estendidas de modo que

$$f_e(x,y) = \begin{cases} f(x,y) & 0 \leq x \leq A-1 \text{ e } 0 \leq y \leq B-1 \\ 0 & A \leq x \leq M-1 \text{ ou } B \leq y \leq N-1 \end{cases} \quad \text{Equação 4.21}$$

$$h_e(x,y) = \begin{cases} h(x,y) & 0 \leq x \leq C-1 \text{ e } 0 \leq y \leq D-1 \\ 0 & C \leq x \leq M-1 \text{ e } D \leq y \leq N-1 \end{cases} \quad \text{Equação 4.22}$$

Desse modo a Equação 4.21 pode ser representada como:

$$g(x,y) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} f_e(m,n)h_e(x-m,y-n) + n_e(x,y) \quad \text{Equação 4.23}$$

Onde  $n_e(x,y)$  representa o ruído estendido de dimensões  $M \times N$ .

É possível utilizar também uma notação matricial para representar a Equação 4.27 da seguinte forma:

$$g = Hf + n \quad \text{Equação 4.24}$$

Onde os termos  $f$ ,  $g$  e  $n$  são vetores de tamanho  $MN \times 1$  e  $H$  é uma matriz de tamanho  $MN \times MN$  [Sezan e Tekalp – 1988].

Os valores de  $f$ ,  $g$ , e  $n$  são formados enfileirando-se uma linha na frente da outra, por exemplo, os  $N$  primeiros elementos de  $f$  são elementos da primeira linha de  $f(x,y)$ , os próximos  $N$  elementos são formados a partir da segunda linha e assim sucessivamente.

O operador  $H$  consiste de  $M^2$  partições, que pode ser visto a seguir:

$$H = \begin{bmatrix} H_0 & H_{M-1} & \Lambda & H_1 \\ H_1 & H_0 & \Lambda & H_2 \\ H_2 & H_1 & \Lambda & H_3 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ M & & & \\ H_{M-1} & H & \Lambda & H_0 \end{bmatrix} \quad \text{Equação 4.25}$$

Cada partição  $H_j$  é construída com a  $j$ -ésima linha d função estendida  $h_e(x,y)$ , como dada a seguir:

$$H_j = \begin{bmatrix} h_e(j,0) & h_e(j,N-1) & \Lambda & h_e(j,1) \\ h_e(j,1) & h_e(j,0) & \Lambda & h_e(j,2) \\ h_e(j,2) & h_e(j,1) & \Lambda & h_e(j,3) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ M & & & \\ h_e(j,N-1) & h_e(j,N-2) & \Lambda & h_e(j,0) \end{bmatrix} \quad \text{Equação 4.26}$$

É interessante observar que as partições  $H_j$  são matrizes circulares e o operador  $H$  é uma matriz bloco circulante. Essa propriedade está relacionada ao fato de uma linha ser um deslocamento circular da linha anterior.



## 4.2. Filtro Inverso

Como se sabe, a convolução de duas funções no domínio do espaço pode ser representada como uma multiplicação ponto-a-ponto no domínio da frequência, assim a Equação 4.18 pode ser reescrita da seguinte forma:

$$G(u, v) = H(u, v) \cdot F(u, v) + N(u, v) \quad \text{Equação 4.27}$$

Onde os termos representados pelas letras maiúsculas são as transformadas de Fourier dos termos da Equação 4.18.

Utilizando condições ideais de linearidade, ausência total de ruído e invariância no espaço é válida a seguinte equação:

$$\hat{F}(u, v) = \frac{G(u, v)}{H(u, v)} \quad \text{Equação 4.28}$$

a qual é conhecida como filtro inverso, o que torna possível recuperar a imagem original pela razão entre as TF da imagem degradada e a TF da função de espalhamento. [Mascarenhas e Velasco – 1984]

Entretando, o filtro inverso é instável devido ao operador  $H(u, v)$  atuar como filtro passa-baixas, o qual nas altas frequências possui valores próximos ou iguais a zero.

Com o intuito de se eliminar esta instabilidade foi proposta uma modificação no filtro inverso, de modo a truncar a PSF de modo a remover essa situação, o que é representado por:

$$H_{ps}(u, v) = \begin{cases} \frac{1}{H(u, v)} & \text{para } H(u, v) \neq 0 \\ \max(G(u, v)) & \text{para } H(u, v) = 0 \end{cases} \quad \text{Equação 4.29}$$

Outro problema ocorre quando o filtro inverso é aplicado em imagens ruidosas. Isto pode ser demonstrado a partir das equações:

$$\hat{F}(u, v) = \frac{G(u, v)}{H(u, v)} \quad \text{Equação 4.30}$$

$$\hat{F}(u, v) = \frac{H(u, v)F(u, v) + N(u, v)}{H(u, v)} \quad \text{Equação 4.31}$$

$$\hat{F}(u, v) = F(u, v) + \frac{N(u, v)}{H(u, v)} \quad \text{Equação 4.32}$$

É possível perceber pela Equação 4.32 que se  $H(u, v)$  possui valores muito pequenos, ocorre uma amplificação do ruído. Pode se perceber também que nas vizinhanças dos zeros de  $H(u, v)$  o segundo termo da Equação 4.32 tende a predominar sobre o valor do primeiro termo.

Uma possível solução seria utilizar um filtro que ponderasse pouco as partes da imagem próximo dos zeros de  $H(u, v)$ , onde a relação sinal ruído tende a ser baixa.

Essa instabilidade do filtro inverso decorre que a equação que caracteriza a degradação da imagem ser na essência um problema mal condicionado, de modo que pequenas perturbações na imagem degradada provocam grandes variações na imagem restaurada.

### 4.3. *Filtro de Wiener*

O filtro de Wiener é um filtro que incorpora tanto a degradação da imagem como o ruído na sua especificação, evitando desse modo a grande instabilidade do filtro inverso.

O filtro considera a imagem e o ruído como processos randômicos e tem como objetivo encontrar e estimar uma imagem  $\hat{f}$  da imagem original  $f$  de modo a minimizar o erro médio quadrático. O erro médio quadrático é dado por

$$e^2 = E\left\{(f - \hat{f})^2\right\} \quad \text{Equação 4.33}$$

Onde  $E\{\}$  é o valor esperado do argumento.

Assumindo que o ruído e a imagem são não correlacionados; que um ou outro possui média nula, e ainda que os valores encontrados em  $\hat{f}$  é uma função linear da imagem degradada.

Baseado nessas condições, o mínimo da Equação 4.33 é dado por:

$$\begin{aligned}\hat{F}(u, v) &= \left[ \frac{H^*(u, v)S_f(u, v)}{S_f(u, v)|H(u, v)|^2 + S_n(u, v)} \right] G(u, v) \\ &= \left[ \frac{H^*(u, v)}{|H(u, v)|^2 + S_n(u, v)/S_f(u, v)} \right] G(u, v) \\ &= \left[ \frac{1}{H(u, v)} \frac{|H(u, v)|^2}{|H(u, v)|^2 + S_n(u, v)/S_f(u, v)} \right] G(u, v)\end{aligned}\tag{Equação 4.34}$$

Onde:  $H(u, v)$  é a função de degradação

$H^*(u, v)$  é o complexo conjugado de  $H(u, v)$

$|H(u, v)|^2 = H^*(u, v)H(u, v)$

$S_n(u, v)$  é o espectro de potência do ruído

$S_f(u, v)$  é o espectro de potência da imagem não degradada

O espectro de potência é definido como sendo o quadrado do espectro de Fourier e é dado por

$$\begin{aligned}S(u, v) &= |F(u, v)|^2 \\ &= R^2(u, v) + I^2(u, v)\end{aligned}\tag{Equação 4.35}$$

onde:  $R^2(u, v)$  é a parte real da FT.

$I^2(u, v)$  é a parte imaginária da FT.

A Equação 4.34 é chamada de filtro de Wiener. Considerando o ruído nulo, o filtro de Wiener se torna o filtro inverso.

Quando o ruído é branco, o espectro de potência do ruído é constante, e como o espectro de potência da imagem não degradada raramente é conhecido, normalmente se utiliza uma aproximação da Equação 4.34 é dada por:

$$\hat{F}(u, v) = \left[ \frac{1}{H(u, v)} \frac{|H(u, v)|^2}{|H(u, v)|^2 + K} \right] G(u, v)\tag{Equação 4.36}$$

Onde  $K$  é uma constante obtida empiricamente.

## 4.4. Redução do Ruído Poisson

Para a redução do ruído Poisson podem-se utilizar várias abordagens como um algoritmo baseado em probabilidade de máximo *a posteriori* (MAP) ou ainda através de um método baseado na Transformada de Anscombe, que transforma o ruído Poisson em um ruído aproximadamente aditivo, independente do sinal e gaussiano.

Neste trabalho será utilizada a transformada de Anscombe, pois segundo Homem [Homem 2003], essa abordagem obtém melhores resultados que o algoritmo MAP.

### 4.4.1. Estimação por Transformada de Anscombe

Através de uma transformação não linear (Transformada de Anscombe – AT) o ruído de Poisson, que é dependente do sinal se torna um ruído aproximadamente independente do sinal e ainda com média aproximadamente nula, com variância aproximadamente unitária [Inouye 1971] e ainda seguindo uma distribuição gaussiana [Anscombe 1948].

A AT de uma variável aleatória  $\tilde{U}_i$  com distribuição de Poisson é dada por:

$$\tilde{Z}_i = 2 \cdot \sqrt{\tilde{U}_i + \frac{3}{8}} \quad \text{Equação 4.37}$$

Ainda segundo Inouye, a nova variável aleatória  $\tilde{Z}_i$  pode ser representada por um modelo aditivo:

$$\tilde{Z}_i = 2 \cdot \sqrt{\tilde{U}_i + \frac{1}{8}} + \tilde{N}_i = \tilde{S}_i + \tilde{N}_i \quad \text{Equação 4.38}$$

Onde  $\tilde{N}_i$  representa um ruído aproximadamente independente de  $\tilde{S}_i$ , descrito por uma distribuição gaussiana com média:

$$E = [\tilde{N}_i] \approx 0 \quad \text{Equação 4.39}$$

E variância:

$$\text{Var}[\tilde{N}_i] \approx 1 \quad \text{Equação 4.40}$$

É possível mostrar ainda que a média de  $\tilde{Z}_i$  é aproximadamente:

$$E[\tilde{Z}_i] \approx 2 \cdot \sqrt{E[\tilde{U}_i] + \frac{1}{8}} \quad \text{Equação 4.41}$$

E sua variância é dada por:

$$\text{Var}[\tilde{Z}_i] \approx \text{Var}[S_i] + 1 \quad \text{Equação 4.42}$$

Com isso pode-se agora utilizar técnicas bem conhecidas para a redução do ruído, que agora é considerado aditivo e independente do sinal sobre a nova variável no domínio de Anscombe [Mascarenhas – 1999].

Desse modo é possível utilizar o filtro de Wiener [Andrews e Hunt – 1977] para remover esse ruído. Dessa forma, dado um vetor de observações  $u$ , temos:

$$z = 2 \cdot \sqrt{u + \frac{3}{8}} \quad \text{Equação 4.43}$$

É necessária, para a utilização do filtro de Wiener, uma estimativa sem ruído  $\hat{s}_i$  para  $z_i$ , que pode ser obtida da seguinte forma:

$$s_i = E[S_i] + \frac{\sigma_{S_i}^2}{\sigma_{S_i}^2 + 1} (z_i - E[S_i]) \quad \text{Equação 4.44}$$

Onde a média e variância de  $S_i$ , expressas por  $E[S_i]$  e  $\sigma_{S_i}^2$ , são medidas locais e podem ser calculadas a partir da imagem que será filtrada.

A variância pode ser calculada com a utilização de um filtro de média 3x3, sobre uma região homogênea da imagem.

$$z_m = z_i * h_m \quad \text{Equação 4.45}$$

Onde  $z_m$  é a estimativa do sinal sem ruído, na região escolhida, o qual foi obtido pela utilização de um filtro de média 3x3 representado pela convolução de  $z_i$  com  $h_m$ .

Considerando que o sinal, após o filtro de média, não apresenta ruídos é possível ter uma estimativa da variância do sinal sem ruído utilizando a Equação 4.46 para o cálculo da variância.

$$\sigma_{S_i}^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (z_m - \bar{z})^2 \quad \text{Equação 4.46}$$

Onde  $\bar{z}$  é dado por:

$$\bar{z} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_m \quad \text{Equação 4.47}$$

N é o número de pontos de  $z_m$ .

Uma outra opção é utilizar  $\sigma_{Z_i}^2$  dado por:

$$\sigma_{S_i}^2 = \sigma_{Z_i}^2 - 1 \quad \text{Equação 4.48}$$

Mas essa abordagem é mais perigosa, pois pode ser possível se obter valores negativos para a variância, o que não corresponderia à realidade.

Após a redução do ruído deve-se fazer uma transformada inversa de Anscombe (IAT), obtendo desse modo uma estimativa da imagem com o ruído Poisson reduzido.

A IAT é expressa por:

$$b_i = \frac{1}{4} \cdot \hat{s}_i^2 - \frac{1}{8} \quad \text{Equação 4.49}$$

É possível dizer que essa abordagem é pontual e não leva em conta a correlação dos *voxels* da imagem tridimensional.

## 5. Projeção sobre Conjuntos Convexos

Os algoritmos de projeção, tanto os sobre conjuntos convexos (ver seção 5.4) quanto os demais, têm sido utilizados extensivamente na área de processamento de imagens digitais. O método de projeção sobre conjuntos convexos (POCS) é uma técnica poderosa de reconstrução e restauração de imagens que utiliza informações a priori das mesmas como conjuntos de restrições, a fim de tentar solucionar o problema de restauração [Sezan e Trussel – 1991]

Atualmente, os métodos POCS vêm sendo aplicados em várias áreas, principalmente na restauração de imagens médicas e ainda em aplicações astronômicas [Stark e Yang – 1988].

Recentemente vários métodos iterativos de convergência propostos foram considerados como casos específicos de POCS.

