

Moacir Pereira Ponti Junior

***Extrapolação Espectral na Restauração de Imagens
Tridimensionais de Microscopia Ótica de
Fluorescência***

São Carlos – SP

26 / Setembro / 2008

Moacir Pereira Ponti Junior

***Extrapolação Espectral na Restauração de Imagens
Tridimensionais de Microscopia Ótica de
Fluorescência***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores:

Prof. Dr. Nelson Delfino d'Ávila Mascarenhas (Departamento de Computação)

Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo (Departamento de Engenharia Química)

DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE COMPUTAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PPG-BIOTEC - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

São Carlos – SP

26 de Setembro de 2008

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

P811ee

Ponti Junior, Moacir Pereira.

Extrapolação espectral na restauração de imagens tridimensionais de microscopia ótica de fluorescência / Moacir Pereira Ponti Junior. -- São Carlos : UFSCar, 2009. 109 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Processamento de imagens. 2. Restauração de imagens. 3. Microscopia de fluorescência. 4. Reconstrução por super resolução. I. Título.

CDD: 006.4 (20^a)

MOACIR PEREIRA PONTI JUNIOR

Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 26/09/2008

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Nelson Delfino D'Ávila Mascarenhas (Orientador)
Universidade Federal de São Carlos – DC/UFSCar



Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo (Orientador)
Universidade Federal de São Carlos - DEQ/UFSCar



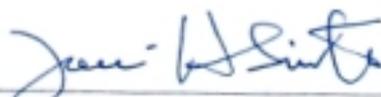
Prof. Dr. Sérgio Shigume Furuie
Incor/USP



Prof. Dr. Paulo Mazzoncini de Azevedo Marques
FMRP/USP



Prof. Dr. João do Espírito Santo Batsita Neto
ICMC/USP



Prof. Dr. José Hiroki Saito
Universidade Federal de São Carlos – DC/UFSCar

*Dedico este trabalho à Paula, pelo amor, paciência e companherismo, que a tudo me inspira,
e a toda a humanidade, a qual este trabalho pretende beneficiar*

Agradecimentos

Nesta trajetória foram muitos os que me acompanharam (e já aqui peço desculpas aos que não citei). Como não tentarei não esquecer de ninguém, a lista é grande. Assim, dedico meus sinceros agradecimentos:

– ao Professor Nelson, pelo exemplo profissional e visão. Por aceitar me orientar e estar sempre atento tanto aos fundamentos quanto ao futuro do trabalho,

– ao Professor Cláudio, pela paciência e pelas reuniões que ampliaram meus conhecimentos e permitiram que este trabalho multidisciplinar acontecesse,

– ao Professor Paulo Ferreira, mestre por excelência, por buscar sempre uma nova e clara linguagem para explicar e descrever as teorias mais complexas, pelo exemplo de continuar codificando seus próprios programas e escrevendo suas próprias pesquisas,

– ao Professor José Vieira, pelas aulas de Processamento Digital de Sinais, comentários e explicações que me esclareceram e contribuíram para o trabalho,

– aos Professores Saito, Fatibello e Mauro que me incentivaram durante todo o doutorado, pelas conversas, aulas, histórias e sugestões.

– aos Professores Sérgio S. Furuie, Paulo Mazzoncini A. Marques, João Espírito Santo Batista Neto e José H. Saito, que leram, avaliaram e contribuíram imensamente para a versão final deste trabalho.

– ao Clóvis, à Bruna, à Kamilla e à Marta, que me auxiliaram na aquisição das imagens no Laboratório de Técnicas de Cultivo Celular (UFSCar) e na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, e me forneceram informações importantes,

– ao Murillo com sua humildade e vasto conhecimento, que desde o mestrado me auxiliou nos projetos, cedeu imagens e dados, corrigiu artigos e textos, e pelos seminários que muito me auxiliaram no entendimento dos problemas e das técnicas que embasaram este trabalho.

– ao João por sua autenticidade e alegria, ao Zorzan pela generosidade e amizade, e ao Gustavo por sua espontaneidade e capacidade de mudar; cada um contribuiu com sua melhor

virtude para que eu fosse hoje uma pessoa melhor. E a todos eles juntos, pela arte de fazer um laboratório feliz,

– ao Alexandre Levada, sempre disposto a ajudar e a explicar os mistérios do universo da matemática e estatística, pelas idéias, pelas conversas loucas e pelos filmes compartilhados;

– à Luciana Montera, colega desde o início de doutorado, que também passou pelas mesmas lutas e dificuldades, mas que também chegou ao fim, obrigado pelo companheirismo, pelos auxílios, pelas aulas de inglês, e pelo Sobá que estava maravilhoso (ainda quero esta receita!),

– à Helena e à Nãna, pela alegria, companheirismo, que tornaram minha vida mais feliz, tanto que sinto que as conheço desde sempre; pelos “honestos” vinhos do Porto compartilhados, pelo arroz carreteiro, pelas músicas e filmes, por terem nos encontrado do outro lado do mundo e tornado grandes amigas;

– à Michelle e à Débora, as meninas do laboratório, por terem unido o Grupo e proporcionado tantos momentos divertidos, como os aniversários do Prof. Nelson, as confraternizações e também as publicações em conjunto;

– ao Dênis, eterno estagiário, pelos livros em PDF, pela integração com o pessoal da graduação e por estar sempre disposto a contribuir (“*e dá-lhe, dá-lhe porco!*”).

– ao João Paulo Papa, que está sempre com novas idéias e com grande disposição para compartilhá-las,

– ao Luis Cantanheira pelos momentos de descontração nas conversas sobre tudo e mais um pouco e por me aceitar no PESCD;

– ao Fernando Salina, Ana Luísa, Fabrício e demais colegas Gapinianos e do Departamento de Computação da UFSCar;

– aos colegas do PPG-Biotec e agregados: Sidnei, Carmem Lúcia e Alexandre, que também contribuíram com conversas descontraídas, risadas, nos laboratórios e nos trabalhos;

– à Universidade de Aveiro por me receber, em especial à Helena Barbosa, Anabela, e às cozinheiras e funcionários dos refeitórios, por fazerem o melhor R.U. do mundo!

– à cidade de Aveiro e à Portugal, pelo clima agradável, pelo vinho verde, o bacalhau, a francesinha, o bolo-rei e os ovos moles!

– à minha mãe Clara por todo apoio e amor, meu irmão Maurício e minha imrã Mayra por existirem (amo vocês!).

- à meus familiares, em especial minha avó Judith, pelo apoio desde o início do meu interesse por computadores e me incentivar a seguir sempre em frente.
- à meu pai por me apoiar e participar de minha vida nesta etapa, especialmente antes e depois o estágio no exterior.
- aos colegas do mestrado (PPGCC 2002 e agregados), que, mesmo estando distantes estão sempre em minha memória e não poderia deixar de agradecer.
- à Valéria, Neneco e Dona Teresa por me receberem em sua família, e aos amigos da Casa de Jesus, Luci Helena, Araújo, Mariana, Gildete, Vilma, João, Fernando e tantos outros.
- aos colegas de trabalho e diretores da Libertas Faculdades Integradas: Edson, Davidson, José Luiz, Bernadeth, Gustavo, Leandro, Débora, Júnior, Luísa, Pedro, Sílvia e demais.
- aos meus alunos da Libertas Faculdades Integradas, por me ajudarem a perceber meu amor pelo ensino.
- ao Humberto Tizziotti e à Fernanda Bordonale, que acreditaram no meu trabalho quando ainda estava começando, e foram de grande importância para que chegasse a este resultado.
- aos secretários e secretárias do PPG-Biotec
- à UFSCar e seus funcionários, pela atenção e dedicação ao ensino.
- à cidade de São Carlos por seu clima agradável e ao Trem Bão, Kirei-San, Amici, Mister Chic/Bella Itália e Yakissoba da rodoviária pela alimentação básica.
- ao Tigre e à Catolina, pelo companherismo e pelas brincadeiras,
- aos amigos de São Carlos: Rita e Christiano, pela amizade e pelo apoio na defesa, ao Sandro e à Lucinéia, por compartilhar nossas reuniões do Evangelho no lar,
- aos amigos do Batuíra e ao “Canto do Canto” que foram meu apoio espiritual durante muito tempo.
- aos amigos do outro lado, que sei que sempre estiveram comigo.
- a todos os outros que não estão nesta lista mas que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

Resumo

O estudo de células, isoladas ou na forma de tecidos, em diversas aplicações biotecnológicas requer a utilização de técnicas de microscopia. O microscópio de fluorescência, em especial, é atualmente uma ferramenta de grande importância por permitir destacar detalhes em células e detectar processos biológicos. Contudo, os microscópios, como outros sistemas óticos, corrompem as imagens de forma que muitos detalhes são perdidos na passagem da imagem pelos componentes óticos deste tipo de equipamento. Os microscópios de fluorescência convencionais degradam a imagem principalmente na direção axial, o que, no domínio da frequência, é visto como um limite de banda nesta direção que inviabiliza a visualização de imagens tridimensionais por microscopia de seccionamento ótico computacional. A principal contribuição deste projeto é o desenvolvimento de métodos computacionais que restaurem estas imagens mediante a utilização de algoritmos de extrapolação que recuperem parte das frequências perdidas além do limite de banda do microscópio, mesmo na presença de ruído. Para tal fim, foi proposto um procedimento não linear com base no algoritmo Richardson-Lucy, com restrições no domínio do espaço e da frequência, conforme o algoritmo de Gerchberg-Papoulis. O método proposto define um algoritmo único para restauração e extrapolação, com foco na restrição de suporte finito espacial. Este método mostrou melhoria na extrapolação quando comparado à métodos conhecidos na literatura. Foram desenvolvidas variantes deste algoritmo, cada qual possuindo características para atenuar o ruído, calcular de forma adaptativa a restrição espacial, e detectar a região de fundo da imagem. Foi mostrado que o uso de restrições adaptativas e a extração de informações a partir da imagem pode contribuir para a recuperação de frequências perdidas. Os resultados obtidos são promissores, pois mostram o potencial de extrapolação dos métodos em condições reais, permitindo a melhoria na visualização tridimensional de espécimes em microscópios *wide-field* (não-confocais), auxiliando diversas aplicações importantes em biotecnologia, como no caso de acompanhamento de cultivos celulares.

Abstract

The study of living cells, isolated or in tissues, in several applications, requires the use of microscopy techniques. The fluorescence microscopes are specially important for making possible images with enhancement of specific structures and detection of biological processes. However, microscopes, like other optical systems, corrupt images so that many details are lost after the passage of the image through their optical components. The conventional (wide-field) fluorescence microscopes degrade images mainly on the axial direction, limiting the amount of frequencies that passes through the system. As a result, there is an out-of-focus blur, making it difficult to use the images to obtain three-dimensional (3D) images by computational optical sectioning microscopy (COSM). The main contribution of this thesis is the development of computer-based methods that are able to restore acquired images, through spectrum extrapolation algorithms that restore a portion of the lost frequencies, even in noisy images. A non-linear algorithm was proposed, based on the Richardson-Lucy method, with space and frequency domain constraints as in the Gerchberg-Papoulis algorithm. This method defines a unified algorithm to restore and extrapolate images, focusing on the spatial finite support constraint. The proposed method showed improved extrapolation when compared to previously known methods. Besides, other algorithms were developed based on the proposed method. Each variation of the basic algorithm has distinct features to attenuate the noise, define adaptively the spatial constraint, and detect the image background region. The use of an adaptive constraint and the extraction of information directly from the images were shown to contribute to the recovery of lost frequencies. The results are promising, showing the potential of extrapolation in real conditions, improving the three-dimensional visualization of specimens in wide-field (non-confocal) microscopes, helping many important applications in biotechnology, such as the assessment of cell cultures.

Lista de Abreviaturas

COSM Microscopia de Seccionamento Ótico Computacional, do inglês *Computer Optical Sectioning Microscopy*

EM *Expectation-Maximization*

FFT Transformada Rápida de Fourier, do inglês *Fast Fourier Transform*

GP Gerchberg-Papoulis

IDIV Índice de Divergência, do inglês *I-Divergence*

ISNR Melhoria na Relação Sinal-Ruído, do inglês *Improvement on Signal-to-Noise Ratio*

OTF Função de Transferência Ótica, do inglês *Optical Transfer Function*

POCS Projeção sobre Conjuntos Convexos, do inglês *Projection Onto Convex Sets*

PSF Função de Espalhamento Pontual, do inglês *Point Spread Function*

RL Richardson-Lucy

RL-TM Richardson-Lucy regularizado com Tikhonov-Miller

RL-TV Richardson-Lucy regularizado com *Total Variation*

RLE Richardson-Lucy com extrapolação melhorada

RLE-A Richardson-Lucy com extrapolação melhorada e suporte espacial adaptativo

RLE-B Richardson-Lucy com extrapolação melhorada e suporte espacial extraído da região de fundo

RLE-SL Richardson-Lucy com extrapolação melhorada e suavização linear

RLE-SNL Richardson-Lucy com extrapolação melhorada e suavização não-linear

TM Tikhonov-Miller

TV *Total Variation*

UIQI Índice de Qualidade Universal da Imagem, do inglês *Universal Image Quality Index*

Lista de Figuras

2.1	Esquema de funcionamento do microscópio ótico	9
2.2	Refração da luz com lente seca (a) e com uso de óleo de imersão (b)	10
2.3	Aproximação numérica de um padrão de difração a partir de uma frente de onda bloqueada por um plano com uma fenda. Adaptado de Lyon (2007)	11
2.4	Exemplos de discos de Airy para diferentes comprimentos de onda e abertura: $\lambda = 700nm$, NA = 0,75 (a); $\lambda = 500nm$, NA = 0,75 (b); $\lambda = 700nm$, NA = 1,4 (c); $\lambda = 700nm$, NA = 1,4 (d). Extraído e adaptado de Olympus-America (2008)	12
2.5	Esquema de funcionamento do microscópio de fluorescência	14
2.6	Composição de imagem da célula HeLa por meio de imagens obtidas utilizando duas combinações de filtros: fluorocromo Alexa Fluor 594 para rotular rede intracelular de microfilamentos com resposta em 617nm (a), fluorocromo DAPI para rotular DNA com resposta em 460nm (b), e imagem composta (c).	15
2.7	Exemplo de aquisição de imagem 3-D de uma célula por meio de um microscópio de fluorescência (COSM). Extraído e adaptado de Sarder e Nehorai (2006)	16
2.8	Esquema simplificado de formação da imagem em um microscópio ótico <i>wide-field</i> . Adaptado de Castleman (1996) e Verveer (2001).	17
2.9	Esquema simplificado de formação da imagem em um microscópio ótico confocal. Adaptado de Castleman (1996) e Verveer (2001).	17
2.10	Suportes para a PSF (a) e OTF (b) de um microscópio <i>wide-field</i> , considerando $\lambda = 520nm$, NA = 1,3 e índice de refração do meio de 1,5. Os contornos representam o suporte para 50%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1% e 0,05% do valor máximo.	24
2.11	Suportes para a PSF (a) e OTF (b) de um microscópio confocal, considerando excitação $\lambda = 488nm$, emissão $\lambda = 520nm$, NA = 1,3 e índice de refração do meio de 1,5, diâmetro do <i>pinhole</i> = 200nm. Os contornos representam o suporte para 50%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1% e 0,05% do valor máximo.	24

4.1	Exemplo de extrapolação usando o algoritmo Gerchberg-Papoulis	42
4.2	Imagem de microscopia de fluorescência cujo substrato emite fluorescência. . .	46
4.3	Histograma de imagem de microscopia de fluorescência com área cinza desta- cando o primeiro pico correspondente ao fundo da imagem.	46
4.4	Diagrama com os dois principais algoritmos: a) com restrição baseada no fundo da imagem, e b) com restrical adaptativa	48
4.5	Comparação entre os filtros média e mediana em sinal corrompido com ruído Poisson: sinais original e ruidoso (a); sinais original e filtrados por média e mediana (b)	51
5.1	Duas seções radiais da imagem sintética retângulos: original seções 32 (a) e 48 (b), e degradada seções 32 (c) e 48 (d)	55
5.2	Duas seções radiais da imagem sintética bead: original seções 32 (a) e 64 (b), e degradada seções 32 (c) e 64 (d)	56
5.3	Duas seções radiais da imagem sintética cultura de células 20x: original seções 8 (a) e 16 (b), e degradada seções 8 (c) e 16 (d).	56
5.4	Imagem sintética cultura de células 40x original: seção radial n.28 (a) visão (y - z) da projeção ao longo do eixo x (b).	57
5.5	Amostras de imagens de cultivo da célula RetroPack: com aumento de 20x (a), com aumento de 40x (b).	58
6.1	Seção axial (n.42) da restauração da imagem sintética <i>retângulos</i> : degradada (a), RL (b), RLE (c), RLE-A (d), RLE-B (e)	67
6.2	Gráfico da I-divergência (a) e Número de componentes de frequência da banda prática da imagem (b), em função do número de iterações, para a restauração da imagem sintética <i>retângulos</i>	68
6.3	Gráfico dos coeficientes de autocorrelação para a imagem sintética <i>Retângulos</i> .	69
6.4	Seção axial central (n.64) da restauração da imagem sintética <i>bead</i> : degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE- A (h), RLE-B (i)	70

6.5	Seção radial central (n.16) da restauração da imagem sintética <i>células 20x</i> : degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)	71
6.6	Seção axial central (n.128) da restauração da imagem sintética <i>células 20x</i> : original (a), degradada (b), RL (c), RL-TM (d), RL-TV (e), RLE (f), RLE-SL (g), RLE-SNL (h), RLE-A (i), RLE-B (j)	72
6.7	Seção radial (n.32) da restauração da imagem sintética <i>células 40x</i> : degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)	73
6.8	Seção axial (n.177) da restauração da imagem sintética <i>células 40x</i> : original (a), degradada (b), RL (c), RL-TM (d), RL-TV (e), RLE (f), RLE-SL (g), RLE-SNL (h), RLE-A (i), RLE-B (j)	74
6.9	Gráfico da I-divergência (a) e Número de componentes de frequência da banda prática da imagem (b), em função do número de iterações, para a restauração da imagem sintética <i>células 40x</i>	75
6.10	Gráfico dos coeficientes de autocorrelação para a imagem sintética <i>Células 40x</i>	76
6.11	Detalhe das seções radiais (n.14) da restauração da imagem real <i>RetroPack 1</i> : degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)	77
6.12	Seção radial central (n.16) da restauração da imagem real <i>RetroPack 2</i> : degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)	79
6.13	Seção radial central (n.16) da restauração da imagem real <i>RetroPack 3</i> : degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)	80
6.14	Gráfico dos coeficientes de autocorrelação para a imagem real <i>RetroPack 3</i> . . .	81
6.15	Seção radial (n.31) da restauração da imagem real <i>RetroPack 4</i> : degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)	82
6.16	Seção axial (n.134) da restauração da imagem real <i>RetroPack 4</i> : degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)	82

6.17	Gráfico dos coeficientes de autocorrelação para a imagem real <i>RetroPack 4</i> . . .	83
A.1	Mudança de estado de um átomo com emissão de fóton	98
C.1	Ilustração dos métodos de redução de artefatos em algoritmos baseados na convolução no domínio da frequência: preenchimento com zeros (a), suavização (b), interpolação (c), e espelhamento (d) — as linhas brancas indicam a região de suporte da imagem original.	107

Lista de Tabelas

5.1	Parâmetros para as PSFs teóricas utilizadas nos experimentos	53
5.2	Parâmetros para execução dos algoritmos nas imagens	62
6.1	Resultados da avaliação da restauração da imagem sintética <i>retângulos</i>	66
6.2	Resultados da avaliação da restauração da imagem sintética <i>bead</i>	69
6.3	Resultados da avaliação da restauração da imagem sintética <i>celulas 20x</i>	70
6.4	Resultados da avaliação da restauração da imagem sintética <i>celulas 40x</i>	72
6.5	Resultados da extrapolação da imagem real <i>RetroPack 1</i>	77
6.6	Resultados da extrapolação da imagem real <i>RetroPack 2</i>	78
6.7	Resultados da extrapolação da imagem real <i>RetroPack 3</i>	78
6.8	Resultados da extrapolação da imagem real <i>RetroPack 4</i>	81

Sumário

1	Introdução	1
2	Introdução à Microscopia Ótica de Fluorescência <i>Wide-field</i>	8
2.1	Microscopia Ótica	8
2.1.1	Resolução em Microscopia Ótica	9
2.2	Microscopia de Fluorescência	12
2.2.1	Fluorescência e Fluorocromos	13
2.3	Microscopia de Seccionamento Ótico Computacional (COSM)	15
2.3.1	Microscopia <i>Wide-Field</i> e Confocal	16
2.4	Modelo de Formação da Imagem em Microscopia <i>Wide-Field</i>	18
2.4.1	Modelo Discreto de Formação da Imagem	20
2.4.2	Função de Espalhamento Pontual (PSF) e Função de Transferência Ótica (OTF)	21
3	Métodos de Restauração para Microscopia Ótica <i>Wide-field</i>	25
3.1	Restauração: O Problema Inverso	26
3.1.1	Filtro de Mínimos Quadrados (LS)	27
3.1.2	Abordagem Bayesiana para Restauração	28
3.2	Regularização	31
3.2.1	Regularização de Tikhonov-Miller	33
3.2.2	Regularização <i>Total Variation</i>	33
3.2.3	Propriedades dos Métodos de Regularização	35
3.3	Projeção Sobre Conjuntos Convexos (POCS)	35

3.3.1	Conjuntos Convexos	36
3.3.2	Conjuntos de Restrição	36
3.3.3	Projeções	38
3.4	Algoritmo de Gerchberg-Papoulis	39
4	Novos Métodos para Extrapolação Espectral e Restauração de Imagens	41
4.1	Restauração Não Linear com Restrição Espacial (RLE)	41
4.2	O Uso da Informação de Suporte Espacial Finito da Imagem como Restrição . .	43
4.2.1	Restrição Espacial Adaptativa (RLE-A)	44
4.2.2	Restrição Espacial Baseada na Estimção do Fundo da Imagem (RLE-B)	45
4.3	Restauração Não Linear com Restrição Espacial e Passo de Suavização (RLE-S)	48
4.3.1	Filtros	50
5	Método	52
5.1	Acompanhamento de Cultivo Celular por Imagens de Microscopia	52
5.2	Gerao das Funções de Espalhamento Pontual	53
5.3	Imagens Utilizadas nos Experimentos	53
5.3.1	Cores e visualização	57
5.4	Métodos de Avaliao da Restauração e Extrapolação	58
5.4.1	Melhoria na Relação Sinal-Ruído (ISNR)	59
5.4.2	I-Divergência (IDIV)	60
5.4.3	Índice de Qualidade Universal da Imagem (UIQI)	60
5.4.4	Avaliao da Extrapolação	61
5.5	Detalhes dos Experimentos	62
5.5.1	Parâmetros	62
5.5.2	Condição de Parada	63
5.5.3	Redução de Artefatos de Borda no Uso de Restrição de Suporte Espacial	63

5.5.4	Sistema de Aquisição	63
5.5.5	Ambiente de Processamento	64
6	Resultados e Discussões	65
6.1	Resultados com Imagens Sintéticas	65
6.2	Resultados com Imagens Reais	76
6.3	Discussão	83
6.3.1	Desempenho da Restauração	83
6.3.2	Complexidade e Velocidade	85
6.3.3	Avaliação da Extrapolação	86
6.3.4	Métodos de Avaliação	87
7	Conclusões	88
	Referências Bibliográficas	90
	Apêndice A – Fluorescência	98
A.1	Processo de Fluorescência	98
A.2	Eficiência e Tempo de Vida do Processo de Fluorescência	99
	Apêndice B – Detalhes dos Algoritmos de Restauração	100
B.1	Derivação do Algoritmo Richardson-Lucy (RL)	100
B.2	Derivação do Algoritmo Richardson-Lucy com Regularização Tikhonov-Miller (RLTM)	102
B.3	Derivação do Algoritmo Richardson-Lucy com Regularização Total Variaton (RLTV)	103
	Apêndice C – Aspectos Computacionais	105
C.1	Convolução Linear no Domínio da Frequência	105
C.1.1	Artefatos de Borda	106

C.2	Discretização dos Operadores	108
C.2.1	Algoritmo de Regularização Total Variation	108

1 *Introdução*

A biotecnologia passou nas últimas décadas por uma expansão intensa, tanto na aquisição de novos conhecimentos científicos, quanto no desenvolvimento de processos tecnológicos, assim como de instrumentos e métodos que facilitaram as pesquisas e viabilizaram a execução de diversas medidas e observações.

Dentre as diversas áreas de aplicação da biotecnologia podemos citar, com destaque, o estudo de bioprocessos de cultivos celulares. A investigação dos bioprocessos, técnicas de cultivo e produção de biomoléculas de interesse para o ser humano são importantes em diversas aplicações biotecnológicas na área de saúde humana e animal e bioengenharia (BOROJEVIC, 2006). A busca por processos mais eficientes, seguros e econômicos passou a demandar conhecimentos mais aprofundados, principalmente por causa da grande complexidade dos processos bioquímicos de interesse em biotecnologia, como a produção de vacinas, e, recentemente, o cultivo de células tronco com finalidade terapêutica. Estes processos devem ser então monitorados e controlados de modo a manter condições favoráveis no cultivo das células. Para isso, dados são adquiridos por meio de sensores ou equipamentos específicos que permitam enxergar os espécimes em estudo.

Para suprir esta necessidade de visualizar elementos de tamanho muito reduzido, diversas tecnologias em microscopia surgiram ao longo do século passado, como a microscopia eletrônica, de campo escuro (*dark-field*), de contraste de fase, e de fluorescência (DAVIDSON; ABRAMOWITZ, 1999). Em se tratando de microscopia ótica, o funcionamento básico corresponde à iluminação de um objeto de interesse em uma superfície translúcida. A luz que passa pelo objeto é capturada por um sistema de lentes que amplia a magnitude do objeto, sendo possível enxergar com aumentos de 10x, 20x e 100x, por exemplo. O limite de resolução dos microscópios óticos é de cerca de $0,2\mu\text{m}$ (ou 200nm), 500 vezes superior ao olho humano. Não se consegue construir microscópios óticos com desempenho melhor, pois o fator limitante é o comprimento de onda da luz. No entanto, algumas técnicas permitem melhorar a qualidade das imagens obtidas pelos microscópios. Em especial, a microscopia de fluorescência passou a destacar-se nas áreas de ciências médicas e biológicas. O principal fator é que esta permite

observações detalhadas de estruturas específicas dentro das células de forma não invasiva e em tempo real. A base de seu funcionamento é utilizar a propriedade de moléculas de absorver luz em um comprimento de onda particular e, posteriormente, emitir luz em um comprimento de onda maior. Estas moléculas são substâncias chamadas de fluorocromos, utilizadas para marcar células ou estruturas celulares. Os fluorocromos, quando excitados, emitem luz, permitindo visualizar o objeto de interesse com maiores detalhes.

Os dois tipos de microscópios mais utilizados em conjunto com estas técnicas são o microscópio *wide-field* (convencional) e o microscópio confocal. O equipamento de aquisição composto por um microscópio *wide-field* é de custo inferior ao de um confocal, o que o torna mais popular. No entanto, este microscópio em especial possui uma limitação na capacidade de resolução que impede seu uso para a observação de imagens tridimensionais. Muitas aplicações seriam beneficiadas com a melhoria nesta resolução. Existem frentes de pesquisa que aperfeiçoam os equipamentos, formulando lentes, câmeras, acessórios e configurações que melhorem a aquisição de imagens. Estas soluções, no entanto, frequentemente são de custo elevado e nem sempre acessíveis à maioria dos pesquisadores. Na procura de soluções mais promissoras, métodos de restauração foram desenvolvidos para recuperar informações após a obtenção das imagens pelo microscópio.

Agard, Hiraoka e Sedat (1989), Agard et al. (1989) e Agard (1984) foram alguns dos primeiros a aplicar restauração de imagens em microscopia de fluorescência 3D. Os métodos: deconvolução por vizinho mais próximo, filtro de Wiener e o algoritmo de Jansson-van Cittert foram utilizados por eles nesta abordagem (JANSSON, 1997; CASTLEMAN, 1996). Os autores notaram que parte do borramento presente nas imagens provinha da contribuição de planos vizinhos, sendo utilizadas as intensidades destes planos para remover parte do borramento. Este algoritmo não requeria o cômputo de transformadas de Fourier 3D, e assim era viável, especialmente para a época em que não havia poder computacional suficiente. Esta técnica, conhecida pelo nome de vizinhos mais próximos, não leva em consideração a contribuição de todos os planos focais, promovendo, assim, uma solução aproximada. O algoritmo de Landweber-van Cittert assume a imagem observada como sendo uma primeira aproximação da imagem restaurada, e iterativamente “corrige” esta aproximação usando um fator de erro (JANSSON, 1997). O algoritmo de Jansson-van Cittert utiliza uma técnica de deconvolução determinística como uma variação do algoritmo iterativo de deconvolução de Landweber-van Cittert. Os autores modificaram o algoritmo inserindo uma restrição de não-negatividade, na qual se atribuíam zero a toda intensidade que resultava negativa (CASTLEMAN, 1996). Existem ainda outras variações deste algoritmo.

O algoritmo *Expectation-Maximization* (EM) foi extensamente aplicado na restauração de imagens e até hoje seus resultados são uma referência em termos de qualidade (CONCHELLO, 1998). O EM busca iterativamente pelo estimador da máxima verossimilhança de parâmetros de modelos probabilísticos. O algoritmo alterna entre a execução do passo **E** (*expectation*), que computa a esperança da probabilidade usando os dados observados, e o passo **M** (*maximization*), que computa a estimação de máxima verossimilhança dos parâmetros, maximizando a probabilidade esperada encontrada no passo E. Os parâmetros encontrados no passo M são então utilizados em um novo passo E. O procedimento é repetido até que se alcance o resultado desejado. Diversos autores utilizaram a idéia do algoritmo EM em vários contextos e aplicações diferentes, como em reconstrução para tomografia computadorizada (SHEPP; VARDI, 1982), utilizando distribuições de probabilidade diversas. O trabalho de Dempster, Laird e Rubin (1977) unificou o método e desenvolveu a teoria que o embasava, derivando uma versão generalizada do algoritmo e batizando-o de EM, nome pelo qual ficou conhecido.

O algoritmo EM aplicado a microscopia de fluorescência foi estudado posteriormente por Holmes (1988, 1989), Holmes e Liu (1989, 1991) e Willis et al. (1993). Entre os trabalhos anteriores ao de Dempster, Laird e Rubin (1977), é possível destacar os de Richardson (1972) e Lucy (1974), que derivaram de forma independente um algoritmo para restauração de imagens de astronomia, sob a hipótese de a imagem poder ser modelada por uma distribuição de Poisson. O algoritmo ficou conhecido como algoritmo Richardson-Lucy (RL) e pode ser considerado um caso particular do EM. Nas condições em que foi derivado, este algoritmo é apropriado para o uso em imagens de microscopia ótica. O RL é iterativo, possui características não-lineares, propriedade de não-negatividade e é não-regularizado, sendo, portanto, sensível ao ruído presente na imagem (KEMPEN; VLIET; VERVEER, 1997a). Os algoritmos citados levam em consideração o conhecimento da resposta impulsional do sistema, a qual é chamada de PSF (Função de Espalhamento Pontual, do inglês *Point Spread Function*).

Para lidar com o ruído diversos autores propuseram métodos de regularização. Snyder e Miller (1991) investigaram o uso de “peneiras” (do inglês *sieve*). A regularização de Good foi proposta por Joshi e Miller (1993) e utilizada no contexto de microscopia por Preza, Miller e Conchello (1993). Conchello e McNally (1996) propuseram a regularização de Tikhonov (TIKHONOV; ARSENIN, 1977). Ainda, baseados no algoritmo EM, diversos outros autores desenvolveram algoritmos de deconvolução cega (*blind deconvolution*) que não requerem conhecimento prévio sobre a PSF, sendo esta estimada ao mesmo tempo em que a imagem é restaurada. Monvel et al. (2003) propuseram também a extração direta da PSF aproximada a partir das imagens a serem restauradas. Estes tipos de algoritmos não serão considerados neste trabalho.

Sob a interpretação de Hayner et al. (1982), entre outros autores, a restauração de imagem pode ser caracterizada como extrapolação espectral. O borramento presente em uma imagem é frequentemente resultado da filtragem das frequências mais altas da imagem. Assim, ao aumentar a largura de banda útil dos dados observados, em particular em informação de alta frequência, uma melhoria na resolução pode ser obtida. Esta interpretação levou ao estudo da capacidade de extrapolação dos métodos. Os filtros de restauração lineares, por exemplo, aproximam o filtro inverso nas frequências dominadas pelo objeto, e possuem resposta baixa ou nula em frequências dominadas pelo ruído ou para as quais a OTF (Função de Transferência Ótica, do inglês *Optical Transfer Function*) possui valores baixos ou nulos. Assim, estes filtros apenas possuem capacidade de restaurar frequências dentro do limite de banda da OTF e então não irão restaurar as frequências além do limite de difração. A não linearidade é, portanto, necessária para restaurar estas frequências (HANSON, 1987). São chamados algoritmos de **super-resolução** ou de **extrapolação espectral**¹ os algoritmos que restauram frequências além da largura de banda da OTF (GERCHBERG, 1974; JAIN, 1989; CARRINGTON et al., 1995). Os algoritmos de restauração lineares são incapazes de realizar extrapolação espectral. Como em microscopia ótica, em especial a microscopia *wide-field*, o corte de frequências representa grande perda de dados presentes no objeto inicial, neste trabalho serão estudados os métodos capazes de restauração e extrapolação espectral com aplicação em microscopia de fluorescência.

No contexto específico da extrapolação espectral, os primeiros trabalhos (SLEPIAN; POLLAK, 1961; HARRIS, 1964) utilizavam conjuntos de funções de onda prolatas esferoidais², aproveitando do fato de o espectro possuir característica analítica de variáveis complexas, sendo indefinidamente diferenciáveis, e, por consequência, o conhecimento sobre ele num conjunto limitado, implicaria em seu conhecimento em todo o plano complexo. Os trabalhos mostraram que não havia dois objetos diferentes com o mesmo espectro de Fourier e, pelas propriedades das funções de onda prolatas esferoidais, citaram a possibilidade da restauração das frequências perdidas. Um algoritmo para a reconstrução do sinal e extrapolação espectral, bem como a extensão para sistemas de imageamento limitados pela difração baseados na teoria citada, foi proposto por Barnes (1966) e Frieden (1961). Finalmente, Rushforth e Harris (1968) consideraram o método na presença de ruído, mostrando a principal limitação do método, que exigia relação sinal-ruído muito alta, sugerindo que havia necessidade de conhecimento adicional para a obtenção da extrapolação.

¹Como o termo super-resolução passou recentemente a ser usado também para representar a construção de uma imagem de maior resolução a partir de uma coleção de imagens de menor resolução, utilizaremos o termo extrapolação espectral para definir estes algoritmos ou métodos.

²Funções obtidas pela limitação no domínio do tempo, filtragem de passa-baixas, e uma segunda operação de limite do tempo

Na década de 1970, Gerchberg (1974) e Papoulis (1975) demonstraram de forma independente que o uso de sucessivas restrições nos domínios do espaço e frequência a partir de informações conhecidas, permitia a extrapolação dos sinais. O algoritmo resultante destes trabalhos ficou conhecido como Gerchberg-Papoulis (GP). Mais tarde a versão discreta do algoritmo foi abrangentemente estudada por Ferreira (1994). É importante notar que este algoritmo apenas considera a extrapolação do sinal além do limite de banda, sem considerar o modelo de formação da imagem (como a resposta impulsional do sistema — PSF — ou o modelo do ruído).

Mesmo após diversos trabalhos publicados, a propriedade da restauração de frequências além do limite de banda da OTF foi por algum tempo controversa, existindo importante literatura que afirmava a impossibilidade deste tipo de restauração (ANDREWS; HUNT, 1977). De fato, um dos autores que afirmavam esta impossibilidade, tornou-se anos depois um dos maiores pesquisadores na área, possuindo diversos trabalhos que exploravam a capacidade de extrapolação de algoritmos de restauração (SEMENTILLI; HUNT; NADAR, 1993) (HUNT, 1999, 1995).