De uma forma geral, é possível descrever o método de POCS da seguinte forma: a imagem degradada é representada como um vetor em um espaço de Hilbert, e as restrições são descritas como conjuntos convexos sobre este espaço. Considera-se que há um total de  $m$  conjuntos avaliados,  $C_1, C_2, \dots, C_m$  e normalmente cada conjunto é associado a um único parâmetro. Entretanto, algumas vezes é conveniente agrupar os conjuntos. Desse modo, a intersecção desses conjuntos

$$C_o = \prod_{i=1}^m C_i$$

**Equação 5.1**

deverá conter todas as possíveis soluções para o problema, pois cada uma delas satisfaz a uma das restrições.

Para ser possível o entendimento de POCS é necessário definir alguns conceitos que serão utilizados neste capítulo.

## 5.1. Norma

Considerando um espaço vetorial  $V$ , a norma de  $V$  será uma função que associará um valor real representado por  $\|x\|$ , para cada  $x$  contido em  $V$  de modo que

$$\|x\| \geq 0, \text{ e } \|x\| = 0 \text{ se e somente se } x = 0 \quad \text{Equação 5.2}$$

$$\|\alpha x\| = |\alpha| \|x\|, \text{ para cada escalar } \alpha \text{ e qualquer } x \text{ em } V \quad \text{Equação 5.3}$$

$$\|x + y\| \leq \|x\| + \|y\| \text{ para todo } x \text{ e } y \text{ em } V \quad \text{Equação 5.4}$$

## 5.2. Produto Interno

Considerando um espaço vetorial  $V$ , o produto interno em  $V$  é uma função que associa para cada par ordenado de vetores  $x$  e  $y$  contidos em  $V$  um valor escalar, denotado por  $\langle x, y \rangle$ , de tal forma que para cada  $x, y$  e  $z$  contido em  $V$  e um escalar  $\alpha$  qualquer teremos:

$$\langle x, x \rangle \geq 0, \text{ e } \langle x, x \rangle = 0 \text{ se e somente se } x = 0 \quad \text{Equação 5.5}$$

$$\langle x + y, z \rangle = \langle x, z \rangle + \langle y, z \rangle \quad \text{Equação 5.6}$$

$$\langle \alpha x, y \rangle = \alpha \langle x, y \rangle \quad \text{Equação 5.7}$$

$$\langle x, y \rangle = \overline{\langle y, x \rangle}, \text{ onde } \overline{\langle y, x \rangle} \text{ é o complexo conjugado de } \langle y, x \rangle \quad \text{Equação 5.8}$$



### 5.3. Espaço de Hilbert

Denomina-se espaço de Hilbert ( $H$ ) como sendo um espaço de produto interno, o qual é completo em relação à indução da norma pelo produto interno [Stark e Yang – 1998]. Um exemplo é o espaço euclidiano  $\mathfrak{R}^n$ , no qual o produto interno é definido por:

$$\langle x, y \rangle = \sum_{i=1}^n x_i y_i \quad \text{Equação 5.9}$$

Para todo  $x = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ ,  $y = (y_1, y_2, \dots, y_n)$  em  $R^n$ .

A norma euclidiana induzida é dada por:

$$\|x\|_2 = \left( \sum_{i=1}^n |x_i|^2 \right)^{1/2} \quad \text{Equação 5.10}$$

Para todo o  $x \in R^n$ .

O espaço  $R^n$  também é completo em relação à norma euclidiana e por isso o espaço euclidiano  $R^n$  é um Espaço de Hilbert.

### 5.4. Conjuntos Convexos

Um conjunto  $C$  é convexo somente se todos os pontos pertencentes a um segmento de reta, definido por um par qualquer de elementos de  $C$ , pertençam a esse conjunto

Seja  $C_1$  um conjunto definido por

$$C_1 = \{x = (x_1, x_2) : x_1^2 + x_2^2 \leq 4\} \text{ no } R^2 \quad \text{Equação 5.11}$$

Tomando quaisquer pontos  $x_1, x_2 \in C_1$  e permitindo que  $0 \leq \mu \leq 1$ , isto é,  $C_1$  será um conjunto convexo se

$$x = \mu x_1 + (1 - \mu)x_2 \in C_1 \quad \text{Equação 5.12}$$

para todo  $x_1, x_2 \in C_1$  e  $0 \leq \mu \leq 1$ .

É fácil provar que  $C_1$  é um conjunto convexo. Tomando  $x_1, x_2 \in C_1$ , então  $\|x_1\| \leq 2$  e  $\|x_2\| \leq 2$ . Desse modo com  $x = \mu x_1 + (1 - \mu)x_2 \in C_1$  e com  $0 \leq \mu \leq 1$  tem-se que:

$$\|x\| = \|\mu x_1 + (1 - \mu)x_2\| \leq \mu\|x_1\| + (1 - \mu)\|x_2\| \leq 2 \quad \text{Equação 5.13}$$

Percebe-se pela Equação 5.13 que  $C_1$  é um conjunto convexo.

Com o intuito de mostrar que nem todos os conjuntos são convexos, utiliza-se o seguinte conjunto:

$$C_2 = \{x = (x_1, x_2) : x_1^2 + x_2^2 = 4\} \text{ no } R^2 \quad \text{Equação 5.14}$$

Considerando  $x_1, x_2 \in C_2$  com  $x_1 = (0, 2)$  e  $x_2 = (0, -2)$ , tomando  $\mu = 0,5$  tem-se que:

$$x = \mu x_1 + (1 - \mu)x_2 = (0, 0) \quad \text{Equação 5.15}$$

Claramente  $x=(0,0)$  não pertence ao conjunto  $C_2$ , portanto o conjunto não é convexo.

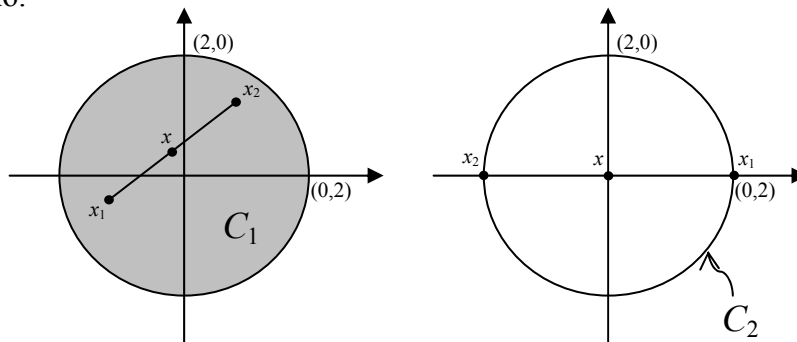


Figura 5-1: Representação gráfica dos Conjuntos  $C_1$  e  $C_2$

## 5.5. **Projeção**

Considere os seguintes problemas geométricos representados na Figura 5-2:

- Num plano bidimensional, a reta que passa por um ponto arbitrário  $x$  intercepta a reta  $l$  em exatamente um único ponto,  $x^*$ . Esse ponto possui uma propriedade importante em relação a qualquer outro ponto de  $l$ : possui a menor distância euclidiana do ponto  $x$ .
- Assuma que  $D$  seja um disco e que  $y$  é ponto arbitrário localizado fora do disco. De todos os círculos possíveis centrados em  $y$ , somente um irá tocar o disco  $D$  em apenas um ponto,  $y^*$ . Este ponto  $y^*$  tem a propriedade de ser o ponto mais próximo de  $y$  em relação a todos os pontos do disco  $D$ .

É interessante destacar que tanto a reta  $l$  como o disco  $D$  podem ser considerados como conjuntos convexos no  $R^2$ , e que  $x^*$  e  $y^*$  são projeções de  $x$  e  $y$  em  $l$  e  $D$  respectivamente.

Seja  $C$  um conjunto convexo num espaço de Hilbert  $H$ . Percebe-se então que para cada  $x$  em  $H$ , existe um único ponto  $x^*$  em  $C$  que é o mais próximo de  $x$ .

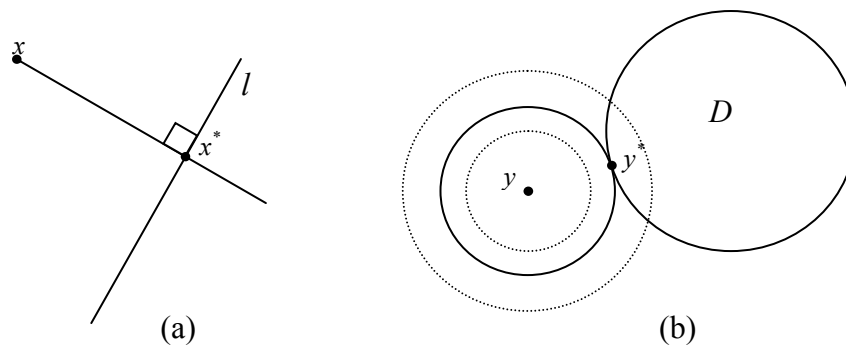
Desse modo, admitindo-se que  $x^* \in C$ ,

$$\|x - x^*\| = \min_{y \in C} \|x - y\| \quad \text{Equação 5.16}$$

Como é possível observar, a Equação 5.16 fornece uma única solução, a qual é uma das principais características associadas aos conjuntos convexos num espaço de Hilbert. Ou seja, para todo  $x \in H$  existe somente um ponto mais próximo do conjunto  $C$ , o qual é denominado como sendo a projeção de  $x$  em  $C$ .

A regra que determina a projeção no conjunto  $C$  é denominada de projetor, ou operador de projeção em  $C$ , ou ainda denotado por  $P_C$ , desse modo, para todo  $x \in H$  a projeção  $P_C x$  em  $C$  é descrita por

$$\|x - P_C x\| = \min_{y \in C} \|x - y\| \quad \text{Equação 5.17}$$



**Figura 5-2:** (a) reta  $l$  e a perpendicular a ela passando pelo ponto  $x$ . (b) círculos centrados em  $y$  onde é possível ver que somente um deles toca o disco  $D$  em apenas um ponto  $y^*$ .

## 5.6. Algoritmos POCS

Vários problemas podem ser descritos na forma de conjuntos de restrições convexas, como por exemplo, quando se tem conhecimento *a priori* de imagens degradadas que devem ser restauradas.

Os algoritmos de POCS buscam uma solução para esse tipo de problema de modo que todas as restrições estabelecidas sejam atendidas na busca pela melhor solução. Esse fato decorre da natureza do método de fazer a intersecção dos conjuntos de restrições.

Admitindo que existam  $n$  conjuntos de restrições, os quais são representados por  $C_i$  com  $i=1,2,\dots,n$ , a solução para esse problema estará na intersecção entre os conjuntos [Sezan e Tekalp – 1988], a qual é representada pela Equação 5.1.

Considerando que os conjuntos  $C_i$  são convexas e que a intersecção desses conjuntos não é vazia e tomando-se projeções sucessivas entre os conjuntos, essas projeções irão convergir para um ponto pertencente a  $C_0$ .

Essa abordagem pode ser descrita por

$$x_{k+1} = P_{C_n} \dots P_{C_2} P_{C_1} x_k \quad k = 0,1,2,3,\dots \quad \text{Equação 5.18}$$

Essa equação representa o algoritmo de POCS seqüencial e que  $x_0$  é um ponto qualquer e representa a estimativa inicial.

Na Figura 5-3 pode-se ver uma representação gráfica do funcionamento desse algoritmo.

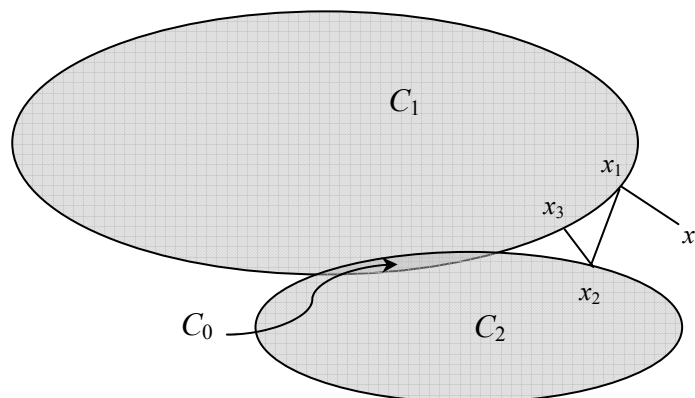


Figura 5-3: Processo Iterativo do algoritmo de POCS seqüencial

O algoritmo fornecido pela Equação 5.18 faz a projeção nos conjuntos de restrições de maneira seqüencial. É possível modificar esse algoritmo de modo que ele faça a projeção em todos os conjuntos de maneira simultânea e depois utilizando algum critério de peso calcule um valor para a projeção. Essa abordagem é conhecida como sendo um método de POCS paralelo, que pode ser descrito por:

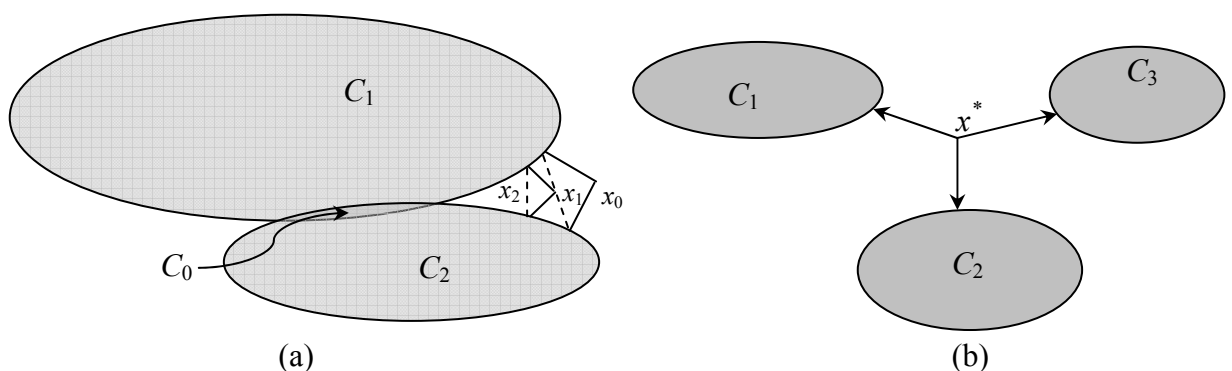
$$x_{k+1} = x_k + \sum_{i=1}^n w_i (P_{C_i} - x_k) \quad k = 0,1,2,3,\dots \quad \text{Equação 5.19}$$

$$\sum_{i=1}^n w_i = 1 \quad \text{Equação 5.20}$$

Uma das grandes vantagens do POCS paralelo é que o problema pode ser dividido em vários processadores de modo a ser calculado de forma mais rápida e ainda, talvez a principal razão dessa abordagem seja no caso da intersecção dos conjuntos de restrições ser vazia.