Outros métodos que incluíam restrições alternadas, como no algoritmo de Gerchberg-Papoulis foram desenvolvidos posteriormente, como um método de deconvolução cega que utilizava restrições nos domínios espaciais e de frequência, assumindo ausência de ruído nas imagens (AYERS; DAINTY, 1988). Na década de 1990, diversos autores trabalharam nesta área. Os trabalhos de Sementilli, Hunt e Nadar (1993), Hunt (1995) descreviam um algoritmo MAP (*Maximum a Posteriori*) que possibilitava a extrapolação espectral, tendo aplicado em imagens 2D com corte nas frequências. Ainda, estes trabalhos analisaram os limites para a extrapolação, sendo os principais: a) a **quantidade de conhecimento adicional** sobre o sinal, b) o **limite de banda**, e c) o **ruído**. Os autores reafirmaram ainda a necessidade da não linearidade. Bertero e Boccacci (1998) posteriormente analisaram os métodos existentes e concluíram que a extrapolação seria viável apenas quando o tamanho dos objetos não é tão grande quando comparado com o limite de resolução do sistema de imageamento. Carrington et al. (1995) possui um trabalho importante em microscopia de fluorescência, realizando extrapolação por meio da não-negatividade e uso do algoritmo do gradiente conjugado. Conchello (1998) estudou a capacidade de extrapolação do algoritmo EM (equivalente ao algoritmo Richardson-Lucy), para o caso de microscopia ótica.

O problema de deconvolução em microscopia 3D usando projeções sobre conjuntos convexos (POCS, do inglês *Projection Onto Convex Sets*), por meio do uso da aplicação sucessiva de múltiplas restrições, bem como a pré-filtragem da imagem foi estudado por Homem et al. (2002), Homem (2003). Outro trabalho ainda utilizou extrapolação por meio de POCS e uma

expansão em série de Taylor, o que é viável apenas em imagens sem ruído (BHATTARCHAJEE; SUNDARESHAN, 2003). O uso da pré-filtragem também foi explorado por diversos autores, entre eles Colicchio et al. (2005) e Kempen, Vliet e Verveer (1997a). Devido à convergência lenta do algoritmo EM, Markham e Conchello (2001) derivaram um algoritmo baseado na I-divergência de Csiszár (CSISZAR, 1991) para restauração em microscopia com bons ganhos em velocidade de convergência.

Recentemente Dey et al. (2004b, 2006) derivaram um método de regularização Total Variation para uso no algoritmo Richardson-Lucy com aplicação específica em microscopia confocal. Hom et al. (2007), definiram um método adaptativo de regularização para a restauração estatística, e Aguet, Ville e Unser (2008) desenvolveram um método para aumentar a profundidade de campo em microscopia de campo claro (não fluorescente) baseado na estimação da textura e da topologia do objeto em estudo. Todos estes trabalhos continuam buscando por melhores resultados no imageamento tridimensional, seja em imagens de astronomia, microscopia convencional ou confocal, indicando que o problema da restauração e extrapolação de imagens ainda está em aberto.

Assim, este trabalho visa a melhoria nas imagens de microscopia de fluorescência obtidas por seccionamento ótico computacional, com aplicação em imagens de células obtidas de cultura celular. A principal contribuição é o desenvolvimento de métodos capazes de melhorar a extrapolação dos algoritmos de restauração existentes, bem como o estudo experimental que envolve a aquisição de dados, preparação e avaliação dos resultados. A principal motivação é que, como citado, diversos autores apontam a capacidade de extrapolação como sendo de grande importância para a restauração de imagens de microscopia. Ainda, por meio da melhoria de imagens de microscópios convencionais (*wide-field*), espera-se que os métodos desenvolvidos neste trabalho contribuam para a criação de sistemas acessíveis de aquisição de imagens tridimensionais de microscopia de fluorescência.

O documento está organizado da seguinte forma: o capítulo 2 descreve a microscopia de fluorescência *wide-field*, suas características e problemas envolvidos na obtenção de imagens 3D. O capítulo 3 descreve as soluções existentes na literatura. Em seguida, os métodos desenvolvidos neste trabalho são descritos no capítulo 4. O capítulo 5 descreve a metodologia, como foram conduzidos e avaliados os experimentos realizados, e o capítulo 6 apresenta os resultados e discussões. Finalmente, no capítulo 7, são apresentadas as conclusões do trabalho com considerações finais e sugestões de trabalhos futuros. Ainda, o apêndice A trata com maiores detalhes o processo de fluorescência, o apêndice B coloca detalhes da derivação dos algoritmos

de restauração e o apêndice C trata dos detalhes de implementação e aspectos computacionais do trabalho.

2 *Introdução à Microscopia Ótica de Fluorescência Wide-field*

Neste capítulo serão abordados os conceitos principais de microscopia ótica de fluorescência *wide-field*, seu funcionamento e suas limitações. Posteriormente, a microscopia de seccionamento ótico computacional (COSM) será introduzida. A ênfase será na descrição do processo de formação da imagem e na caracterização do problema ao se obter imagens por meio destes instrumentos.

2.1 **Microscopia Ótica**

A microscopia é uma técnica desenvolvida para ampliar um determinado objeto que se deseja estudar com maior detalhe. A idéia central é utilizar lentes, pelas quais passa a luz proveniente do objeto em estudo e uma representação ampliada do mesmo possível de ser observada é criada. Para obter-se imagens de qualidade, muitas lentes (e conjuntos de lentes) foram desenvolvidas. O primeiro uso científico do microscópio que se encontrou registro data do século XVII (BIGNAMI, 2000). Avanços significativos na área foram obtidos no século XIX, principalmente no projeto de lentes com aberração esférica e cromática reduzidas e maior abertura numérica, a partir dos trabalhos de Lister, Amici, Abbe e Carl Zeiss (DAVIDSON; ABRA-MOWITZ, 1999). A contribuição destes e outros pesquisadores permitiu o desenvolvimento da microscopia ótica e beneficiou a pesquisa em diversas áreas do conhecimento.

O microscópio ótico atual conta, basicamente, com um sistema de iluminação que incide luz sobre uma amostra de um material de interesse. Este material é, em geral, colocado sobre uma lâmina de vidro, apropriada para este fim, posicionada sobre uma plataforma. A luz passa através do material e atinge um sistema de lentes (chamado de objetiva), cuja função é ampliar a visualização do objeto em estudo. Após passar pela objetiva, é possível visualizar uma imagem bidimensional que representa uma seção do objeto, definida pelo plano focal (posicionamento do objeto). Um esquema simplificado deste microscópio é demonstrado na Figura 2.1. No caso

dos espécimes biológicos, que são translúcidos, a luz passa pelo objeto na lâmina, permitindo sua observação pelo sistema de lentes.

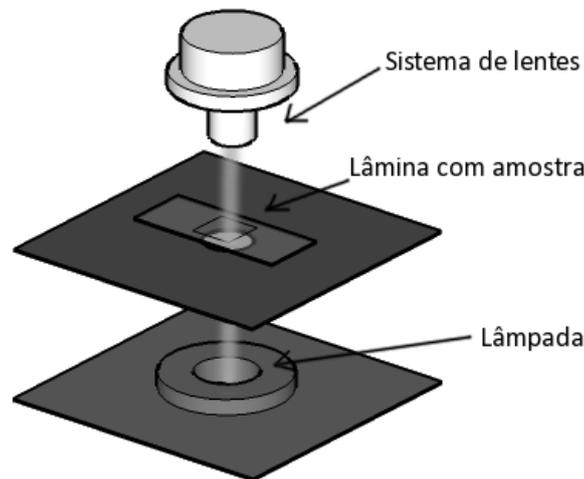


Figura 2.1: Esquema de funcionamento do microscópio ótico

2.1.1 Resolução em Microscopia Ótica

Na microscopia ótica, parte da luz que passa pelo espécime e ao seu redor, não sofre qualquer desvio em seu caminho até a objetiva. No entanto, uma parte da luz sofre um desvio quando encontra o espécime. Esta luz desviada (chamada de luz difratada) é imageada com um atraso de metade do comprimento de onda, ou a 180 graus da fase da luz direta que passou sem desvio (DAVIDSON; ABRAMOWITZ, 1999). Este comportamento faz com que a luz desviada cause uma interferência destrutiva com a luz direta, quando ambas chegam ao plano de formação da imagem. Assim, a luz direta é projetada pela objetiva e distribuída de forma homogênea por todo o plano da imagem. A luz difratada é também projetada no mesmo plano de forma não homogênea e com intensidade reduzida, sendo que parte da luz não é capturada pela objetiva devido a sua abertura finita. A imagem produzida é, portanto, uma reconstrução imprecisa do objeto original.

Devido a este comportamento da luz, diversos pesquisadores fizeram esforços no sentido de melhorar a captura da luz, pois quanto maior o número de ondas difratadas capturadas pela objetiva, melhor será a resolução de detalhes do espécime e, por consequência, mais fiel será a imagem em relação ao objeto original. O que caracteriza a faixa de ângulos que uma objetiva é capaz de capturar é a sua **abertura numérica** (NA, do inglês *numerical aperture*). Portanto, objetivas de maior abertura numérica possuem maior poder de resolução.

ção deve-se entender a capacidade de resolver objetos separados por uma certa distância, o que implica que estes objetos possam ser percebidos como sendo distintos. A equação de Rayleigh define a seguinte distância (DAVIDSON; ABRAMOWITZ, 1999):

$$d = 1,22 \frac{\lambda}{2NA}, \quad (2.1)$$

onde d representa a distância entre duas partículas adjacentes que ainda podem ser resolvidas como sendo separadas. Aqui, esta distância é calculada em função de: λ , o comprimento de onda da luz que ilumina o objeto; e NA, a abertura numérica da objetiva. Pela Equação 2.1 é possível notar que o uso de luz com menores comprimentos de onda e objetivas de maior abertura numérica permite resolver objetos separados por menor distância.

Os avanços em microscopia ótica permitiram a criação de objetivas com maior abertura numérica, menores aberrações, e o desenvolvimento de sistemas condensadores para concentrar a luz. Estes avanços, no entanto, são limitados, pois mesmo com o uso de uma lente perfeita, sempre haverá um limite na resolução de uma imagem criada por estas lentes (DAVIDSON; ABRAMOWITZ, 1999).

Uma forma comumente utilizada para melhorar a captura de luz (e por consequência o poder de resolução) é utilizar um meio de índice refrativo superior ao ar entre a primeira lente da objetiva e a cobertura da lâmina que contem o espécime (comumente chamado de meio de imersão), reduzindo o ângulo de refração, melhorar a resolução em relação a uma objetiva "seca". A Figura 2.2 mostra uma representação deste efeito para diferentes meios de imersão (ar e óleo), cada qual com um índice de refração diferente, representado por n .

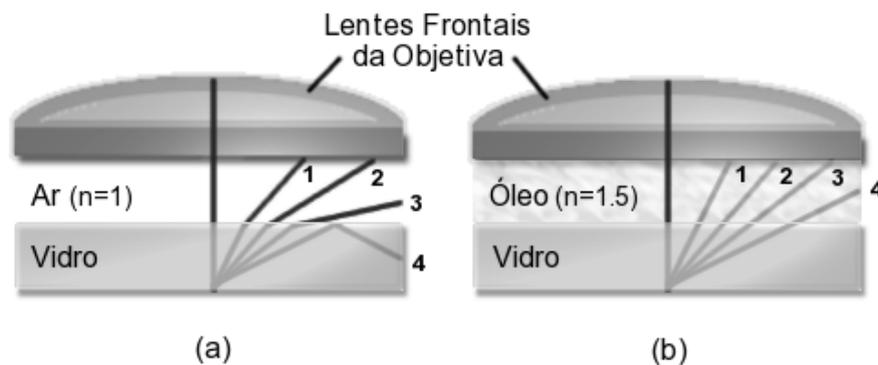


Figura 2.2: Refração da luz com lente seca (a) e com uso de óleo de imersão (b)

Difração

Quando uma frente de onda é bloqueada por um objeto opaco contendo uma fenda, a frente de onda sofre uma difração. Considerando que haja apenas uma abertura, pode-se assumir que

a onda consiste em uma fonte pontual única, que produz, após esta abertura, uma onda semi-circular. Esta onda semi-circular é chamada de padrão de difração. A Figura 2.3 mostra uma simulação da difração de uma onda, na qual é possível observar a existência de um feixe direto, de fases deslocadas e de regiões nulas no padrão de difração.

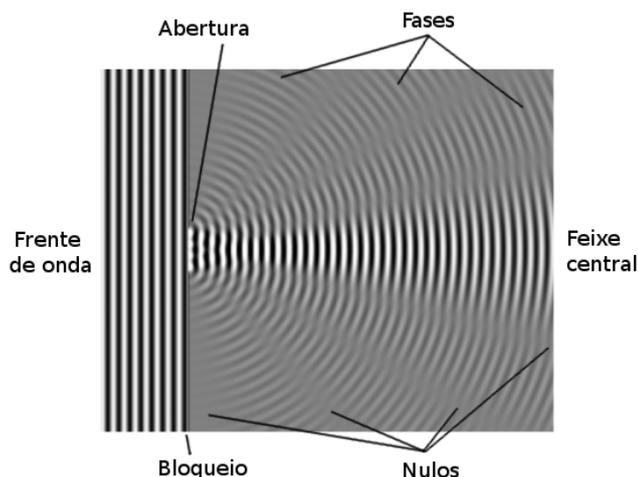


Figura 2.3: Aproximação numérica de um padrão de difração a partir de uma frente de onda bloqueada por um plano com uma fenda. Adaptado de Lyon (2007)

Devido à natureza ondulatória da luz, este fenômeno se aplica aos instrumentos óticos, como o microscópio, cuja objetiva possui abertura finita e atua como a fenda citada anteriormente. Assim, a imagem de uma fonte de luz pontual que passa pela objetiva, não é um ponto, mas uma versão borrada deste ponto. A imagem de um ponto produz um padrão, composto de uma região circular central e uma série de discos concêntricos. Este padrão é conhecido como **Disco de Airy**¹, ou ainda padrão de difração de Fraunhofer. O tamanho da abertura circular e o comprimento de onda da luz são os fatores que definem o diâmetro do disco. A Figura 2.4 na página seguinte mostra exemplos de discos de Airy para diferentes comprimentos de onda e aberturas numéricas.

Devido à difração, um ponto no objeto real **não** corresponde a um ponto na imagem produzida pelo microscópio e, portanto, como descrito na seção 2.1.1 na página 9, a representação mais fiel do objeto dependerá da objetiva utilizada (suas características e material usado como meio entre o espécime e a objetiva). A distância d da equação de Rayleigh (Equação 2.1) representa a distância mínima entre dois pontos para que estes sejam resolvidos. Se dois objetos não estão suficientemente separados, os discos de Airy produzidos na imagem se sobrepõem, impedindo que sejam percebidos como dois pontos distintos (Figura 2.4 na página seguinte,(a)).

¹nome do pesquisador George B. Airy, que pela primeira vez descreveu o fenômeno

A imagem resultante, portanto, pode ser descrita como um mosaico de discos de Airy (DAVIDSON; ABRAMOWITZ, 1999).

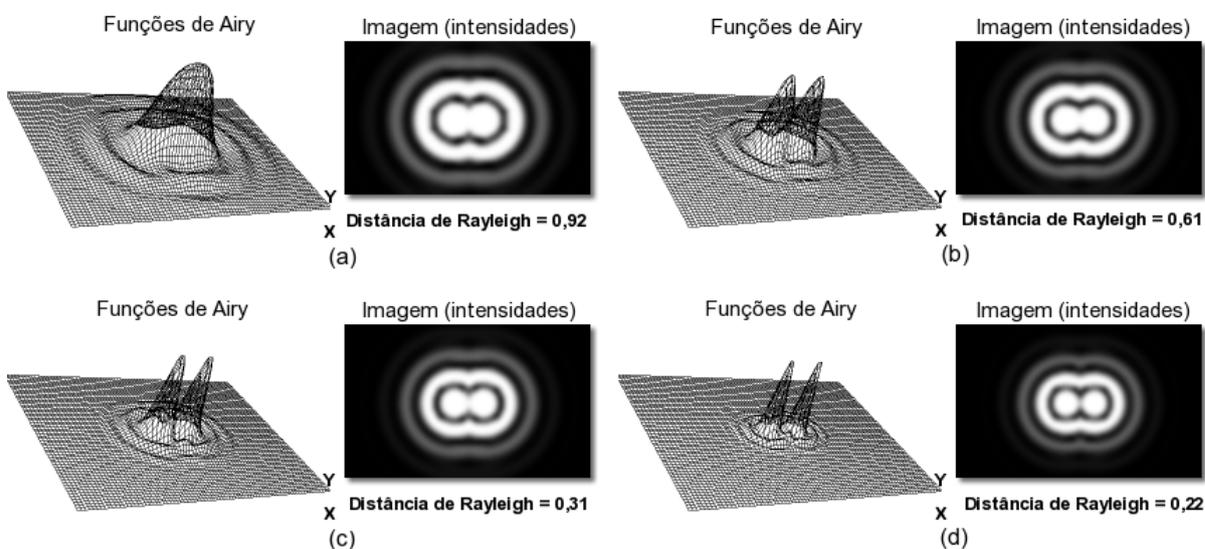


Figura 2.4: Exemplos de discos de Airy para diferentes comprimentos de onda e abertura: $\lambda = 700nm$, $NA = 0,75$ (a); $\lambda = 500nm$, $NA = 0,75$ (b); $\lambda = 700nm$, $NA = 1,4$ (c); $\lambda = 700nm$, $NA = 1,4$ (d). Extraído e adaptado de Olympus-America (2008)

2.2 Microscopia de Fluorescência

Técnicas de fluorescência tiveram grande expansão por volta da década de 1990, após o advento de novas técnicas em biologia molecular e celular e biotecnologia, entre outras, que utilizam instrumentos óticos para geração de dados em diversas aplicações, como apontado por Slavik (1993). Segundo este autor, as principais causas da popularidade desta técnica são o fato de ser altamente sensível, seletiva, quase não-invasiva, além da grande disponibilidade de instrumentos de imageamento por fluorescência. A utilização de fluorescência em microscópios permite melhorar substancialmente a observação de moléculas e reações, incluindo a possibilidade de reconstruções tridimensionais. Ainda, permite a determinação de variáveis como pH e íons em solução em tempo real.

A observação da fluorescência é possível por meio da utilização de uma propriedade de uma molécula de transmitir luz quando excitada por um determinado comprimento de onda ou em determinadas condições físico-químicas.