Não havendo intersecção, não existe uma solução ótima para o problema, mas pode existir uma solução que não seja a ideal, mas que minimize o erro dos conjuntos de restrições.

Em vez de atender otimamente uma única restrição, como ocorre no caso serial, a solução irá convergir fracamente para um ponto  $x^*$  entre os conjuntos de restrições.[Stark e Yang – 1998]



**Figura 5-4: (a) Algoritmo Paralelo para conjuntos com intersecção (b) Algoritmo Paralelo para conjuntos sem intersecção**

Para conseguir convergências mais rápidas dos algoritmos, pode-se modificar a Equação 5.18 e a Equação 5.19 acrescentando um parâmetro de relaxação. Esse parâmetro será representado por  $\lambda_i$  com  $i=1,2,\dots,n$ , onde  $0 < \lambda_i < 2$ .

Ao se utilizar  $0 \leq \lambda_i < 1$  é dito que a projeção é sub-relaxada e quando  $1 < \lambda_i \leq 2$  dizemos que a projeção foi sobre-relaxada, na Figura 5-5 pode-se ver a representação gráfica dessas abordagens.

Utilizando o parâmetro de relaxação, cada projeção descrita pela Equação 5.18 pode ser descrita da seguinte forma:

$$T_i x_k = x_k + \lambda_i (P_{C_i} x_k - x_k) \quad k = 0,1,2,3,\dots \quad e \quad i = 1,2,3,\dots,n \quad \text{Equação 5.21}$$

Desta forma a Equação 5.18 pode ser representada da seguinte maneira:

$$x_{k+1} = T_n \dots T_2 T_1 x_k \quad k = 0,1,2,3,\dots \quad \text{Equação 5.22}$$

No caso do POCS paralelo, pode-se acrescentar o valor de  $\lambda_k$  na Equação 5.19

$$x_{k+1} = x_k + \lambda_k \sum_{i=1}^n w_i (P_{C_i} - x_k) \quad k = 0,1,2,3,\dots \quad \text{Equação 5.23}$$

Deve-se notar que na Equação 5.21 é possível utilizar diferentes parâmetros de relaxação para cada conjunto, pois a projeção é seqüencial, mas o mesmo não pode ser utilizado na Equação 5.23. Devido à natureza paralela do algoritmo as operações de projeções são feitas ao mesmo tempo, pelo menos teoricamente.

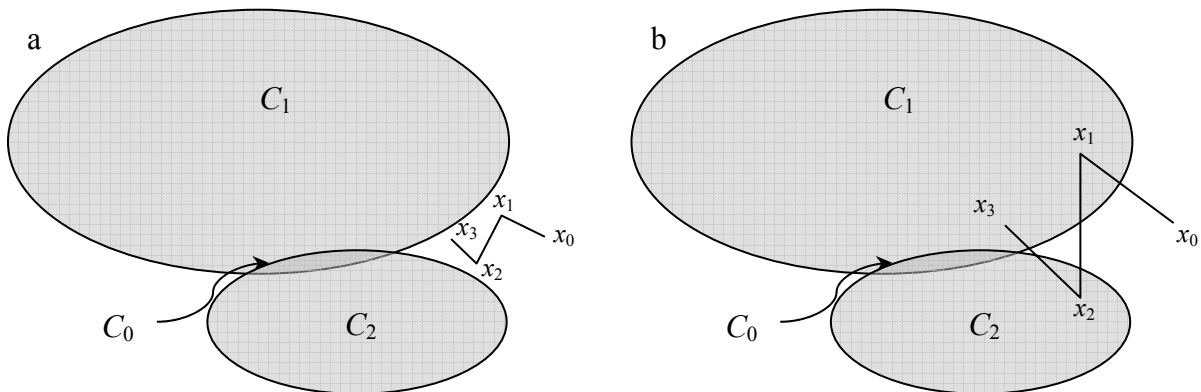


Figura 5-5 (a) Projeção com relaxação  $0 < \lambda < 1$  (b) Projeção com relaxação  $1 < \lambda < 2$

## 5.7. Conjuntos de Restrições Convexas

### 5.7.1. Row Action Projection

Utilizando o modelo linear como base para a restauração de imagens, temos que :

$$g = Hf \quad \text{Equação 5.24}$$

Onde os termos  $f$  e  $g$  são vetores de dimensão  $MN \times 1$  e  $H$  é uma matriz de tamanho  $MN \times MN$ .

A Equação 5.24 representa um sistema linear, onde cada linha de  $g$  representa uma equação que pode ser descrita por um hiperplano, o qual por definição é um conjunto convexo.

Se existe a intersecção entre esses conjuntos, é possível encontrar o conjunto intersecção, através de métodos POCS.

O uso de POCS para a solução de sistemas lineares, através de projeções ortogonais e iterativas entre os hiperplanos de cada equação é também chamado de algoritmo de *Row Action Projection* (RAP), o qual foi desenvolvido por Kaczmarz [Kaczmarz – 1937]. O RAP também pode ser considerado como um caso específico de *Algebraic Reconstruction Technique*(ART).

O algoritmo de POCS é uma generalização do RAP [Kuo e Mammone – 1992], pois os hiperplanos são substituídos por outros conjuntos convexos. O método converge para a intersecção dos hiperplanos, com a equação do algoritmo RAP dada por:

$$f^{(k+1)} = f^k + \lambda \frac{g_i - h_i^T f^k}{\|h_i\|^2} h_i \quad \text{Equação 5.25}$$

Onde:

$\lambda$  é o parâmetro de relaxação

$g_i$  é o  $i$ -ésimo elemento do vetor  $g$

$h_i^T$  é a  $i$ -ésima linha da matriz  $H$

$f^{(k+1)}$  é a projeção de  $f^k$  no hiperplano correspondente

As equações lineares podem ser representadas na forma de produto interno, ou seja:

$$\langle h_i, f \rangle = g_i \quad i = 1, 2, 3, \dots, n \quad \text{Equação 5.26}$$

Assim, a Equação 5.26 representa um conjunto de equações lineares, onde  $h_i$  representa os coeficientes,  $f$  representa a variável e  $g_i$  são os termos independentes.

O conjunto de soluções para cada equação pode ser representado por:

$$C_i = \{f : \langle h_i, f \rangle = g_i\} \quad i = 1, 2, 3, \dots, n \quad \text{Equação 5.27}$$

Por definição, a projeção  $P_i x$  de um vetor  $x$  no conjunto  $C_i$  é o ponto de  $C_i$  mais próximo de  $x$  [Stark e Yang – 1998]. Desse modo, o projetor  $P_i x$  para um conjunto de restrição do tipo sistema linear, baseado na Equação 5.25, é dado por:

$$P_i x = x + \frac{\langle h_i, x \rangle - g_i}{\|h_i\|^2} h_i \quad \text{Equação 5.28}$$

Para se obter a solução de um sistema de equações lineares, é necessário escolher um  $x$  inicial e utilizar a Equação 5.18 ou ainda a Equação 5.19 iterativamente, até que se verifique a convergência.

De acordo com [Gopalakrishnan et al. – 1999] o sucesso da implementação do RAP depende da condição inicial escolhida, do número de iterações e também do valor de  $\lambda$ .

### 5.7.2. RAP3D

Como nesse trabalho as imagens utilizadas são tridimensionais, é possível estender a idéia geral do RAP para o caso tridimensional, simplesmente modificando na Equação 5.24 os termos  $f$ ,  $g$  e  $h$  de forma que sejam agora vetores formados por todos os elementos da imagem tridimensional, tendo então seu tamanho definido por  $f = MNO \times 1$ ,  $g = MNO \times 1$  e  $h = MNO \times MNO$ .

O principal problema dessa abordagem é o tamanho da matriz bloco circulante, que passa a possuir uma dimensão muito grande e a exigir um grande poder de processamento e armazenamento para sua construção.

O problema do armazenamento é facilmente superado, com a construção de cada linha da matriz bloco circulante em tempo de execução. Isso pode ser feito, por



exemplo, com a utilização de ponteiros, o que resolve o problema de armazenamento, mas resulta em um aumento do custo computacional.

Quanto ao número de operações necessárias para a realização do RAP a solução é menos simples, foi utilizada uma versão modificada do RAP2D, proposto por Kuo e Mammone [Kuo e Mammone – 1992]. Como normalmente a matriz bloco circulante é esparsa e compacta, devido ao fato da PSF ser normalmente menor que a imagem, o algoritmo RAP dado pela Equação 5.25 pode ser reescrito utilizando somente a região não nula da PSF. Desse modo a equação, pode ser reescrita, para o caso tridimensional da seguinte forma:

$$\hat{f}^{(l+1)} = \begin{cases} \hat{f}^{(l)}(m,n,o) + \\ \lambda \frac{\varepsilon(i,j,k)}{\|h(i,j,k)\|^2} h(i-m, j-n, k-o; i, j, k), \text{ se } \hat{f}^{(l)}(m,n,o) \in S_{h(i,j,k)} \\ \hat{f}^{(l)}(m,n,o) \text{ caso contrário} \end{cases} \quad \text{Equação 5.29}$$

Com a utilização da Equação 5.29 é possível reduzir de forma significativa o esforço computacional necessário para a aplicação do algoritmo RAP.

### 5.7.3. Conjunto de Restrição de Não Negatividade

É possível utilizar algum conhecimento *a priori* sobre a imagem a ser restaurada. Para isso, utilizam-se conjuntos de restrição que incorporem esses conhecimentos.

O conjunto de restrição de não negatividade é um desses conjuntos, pois é sabido que não existem valores negativos para os pixels de uma imagem.

Desse modo o conjunto descrito por

$$C_+ = \{h : h \in H \text{ e } h(i) \geq 0 \forall i\} \quad \text{Equação 5.30}$$

possui apenas elementos não negativos.

A regra de projeção neste conjunto  $C_+$  é dada por:

$$P_+q(i) = \begin{cases} q(i), \text{ se } q(i) \geq 0 \\ 0, \text{ caso contrário} \end{cases} \quad \text{Equação 5.31}$$

### 5.7.4. Conjunto de Restrição de Amplitude Limitada

Esse conjunto descreve o limite inferior e superior para os valores dos pixels da imagem a ser restaurada. Esse conjunto é descrito por:

$$C_{AL} = \{h : h \in H \text{ e } \alpha \leq h(i) \leq \beta \ \forall i \in \Omega\} \quad \text{Equação 5.32}$$

Onde  $\alpha$  é o limite inferior,  $\beta$  é o limite superior e  $\Omega$  é a região onde se encontra a imagem.

O projetor do conjunto  $C_{AL}$  é dado por:

$$P_{AL}q(i) = \begin{cases} \alpha, & \text{se } q(i) < \alpha \\ q(i), & \text{se } \alpha \leq q(i) \leq \beta \\ \beta, & \text{se } q(i) > \beta \end{cases} \quad \text{Equação 5.33}$$

### 5.7.5. Conjunto de Restrição de Imagem Referência

O conjunto de restrição que utiliza uma imagem de referência é dado por:

$$C_R = \{h : h \in H \text{ e } \|h - f_R\| \leq \varepsilon_R\} \quad \text{Equação 5.34}$$

Onde

$H$  é o espaço de Hilbert

$\varepsilon_R$  é a distância máxima da imagem restaurada da imagem referência

Como imagem de referência pode-se utilizar uma imagem protótipo, ou ainda uma solução obtida por outro método, como por exemplo uma imagem restaurada pelo filtro de Wiener.

O projetor para o conjunto  $C_R$  é dado por:

$$P_Rq = f_R + \varepsilon_R \frac{q - f_R}{\|q - f_R\|} \text{ com } q \neq f_R \quad \text{Equação 5.35}$$

O valor de  $\varepsilon_R$  pode ser obtido por

$$\varepsilon_R = c \|f_R - f_{TRUE}\| \quad \text{Equação 5.36}$$

Onde  $f_{TRUE}$  é a imagem original e  $c > 0$  é o chamado índice de confiança, e pode ser determinado empiricamente. [Sezan e Trussel – 1991]

## 6. Resultados

Para a avaliação dos algoritmos foram utilizadas imagens de teste (*phantom*). Essas imagens foram geradas de forma sintética, permitindo que suas características fossem conhecidas.

A utilização dessa abordagem se faz necessária, por permitir utilizar métodos de estimação da qualidade da imagem.

Um parâmetro que pode ser utilizado é o ISNR (Melhoria da Razão Sinal Ruído), o qual é dado por:

$$ISNR = 10 \log_{10} \left\{ \frac{\sum_{i,j,k} [f(i,j,k) - g(i,j,k)]}{\sum_{i,j,k} [f(i,j,k) - \hat{f}(i,j,k)]} \right\} \quad \text{Equação 6.1}$$

Onde:

$g(i, j, k)$  imagem borrada

$\hat{f}(i, j, k)$  imagem restaurada

$f(i, j, k)$  imagem original

Outro parâmetro é o *Universal Image Quality Index* (UIQ) [Wang and Bovik – 2002] que é dado por:

$$Q = \frac{4\sigma_{xy}\bar{x}\bar{y}}{(\sigma_x^2 + \sigma_y^2)[(x^2) + (y^2)]} \quad \text{Equação 6.2}$$

Onde:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad \text{Equação 6.3}$$

$$\bar{y} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N y_i \quad \text{Equação 6.4}$$

$$\sigma_x^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{Equação 6.5}$$

$$\sigma_y^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2$$

**Equação 6.6**

$$\sigma_{xy} = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

**Equação 6.7**

Onde:  $x$  é a imagem original  $f$

$y$  é a imagem restaurada  $\hat{f}$

Os valores de  $Q$  podem estar no intervalo  $[-1, 1]$  de modo que o melhor valor, 1, só é atingido se e somente se  $y_i = x_i$  para todo  $i = 1, 2, 3, \dots, N$ .

Este índice de qualidade modela qualquer distorção como uma combinação de três fatores: Perda de correlação, distorção de luminância, e distorção de contraste.

Imagens reais obtidas por um microscópio confocal também foram utilizadas de forma a se observar os resultados dos métodos propostos em condições reais de utilização, mas em compensação o método de análise é visual.

### **6.1. Imagem de teste (phantom)**

O *phantom* utilizado é tridimensional composto de um cubo com dimensão de  $32 \times 32 \times 32$  *voxels* de intensidade 255 com estruturas também cúbicas no seu interior com intensidade zero. Esse cubo é circundado por uma região também cúbica de modo a se obter a dimensão total  $64 \times 64 \times 64$  *voxels*. Abaixo na Figura 6-1, pode se ver o *phantom*.

Para a utilização da imagem como parâmetro para os testes essa imagem foi convoluída com a psf teórica do microscópio confocal. Essa psf foi gerada utilizando o programa XCOSM, utilizando os seguintes parâmetros:

Tamanho Pixel XY	0,04 $\mu$ m
Distancia entre as Fatias Z	0,04 $\mu$ m
Magnificação Lateral da Lente	60
Abertura Numérica	1,4
Distância de Trabalho da Lente	0,21 mm
Comprimento de Onda	0.000530

Índice Refração Cover Slip	1.522
Índice Refração do Meio	1.51
Índice Refração do Espécime	1,33
Comprimento Tubo Óptico	160
Tipo de Diafragma	Linear
Distância entre as aberturas	0 $\mu\text{m}$
Largura da abertura	15 $\mu\text{m}$

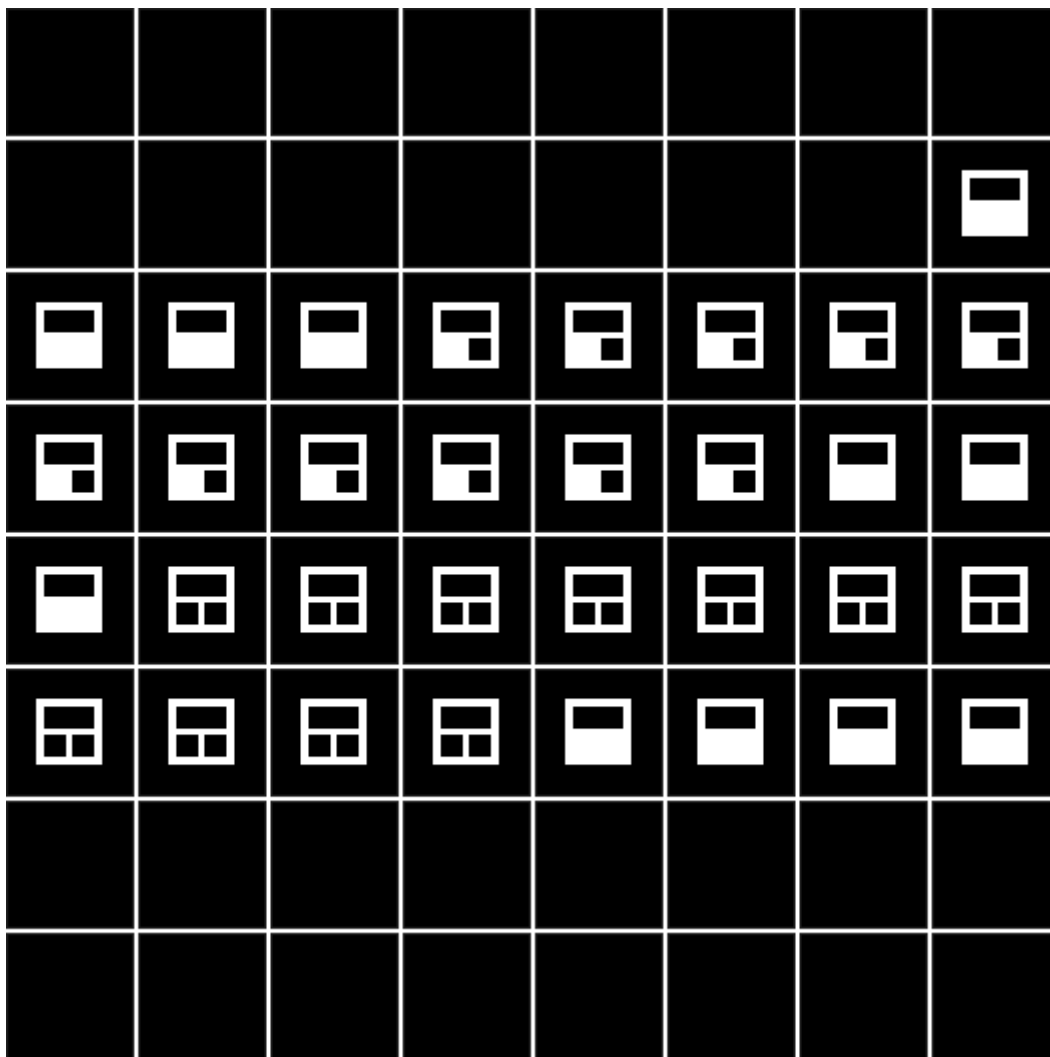
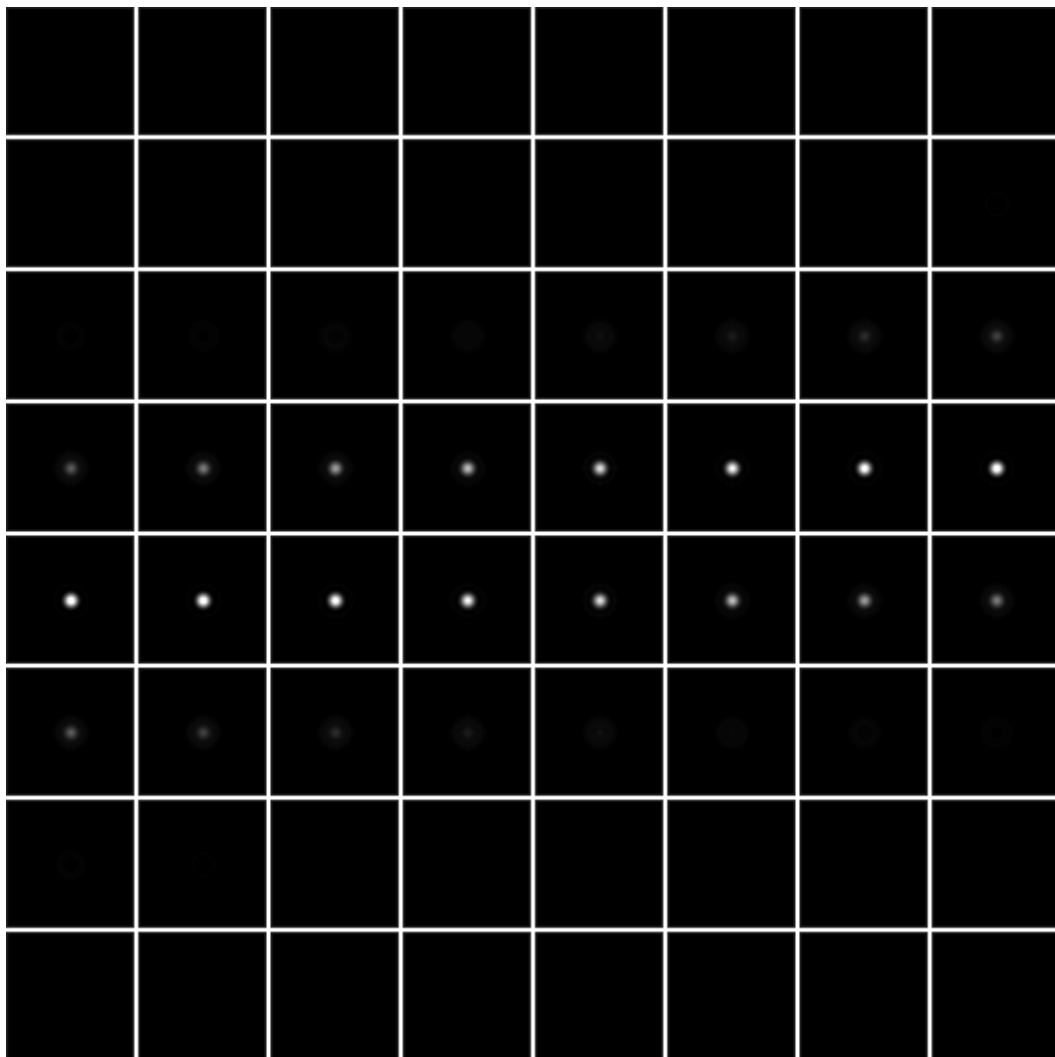


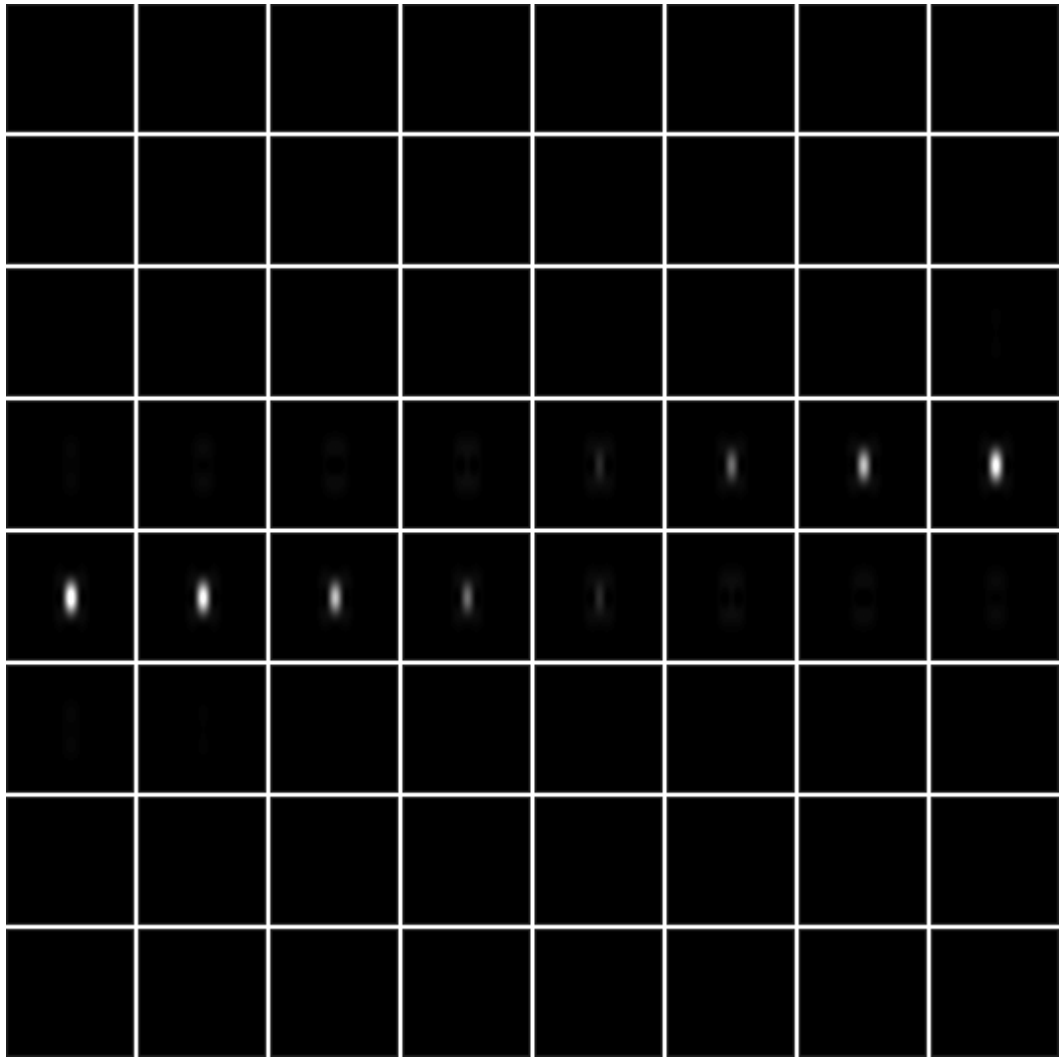
Figura 6-1: Todas as fatias (*slices*) do *phantom* (ordenadas da esquerda para direita e de cima para baixo em ordem decendente)

Na Figura 6-2 é exibido o corte XY da PSF e na Figura 6-3 é exibido o corte XZ da mesma. É necessário salientar que devido aos baixos valores da psf, de modo a permitir uma melhor visualização, a intensidade dos tons de cinza foi alterada.

Pode-se perceber por essas figuras que o grande fator de borramento se encontra ao longo do eixo óptico.