A microscopia ótica convencional, seja de campo claro ou escuro, ilumina o objeto como um todo para visualizá-lo. Em algumas aplicações, no entanto, existe a necessidade de observar de forma destacada apenas uma região, ou estrutura de um determinado espécime. Em apli-

cações biológicas, por exemplo, pode ser necessário observar apenas a matriz extra-celular, o núcleo ou ainda um gene específico. A microscopia de fluorescência é uma técnica utilizada por ser capaz de fornecer informações específicas de materiais orgânicos e estruturas celulares vivas. Quando comparada a outras formas de microscopia, suas vantagens estão em identificar células e componentes celulares submicroscópicos com um alto grau de especificidade entre moléculas de interesse (SLAVIK, 1993). Neste tipo de microscopia, substâncias chamadas **fluorocromos** são adicionadas à amostra de forma a rotular determinadas moléculas ou estruturas celulares. Estas substâncias serão mais bem descritas na seção 2.2.1.

O princípio fundamental da microscopia de fluorescência está no uso desta substância que, quando excitada por luz em um determinado comprimento de onda, responde emitindo luz em outro comprimento de onda. No microscópio, há um dispositivo de **excitação** por uma luz em determinado comprimento de onda e a imagem observada será dada pela **emissão** da luz em comprimento de onda diferente.

O microscópio de fluorescência deve, portanto, permitir que uma luz de excitação atinja a amostra, e capturar a luz emitida por ela para visualização. A Figura 2.5 na próxima página apresenta um esquema simplificado do funcionamento do microscópio de fluorescência: uma lâmpada especial (em geral de vapor de mercúrio) produz luz em diversos comprimentos de onda; um filtro de excitação permite a passagem de uma faixa de comprimentos de onda específica que será desviada pelo espelho dicróico, será concentrada pela objetiva e alcançará o espécime em estudo. A luz excita o fluorocromo que por sua vez emite como resposta uma luz de comprimento de onda (em geral no espectro visível e menor do que a luz de excitação). Esta é irradiada esfericamente em todas as direções, independentemente da direção da luz de excitação. A objetiva captura parte desta luz, sendo separada pelo espelho dicróico, capaz de refletir a luz de excitação emitida pela lâmpada, deixando passar apenas a luz emitida pelo espécime; por fim, um filtro de emissão permite selecionar uma faixa de comprimentos de onda específica para a visualização da imagem final (WU; MERCHANT; CASTLEMAN, 2008).

Note que, neste caso, não está presente a iluminação de fundo, pois deseja-se apenas observar a luz que é emitida pelo fluorocromo utilizado. A fluorescência emitida é tipicamente mil vezes menos intensa do que a luz de iluminação (KEMPEN, 1999).

2.2.1 **Fluorescência e Fluorocromos**

Como visto anteriormente, a microscopia de fluorescência requer o uso de fluorocromos, também chamados de corantes fluorescentes, moléculas capazes de emitir luz fluorescente. Apesar de ter este nome, a propriedade fluorescente da molécula está frequentemente relaci-

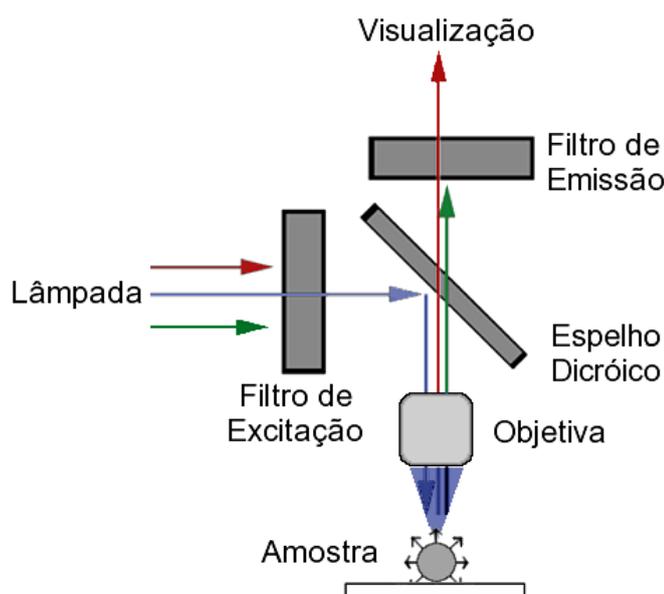


Figura 2.5: Esquema de funcionamento do microscópio de fluorescência

onada a uma certa parte, um grupo específico da molécula. Na literatura, estes grupos são chamados “grupos fluorocromos”. Os grupos fluorocromos são em geral anéis aromáticos ou sistemas altamente conjugados, que absorvem larga faixa de comprimentos de onda (WEHRY; ROGERS, 1966).

Grupos ou moléculas fluorescentes podem ser usados para marcar outras moléculas específicas. Por isto é dito que estes corantes são específicos, no sentido de que são projetados para se fixar apenas em determinadas estruturas. Alguns fluorocromos reagem especificamente com certos grupos químicos como aminas, tióis, carboxilas, etc. Moléculas previamente rotuladas com fluorescência estão disponíveis comercialmente como: lipídios, proteínas, nucleosídeos, etc. Há técnicas para produzir moléculas fluorescentes análogas sem afetar sua atividade biológica, podendo ser usadas para marcar seletivamente: componentes celulares, DNA, RNA ou segmentos de proteína (SLAVIK, 1993).

Os fluorocromos reagem diferentemente pela absorção e emissão de luz em comprimentos de onda característicos. É possível realizar uma separação baseada nos espectros de emissão e absorção do fluorocromo. No entanto, o valor ótimo para ambas, emissão e absorção, é dependente da temperatura, pH e solubilidade da amostra. O ideal é que os fluorocromos possuam um alto coeficiente de emissão (alto rendimento quântico), pois assim ele poderá ser facilmente distinguível da fluorescência de fundo, da autofluorescência das células, e também de outras fluorescências presentes na solução (HISIGER; JOLICOEUR, 2005; WU; MERCHANT; CASTLEMAN, 2008). Com uma boa escolha dos filtros para os comprimentos de onda de excitação e emissão, diversos fluorocromos podem ser monitorados simultaneamente em uma mesma

amostra, sendo possível compor uma imagem a partir de imagens obtidas por diferentes combinações de filtros (veja Figura 2.6).

Para mais detalhes do processo de fluorescência, sua eficiência e tempo de vida, consultar Apêndice A na página 98.

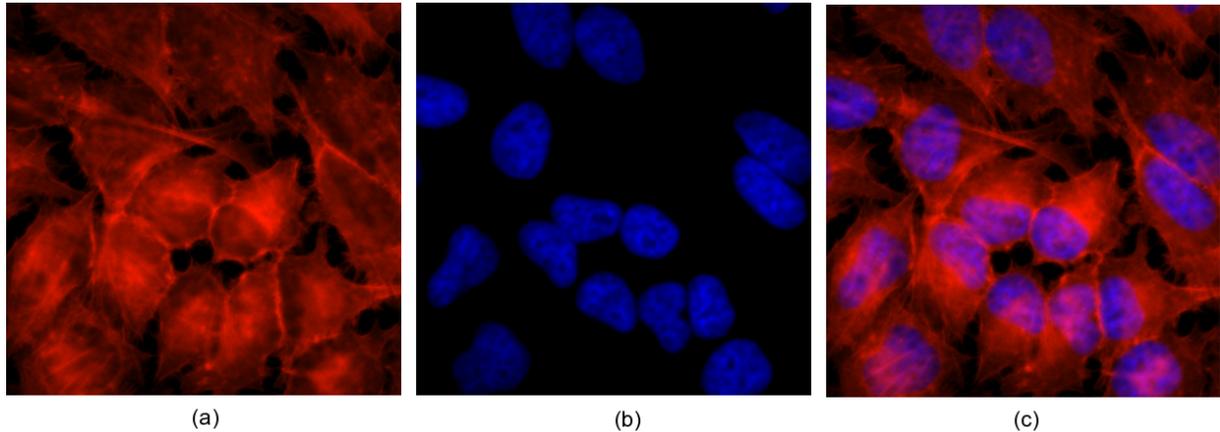


Figura 2.6: Composição de imagem da célula HeLa por meio de imagens obtidas utilizando duas combinações de filtros: fluorocromo Alexa Fluor 594 para rotular rede intracelular de microfilamentos com resposta em 617nm (a), fluorocromo DAPI para rotular DNA com resposta em 460nm (b), e imagem composta (c).

2.3 Microscopia de Seccionamento Ótico Computacional (COSM)

A Microscopia de Seccionamento Ótico Computacional (COSM - do inglês *Computational Optical Sectioning Microscopy*) consiste na aquisição de secções óticas de um espécime em diferentes planos focais, de forma a varrer o eixo axial. Após a aquisição, a série de imagens bidimensionais é montada de maneira a compor uma imagem tridimensional (SARDER; NEHORAI, 2006; HOMEM, 2003; AGARD, 1984). A Figura 2.7 na página seguinte mostra um exemplo da aquisição da imagem 3-D de uma célula por meio de um microscópio de fluorescência.

Dois tipos principais de microscópios são utilizados para adquirir imagens por meio da microscopia de fluorescência: o microscópio wide-field e o microscópio confocal. As próximas seções irão introduzir os conceitos fundamentais acerca destes dois tipos de microscópios.

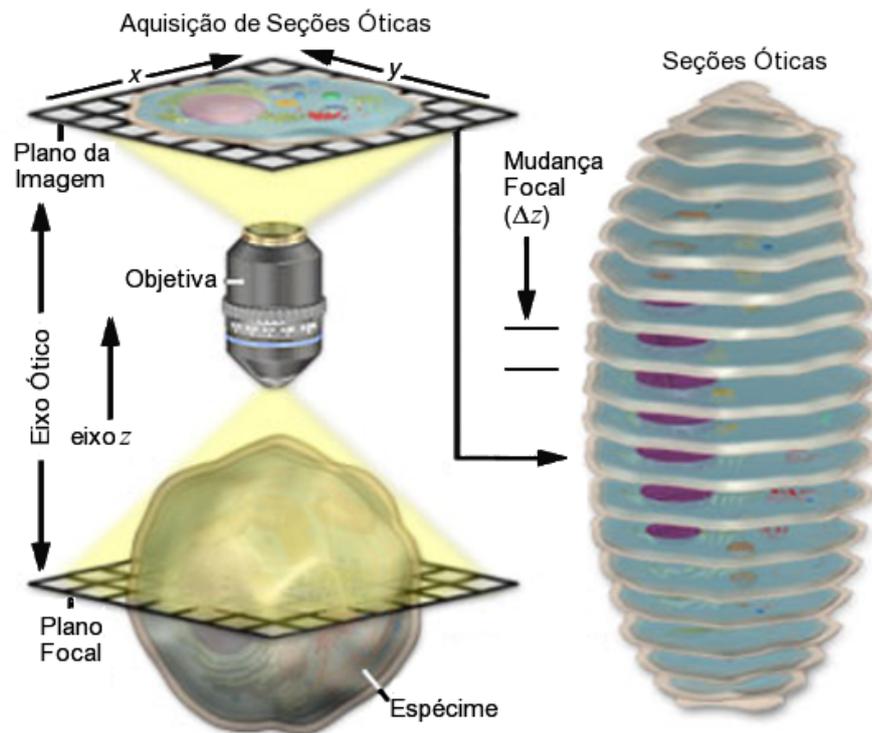


Figura 2.7: Exemplo de aquisição de imagem 3-D de uma célula por meio de um microscópio de fluorescência (COSM). Extraído e adaptado de Sarder e Nehorai (2006)

2.3.1 Microscopia *Wide-Field* e Confocal

O **microscópio *wide-field*** é o tipo mais comumente utilizado para aquisição de imagens de microscopia de fluorescência em 3-D (KEMPEN, 1999). Portanto, é muitas vezes chamado de microscópio convencional. O funcionamento do microscópio *wide-field* segue o padrão descrito na seção 2.2 na página 12. O espécime em estudo é iluminado integralmente pela luz de excitação e, por isto, a câmera recebe num mesmo instante a luz fluorescente que provém do plano focal, assim como dos planos acima e abaixo (veja Figura 2.8 na página seguinte, onde a linha seccionada representa a luz fora de foco). Este efeito, em conjunto com o fato de o sistema de lentes possuir abertura finita, é um borramento por luz fora de foco. Este borramento é observado com maior intensidade na direção axial (eixo z), o que dificulta o uso de seccionamento ótico computacional para obtenção de imagens 3-D.

O **microscópio confocal** foi desenvolvido de forma a minimizar a contribuição de luz proveniente dos planos fora de foco, e, assim, reduzir de forma significativa o borramento na direção axial. Ao invés de iluminar a amostra completamente, apenas um ponto é iluminado. A fonte de luz também é pontual (em geral, um feixe de laser). A luz fluorescente que origina do ponto

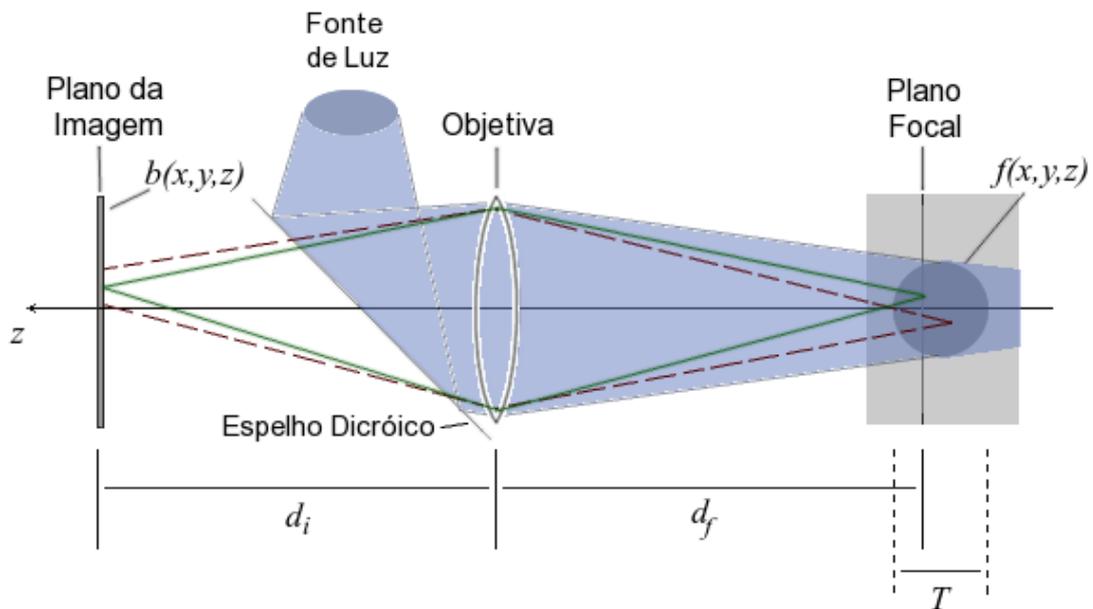


Figura 2.8: Esquema simplificado de formação da imagem em um microscópio ótico *wide-field*. Adaptado de Castleman (1996) e Verveer (2001).

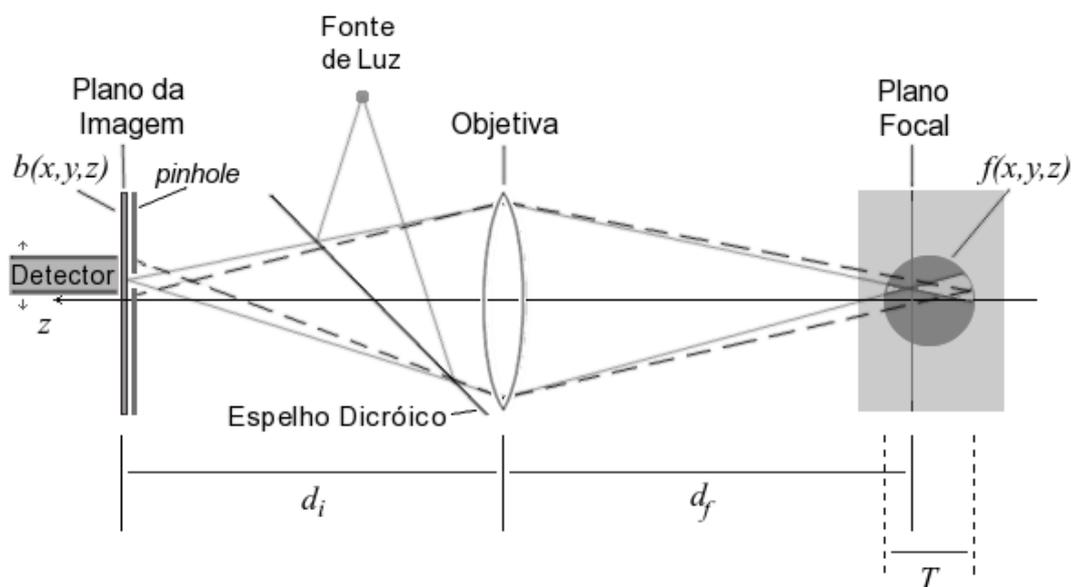


Figura 2.9: Esquema simplificado de formação da imagem em um microscópio ótico confocal. Adaptado de Castleman (1996) e Verveer (2001).

correspondente no plano focal é observada através de um *pinhole*² existente no detector. O *pinhole* rejeita a maior parte da luz proveniente de planos acima ou abaixo do plano focal. Para formar uma imagem completa, uma varredura da fonte de luz ou do detector é necessária (veja Figura 2.9 na página precedente, onde a linha seccionada representa a luz fora de foco). Assim, imagens obtidas por microscopia confocal podem ser usadas diretamente para obter-se visualização 3-D.

A microscopia confocal, no entanto, não possui apenas vantagens. Apesar de sua alta resolução, o sinal adquirido é mais fraco em comparação com o *wide-field*. Isto porque a necessidade da varredura diminui a velocidade do sistema e por consequência o número de fótons detectados para um dado tempo de exposição. Pelo fato dos fótons serem rejeitados pelo *pinhole*, o sinal pode ser fraco, quando comparado ao produzido por um microscópio *wide-field*. Por isto, uma maior intensidade da luz de excitação ou maior exposição faz-se necessária, o que pode levar a danos no espécime estudado. As regiões fora de foco são atingidas pela luz de excitação, ainda que os fótons gerados por estas regiões não sejam imageados. Isto pode causar diminuição na fluorescência nas regiões ainda não observadas e por consequência a obtenção de uma imagem não uniforme (CONCHELLO; MCNALLY, 1996). A principal consequência dos fatores acima citados é a diminuição na relação sinal-ruído. Ainda, o equipamento confocal é mais complexo e cerca de quatro ou cinco vezes mais caro. Assim, em aplicações em que a velocidade ou a fluorescência emitida pelo espécime são fatores limitantes, o microscópio *wide-field* pode ser preferível (KEMPEN, 1999).

2.4 Modelo de Formação da Imagem em Microscopia *Wide-Field*

A resolução de um microscópio determina o limite para a detecção de detalhes de um objeto (como visto na seção 2.1.1 na página 9). O modelo de formação da imagem de um dado sistema permite conhecer a influência deste na resolução da imagem. Assim como em outros estudos, iremos considerar o modelo com base na função de espalhamento pontual (PSF - do inglês *Point Spread Function*) do microscópio, que representa a imagem observada, dada uma fonte pontual simples. Esta função determina a resposta impulsional do sistema, e por consequência, reflete o poder de resolução do mesmo.

Para descrever o modelo de formação da imagem, utilizaremos os excelentes textos de Homem et al. (2002), Kempen (1999), Castleman (1996), Goodman (1996), Gibson e Lanni

²Termo em inglês usado para designar uma pequena abertura pela qual passa a luz (tradução literal: "buraco de alfinete")

(1989, 1991), cuja leitura é sugerida para maior detalhe acerca da análise dos sistemas óticos, suas aberrações e modelos de degradação.

A imagem tridimensional, formada por meio da COSM, é obtida por meio da aquisição de imagens bidimensionais em diversos planos focais, com distância aproximadamente fixa entre os planos adquiridos. Consideraremos o objeto real (espécime) como sendo uma função $f(x, y, z)$ no espaço tridimensional. O aumento produzido pela lente, modifica um dado ponto (x_f, y_f) no objeto num dado plano focal, para os pontos $x_i = -Mx_f$ e $y_i = -My_f$ da imagem formada pelo microscópio, sendo $-M$ consequência do aumento e da rotação de 180° . A formação da imagem se dá em um plano, após a passagem da luz pela objetiva.

A Figura 2.8 na página 17 mostra um esquema simplificado da formação da imagem. O aumento é dado por $M = \frac{d_i}{d_f}$ (CASTLEMAN, 1996). A distância d_i é fixa para uma dada objetiva (sendo algumas vezes corrigida, ver Davidson e Abramowitz (1999) para maiores detalhes), e a distância d_f pode ser variada pela movimentação do objeto em estudo ao longo do eixo z . A variação no aumento M , no entanto, provocada pela movimentação do objeto pode ser desprezada, pois o tamanho T do espécime é insignificante em relação a d_f .

Segundo Homem et al. (2002), podemos considerar o objeto $f(x, y, z)$, de tamanho T (ao longo do eixo z) como sendo uma pilha de J seções bidimensionais ao longo do eixo z , onde $T = (J - 1)\Delta z$ e Δz é a distância entre as seções.

Segundo Davidson e Abramowitz (1999) a imagem observada pode ser descrita como um mosaico de discos de Airy (seção 2.1.1 na página 10). Se considerarmos a PSF como sendo o modelo capaz de descrever a resposta impulsional do microscópio, podemos dizer que a imagem observada é resultado da soma de uma PSF para cada ponto no objeto real (mais especificamente, centrada em cada ponto no objeto real). Matematicamente, uma convolução:

$$g(x, y, z) = \int \int \int h(x - x', y - y', z - z') f(x', y', z') dx' dy' dz' = h(x, y, z) * f(x, y, z), \quad (2.2)$$

onde g é a imagem observada e h é a PSF tridimensional do microscópio, e $*$ representa a operação de convolução tridimensional. Este modelo considera um sistema livre de ruído.

Para que o modelo baseado na convolução seja válido, é preciso considerar que a PSF seja invariante ao deslocamento e que o sistema seja linear.

Invariância ao Deslocamento: A invariância ao deslocamento da PSF não reflete exatamente a realidade, pois mesmo para lentes de alta qualidade, existe uma variação na resposta impulsional quando há um deslocamento. No entanto, ainda que não globalmente, é possível

assumir que a PSF é localmente invariante ao deslocamento, e assim utilizar o modelo da convolução (CASTLEMAN, 1996).

Linearidade: de acordo com Goodman (1996), um sistema ótico pode ser considerado linear se o objeto em estudo é translúcido e se a emissão de luz é incoerente (o que significa que as ondas provenientes de fontes pontuais podem variar em fase, independente uma das outras) e, neste caso, o sistema é linear em intensidade. Como na seção 2.1 na página 8, os espécimes biológicos observados em microscópios são em geral translúcidos. Ainda, na microscopia ótica a distribuição da intensidade é espacialmente incoerente. Sendo assim, este modelo é válido. Sistemas de luz coerentes (lineares em amplitude) apenas são obtidos por meio de lasers, como no caso dos microscópios confocais.

2.4.1 Modelo Discreto de Formação da Imagem

As imagens bidimensionais observadas são em geral gravadas por meio de câmeras com sensores CCD. As diversas seções ao longo do eixo z são obtidas em distâncias regulares Δz . Assim, as imagens tridimensionais obtidas são discretas. É possível escrever o modelo discreto de formação da imagem, a partir da Equação 2.2 como:

$$g[x, y, z] = h[x, y, z] * f[x, y, z], \quad (2.3)$$

onde $*$ representa convolução discreta tridimensional, e $x, y, z \in \mathbb{Z}$. No domínio de Fourier, e devido ao teorema da convolução, podemos escrever a Equação 2.3 como:

$$G[u, v, w] = H[u, v, w] \cdot F[u, v, w], \quad (2.4)$$

onde G , H e F são, respectivamente, as Transformadas de Fourier Discretas (DFT, do inglês *Discrete Fourier Transform*) de g , h e f , sendo que $u, v, w \in \mathbb{Z}$.

Ainda, em se tratando de microscopia, e para a aquisição por meio de um sensor discreto como o CCD, a estatística de contagem de fótons para cada posição do sensor é dada por variáveis de Poisson independentes. Assim, cada valor $g(x, y, z)$ é a realização de uma variável aleatória descrita por uma distribuição de Poisson com taxa de contagem dada por $f[x, y, z] * h[x, y, z]$ (VLIET et al., 1998). Desta forma, o modelo é reescrito como:

$$g[x, y, z] = \mathcal{N} \{ f[x, y, z] * h[x, y, z] \}, \quad (2.5)$$

onde $\mathcal{N} \{ \}$ representa um processo aleatório. A distribuição das imagens de microscopia de fluorescência é bem modelada por uma distribuição de Poisson. O ruído advindo deste processo é

dependente da imagem gerada por $f(x, y, z) * h(x, y, z)$. Em algumas aplicações, as imagens são capturadas com baixo tempo de exposição para evitar o efeito *photobleaching*, processo que causa diminuição da fluorescência; obtém-se uma baixa contagem de fótons e, por consequência, a relação sinal-ruído da imagem diminui (SONG et al., 1995).

Outros tipos de ruído estão presentes na imagem de microscopia de fluorescência. O segundo principal ruído é aquele resultante do processo eletrônico de aquisição, o qual é frequentemente modelado por uma distribuição Gaussiana e considerado como aditivo (independente do sinal). Apesar deste tipo de ruído estar presente nas imagens de microscopia de fluorescência, é insignificante comparado àquele proveniente da contagem de fótons (VLIET et al., 1998).

Para imagens com alta relação sinal ruído é possível também aproximar o ruído Poisson para um modelo Gaussiano aditivo como apontado por Snyder e Miller (1991). De fato, pela dificuldade em lidar com o ruído Poisson, esta hipótese é adotada por alguns autores, mas não será considerada neste trabalho.

Para simplificar a notação, serão omitidas as coordenadas tri-dimensionais (x, y, z) das equações, sendo referenciadas quando necessário na forma do vetor \mathbf{x} . No domínio da frequência (u, v, w) será representado na forma do vetor \mathbf{u} .

2.4.2 Função de Espalhamento Pontual (PSF) e Função de Transferência Ótica (OTF)

Para o caso de luz incoerente, com comprimento de onda λ , a PSF bidimensional no plano da imagem é o quadrado da Transformada de Fourier da função pupila do sistema de lentes do microscópio, dada por:

$$p(x_a, y_a) = \begin{cases} 1, & \text{se } -\frac{a}{2} \leq \sqrt{x_a^2 + y_a^2} \leq \frac{a}{2}, \\ 0, & \text{caso contrário.} \end{cases} \quad (2.6)$$

A PSF pode, então, ser escrita em termos da função de Bessel:

$$h(r) = \left\{ 2 \frac{J_1 \left(\pi \left[\frac{r}{r_0} \right] \right)}{\pi \left[\frac{r}{r_0} \right]} \right\}^2, \quad (2.7)$$

onde $J_1()$ é a função de Bessel de primeira espécie de primeira ordem. Esta PSF é uma função com simetria radial, sendo que a constante r_0 é um fator de escala dado por

$$r_0 = \frac{\lambda d_i}{a} \quad (2.8)$$

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

$$r = \sqrt{x_i^2 + y_i^2}. \quad (2.9)$$

Na literatura, para derivação e análise da PSF, é considerada a Função de Transferência Ótica (OTF, do inglês *Optical Transfer Function*), que representa a transformada de Fourier normalizada da PSF. A OTF reflete a região do espectro que passa pelo sistema, e muitas vezes é usada para especificar a qualidade de um sistema de lentes. Considerando uma lente com abertura circular de diâmetro a , e luz incoerente de comprimento de onda λ , a OTF no plano da imagem, segundo Hopkins (1955), pode ser escrita como:

$$H(q) = \frac{2}{\pi - 2} \left\{ \cos^{-1} \left(\frac{q}{f_c} \right) - \text{sen} \left[\cos^{-1} \left(\frac{q}{f_c} \right) \right] \right\}, \quad (2.10)$$

onde q é a frequência radial, dada por:

$$q = \sqrt{u^2 + v^2}, \quad (2.11)$$

e o parâmetro f_c é a maior frequência espacial que pode passar através do sistema, também chamada de **frequência de corte**, e pode ser determinada por:

$$f_c = \frac{1}{r_0} = \frac{a}{\lambda d_i}. \quad (2.12)$$

A PSF tridimensional discreta do microscópio pode ser derivada a partir de um conjunto de funções bidimensionais igualmente espaçadas ao longo do eixo z :

$$h_{k-j}(x, y) = h(x, y, z_d), \quad (2.13)$$

onde $z_d = z_k - j\Delta z$. Esta PSF é chamada de PSF desfocada, e representa a PSF na j -ésima seção quando o microscópio está focado sobre o k -ésimo plano em z_k .

A frequência de corte no plano $(u - v)$ é equivalente à frequência de corte bidimensional no plano focal e expressa em termos da abertura numérica:

$$f_c^{u-v} \approx \frac{2NA}{\lambda}, \quad (2.14)$$

onde NA é aqui definida como:

$$NA = \hat{n} \cdot \text{sen}(\hat{\alpha}) \approx \frac{a}{2 \cdot d_f}, \quad (2.15)$$

sendo \hat{n} o índice de refração do meio entre o espécime e a lente, e

$$\hat{\alpha} = \arctan\left(\frac{a}{2 \cdot d_f}\right), \quad (2.16)$$

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

$$f_c^w \approx \frac{NA^2}{2\lambda}, \quad (2.17)$$

Muitos estudos sobre a forma exata da PSF foram realizados nos últimos 50 anos, entre eles Monvel et al. (2003), Gibson e Lanni (1991, 1989), Sheppard e Gu (1991), Hiraoka, Sedat e Agard (1990), Hopkins (1955). Neste trabalho, para geração da PSF, consideramos o modelo de Gibson e Lanni (1991, 1989) que incorpora possíveis aberrações existentes no sistema de lentes e leva em consideração um sistema limitado pela difração.

A Figura 2.10 na página seguinte mostra seções axiais centrais da PSF e da OTF para um microscópio *wide-field*, onde é possível observar o suporte da OTF. Todas as frequências acima da frequência de corte são completamente perdidas, o que indica que altas frequências não passam pelo sistema, limitando a resolução. No microscópio *wide-field* um “**cone de frequências perdidas**” pode ser visto na direção axial. Nesta direção haverá perda em diversas frequências (MCNALLY et al., 1994). Por exemplo, uma fina fatia de fluorescência orientada ao longo do plano focal, possui todas as suas frequências dentro do cone de frequências perdidas, o que impossibilita determinar a posição desta fatia em relação ao plano focal (KEMPEN, 1999). Este fator limita o uso do microscópio *wide-field* para obter imagens 3-D, visto que não apenas altas frequências serão perdidas, mas também grande parte das baixas frequências na direção axial. A Figura 2.11 na próxima página mostra seções axiais centrais da PSF e da OTF para um microscópio confocal.

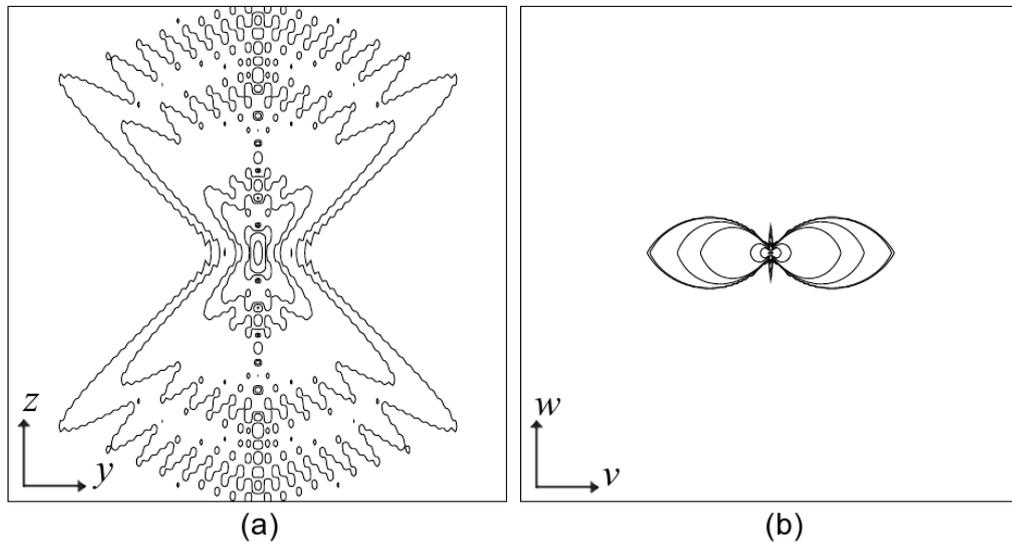


Figura 2.10: Suportes para a PSF (a) e OTF (b) de um microscópio *wide-field*, considerando $\lambda = 520\text{nm}$, $\text{NA} = 1,3$ e índice de refração do meio de 1,5. Os contornos representam o suporte para 50%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1% e 0,05% do valor máximo.

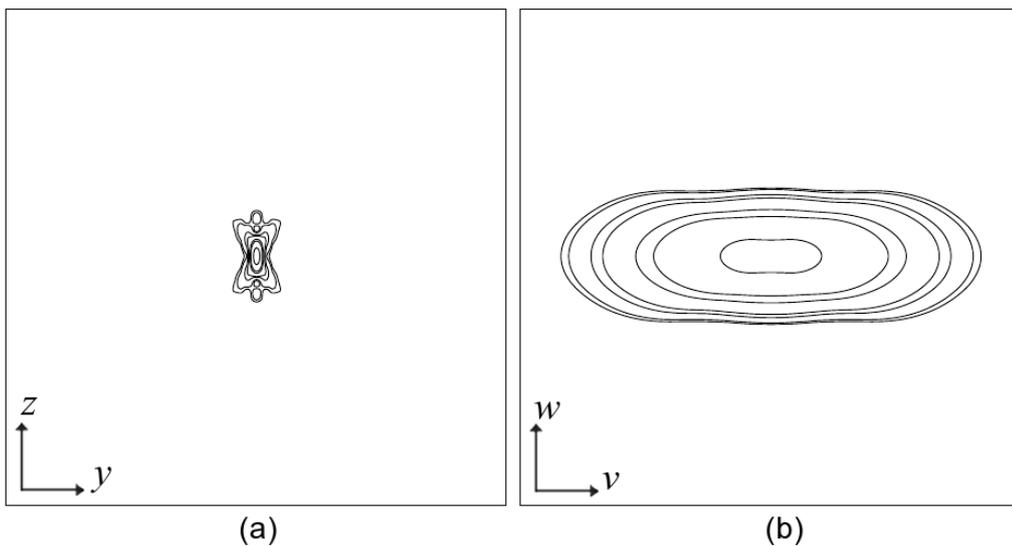


Figura 2.11: Suportes para a PSF (a) e OTF (b) de um microscópio confocal, considerando excitação $\lambda = 488\text{nm}$, emissão $\lambda = 520\text{nm}$, $\text{NA} = 1,3$ e índice de refração do meio de 1,5, diâmetro do *pinhole* = 200nm. Os contornos representam o suporte para 50%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1% e 0,05% do valor máximo.

3 *Métodos de Restauração para Microscopia Ótica Wide-field*

As imagens obtidas por microscopia não correspondem exatamente ao objeto imageado. Isto se deve principalmente ao fato de o sistema de lentes possuir abertura finita, definindo um limite de difração que provoca corte e distorção das frequências e pela interferência da luz fora de foco. A ótica de Fourier demonstra que existe uma frequência de corte, que é diretamente determinada pelo tamanho e forma do sistema de lentes do instrumento ótico (GOODMAN, 1996). A distorção dos componentes de frequência é governada pela OTF, que é a transformada de Fourier normalizada da PSF, função de espalhamento pontual do instrumento, que descreve o espalhamento espacial dada a entrada de um único ponto no sistema. Além disso, pelas características do sistema de microscopia, há presença de ruído de diversas fontes, em especial, no caso da microscopia de fluorescência, ruído causado pela baixa contagem de fótons que é bem modelado por uma distribuição de Poisson.

Os métodos para recuperar a imagem, revertendo as distorções causadas pelo sistema de imageamento, são chamados de métodos de restauração de imagens. Pode-se dizer que o objetivo é reconstruir o objeto original a partir da imagem observada, usando as informações disponíveis. Frequentemente, existem casos em que se têm informações sobre a PSF e a estatística do ruído presente na imagem, além de outros conhecimentos *a priori*. A partir dessa informação *a priori* uma metodologia particular pode ser usada para a obtenção da imagem desejada.