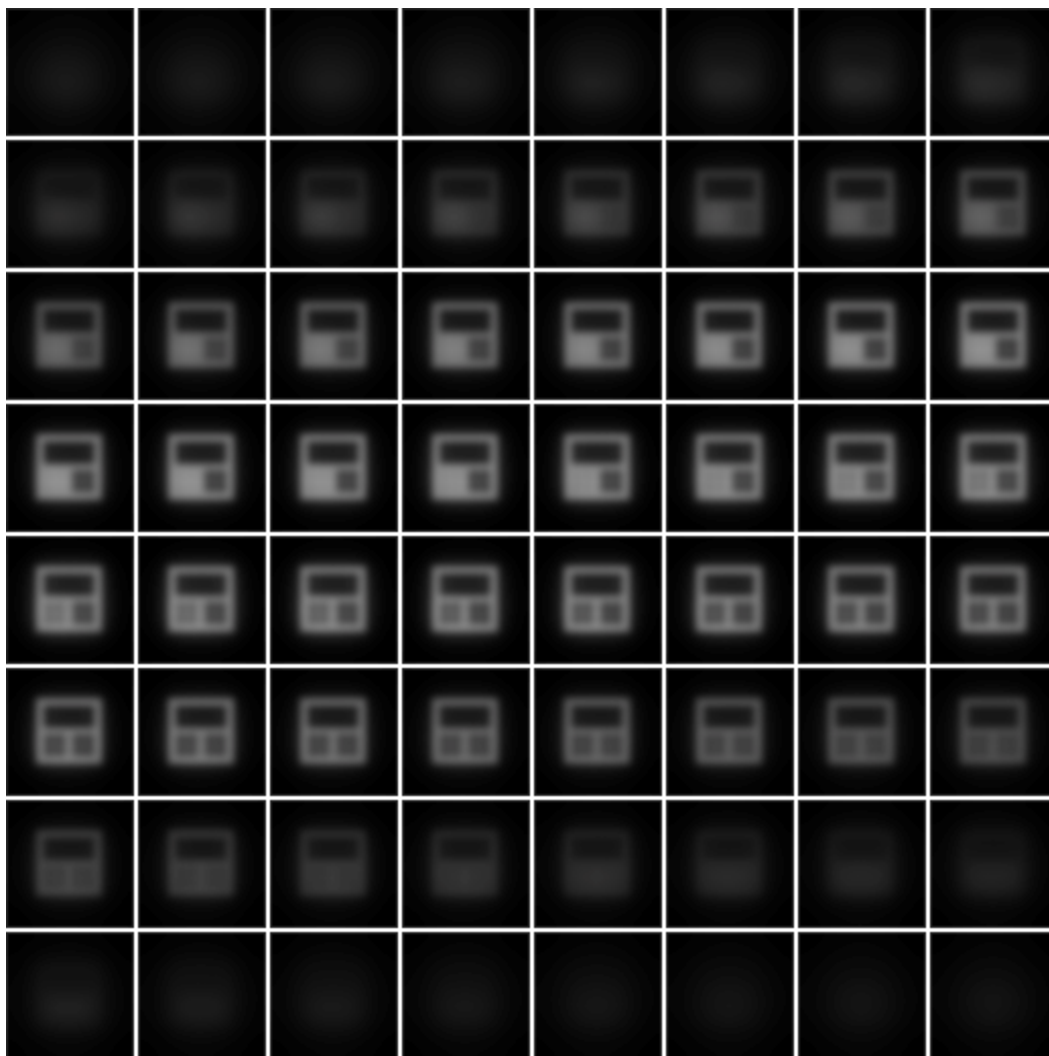
**Figura 6-2: PSF – Mostra de todas as fatias do plano XY ordenados da esquerda para direita e de cima para baixo em ordem descendente.**



**Figura 6-3: PSF todas as fatias do plano XZ ordenados da esquerda para direita e de cima para baixo em ordem decendente.**

Na Figura 6-4 é possível ver o *phantom* borrado pela psf.

Ainda com o intuito de se conseguir uma imagem de teste mais realística foi incluído o ruído Poisson.



**Figura 6-4: Imagem degradada pela PSF mostrando todas as fatias do plano XY ordenados da esquerda para direita e cima para baixo ordenados em ordem decendente.**

Para fim de testes foram utilizados vários níveis de ruído Poisson, mas na figura vê-se a imagem degradada com ruído utilizando um parâmetro  $\lambda=1$ .

## **6.2. Redução do Ruído Poisson**

Existem vários métodos de redução do ruído Poisson, mas como já foi discutido em seção anterior, esse trabalho utilizará a Transformada de Anscombe (AT) para lidar com esse ruído.



Para a remoção do ruído uma observação é necessária aplicar a AT que é dada por:

$$z = 2 \cdot \sqrt{u + \frac{3}{8}} \quad \text{Equação 6.8}$$

Com o objetivo de remover esse ruído, agora aproximadamente aditivo e gaussiano, foi utilizado o filtro de Wiener pontual, dado por:

$$\tilde{s}_i = E[S_i] + \frac{\sigma_{S_i}^2}{\sigma_{S_i}^2 + 1} (z_i - E[S_i]) \quad \text{Equação 6.9}$$

A média  $E[S_i]$  e a variância  $\sigma_{S_i}^2$  podem ser estimadas na prática, permitindo obter melhores resultados, ou ainda utilizando os valores teóricos da AT.

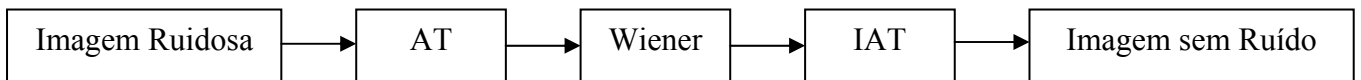
Utilizando a Transformada Inversa de Anscombe (IAT):

$$b_i = \frac{1}{4} \cdot \hat{s}_i^2 - \frac{1}{8} \quad \text{Equação 6.10}$$

Obtendo agora a imagem com o ruído Poisson reduzido.

Essa técnica de redução do ruído se faz necessária antes do processamento do borramento porque alguns métodos de remoção do borramento, como o RAP, não consideram a existência de ruído Poisson na sua formulação.

Na figura pode-se ver um diagrama de blocos mostrando a seqüência de operações necessárias para a remoção do ruído



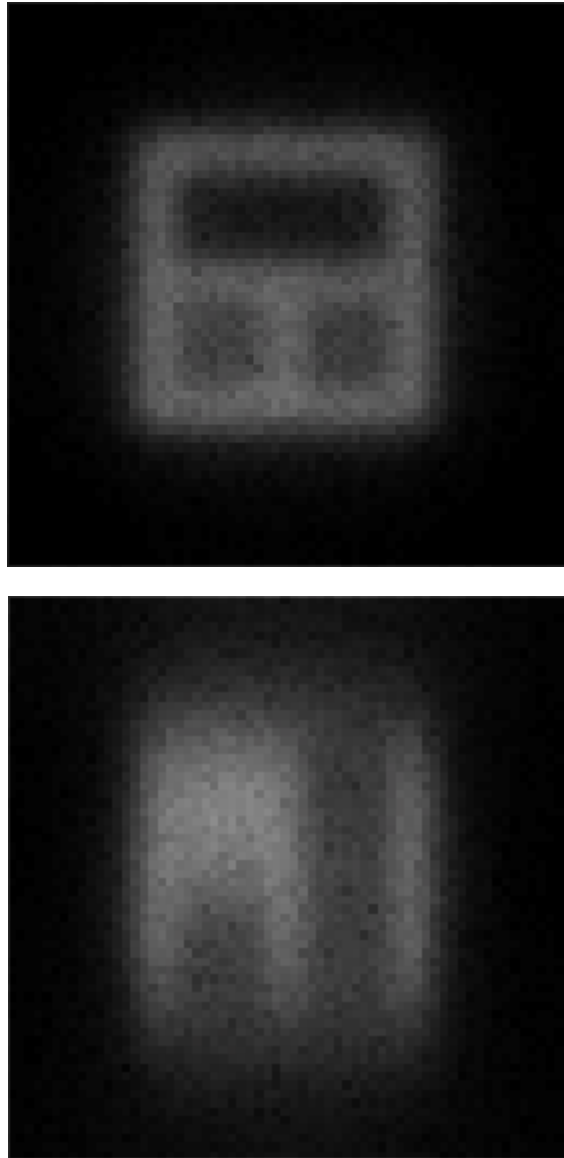
**Figura 6-5: Diagrama de Blocos, redução de ruído Poisson**

Na Tabela 6-1 é possível ver alguns resultados obtidos pelo método da AT. A tabela mostra a redução da variância das imagens antes e após o processo de remoção de ruído.

**Tabela 6-1: Redução da Variância após AT**

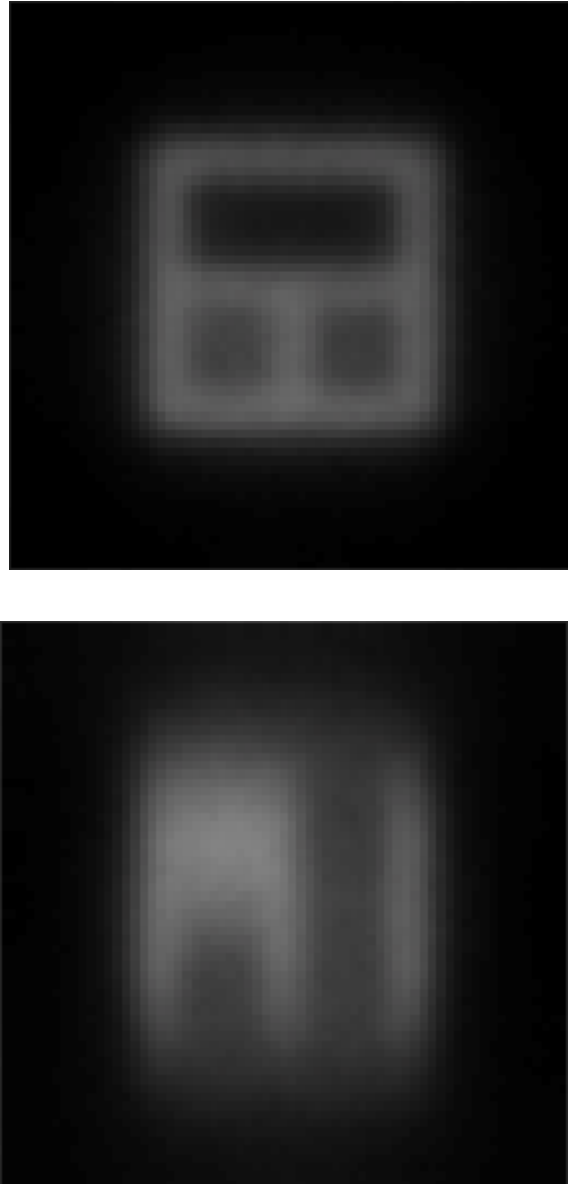
$\Lambda$	Variância antes da AT e Wiener	Variância após AT e Wiener
1	0.364544	0.028585
2	0.362562	0.061806
3	0.462332	0.101246
4	0.378280	0.109859

Na Figura 6-6 vê-se o *phantom* borrado e degradado pelo ruído Poisson com um parâmetro  $\lambda = 1$ .



**Figura 6-6: Phantom borrado e degradado com ruído Poisson. Acima corte no plano XY e abaixo corte no plano XZ.**

Na Figura 6-7 é possível ver o resultado obtido na redução do ruído Poisson, utilizando a AT.



**Figura 6-7: Phantom processado para remoção do ruído Poisson. Acima corte no plano XY e abaixo corte no plano XZ**

### **6.3. RAP**

Foram utilizados nesse trabalho os algoritmos RAP e RAP3D propostos na seção anterior, e ainda os conjuntos de restrições de amplitude limitada e positividade.

A utilização desses conjuntos é necessária para evitar oscilações inerentes ao algoritmo RAP permitindo obter melhores resultados, pois o RAP sem conjunto de restrições tende ao filtro inverso [Mammone-1992], e a presença de ruído que, embora reduzido pela AT, ainda é significativo.

Para evitar a ocorrência de convolução circular com os algoritmos RAP, a imagem foi expandida.

Ainda com o intuito de amenizar o problema do mau condicionamento de bordas, as imagens foram espelhadas sobre a região expandida.

Foram utilizadas duas abordagens para o processamento das imagens.

A primeira consistiu em integrar a PSF, de modo a reduzi-la a apenas uma dimensão, para aplicar o processamento somente no eixo Z. Isto é possível devido ao baixo nível de borramento das imagens nos eixos X e Y.

Essa abordagem foi denominada nesse trabalho como RAP1D.

A outra abordagem utilizou a PSF tridimensional de maneira integral, utilizando o RAP3D já explicitado no capítulo anterior.

Na Tabela 6-2 e Tabela 6-3 pode-se ver resultados obtidos pelo RAP1D utilizando os conjuntos de restrições de AL e positividade para vários valores de relaxação.

Foi utilizando como critério de parada os limites de 100 e 200 iterações.

Na Tabela 6-4 pode-se ver os resultados obtidos com o uso do RAP3D para diversos parâmetros de relaxação, utilizando 10 iterações como critério de parada.

Um fato interessante de ser destacado é como o fator de relaxação interfere na restauração da imagem. Teoricamente seria desejável utilizar valores de relaxação unitário ou próximos de um, mas nos testes pode-se ver que parâmetros maiores implicam em deterioração da imagem em vez de melhoria.