A forma mais simples de modelar a distorção é estudar o processo de formação da imagem de um sistema de imageamento. Uma forma é considerar este modelo como a convolução da imagem do objeto real com a PSF ou, de forma equivalente, o produto da transformada de Fourier da imagem com a OTF. Partindo deste modelo, a solução mais intuitiva seria dividir a transformada de Fourier da imagem pela OTF. Este procedimento é conhecido como filtragem inversa e foi intensamente estudado. O resultado do filtro inverso é, em casos reais, não viável devido à alta amplificação do ruído presente na imagem. Esta amplificação é causada pela reconstrução das altas frequências no espectro de Fourier da imagem, dominadas pelo ruído. Isto

porque a OTF possui valores muito baixos nestas regiões, resultando em uma grande amplificação do ruído no resultado final, como será visto com maiores detalhes a seguir.

Neste capítulo será realizada uma revisão da literatura da área de restauração de imagens em microscopia. Em seguida, os métodos de restauração e de extrapolação espectral utilizados neste trabalho serão descritos.

3.1 Restauração: O Problema Inverso

A restauração de imagens pode ser vista como um problema inverso, pois uma função modificada g está disponível e deseja-se encontrar uma função original f que foi modificada pelo sistema — aqui representado pela PSF h . A solução de um problema inverso pode ser encontrada por meio de vários métodos. Um método frequentemente utilizado é a modelagem do problema como um sistema de equações lineares em que se trabalha com matrizes e vetores, sendo equivalente à chamada notação lexicográfica, por exemplo:

$$g_{xyz} = H_{xyz}f_{xyz} + n_{xyz}, \quad (3.1)$$

sendo o vetor g gerado pelo produto da matriz Toeplitz H e do vetor f . Sendo assim, o objetivo é encontrar a matriz H^{-1} , e assim obter a solução inversa. O esquema mostrado na equação 3.1 permite a aplicação de uma série de modelos. Muitos métodos foram propostos no sentido de obter f a partir da observação g , possuindo ou não conhecimento acerca de H (SABATIER, 2000; TARANTOLA, 2005). A solução mais natural seria o filtro inverso exato:

$$f_{xyz} = \frac{g_{xyz}}{H_{xyz}} - \frac{n_{xyz}}{H_{xyz}}. \quad (3.2)$$

No entanto, o filtro inverso apenas existe em condições especiais. Como pode ser observado na equação 3.2, quando a matriz H é singular, o que impede o cômputo da divisão, o filtro fica comprometido. Ainda, quando a matriz H é próxima da singularidade, na divisão os componentes da imagem serão extremamente amplificados, geralmente de forma oscilatória (BERTERO; BOCCACCI, 1998). Na presença de ruído este é amplificado, tornando a solução inviável. Assim, apenas técnicas aproximadas são possíveis nesta abordagem.

As soluções lineares para o problema de estimar a imagem f podem ser colocadas na forma:

$$\hat{f}_{xyz} = W_{xyz}g_{xyz}, \quad (3.3)$$

onde \hat{f} é a imagem restaurada estimada e W é um filtro apropriadamente desenvolvido de forma a otimizar algum critério, ou ainda minimizar algum erro — geralmente por meio da minimização de uma norma.

3.1.1 Filtro de Mínimos Quadrados (LS)

Uma abordagem clássica é o filtro de mínimos quadrados (LS, do inglês *Least Squares*), que busca o \hat{f} que minimiza a seguinte norma:

$$\arg \min_{\hat{f}_{xyz}} \left(\|H_{xyz} \hat{f}_{xyz} - g_{xyz}\|^2 \right). \quad (3.4)$$

O filtro W que minimiza a equação 3.4 é dado por:

$$W_{uvw} = (H_{xyz} H_{xyz}^T)^{-1} H_{xyz}^T, \quad (3.5)$$

Este filtro é chamado da inversa generalizada, ou *pseudo*-inversa, de H . Como citado anteriormente, o problema deste método é a amplificação do ruído, que fica mais clara quando representamos as funções no domínio da frequência:

$$F_{uvw} = \frac{G_{uvw}}{H_{uvw}} = \frac{H_{uvw}^* G_{uvw}}{|H_{uvw}|^2}, \quad (3.6)$$

onde $*$ representa o complexo conjugado, e F, G e H são, respectivamente, as transformadas de Fourier da imagem ideal, da imagem observada e da PSF. Como, em geral, a PSF é um filtro passa-baixas, $H(\mathbf{u}) \approx 0$ nas regiões de alta frequência, onde o ruído é dominante. Esta amplificação leva a erros significativos na imagem restaurada. Assim, a inversa da matriz H é, na maioria dos casos reais, inexistente. Uma possível solução é o emprego de uma *pseudo*-inversa truncada:

$$H_{uvw}^{-1} = \begin{cases} 1/H_{uvw}, & \text{se } |H_{uvw}| > \varepsilon, \\ 1/\varepsilon, & \text{caso contrário.} \end{cases} \quad (3.7)$$

onde ε é um limiar (geralmente baixo), para o qual são rejeitadas respostas onde o filtro é zero ou muito próximas de zero. O valor de ε afeta a imagem restaurada. Sem uma escolha adequada para a variável, ainda assim as imagens estarão corrompidas por ruído e sua restauração inviável. Esta solução melhora o problema em frequências muito baixas, mas ainda amplifica ruído em outras frequências. Por consequência, pequenas perturbações em g podem levar a uma grande perturbação na imagem estimada \hat{f} . O problema em geral é dito ser mal-condicionado, caso em que a *pseudo*-inversa é instável e portanto técnicas de regularização devem ser usadas para

condicionar o problema de forma a obter melhor solução. Os métodos de regularização serão vistos na seção 3.2 na página 31.

3.1.2 Abordagem Bayesiana para Restauração

A estatística permite extrair informações a partir de modelos que são definidos para os dados. Em muitos casos é conveniente supor que os dados observados pertençam a uma família de distribuições (forma) conhecida, apesar de sua distribuição real ser específica e desconhecida. Assim, os parâmetros que caracterizam uma distribuição dentre uma família de distribuições precisam ser inferidos de forma a obter-se uma ferramenta que permita fazer conclusões sobre os dados observados, fazer previsões ou estimar funções. Um exemplo clássico é a caracterização de uma distribuição Gaussiana (ou normal) por meio da média e variância, definindo uma distribuição particular.

A técnica de máxima verossimilhança é uma técnica de inferência para estimação. Para isto, um funcional, também chamado de função de verossimilhança, é definido e maximizado. Desta forma, o estimador de máxima verossimilhança de f é:

$$\hat{f} = \arg \max_f p(g|f), \quad (3.8)$$

onde $L(f) = p(g|f)$ é a função de verossimilhança de f para uma dada observação g . Esta densidade condicional substitui a densidade *a priori* $p(f)$, pois apenas a imagem g está disponível. A *regra de Bayes* denota as duas distribuições acima com outro par de distribuições: a densidade de probabilidade marginal (não condicional) $p(g)$ da imagem g observada, e a densidade condicional $p(g|f)$ da imagem observada, dado que a imagem f foi a imagem original (JIRÍ, 2006). A regra de Bayes é:

$$p(f|g) = \frac{p(g|f) \cdot p(f)}{p(g)}. \quad (3.9)$$

Esta igualdade forma a base dos métodos Bayesianos. A forma da densidade de probabilidade condicional $p(g|f)$ depende da imagem original f . No caso em que se tem um conjunto de variáveis aleatórias independentes e identicamente distribuídas, a distribuição conjunta é o produto das densidades de probabilidades, sendo a verossimilhança definida por:

$$L(f) = \prod_{i=1}^n p(g_i|f), \quad (3.10)$$

que descreve a distribuição de probabilidade das observações g_i dado f .

Para o caso de funções positivas é possível trabalhar com a função log-verossimilhança reduzida, tomando-se o logaritmo da função de verossimilhança e descartando os termos da função que não dependam de f . Assim:

$$\hat{f} = \arg \max_f \log L(f) = \arg \max_f L'(f), \quad (3.11)$$

sendo então f determinada pela estimação de máxima verossimilhança ($\hat{f} = f_{ML}$).

Para encontrar \hat{f} há principalmente quatro metodologias:

1. Inspeção do espaço à procura de pontos que maximizem $L'(f)$, sendo conveniente apenas quando o espaço é finito ou, ao menos, enumerável.
2. Maximização direta de $L'(f)$ por meio de rotinas de otimização e introdução de restrições sobre o espaço.
3. Definição de um sistema de equações com $\nabla L'(f) = 0$, ou seja, diferenciando e igualando a zero. Quando analiticamente possível, esta opção costuma ser a mais utilizada. É importante observar que, dada a distribuição de $L'(f)$ pode não haver uma expressão analítica fechada para o estimador. Isto ocorre principalmente quando a função não é diferenciável.
4. Utilização de estatística suficiente. Quando não é possível encontrar uma expressão analítica, utiliza-se alguma estatística suficiente, como o máximo, a média, entre outros, sendo que cada uma delas é particular para cada distribuição.

Partindo da suposição de que a estatística da imagem de microcopia é descrita por um processo Poisson, é possível definir uma abordagem de máxima verossimilhança para a probabilidade de obter-se a imagem g dado o objeto f como:

$$p(g|f) = \prod_{\mathbf{x}} \frac{[h * f]^g e^{-h * f}}{g!}. \quad (3.12)$$

Note-se que neste caso, o ruído aditivo presente é ignorado pois sua intensidade é desprezível em comparação com o ruído Poisson (dependente do sinal).

Uma das formas de buscar a solução para o problema da equação 3.12 é encontrar a solução de máxima verossimilhança para a equação acima. Isto é equivalente a minimizar o negativo de seu logaritmo. Segundo Jansson (1997), a log-verossimilhança é dada por:

$$-\log p(g|f) = \int_{\mathbf{x}} [(h * f) - g \cdot \log(h * f) + \log(g!)] d\mathbf{x}. \quad (3.13)$$

Sendo o termo $\log(g!)$ constante e conseqüentemente não dependente de f , o funcional a ser minimizado pode ser definido como:

$$L_1(f) = \int_{\mathbf{x}} [(h * f) - g \cdot \log(h * f)] d\mathbf{x}. \quad (3.14)$$

O objetivo é obter a imagem f a partir da observação g e do conhecimento do modelo de formação da imagem (Equação 2.5), e da log-verossimilhança assumindo distribuição de Poisson (Equação 3.14). A solução não necessariamente será a melhor, pois o algoritmo não garante a convergência para um ótimo global. O algoritmo EM-ML (*expectation maximization maximum likelihood*) (DEMPSTER; LAIRD; RUBIN, 1977) realiza esta tarefa. Shepp e Vardi (1982) derivaram o algoritmo de Richardson-Lucy (RICHARDSON, 1972; LUCY, 1974) como sendo um caso especial do algoritmo EM. A derivação usada por Shepp e Vardi é interessante por demonstrar como o conceito de dados incompletos pode ser usado para resolver problemas desta natureza, mostrando conexão entre as iterações e a probabilidade e formação da imagem (JANSSON, 1997). Os detalhes desta derivação podem ser encontrados no Apêndice B.1.

Algoritmo Iterativo de Richardson-Lucy (RL)

Um algoritmo multiplicativo, adequado a dados modelados por distribuição de Poisson, pode ser escrito na forma:

$$f_{n+1}(\mathbf{x}) = f_n(\mathbf{x}) \cdot \left[h(-\mathbf{x}) * \frac{g(\mathbf{x})}{h(\mathbf{x}) * f_n(\mathbf{x})} \right], \quad (3.15)$$

onde $f_n(\mathbf{x})$ é a n -ésima estimativa de f . Quando a solução de máxima verossimilhança é encontrada, o termo entre colchetes será unitário e, portanto, $f_n(\mathbf{x}) = f_{n+1}(\mathbf{x})$, ou seja, se a iteração convergir, convergirá para a solução de máxima verossimilhança.

O procedimento iterativo acima é conhecido como o algoritmo Richardson-Lucy (RL) e é um dos métodos chave deste trabalho.

Propriedades

Este algoritmo possui propriedades importantes que serão citadas e brevemente descritas

- **Não-negatividade:** Uma propriedade importante do algoritmo RL é a não negatividade de suas soluções. O algoritmo mantém a solução não-negativa se a primeira estimativa $f_0(\mathbf{x})$ for não negativa. Isto é de grande interesse, visto que as imagens modeladas por

distribuição de Poisson, por definição, devem ser não-negativas, uma vez que os dados não podem possuir contagem negativa, nem mesmo taxa de contagem média negativa.

- **Convergência:** O algoritmo converge lentamente para a solução ideal. Caso haja presença de ruído, diverge lentamente após encontrar a solução ideal. Em geral o algoritmo é interrompido após um número pré-definido de iterações, ou utilizando um critério baseado na diferença entre duas estimativas f_n e f_{n+1} consecutivas. Um método comum na literatura é o cálculo de $\varepsilon = \frac{\sum_{\mathbf{x}} f_{n+1} - f_n}{\sum_{\mathbf{x}} f_n}$ em cada iteração, e a escolha arbitrária de um ε suficientemente pequeno que indique a melhor proximidade da solução ideal.
- **Instabilidade na presença de ruído:** Outra característica do algoritmo é a convergência para uma solução não aceitável na presença de ruído. Quando há ruído nos dados, este é amplificado após determinado número de iterações. O problema pode ser encarado do ponto de vista de que a estimativa de máxima verossimilhança dada pelo algoritmo de Richardson-Lucy é, de certa maneira, um filtro inverso quando o número de iterações $n \rightarrow \infty$. Assim, em situações práticas, o algoritmo é interrompido após um dado número de iterações. Este procedimento, no entanto, poderá gerar uma solução insatisfatória. Desta forma, mecanismos de regularização e filtragem devem ser utilizados de forma a lidar com o problema, quando existente.
- **Capacidade de extrapolação espectral:** Segundo Conchello (1998) e Kempen e Vliet (2000a), o algoritmo é capaz de produzir extrapolação espectral, principalmente por garantir a não-negatividade, recuperando parte das frequências não presentes na imagem degradada.

3.2 Regularização

Em aplicações reais, com dados frequentemente corrompidos por ruídos de qualquer natureza, o problema possui mais de uma solução e assim, os algoritmos instáveis ao ruído, como é o caso do RL, necessitam de mecanismos que permitam selecionar uma solução dentre um conjunto de soluções possíveis. A forma mais simples de se colocar este problema é pela regularização de Tikhonov, um exemplo clássico e muito utilizado de regularização. No caso linear, este consiste em encontrar a solução de *Least Squares* (mínimos quadrados), que minimiza:

$$f_0 = \arg \min_f \left(\|Hf - g\|^2 + \lambda^2 \|f\|^2 \right), \quad (3.16)$$

onde λ é um parâmetro de regularização, ao invés dos mínimos quadrados originais:

$$\arg \min_f \left(\|Hf - g\|^2 \right). \quad (3.17)$$

A função de custo é modificada de forma que a solução minimize o primeiro termo sem que a norma $\|f\|$ seja muito grande. O parâmetro λ controla o equilíbrio entre os dois termos, sendo que a equação 3.16 corresponde à equação 3.17 quando $\lambda = 0$. No caso inverso, em que λ é muito grande, a regularização excessiva leva a solução a se aproximar da solução mais suave possível, ou seja, a solução nula.

A equação 3.16 pode ainda ser colocada na forma:

$$\|Hf - g\|^2 + \lambda^2 \|f\|^2 = \left\| \begin{pmatrix} H \\ \lambda I \end{pmatrix} f - \begin{pmatrix} g \\ 0 \end{pmatrix} \right\|^2, \quad (3.18)$$

da qual podem ser derivadas as equações normais para o problema de mínimos quadrados:

$$(H^T H + \lambda I) f = H^T g, \quad (3.19)$$

que mostram claramente a influência do parâmetro λ na diagonal principal da matriz, aumentando o valor de todos os auto-valores de $H^T H$ e afastando-os de zero.

O problema, então, passa a ser encontrar o parâmetro λ adequado. O parâmetro pode ser escolhido por tentativa e erro, por meio do teste de uma série de valores no intervalo $[0, 2]$, por exemplo. A escolha $\lambda = 0$ anula o termo regularizador; $\lambda \ll 10^{-4}$ são considerados valores baixos; $\lambda \gg 10^{-2}$ são considerados valores altos como mostram Kempen e Vliet (2000b) para o caso da regularização de Tikhonov, sendo então indicados parâmetros da ordem de 10^{-3} . Esta escolha é particular para cada problema e algoritmo de restauração. Existem ainda métodos: a) estatísticos, b) baseados em mínimos quadrados, c) validação cruzada, e d) adaptativos para encontrar um parâmetro adequado ao problema de restauração. Estes métodos não serão detalhados aqui por estarem fora do escopo do trabalho, sendo possível encontrar o tema na literatura (GALATSANOS; KATSAGGELOS, 1992; KEMPEN; VLIET, 2000b).

Para dados subdeterminados (casos em que há infinitas soluções), é utilizado o método mínimos quadrados de mínima norma (MNLS - do inglês *minimum norm least squares*) por meio de um procedimento em dois passos. No primeiro, obtém-se o conjunto de soluções possíveis, e no segundo, seleciona-se dentre as soluções, aquela de mínima norma (mais próxima à origem). O problema desta abordagem é o cômputo de excessivas soluções antes de buscar aquela de mínima norma, aumentando o custo computacional, além de permitir a escolha de um conjunto de soluções não viáveis.

As próximas seções irão descrever em detalhes dois métodos de regularização: a regularização de Tikhonov-Miller e a regularização *Total Variation*, pela mesma abordagem da derivação do algoritmo RL. A função de custo a ser utilizada será modificada para:

$$L_{reg}(f) = L_1(f) + \lambda L_2(f), \quad (3.20)$$

onde $\lambda L_2(f)$ representa o termo de regularização como no exemplo citado de mínimos quadrados para o caso linear (Equação 3.16 na página 31). Uma série de técnicas de solução numérica podem ser aplicadas segundo esta abordagem.

3.2.1 Regularização de Tikhonov-Miller

Tikhonov (1963) e Phillips (1962) foram os primeiros a estudarem os conceitos de regularização de uma forma geral. Com base nos trabalhos de Tikhonov (1963) e Miller (1970), foi criada a regularização de Tikhonov-Miller (TM), introduzindo um termo baseado na norma l^2 da imagem. Em termos de probabilidades, esta regularização pode ser vista como um modelo *a priori*, em que o problema é o de maximizar a probabilidade *a posteriori* ao invés da máxima verossimilhança através de um esquema Bayesiano. Assim, o modelo *a priori* do objeto pode ser escrito como:

$$p_R(f) = N_R e^{-\lambda_R \int_{\mathbf{x}} |\nabla f(\mathbf{x})|^2 d\mathbf{x}}, \quad (3.21)$$

onde λ_R é o parâmetro de regularização e N_R uma constante de normalização para a probabilidade. É possível notar a semelhança com a equação 3.16 que adiciona a norma de f como regularizador na minimização. A derivação do algoritmo é conduzida da mesma forma que o algoritmo RL. Os detalhes desta derivação podem ser encontrados no Apêndice B.2.