Relaxação	ISNR – 100	UIQ – 100
0,01	0,514456	0,515976
0,02	0,519139	0,516646
0,03	0,518390	0,516657
0,04	0,517127	0,5166
0,05	0,515880	0,51654
0,06	0,514734	0,516469
0,07	0,513666	0,516415
0,08	0,512644	0,516365
0,09	0,511686	0,516313
1	0,502008	0,513861
1,5	0,484269	0,51255
2	0,25971	0,50777

**Tabela 6-2: ISNR e UIQ – RAP1D, critério de parada 100 iterações**

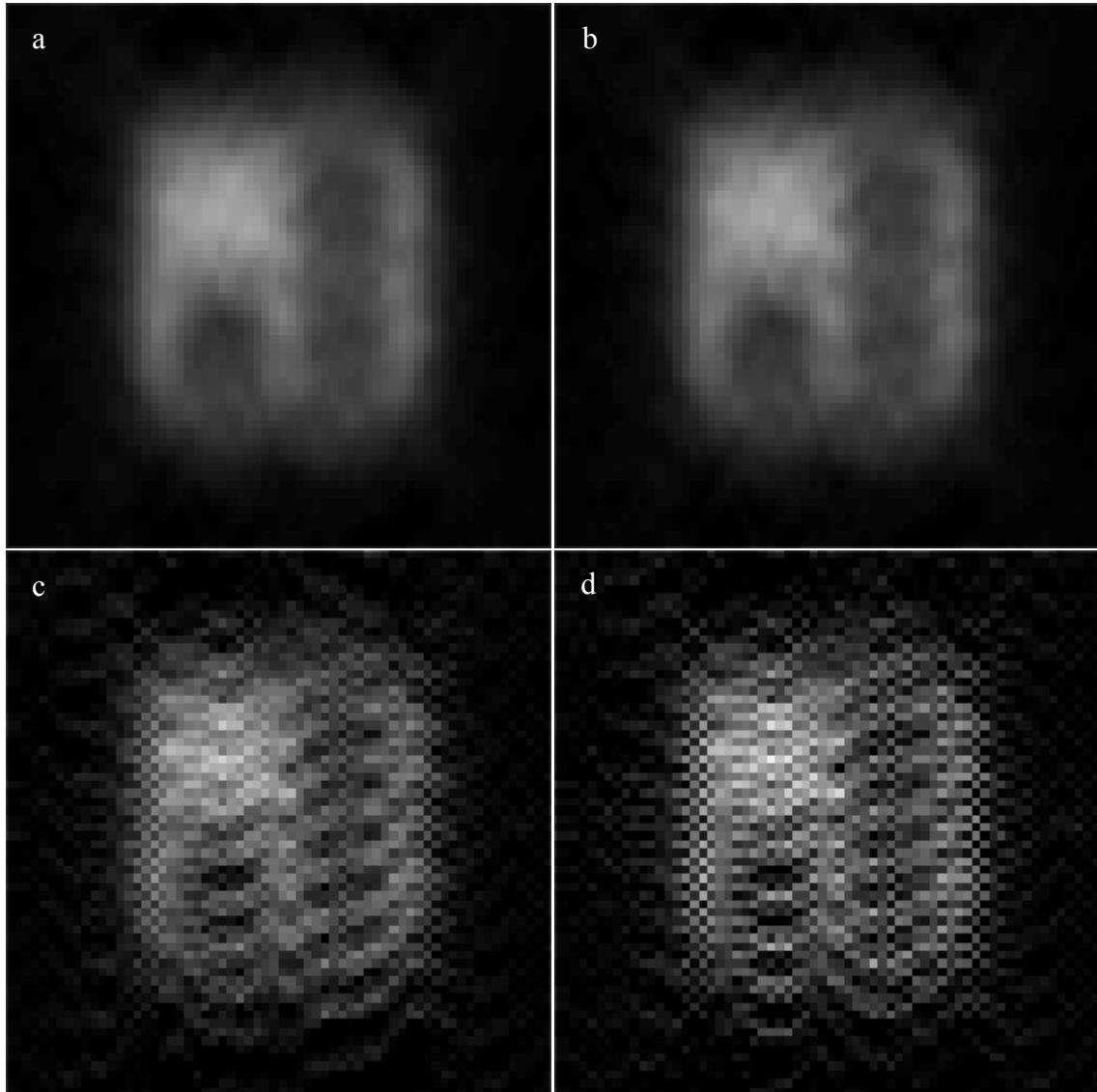
Relaxação	ISNR – 200	UIQ – 200
0,01	0,519023	0,516631
0,02	0,516999	0,516584
0,03	0,514595	0,516446
0,04	0,512526	0,516336
0,05	0,510694	0,51623
0,06	0,509037	0,516144
0,07	0,507438	0,516061
0,08	0,506029	0,515984
0,09	0,504685	0,515915
1	0,302336	0,51205
1,5	0,271192	0,50997
2	0,067372	0,499974

**Tabela 6-3: Resultados utilizando RAPID com critério de parada igual a 200 iterações**

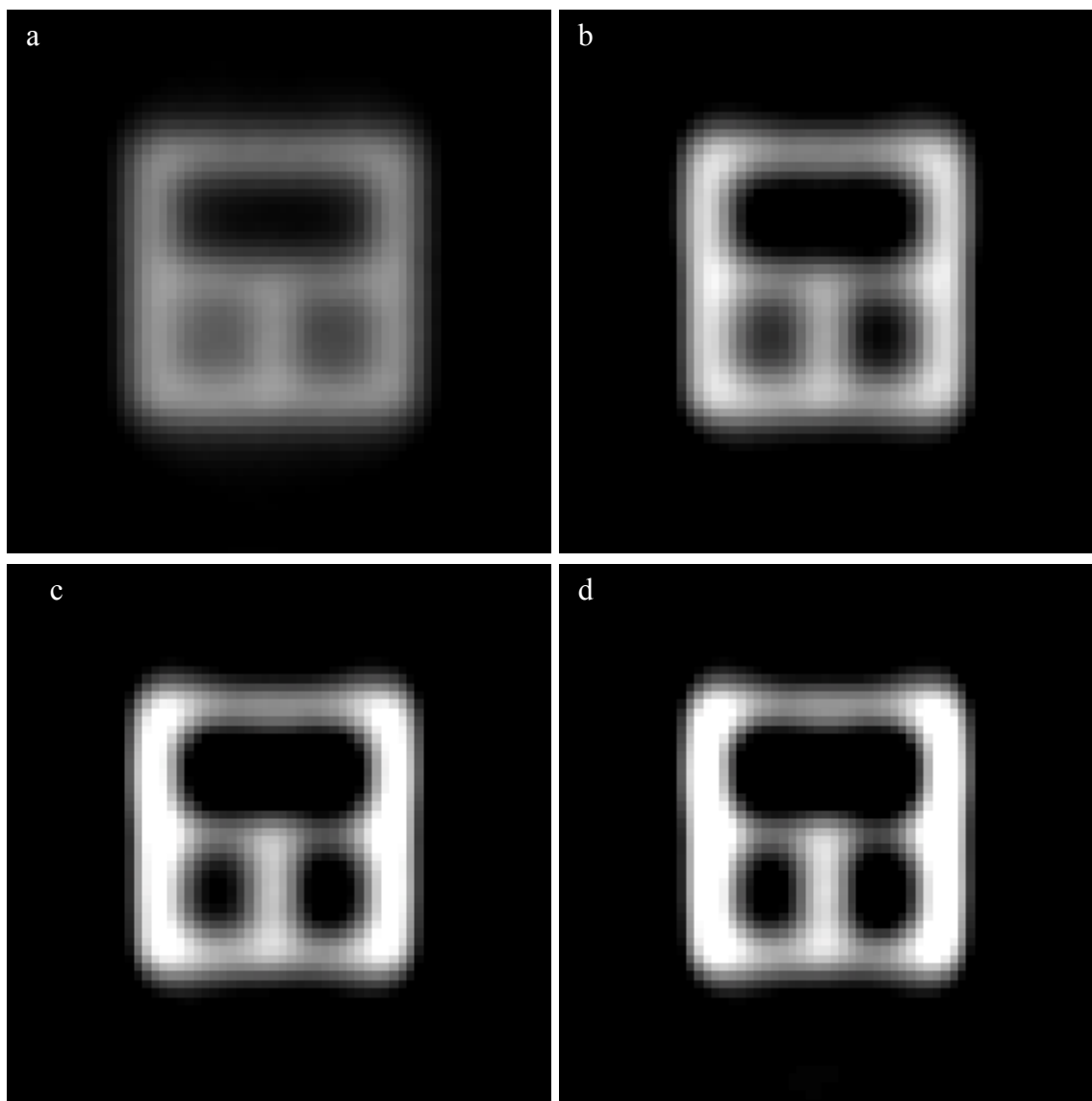
Relaxação	ISNR	UIQ
0,0001	1,206066	0,652902
0,0002	1,754878	0,714152
0,0003	2,061484	0,744576
0,0004	2,231252	0,762333
0,0005	2,317539	0,772708
0,0006	2,352575	0,779014
0,0007	2,358578	0,781283
0,0008	2,346893	0,783138
0,0009	2,322554	0,785106

**Tabela 6-4: Resultados utilizando RAP3D com critério de parada igual a 10 iterações.**

É possível ver os efeitos de sobre-relaxação na Figura 6-8.



**Figura 6-8: (a) corte XZ RAPID 100 iterações e relaxação 0.03 (b) corte XZ RAPID 200 iterações e relaxação 0.04 (c) corte XZ RAPID 100 iterações e relaxação 2 (d) corte XZ RAPID 200 iterações e relaxação 2**

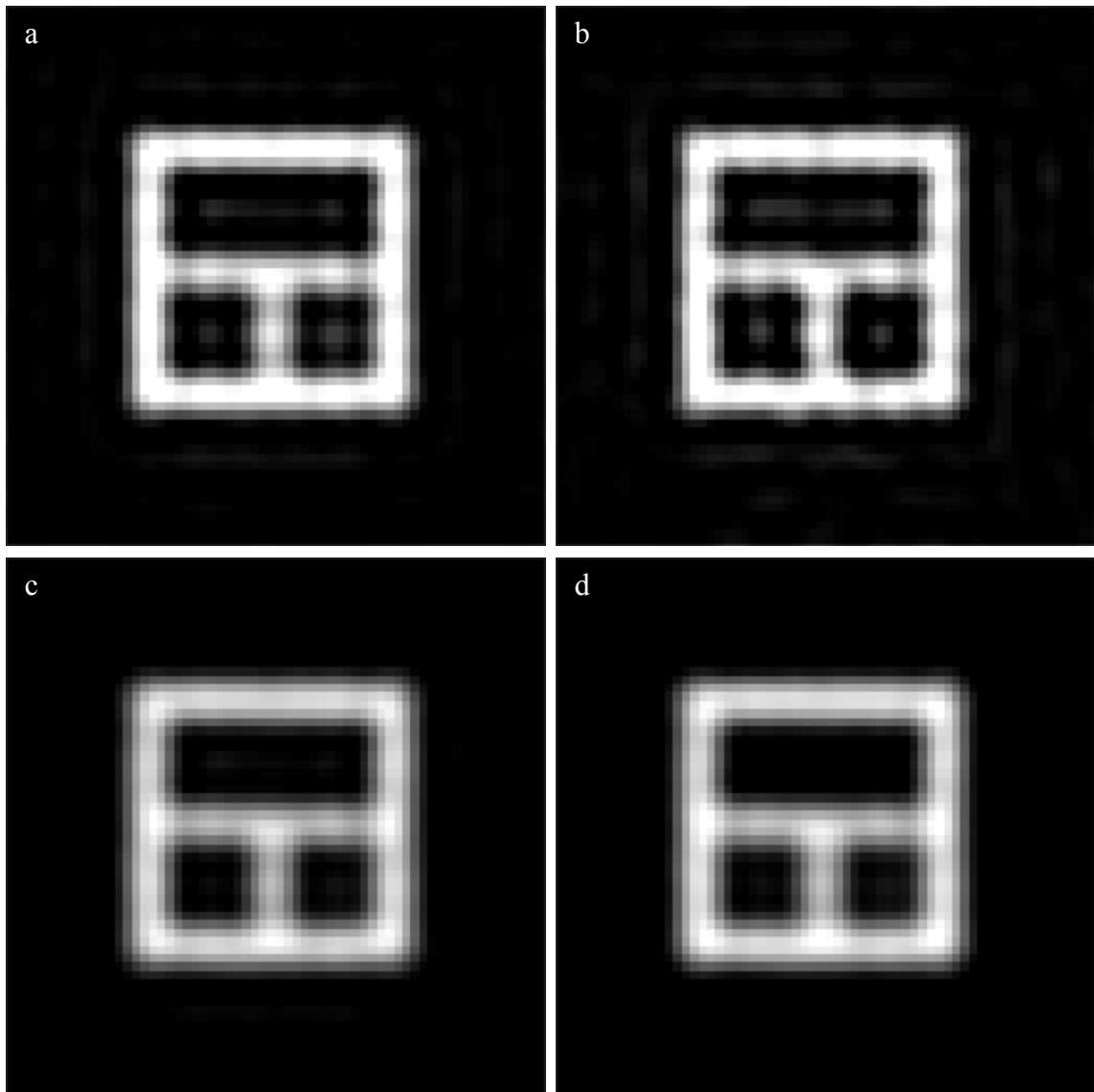


**Figura 6-9 : Cortes XY mostrando resultados obtidos pelo RAP3D com critério de parada de 10 iterações e utilizando valores de relaxação diferentes: (a) 0,0001 (b) 0,0004 (c) 0,0007 (d) 0,0009**

Na Figura 6-9 é possível ver os resultados obtidos utilizando o RAP3D com os conjuntos de restrições de amplitude limitada e positividade.

Pode-se perceber que os resultados são bem superiores aos do RAP1D.

Na Figura 6-10 pode-se ver os resultados obtidos utilizando outros métodos POCS (desenvolvidos por [Homem - 2003]) utilizados como parâmetro de comparação.



**Figura 6-10: Imagens restauradas utilizando (a)Wiener, (b)Goodman-Belsher, (c)POCS1, (d)POCS2**

A solução da Figura 6-10(a) consiste na utilização de um filtro de Wiener tridimensional para a restauração da imagem.

A solução da Figura 6-10(b) consiste da utilização do filtro proposto por Goodman-Belsher [Goodman – 1976], que consiste de um filtro linear baseado em um critério de mínimo erro quadrático, o qual considera a existência de ruído Poisson na imagem a ser restaurada.



O POCS1 é formado pelo seguinte conjunto de restrições:

$$POCS1 = P_5.P_4.P_3.P_1 \quad \text{Equação 6.11}$$

Onde:

- $P_5$  – Suporte Compacto
- $P_4$  – Positividade e Extensão Finita
- $P_3$  – Suavização Adaptativa Pontual
- $P_1$  – Conjunto de restrição baseado na Solução de Wiener

Para a utilização do POCS1 é necessário utilizar algum método de redução do ruído Poisson.

Nesse caso foi utilizado o método de redução pela Transformada de Anscombe, já explicada em seção anterior.

O POCS2 pode ser descrito como:

$$POCS2 = P_5.P_4.P_3.P_2 \quad \text{Equação 6.12}$$

Onde:

- $P_5$  – Suporte Compacto
- $P_4$  – Positividade e Extensão Finita
- $P_3$  – Suavização Adaptativa Pontual
- $P_2$  – Conjunto de restrição baseado na Solução de Goodman-Belsher

Na Tabela 6-5 pode-se ver as melhorias numéricas obtidas utilizando os métodos POCS.

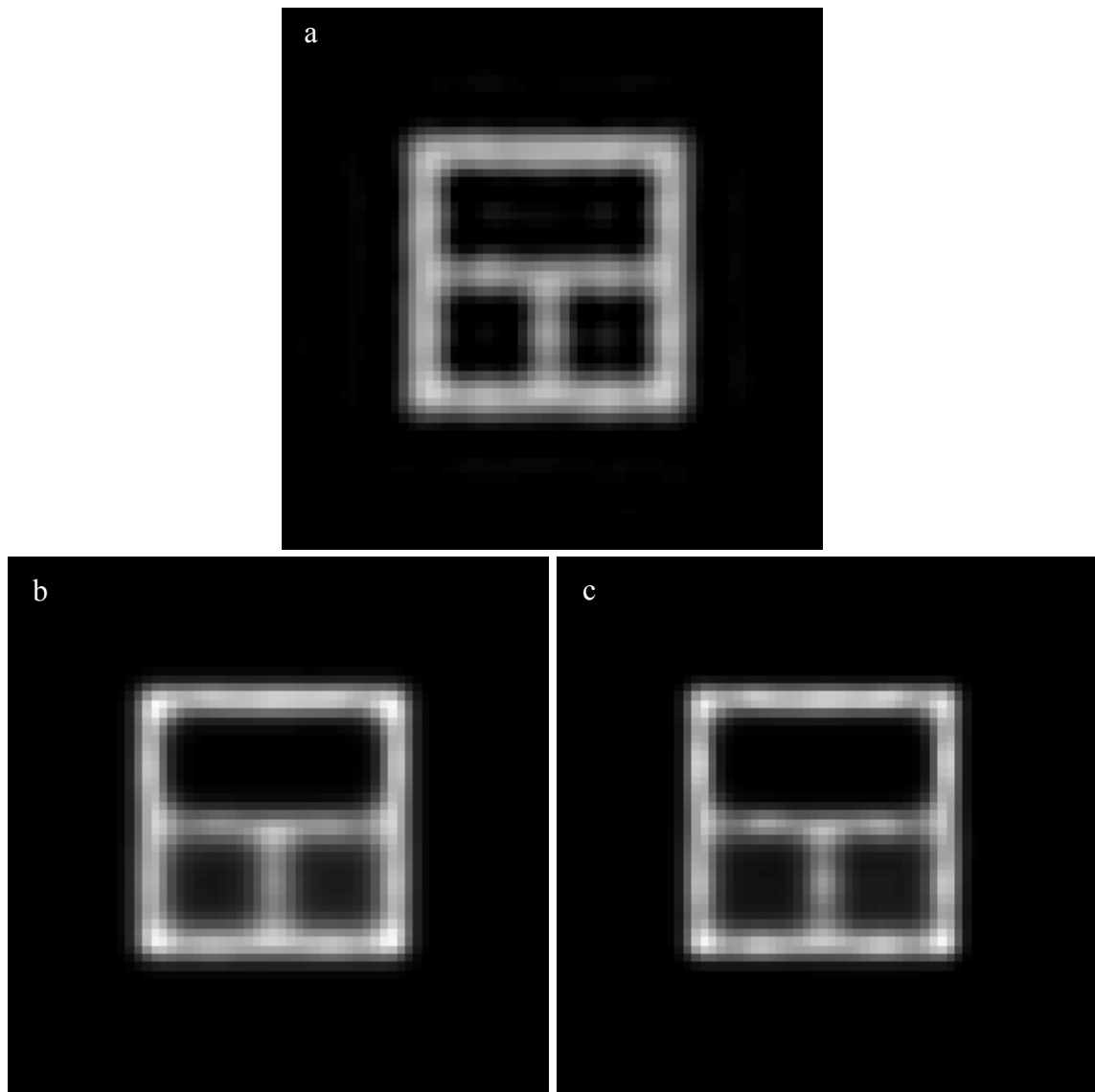
<b>Método</b>	<b>ISNR</b>	<b>UIQ</b>
Wiener	4,821839	0,880097
Goodman-Belsher	5,023270	0,885067
POCS1	3,997314	0,835684
POCS2	4,228896	0,84563

**Tabela 6-5: Resultados obtidos por métodos POCS**

Ainda com o intuito de validar os métodos foram utilizados como métodos padrão, os algoritmos de restauração implementados pelo XCOSM que são: *Expectation Maximization* (EM) [Concello – 1994][ Concello – 1995][ Concello – 1998] e o *Regularized Linear Least Squares* (LLS) [Preza – 1992].

O EM é um método iterativo que possui uma convergência lenta, mas apresenta bons resultados.

O LLS já é um método linear onde os resultados embora possuam menor qualidade que o EM, tem como principal vantagem o baixo custo computacional.



**Figura 6-11: (a) Phantom restaurado usando LLS (b) Phantom restaurado usando EM com 50 iterações (c) Phantom restaurado usando EM com 100 iterações.**

<b>Método</b>	<b>ISNR</b>	<b>UIQ</b>
LLS	4,631757	0,873695
EM-50	3,651365	0,826094
EM-100	3,945784	0,844504

**Tabela 6-6: Resultados utilizando os métodos de referência, LLS, EM com 50 e 100 iterações como critério de parada.**

Na Tabela 6-6 é possível ver os resultados numéricos utilizando o LLS, o EM utilizando 50 e 100 iterações como critério de parada.

Na Figura 6-12 e Figura 6-13 são mostrados os resultados utilizando as imagens reais obtidas no microscópio confocal do INCOR.

Para tentar obter melhores resultados das imagens foi utilizado um método de correção do *photo-bleach*, existente no XCOSM. Esse algoritmo tenta corrigir a redução da fluorescência, por esgotamento do fluorocromo.

Para fazer essa correção o algoritmo faz a soma de cada uma das fatias da imagem tridimensional e armazena esses valores.

Após esse processo o algoritmo testa dois modelos exponenciais:

- exponencial somado a uma constante
- exponencial.

Para determinar qual modelo é melhor, o programa calcula o desvio da solução gerada pelos modelos dos valores reais, e aquele que apresentar o melhor valor é escolhido.

Encontrado o melhor modelo, todas as fatias da imagem são atualizadas utilizando esse modelo, de modo a minimizar os efeitos do *photo-bleach*.

Para efeito de comparação, na Figura 6-14 é mostrada a mesma imagem restaurada pelos métodos LLS e EM.

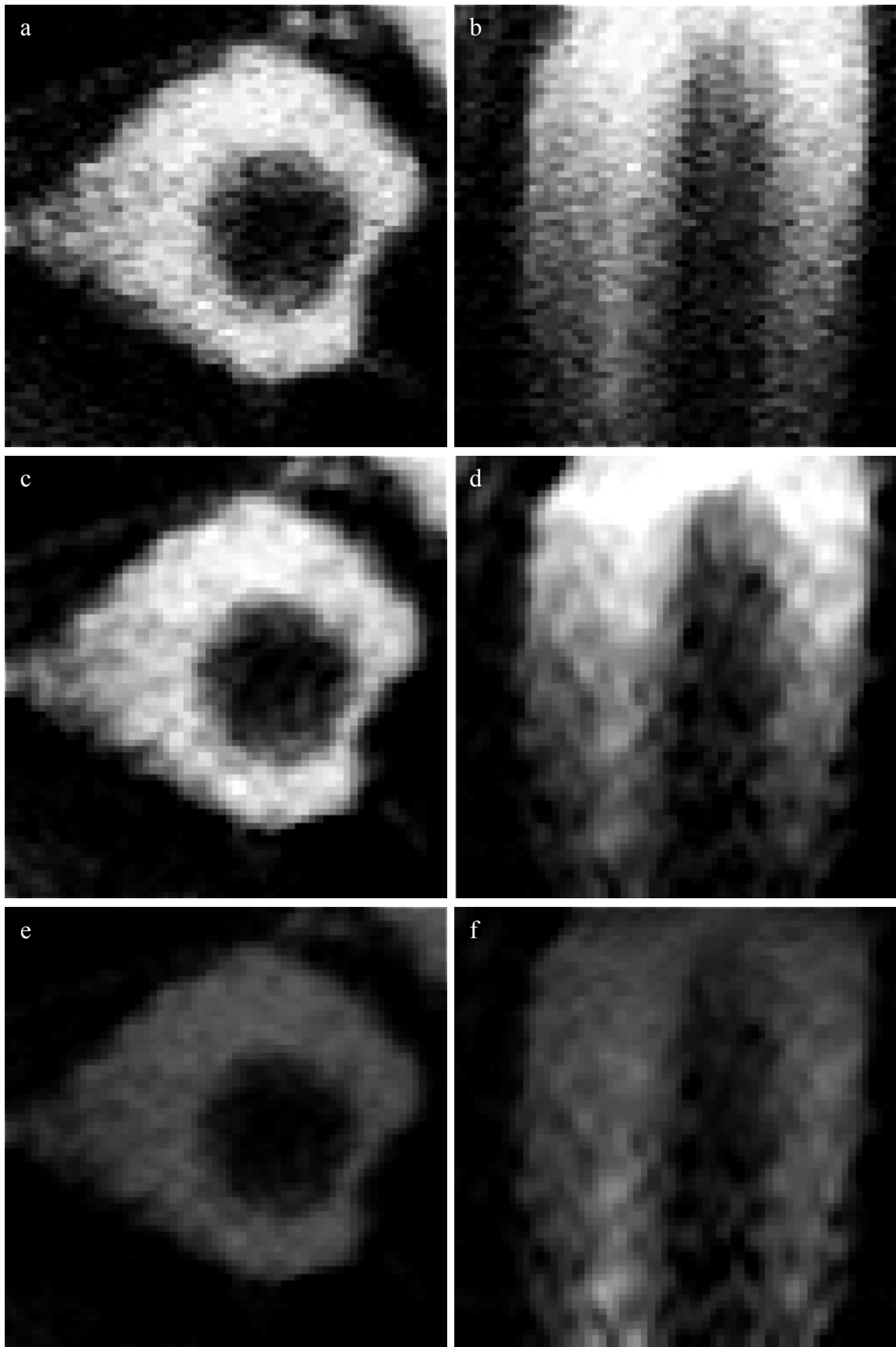
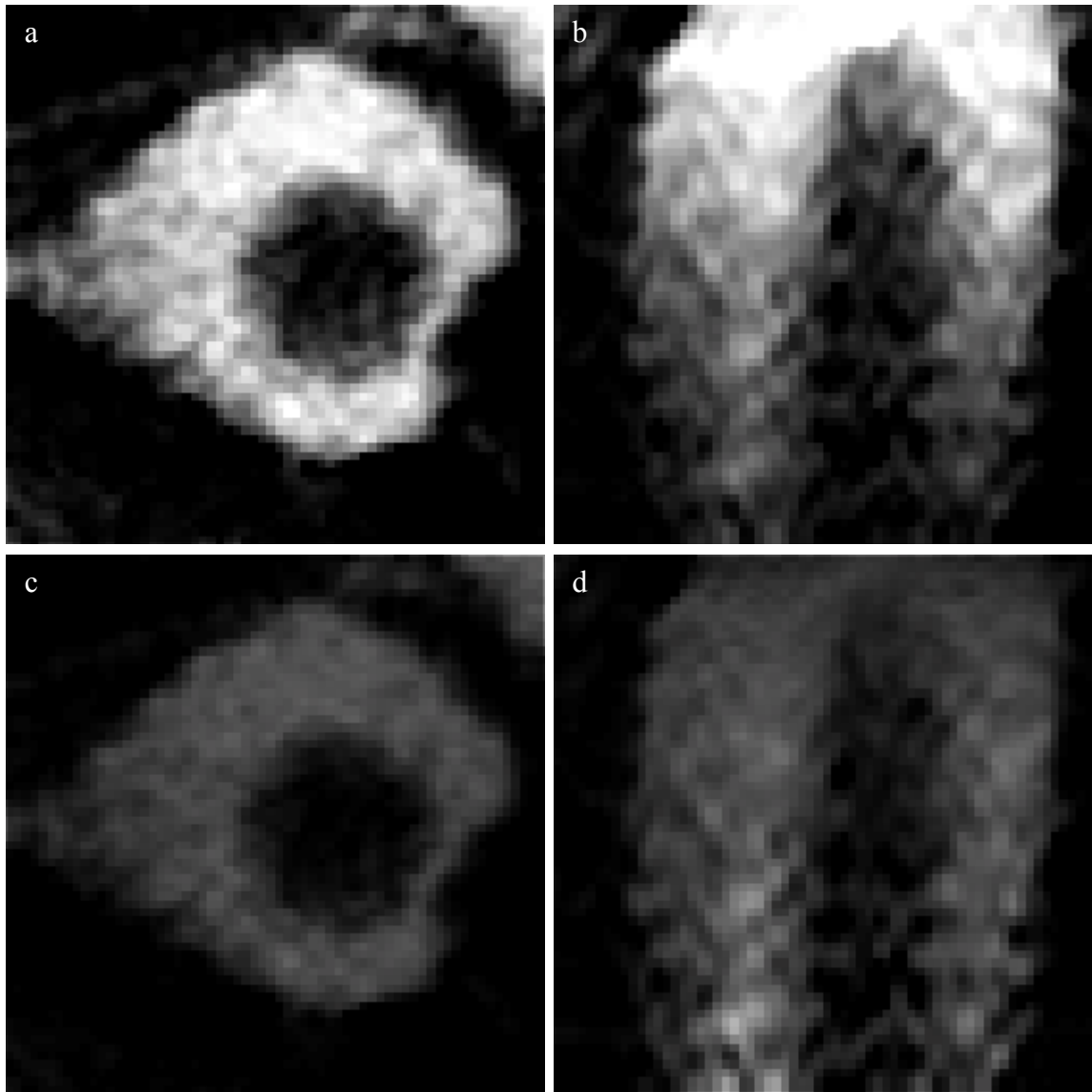
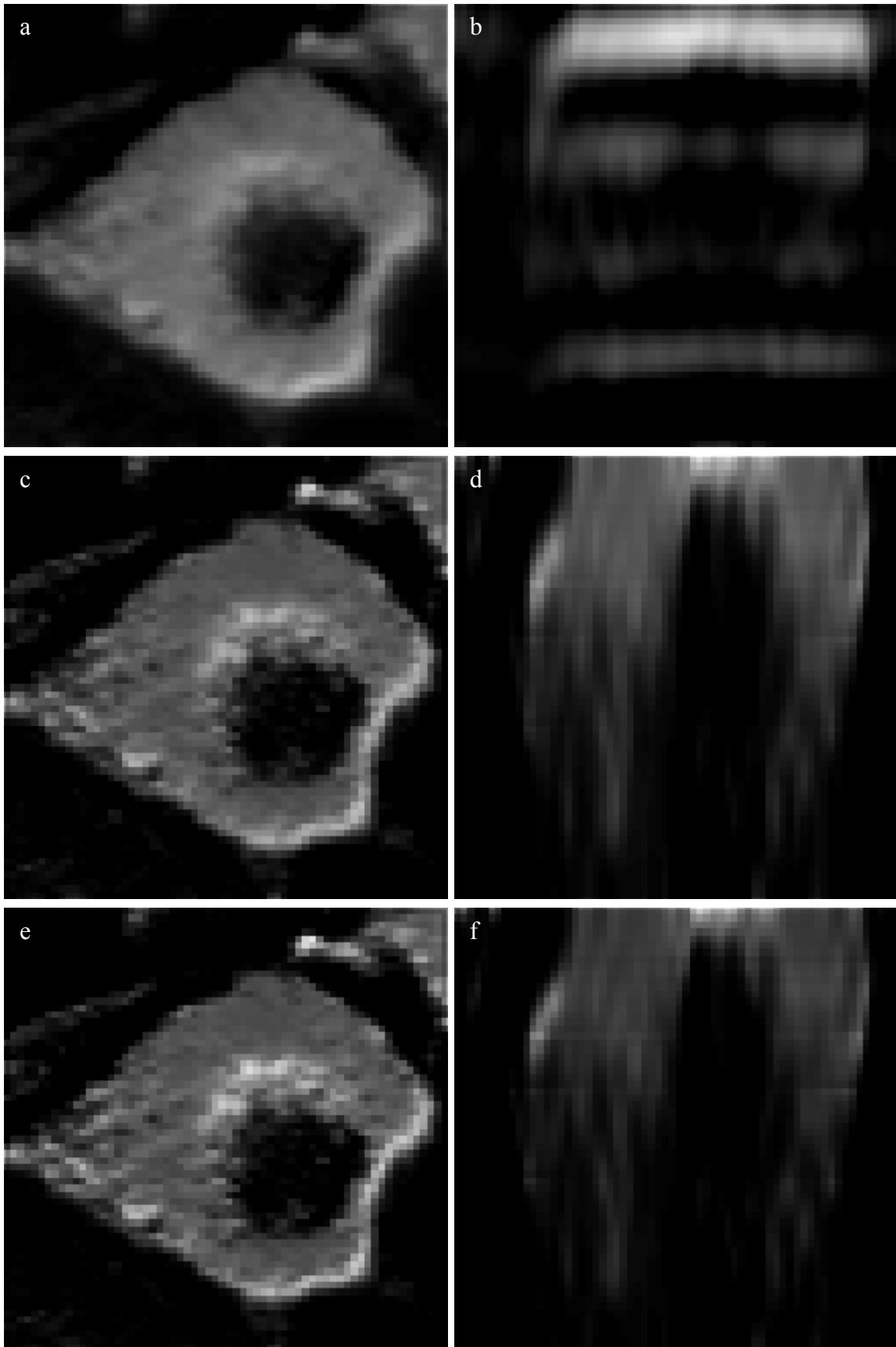