Algoritmo Regularizado RL-TM

O algoritmo regularizado RL-TM (Richardson-Lucy Tikhonov-Miller) para o resultado da equação 3.20, assim como para o algoritmo obtido anteriormente na seção 3.1.2, será (DEY et al., 2004a):

$$f_{n+1}^R(\mathbf{x}) = f_n(\mathbf{x}) \cdot \left[h(-\mathbf{x}) * \frac{g(\mathbf{x})}{h(\mathbf{x}) * f_n(\mathbf{x})} \right] \cdot \frac{f_n(\mathbf{x})}{1 + 2\lambda_R \Delta f_n(\mathbf{x})}. \quad (3.22)$$

3.2.2 Regularização *Total Variation*

Uma abordagem alternativa à regularização de Tikhonov-Miller é a conhecida regularização *Total Variation* (TV). Definida em termos gerais na restauração de imagens por Rudin,

Osher e Fatemi (1992), passou a ser utilizada largamente em diversos casos particulares, e foi utilizada como regularização na restauração de imagens 3D de microscopia confocal por Dey et al. (2004b). O diferencial deste método é a preservação dos contornos dos objetos na imagem, razão pela qual tornou-se um método de grande interesse atualmente. A regularização *Total Variation* utiliza um termo baseado na norma \mathcal{L}^1 ao invés da norma \mathcal{L}^2 da regularização de Tikhonov-Miller. Neste modelo, o funcional a minimizar é escrito:

$$\begin{aligned} L_{RTV}(f) &= L_1(f) && + L_3(f) \\ L_{RTV}(f) &= \int_{\mathbf{x}} [(h * f) - g \cdot \log(h * f)] d\mathbf{x} && + \lambda_{RTV} \int_{\mathbf{x}} |\nabla f| d\mathbf{x} \end{aligned} \quad (3.23)$$

Sendo este o funcional não diferenciável, como apontado por Dobson e Vogel (1997), pode haver problemas próximos à origem na convergência do método TV. Para evitar estes problemas adiciona-se uma pequena constante β^2 ao termo do funcional TV:

$$L_3(f) = \int_{\mathbf{x}} \sqrt{|\nabla f|^2 + \beta^2} d\mathbf{x}, \quad (3.24)$$

e então aplica-se algum método de otimização. A derivação do algoritmo é conduzida de modo ao empregado pelo algoritmo RLTM. Os detalhes desta derivação podem ser encontrados no Apêndice B.3.

Algoritmo Regularizado RLTV

O algoritmo regularizado RLTV (Richardson-Lucy *Total Variation*), derivado do funcional minimizado é:

$$f_{n+1}^{RTV}(\mathbf{x}) = f_n(\mathbf{x}) \cdot \left[h(-\mathbf{x}) * \frac{g(\mathbf{x})}{h(\mathbf{x}) * f_n(\mathbf{x})} \right] \cdot \frac{f_n(\mathbf{x})}{1 - \lambda_{RTV} \operatorname{div} \left(\frac{\nabla f_n}{|\nabla f_n|} \right)}, \quad (3.25)$$

onde $\operatorname{div}()$ é o divergente. Apêndice C mostra como é feita a discretização deste operador para implementação.

Nota-se que, na equação acima, o termo de regularização está no denominador do último termo. Este fato poderá causar problemas na implementação do método, pois o denominador poderá, em algum momento, ser zero ou negativo — o que vai contra uma das principais propriedades do algoritmo RL. Assim, o parâmetro λ_{RTV} deverá ser pequeno, da ordem de 10^{-3} . Esta medida provou ser convergente segundo Dey et al. (2004a) e Dobson e Vogel (1997).

3.2.3 Propriedades dos Métodos de Regularização

De maneira geral, a principal propriedade da regularização *Total Variation* é permitir a regularização preservando as bordas. Por meio do uso do gradiente, ela permite suavizar o ruído presente nas regiões planas da imagem, enquanto restaura as regiões de transição que pertencem ao sinal real, como bordas de um objeto. A regularização Tikhonov-Miller, por sua vez, não possui esta propriedade, tendendo a suavizar tanto as áreas planas quanto as bordas dos objetos na imagem.

A principal limitação da regularização *Total Variation* está no uso de imagens com alto nível de detalhe ou com texturas. Os detalhes ou texturas, por serem estruturas da ordem de magnitude do ruído, são confundidos com este. Neste caso, as imagens podem não apresentar resultado satisfatório após restauradas, com efeito de escada e *ringing*, além de alargamento de contornos.

3.3 Projeção Sobre Conjuntos Convexos (POCS)

Em muitos problemas de restauração de imagens, há um conhecimento *a priori* disponível acerca da imagem que não pode ser definido em termos de um funcional estabilizador como acontece no caso da regularização (seção 3.2). Este conhecimento determinístico, no entanto, é muito útil para reduzir o conjunto de soluções, alcançando, assim, uma forma alternativa de regularização. A ausência de uma expressão analítica para uma imagem que satisfaça um número de possíveis restrições não-lineares tornava o uso destas restrições um procedimento *ad-hoc*. A teoria de projeção sobre conjuntos convexos, ou POCS (do inglês *projection onto convex sets*) foi desenvolvida para descrever este conhecimento por meio de restrições, descritas por conjuntos convexos fechados \mathcal{C}_i , num espaço vetorial. Os trabalhos de Youla (1978) e Youla e Webb (1982) introduziram a teoria de POCS no ocidente — um dos trabalhos pioneiros foi publicado por Gubin, Polyak e Raik (apud JANSSON, 1997, P. 150) em 1967, na antiga URSS. A definição de um formalismo para este método fez com que este se tornasse popular, em especial no processamento de sinais e imagens, a partir de Sezan e Stark (1982) que descreveram aplicações para o método. Posteriormente, Stark e Yang (1998) compilaram a teoria, novos avanços e diversas aplicações POCS.

3.3.1 Conjuntos Convexos

Um conjunto pode ser dito convexo quando, dados quaisquer dois pontos no conjunto, todos os pontos do segmento de reta que liga os dois pontos estão contidos neste conjunto. Ou seja, para quaisquer dois pontos x e y em \mathcal{C} , a seguinte condição deve ser satisfeita:

$$(1 - \alpha)x + \alpha y \in \mathcal{C}, \quad \forall \alpha \in [0, 1] \quad (3.26)$$

Os conjuntos convexos ainda possuem a importante propriedade de que a intersecção de qualquer coleção de conjuntos convexos é também convexa.

Uma projeção P_i poderá, então, ser associada a cada restrição. A projeção impõe à imagem uma restrição, caso esta esteja fora do conjunto \mathcal{C}_i , projetando-se a um ponto único mais próximo pertencente ao conjunto de restrição.

Assim, as restrições podem ser descritas como conjuntos convexos e as projeção no conjunto como a imposição daquela restrição.

Para realizar a restauração por meio de múltiplas projeções em conjuntos convexos, podemos definir a imagem a ser estimada como \hat{f} , e o mapeamento da imagem no conjunto de restrição como c . Assim, podemos escrever a projeção como:

$$P_i \hat{f} = \begin{cases} \hat{f}, & \text{se } \hat{f} \in \mathcal{C}_i \\ c, & \text{se } \hat{f} \notin \mathcal{C}_i \end{cases} \quad (3.27)$$

onde c é o ponto em \mathcal{C}_i mais próximo de f , ou seja:

$$\|c - \hat{f}\| \leq \|x - \hat{f}\|, \quad \forall x \in \mathcal{C}_i, \quad (3.28)$$

É possível provar que, dado um ponto \hat{f} qualquer fora do conjunto, há um, e apenas um ponto c mais próximo deste que pertença ao conjunto \mathcal{C}_i .

3.3.2 Conjuntos de Restrição

Os conjuntos de restrição utilizados para a restauração de imagens encontrados na literatura são:

- **Não-negatividade:** as intensidades da imagem devem ser não negativas, sendo mapeadas para zero quando negativas,

- **Amplitude limitada:** quando se conhece o limite superior das intensidades, estas deverão ser menores ou iguais ao limite,
- **Energia limitada:** existe um valor máximo conhecido para a energia da imagem,
- **Monotonicidade:** encontra regiões não monotônicas e espalha valores oscilantes de forma que o sinal seja monotônico (crescente ou decrescente).
- **Norma do resíduo limitada:** pode ser conveniente manter alto o resíduo de forma a manter o algoritmo em busca de soluções significativas ou ainda tentar impedir oscilações no resíduo, caso em que o algoritmo diverge para diferentes locais do domínio.
- **Variação sobre imagem protótipo:** há um conjunto de imagens que se aproxima da solução desejada, em geral obtidas por filtros. É preciso notar que as restrições impostas por estes conjuntos garantem que a solução desejada não se distancie muito daquelas obtidas por estes filtros, mesmo após a convergência, sendo por vezes preferível a solução dada pelo filtro original.

Uma observação interessante é que a regularização de Tikhonov-Miller (assim como qualquer filtro linear regularizado), é baseada em dois conjuntos convexos. A prova de convergência e a derivação das projeções acima, bem como resultados obtidos em diversas aplicações, podem ser encontradas em diversas referências (SHAFER; MERSEREAU; RICHARDS, 1981; HERMANSEN, 1986; SEZAN; TRUSSEL, 1991; COMBETTES, 1992; GOPALAKRISHNAN et al., 1999; HOMEM et al., 2002).

Para a restauração, além de conjuntos convexos expressos por desigualdades, aparecem também restrições na forma de subespaços lineares que são fechados para operações lineares, o que implica que estes também satisfaçam a condição de convexidade. As próprias observações são resultados de produtos escalares de linhas de H e f , e, portanto, as equações que as definem são hiperplanos (conjuntos convexos).

Da classe de restrições que podem ser consideradas como subespaços lineares destaca-se:

- **Suporte finito:** há conhecimento dos limites das informações existentes em relação ao sinal que se deseja reconstruir. Este limite pode referir-se ao domínio do tempo (ou espaço), frequência ou outro.

O conhecimento do suporte do objeto pode ser complementado estimando-se e subtraindo-se da imagem as intensidades de fundo, que contaminam as regiões planas, principalmente das

intensidades mais baixas. Segundo Kempen e Vliet (2000a) a estimação do fundo da imagem em problemas de restauração de imagens é fator determinante para o desempenho de vários métodos, em especial os não lineares. A informação do fundo da imagem será usada como restrição posteriormente, caso que será discutido na seção 4.2.2 na página 45.

3.3.3 Projeções

Utilizando restauração com a abordagem de múltiplas restrições, o problema inverso é regularizado por meio da imposição de restrições, definindo o método para que o maior número possível de restrições sejam satisfeitas. O melhor resultado seria aquele encontrado na intersecção entre os diversos conjuntos C_i , situação na qual a imagem obtida possui todas as características desejáveis e, portanto, qualquer ponto de intersecção é considerado uma solução viável.

Os métodos POCS buscam encontrar a solução que corresponda à intersecção dos M conjuntos convexos $\mathcal{C}_i, i = 1 \dots M$. O esquema utilizado para representar iterativamente as sucessivas projeções é:

$$\hat{f}_n = (P_1 P_2 \dots P_M)^n \hat{f}_0 \quad (3.29)$$

A solução obtida pelas iterações da equação 3.29 corresponde à intersecção \mathcal{C}_n de todos os conjuntos para qualquer ponto inicial \hat{f}_0 . Quando a intersecção é vazia, as restrições conflitivas não permitem que a solução se estabilize. A solução limite, em que $n \rightarrow \infty$, depende da estimativa inicial, a não ser no caso em que a intersecção possui um único elemento, caso considerado como raro. Uma possibilidade quando a intersecção não existe é escolher arbitrariamente um critério de parada entre uma das projeções, ou ainda permitir que a solução seja a média entre as várias soluções possíveis (solução esta obtida pela técnica conhecida como POCS paralelo). Ainda, o uso de conjuntos *Fuzzy* também foi proposto em meados da década de 1990 para substituir os limites bem definidos dos conjuntos tradicionais, pelos limites suaves dos conjuntos *Fuzzy*, o que permite soluções intermediárias viáveis não possíveis com os conjuntos tradicionais (LAGENDJIK; BIEMOND, 1991; JANSSON, 1997).

Além de aplicações em restauração de imagens, POCS também vem sendo utilizado em problemas de extrapolação de sinais limitados em banda ou limitados espacialmente, bem como recuperação de fase e magnitude e reconstrução a partir de dados incompletos. Outros detalhes teóricos e provas podem ser encontrados no trabalho abrangente de Stark e Yang (1998).

3.4 Algoritmo de Gerchberg-Papoulis

Dos trabalhos de Gerchberg (1974) e Papoulis (1975) surgiu um algoritmo amplamente conhecido que, por meio da imposição de restrições, permite realizar extrapolação de sinais de banda-limitada. A partir dos conhecimentos acerca da largura de banda e do suporte espacial (ou temporal, no caso 1-D) do sinal, o algoritmo iterativamente impõe as restrições definidas pelo conhecimento *a priori*. Sob condições controladas e ausência de ruído, o algoritmo provou convergir para a solução ideal, mesmo considerando dados discretos (FERREIRA, 1994). A prova pode ser encontrada nos artigos originais do trabalho (GERCHBERG, 1974; PAPOULIS, 1975).

O algoritmo pode ser descrito da seguinte forma: seja $g(\mathbf{x})$ uma imagem observada, onde \mathbf{x} representa (x, y, z) para um sinal de 3 dimensões. Seja $G(\mathbf{u})$ a imagem resultante da transformada de Fourier de $g(\mathbf{x})$, onde \mathbf{u} representa (u, v, w) para um sinal de 3 dimensões no domínio da frequência. Como observado, a base do algoritmo é a imposição de conhecimentos nos domínios do espaço e frequência. Assim, define-se: Ω como a região sobre a qual $G(\mathbf{u})$ é não-nula — representando o limite de banda da imagem; e uma região T —, representando a informação sobre o suporte espacial finito da imagem. Desta forma, a função de suporte espacial da imagem pode ser definida como:

$$B_T(\mathbf{x}) = \begin{cases} 1, & (\mathbf{x}) \in T \\ 0, & (\mathbf{x}) \notin T \end{cases} \quad (3.30)$$

Da mesma forma, a função de limite de banda espectral é definida como:

$$B_\Omega(\mathbf{u}) = \begin{cases} 1, & (\mathbf{u}) \in \Omega \\ 0, & (\mathbf{u}) \notin \Omega \end{cases} \quad (3.31)$$

O algoritmo que impõe sucessivamente as restrições aplicadas pelas equações 3.30 e 3.31 é, portanto:

$$\begin{aligned} e_0(\mathbf{x}) &= B_T g(\mathbf{x}), \\ e_{n+1}(\mathbf{x}) &= B_T g(\mathbf{x}) + (1 - B_T) \cdot \mathfrak{F}^{-1} \{ B_\Omega E_n(\mathbf{u}) \}, \end{aligned} \quad (3.32)$$

onde $e_0(\mathbf{x})$ é a primeira estimacão da imagem extrapolada, $e_{n+1}(\mathbf{x})$ é a estimacão na iteraçao $n + 1$, e $E_n(\mathbf{u})$ é a estimacão da imagem na iteraçao n , no domínio da frequência. O algoritmo acima, conhecido como algoritmo Gerchberg-Papoulis (GP), segue a idéia do teorema da continuacão analítica e, portanto, após o sinal ser truncado no domínio da frequência pela função de limite espectral, será estendido espacialmente — ou no tempo, no caso de um sinal 1-D. Como existe uma região conhecida do sinal, e que se deseja manter, esta é inserida novamente no sinal no segundo passo do algoritmo.

As restrições impostas nos domínios do espaço e frequência, podem ser vistas como projeções em subespaços lineares. Assim, este algoritmo é um caso particular de POCS (vide seção 3.3). Juntamente com o método RL, a teoria que fundamenta o algoritmo GP é de grande importância para este trabalho.

4 *Novos Métodos para Extrapolação Espectral e Restauração de Imagens*

Neste capítulo serão apresentados métodos de extrapolação espectral combinados à restauração, com aplicação em imagens tridimensionais de microscopia. Na seção 4.1, serão apresentadas as bases teóricas de um algoritmo baseado na restauração não linear e na imposição de restrições. As seções 4.2.1 e 4.2.2 descrevem duas contribuições significativas na melhoria da extrapolação espectral: a definição adaptativa da região de suporte espacial da imagem e a definição do suporte espacial baseada na estimação da área de fundo da imagem. Na seção 4.3 um procedimento de suavização é incluído para reduzir a variação e assim facilitar a restauração e extrapolação das imagens.

4.1 **Restauração Não Linear com Restrição Espacial (RLE)**

Em microscopia de fluorescência, em especial na microscopia *wide-field*, há uma região no espectro das imagens cujas frequências são nulas, pois não passam pelo sistema. Desta forma, há o interesse em extrapolar as frequências para além do limite da OTF do microscópio. Isto pode ser conseguido modificando-se o algoritmo GP de forma a inverter as restrições impostas. Desta forma, são anuladas as intensidades fora da região de suporte espacial da imagem, e espera-se que haja extrapolação das frequências. No domínio de Fourier, uma parte do espectro pode ser definida como conhecida, e substituída no espectro extrapolado. Nesta abordagem, o algoritmo é escrito como:

$$e_{n+1}(\mathbf{x}) = \mathfrak{F}^{-1} \{ B_{\Omega} E_n(\mathbf{u}) + (1 - B_{\Omega}) \cdot \mathfrak{F} \{ B_T e_n(\mathbf{x}) \} \}, \quad (4.1)$$

onde $e_n(\mathbf{x})$ é a estimação anterior da imagem restaurada e $E_n(\mathbf{u})$ é o espectro da imagem extrapolado com a parte conhecida substituída a partir da estimação anterior da imagem.

O algoritmo modificado descrito nesta seção aplica o limite espacial para extrapolar as frequências. A restrição no domínio da frequência, da forma como citada, requer o conheci-

mento de uma região do espectro, o qual pode não estar disponível. Muitas vezes a função de restrição espectral utilizada pode ser definida como uma área nos limites onde o espectro cai aproximadamente a zero para a imagem observada. O suporte espacial pode ser definido de forma que todos os objetos recaiam completamente sobre a região definida. Uma prática comum é estender a imagem em um número arbitrário de *voxels* (ou *pixels*), aumentando o tamanho original da imagem, e truncar a cada iteração as intensidades da imagem na região estendida (HOMEM, 2003).