Figura 6-12: (a)(b) imagem original, (c)(d) RAP1D 100 iterações (e)(f) Correção de *Photo-bleach* e RAP1D 100 iterações.



**Figura 6-13:** Nas imagens (a) corte no plano XY (b) corte no plano foi utilizado o RAP1D 200 iterações XZ. Nas imagens(c) corte no plano XY (d) corte no plano XZ foram utilizados a Correção de *Photo-bleach* e RAP1D 200 iterações.



**Figura 6-14: (a) Corte XY restaurado pelo LLS (b) Corte XZ restaurado pelo LLS (c) Corte XY restaurado pelo EM com 50 iterações (d) Corte XZ restaurado pelo EM com 50 iterações (e) Corte XY restaurado pelo EM com 100 iterações (f) Corte XZ restaurado pelo EM com 100 iterações**

## 7. Conclusões

Para a realização desse trabalho, foram utilizadas várias máquinas, todas utilizando sistema operacional Linux, com Kernel igual ou superior a versão 2.4.

Como linguagem de programação foi utilizado a linguagem C do GCC(*GNU Compiler Collection*) versão 3.3 ou superior.

Os computadores utilizados foram:

- Computador tipo *desktop*, com processador AMD Athlon 64 – 3000+, com 1GB de memória RAM.
- Computador tipo *desktop*, com processador AMD Athlon 64 – 3200+, com 1GB de memória RAM.
- Estações de Trabalho com dois processadores Intel Xeon 2.4Mhz HT, com 1GB de memória RAM.

As estações de trabalho fazem parte do Cluster existente no GAPIS (Grupo de Arquitetura e Processamento de Imagens e Sinais), que conta com 15 estações interligadas.

Os métodos POCS apresentam uma boa melhoria na qualidade da imagem mas como qualquer método interativo possui um custo computacional maior que o dos métodos lineares.

O RAP1D (unidimensional aplicado na direção do eixo Z) apresenta um desempenho favorável em termos de custo computacional, com resultados inferiores quando comparado ao RAP3D ou com os outros métodos utilizados como padrão.

O tempo de processamento de cada imagem utilizando o RAP1D é pequeno, sendo de aproximadamente 10 minutos para realizar 100 iterações.

Utilizando o RAP de forma tridimensional, montando a matriz bloco circulante a partir da PSF tridimensional que neste trabalho possui dimensões de 64x64x64, o consumo de memória é de aproximadamente  $1.75 \cdot 10^{13}$  bytes.

Uma solução para esse problema é a montagem em tempo de execução da matriz bloco circulante, mas há um aumento no custo computacional.

Para contornar o problema de tamanho da matriz foi utilizado nesse trabalho o RAP3D o qual foi apresentado no capítulo 5, onde não é necessário criar a matriz bloco circulante, pois é utilizada a própria PSF.

Utilizando essa solução há uma sensível redução, tanto do consumo de memória, como do custo computacional, mas mesmo assim, uma única iteração demanda mais de três horas de processamento no *Desktop* com processador Athlon64 3200.

Cabe salientar que todos os algoritmos foram elaborados de forma seqüencial, não aproveitando o paralelismo possível pelo cluster.

É possível que com os algoritmos elaborados de forma paralela os tempos caiam significativamente, permitindo obter melhores resultados em um tempo menor, viabilizando ainda mais a utilização do RAP.

## **7.1. Trabalhos Futuros**

Um possível trabalho futuro seria a elaboração dos algoritmos de forma paralela para se beneficiar do poder de processamento distribuído do cluster, viabilizando alguns algoritmos que neste trabalho foram bastante lentos.

Outra possibilidade seria a obtenção de outros conjuntos de restrição para tentar melhorar ainda mais o rendimento dos métodos POCS.



## Referências Bibliográficas

- [Agard – 1984 ] Agard, D. A. *Optical Sectioning Microscopy: Cellular Architecture in ThreeDimensions*. Ann. Rev. Biophys. Bioeng, Vol. 13, pp. 191-219, 1984.
- [Andrews e Hunt – 1977] Andrews, H. C. e Hunt, B. R. *Digital Image Restoration*. Prentice-Hall, Inc., 1977.
- [Anscombe – 1948] Anscombe, F. J. *The Transformation of Poisson, Binomial and Negative-Binomia Data*. Biometrika, Vol. 15, pp. 246-254, 1948.
- [Bertero e Boccacci – 1998] Bertero, M. and Boccacci, P. *Introduction to Inverse Problems in Imaging*. Institute of Physics Publishing, IOP, 1998.
- [Born e Wolf – 1999] Born, M. e Wolf, E. *Principles of Optics. Eletromagnetic Theory of Propagation Interference and Diffraction of Light*. 7<sup>th</sup> edition, Cambridge, England: Cambridge University Press, 1999.
- [Castleman – 1996] Castleman, K. R. *Digital Image Processing*. Prentice-Hall, Inc., 1996.
- [Concello – 1994] J.J. Kim, E.W. Hansen, "Enhanced three-dimensional reconstruction from confocal scanning microscope images. II. Depth discrimination versus signal-to-noise ratio in partially confocal images", Appl. Opt., Vol. 33, No. 17, pp. 3740-3750, 1994.
- [Concello – 1995] Conchello, J. A., *Fluorescence Photobleaching Correction for Expectation Maximization Algorithm*. In: Three-Dimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing, T. Wilson and C. J. Cogswell (Eds.), Proc. SPIE, Vol. 2412, pp. 138-146, 1995.
- [Concello – 1998] J.-A. Conchello, "Super-resolution and convergence properties of the expectation-maximization algorithm for maximum-likelihood deconvolution of incoherent images", J. Opt. Soc. Am. A, Vol 15, (10), pp. 2609-2620, 1998.
- [Davidson e Abramowitz – 2002] Davidson, M. W. e Abramowitz, M. *Optical Microscopy*. In: Encyclopedia of Imaging Science and Technology, J. Hornak (Ed.), Vol. 2, New York: Wiley-Interscience, pp. 1106-1141, 2002.
- [Gonzalez e Woods – 2001] Gonzalez, R. C., Woods, R. E., *Digital Image Processing 2<sup>nd</sup> edition*. Prentice Hall – 2001
- [Goodman – 1976] Goodman, J. W. and Belsher, J. F. Fundamental Limitations in Linear Invariant Restoration of Atmospherically Degraded Images. Proc. SPIE, Vol. 75, pp. 141-154, 1976.

- [Goodman – 1996] Goodman, J. W. *Introduction to Fourier Optics*. 2<sup>nd</sup> edition, The McGraw-Hill, 1996.
- [Gopalakrishnan – 1999] Gopalakrishnan, V. K. et al. *Restoration of Three Dimensional Images Using the Row Action Projection Method*. IEEE International Symposium on Circuits and Systems, Orlando, FL, pp. 33-36, 1999.
- [Halliday – 1995] Halliday, D. et al. *Fundamentos de Física*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1995.
- [Homem – 2003] Homem, Murillo Rodrigo Petrucelli. *Reconstrução Tridimensional de Imagens Com o Uso de Deconvolução a Partir de Seções Bidimensionais Obtidas em Microscopia Óptica* – Tese de Doutorado – São Carlos: USP, 2003.
- [Hopkins – 1955] Hopkins, H. H. *The Frequency Response of a Defocused Optical System*. Proceedings of the Royal Society of London A, Vol. 231, pp. 91-103, 1955.
- [Inouye – 1971] Inouye, T. *Square Root Transform for the Analysis of Quantum Fluctuations in Spectrum Data*. Nuclear Instruments and Methods, Amsterdam, Vol. 91, pp. 581-584, 1971.
- [Kaczmarz – 1937] – Kaczmarz, S., *Angenaherta auflosung von systemen linearer gleichungen*. Bull.. Acad. Polon. Sci. Lett., A35:355-357, 1937.
- [Kuo e Mammone – 1992] Kuo, S. S., Mammone R.J. *Image restoration by Convex Projections Using Adaptive Constraints and the L1 Norm*. IEEE Transactions on Signal Processing, Vol 40. pp 159-168, 1992
- [Mascarenhas – 1999] Mascarenhas, N. D. A. et al. *Transmission Tomography Under Poisson Noise Using the Anscombe Transformation and Wiener Filtering of the Projections*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, Vol. 423, pp. 265-271, 1999.
- [Mascarenhas e Velasco – 1984] Mascarenhas, N. D. A., Velasco, F. R. D. *Processamento Digital de Imagens*. EBAI, Kapelus: Buenos Aires, 1984.
- [Mammone – 1992] Mammone, R. J. *Computational Methods of Signal Recovery and Recognition*. John Wiley & Sons, 1992
- [Mateev – 1988] Matveev, A. N. *Optics*. Moscow: Mir Publishers, 1988.
- [Minsky – 1988] Minsky, I. M., *Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope*, Scanning, vol.10 pp128-138, 1988.

- [Nikon] sítio da internet <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/index.html> visitado em maio de 2004.
- [Preza – 1990] – Preza, C. *A Regularized Linear-Reconstruction Method for Optical Sectioning Microscopy*. Master's Thesis, Sever Institute of Technology, Washington University in St. Louis, St. Louis, Missouri, USA, 1990.
- [Preza – 1992] – M.I. Miller, L.J. Thomas Jr., J.G. McNally, "Regularized method for reconstruction of three-dimensional microscopic objects from optical sections", *J. Opt. Soc. Am. A*, Vol. 9, pp 219-228, 1992.
- [Sezan e Tekalp – 1988] Sezan, M. I., Tekalp, A. M. *Iterative Image Restoration with Ringing Suppression Using the Method of POCS*. International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing. Vol. 2, pp. 1300-1303, 1988.
- [Sezan e Trussell – 1991] Sezan, M. I. e Trussell, H. J. *Prototype Image Constraints for Set-Theoretic Image Restoration*. *IEEE Transactions on Signal Processing*, Vol. 39, No. 10, pp. 2275- 2285, October 1991.
- [Snyder – 1993] Snyder, D. L. et al. *Image Recovery from Data Acquired with a Charge-Couple-Device Camera*. *J. Opt. Soc. Am. A*, Vol. 10, No. 5, pp. 1014-1023, May 1993.
- [Stark e Yang – 1998] Stark, H. e Yang, Y. *Vector Space Projections, A Numerical Approach to Signal and Image Processing, Neural Nets, and Optics*. Wiley, 1998.
- [Streibl – 1985)] Streibl, N. *Three-Dimensional Imaging by a Microscope*. *J. Opt. Soc. Am. A*, Vol. 2, No. 2, pp. 121-127, February 1985.
- [Wang & Bovik – 2002] Wang, Z., Bovik, A.C. *A Universal Image Quality Index*. *IEEE Signal Processing Letters*, vol. 9, no. 3, pp. 81-84, 2002.
- [Weisstein – 2004] Weisstein, E. W. "Delta Function." From MathWorld--A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/DeltaFunction.html>