Para ilustrar o conceito que permite a extrapolação, a Figura 4.1 mostra uma sequência de aplicação do algoritmo para um sinal unidimensional: na primeira linha, o sinal no domínio da frequência é limitado em banda, e possui uma região conhecida, que se deseja manter (a); o sinal é transformado para o domínio espacial (b), para o qual tem-se o conhecimento do suporte; aplica-se a restrição espacial (c) e toma-se a transformada de Fourier do sinal, que, pelas propriedades analíticas, será estendido na frequência (d); a região conhecida do espectro é reinserida neste sinal (e) e este é novamente levado ao domínio do espaço (f), onde nova restrição de suporte finito será aplicada e assim sucessivamente. A cada iteração o sinal se aproxima do original.

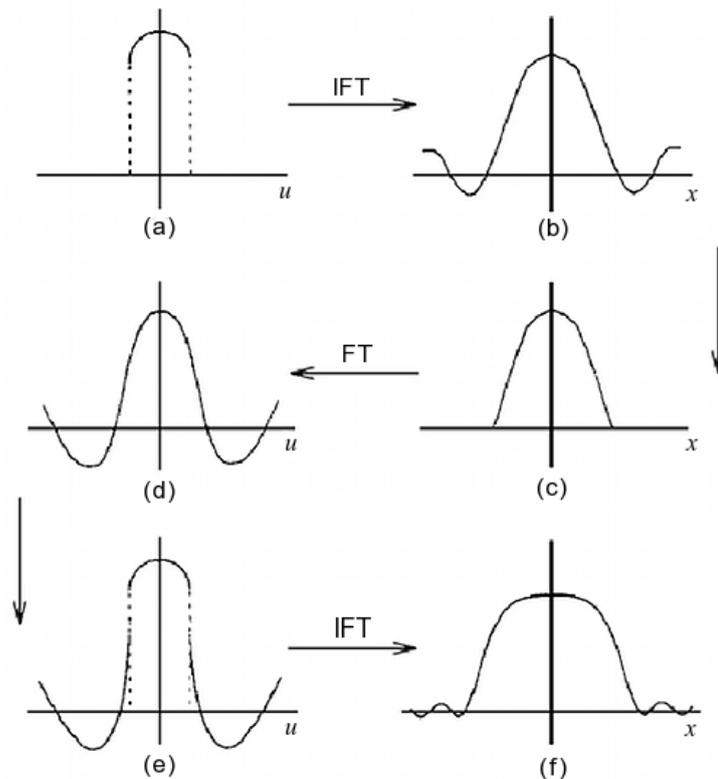


Figura 4.1: Exemplo de extrapolação usando o algoritmo Gerchberg-Papoulis

É possível definir adicionalmente um limite de banda, para além do qual o espectro será considerado nulo. Marques et al. (2006) propôs um método para estimar o limite de banda para aplicação no algoritmo GP, para o caso de imagens cujo limite é desconhecido. Neste caso, um algoritmo pode ser definido como:

$$e_{n+1}(\mathbf{u}) = \mathfrak{F}^{-1} \{ B_{\Phi} [B_{\Omega} E_n(\mathbf{u}) + (1 - B_{\Omega}) \cdot \mathfrak{F} \{ B_T e_n(\mathbf{x}) \}] \}, \quad (4.2)$$

onde B_{Φ} é a função de suporte espectral que define um limite de banda para a imagem.

O uso do método GP para extrapolação, no entanto, implica na separação entre o passo de deconvolução da imagem e o passo de extrapolação. Esta separação, apesar de útil do ponto de vista teórico, em casos práticos não é conveniente, pois o ideal é que um algoritmo seja capaz de restaurar ao mesmo tempo a imagem dentro do limite Ω utilizando os conhecimentos disponíveis acerca do modelo de formação da imagem (PSF, ruído, etc.) e ainda permitir realizar a extrapolação além deste limite. Esta é uma das grandes dificuldades na definição de um algoritmo eficiente sob ambos os pontos de vista (BERTERO; BOCCACCI, 1998).

O algoritmo base para obter extrapolação na restauração será chamado RLE (Richardson-Lucy com restrição espacial), por integrar a restauração promovida pelo algoritmo RL à restrição definida pelo método GP. A restrição de não-negatividade, presente nos algoritmos que obtêm extrapolação, está implícita no algoritmo RL e portanto, permanece válida.

A definição da região de suporte B_T passa a influenciar de forma importante o desempenho do algoritmo, e, por isto, será tratado com detalhes na seção a seguir.

4.2 O Uso da Informação de Suporte Espacial Finito da Imagem como Restrição

Segundo Conchello (1998), Kempen e Vliet (2000a) e Danuser (2001), a principal característica dos algoritmos de restauração capazes de promover extrapolação, como o Richardson-Lucy, ou ainda o algoritmo de Carrington et al. (1995), por exemplo, é a característica de impor a não negatividade à imagem restaurada. A partir do trabalho de Gerchberg (1974) e Papoulis (1975), ficou conhecido o uso da continuidade analítica para extrapolação de frequências. A principal característica desta é a aplicação da restrição de suporte finito no sinal ou imagem para a expansão do seu espectro de Fourier. O uso desta restrição em imagens, no entanto, requer cuidado pois vem acompanhada de diversos problemas de implementação que advêm da discretização dos métodos e dificultam seu uso em restauração, principalmente quando se trata de procedimentos iterativos. Isto porque a restrição impõe uma mudança abrupta na imagem

causando descontinuidade e, conforme diversas iterações são executadas, artefatos de borda aparecem na imagem. O uso em imagens de objetos centralizados e simétricos resalta ainda mais o aparecimento deste tipo de artefato. É provavelmente devido a esta limitação que não existem muitos trabalhos que utilizam esta restrição.

Assim, para utilizar esta restrição em nosso algoritmo iterativo e conseqüentemente melhorar sua capacidade de extrapolação, um método baseado no trabalho de Reeves (2005) é utilizado. Este consiste na extensão periódica da imagem e posterior extensão por zeros. Para reduzir a descontinuidade, as regiões estendidas da imagem são posteriormente borradas. Após a restauração as regiões estendidas são descartadas. Os artefatos de borda e as principais técnicas utilizadas para reduzir este efeito são discutidos com maior detalhe no apêndice C.

A seguir será abordado o uso de métodos que permitem obter melhores resultados, a partir da possibilidade do uso deste tipo de restrição, pelo uso da restrição espacial adaptativa e por uso da informação do fundo da imagem. Um diagrama dos algoritmos pode ser visto na Figura 4.4 na página 48.

4.2.1 Restrição Espacial Adaptativa (RLE-A)

A região B_T utilizada como restrição no método proposto é um parâmetro a ser definido. Como citado anteriormente, uma abordagem possível é estender a imagem em alguns voxels em todas as direções e usar a parte estendida como sendo a região fora do suporte da imagem (ver seção 4.1 na página 41). Este procedimento permite ganhos na extrapolação por aplicar a principal restrição do algoritmo Gerchberg-Papoulis sem perder informação na imagem. Porém, quando se trata de um procedimento iterativo, a região de suporte da imagem se modifica, conforme o borramento e o ruído são removidos durante as iterações. Isto sugere que a função B_T possa ser definida para cada iteração de forma adaptativa, de acordo com algum critério. A redução do suporte da imagem possibilitaria teoricamente uma maior expansão do espectro, dada a dualidade existente entre os domínios espacial e da frequência.

Um critério possível de ser usado, inclusive quando a imagem original não está disponível, ou seja, em situações reais, é o resíduo, que pode ser definido como:

$$\text{res} = \frac{\|\hat{f}_n - \hat{f}_{n-1}\|}{\|\hat{f}_n\|} \quad (4.3)$$

A variável T pode ser definida em termos do resíduo da seguinte forma: quando o resíduo cai abaixo de um limiar, o suporte é reduzido, subtraindo-se a área do suporte em um voxel em cada direção. A idéia por trás disto é que, quando o resíduo é baixo, pouca melhoria está sendo

obtida na imagem, sendo possível que a redução da região T seja benéfica, mantendo o resíduo alto. Da mesma forma, uma condição preventiva pode ser utilizada quando o resíduo aumenta muito rapidamente. Quando isto ocorre, o suporte pode ser definido novamente como o inicial. Isto porque um alto resíduo pode significar que o algoritmo está degradando a imagem. O limiar que define a região do suporte espacial pode ser definida, para cada iteração, como:

$$T_n = \begin{cases} T_n - 1 \text{ voxel}, & \text{res} < \varepsilon_L \\ T_0, & \text{res} > \varepsilon_H \end{cases} \quad (4.4)$$

onde T_n representa a região de suporte na iteração atual, n ; T_0 é a região inicial (em geral, que possa conter toda a imagem observada), ε_L é o limiar baixo do resíduo, que, quando alcançado produz a redução do suporte e ε_H o limiar alto do resíduo, que produz a volta ao suporte inicial. Além destes parâmetros ainda é necessário definir a região de suporte limite em cada direção, para que os objetos na imagem não sejam anulados.

O algoritmo que utiliza este método será chamado de RLE-A (Richardson-Lucy com restrição espacial adaptativa).

4.2.2 Restrição Espacial Baseada na Estimação do Fundo da Imagem (RLE-B)

Em imagens de microscopia de fluorescência é possível observar que não apenas o espécime responde à luz de excitação. Isto porque, em geral, o espécime está em uma solução ou substrato (no caso de cultivo celular, por exemplo), contendo moléculas que também emitem fluorescência, ainda que muito inferior àquela do espécime em si. A depender das condições do cultivo celular ou de aquisição da imagem, grande parte do fundo da imagem possui intensidades que podem dificultar a restauração. Isto acontece principalmente quando há necessidade de uso de baixo tempo de exposição (o que também amplifica o ruído na imagem). A Figura 4.2 na página seguinte ilustra um exemplo de imagem nestas condições, com mapa de cores ajustado para ressaltar a presença de componentes de fundo da imagem.

Estudos realizados sobre a influência do conhecimento do fundo da imagem sobre a restauração de imagens de microscopia confocal e imagens de astronomia (KEMPEN; VLIET, 2000a, 1999; LANTÉRI et al., 2002) indicam que a estimação dos elementos que fazem parte do fundo da imagem e a subtração dos mesmos fornece uma forte restrição de suporte finito da imagem, ampliando a capacidade de superresolução dos algoritmos de restauração. Este procedimento permite que apenas os objetos de interesse sejam processados e que informações fora

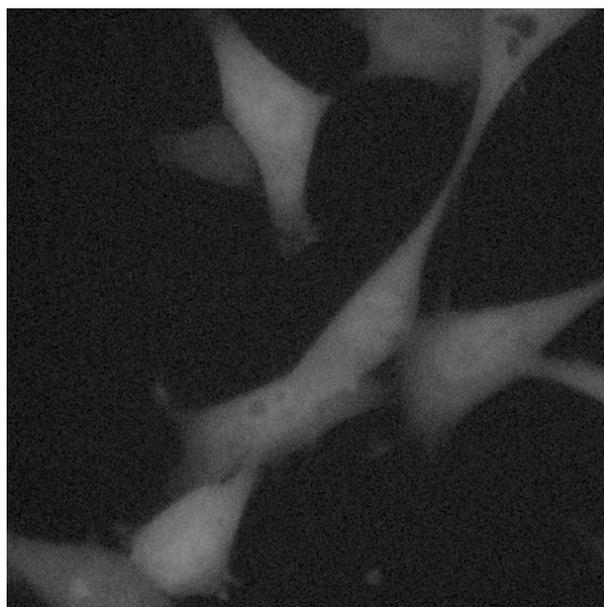


Figura 4.2: Imagem de microscopia de fluorescência cujo substrato emite fluorescência.

deste suporte de interesse sejam descartadas (AVINASH, 1996). O estudo também analisou a velocidade de convergência em função do conhecimento sobre o fundo da imagem.

Dentre as técnicas para estimação do fundo, a mais simples consiste em analisar o histograma da imagem e considerar o primeiro pico do histograma como sendo a intensidade média dos elementos relativos ao fundo da imagem (WU; MERCHANT; CASTLEMAN, 2008). A Figura 4.3 mostra o histograma da imagem anterior, e a área a ser subtraída para remoção do fundo da imagem.

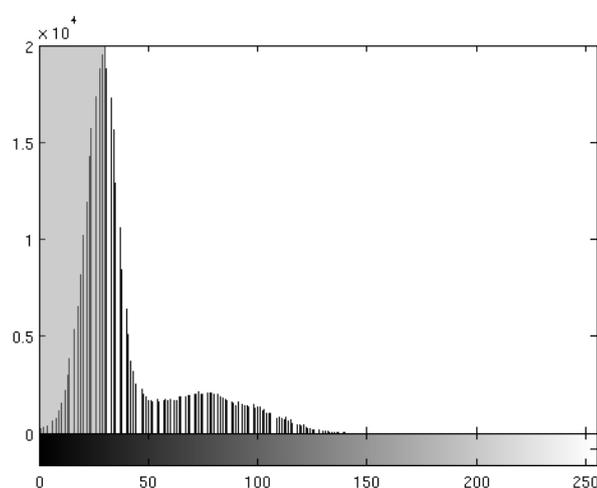


Figura 4.3: Histograma de imagem de microscopia de fluorescência com área cinza destacando o primeiro pico correspondente ao fundo da imagem.

A técnica baseada no histograma é válida sob a hipótese de que o fundo da imagem representa a maior parte dos voxels da mesma, caso, por exemplo, da microscopia ótica na observa-

ção de espécimes pequenos ou de elementos estruturais ou de membrana, sendo relativamente eficiente em muitos casos (DEY et al., 2004a).

Na literatura existem outras técnicas propostas para estimação e remoção do fundo como o trabalho de Kempen e Vliet (2000a) que propõe um método iterativo para obter um valor ótimo; o uso de informação contextual (como vinhança de pixels) para estimar a região de fundo da imagem (BOULANGER; KERVRANN; P., 2006); o reconhecimento e ajuste de superfície (AVINASH, 1996); e a aquisição de duas imagens, uma com filtro de emissão que seja mais sensível ao objeto de interesse, e outra com filtro mais sensível à fluorescência da região de fundo da imagem, procedendo à subtração da primeira imagem pela segunda (WU; MERCHANT; CASTLEMAN, 2008).

Ao considerar ruído na imagem, é possível que a hipótese de um ruído constante não seja verdadeira. Assim, estimaremos o fundo usando tanto a análise de histograma, quanto um operador morfológico. Após encontrar o valor ótimo, este será subtraído da imagem, de forma que valores iguais ou abaixo sejam iguais a zero, ou seja:

$$g_{rb}(\mathbf{x}) = \begin{cases} g(\mathbf{x}), & g(\mathbf{x}) > b \\ 0, & g(\mathbf{x}) \leq b \end{cases} \quad (4.5)$$

onde g_{rb} é a imagem com o fundo removido e b o valor ótimo encontrado com base no histograma.

A função de suporte espacial finito é então definida com base no fundo da imagem:

$$B_T(\mathbf{x}) = \begin{cases} 1, & g_{rb}(\mathbf{x}) > 0 \\ 0, & g_{rb}(\mathbf{x}) = 0 \end{cases} \quad (4.6)$$

Uma operação morfológica de abertura é realizada, para suavizar a região de fundo da imagem:

$$B_n T(\mathbf{x}) = (B_T \ominus d)(\mathbf{x}) \oplus d(\mathbf{x}), \quad (4.7)$$

onde $B_n T$ é a nova função de suporte espacial da imagem, após abertura morfológica usando um disco d , e os operadores \ominus e \oplus correspondem, respectivamente, às operações de erosão e dilatação.

A região $B_n T(\mathbf{x}) = 0$ é considerada como a região de fundo da imagem e removida da imagem observada antes do início da restauração. Ainda, esta região será usada como restrição a cada iteração do algoritmo.

O algoritmo que utiliza este método será chamado de RLE-B (Richardson-Lucy com restrição espacial baseada no fundo da imagem).

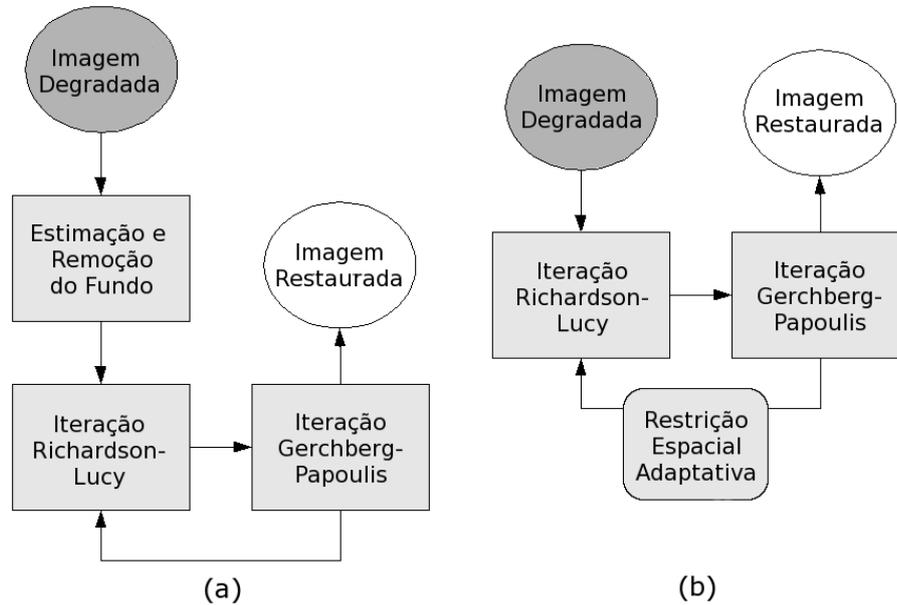


Figura 4.4: Diagrama com os dois principais algoritmos: a) com restrição baseada no fundo da imagem, e b) com restrical adaptativa

4.3 Restauração Não Linear com Restrição Espacial e Passo de Suavização (RLE-S)

Como mostrado anteriormente nas seções 3.4 e 3.1.2, os métodos de GP e RL são muito sensíveis ao ruído presente na imagem. Os efeitos da presença de ruído, especialmente quando este não possui propriedades bem comportadas como as características de uma distribuição Gaussiana, aditivo, de média zero e variância conhecida, leva o algoritmo a divergir a partir de certo ponto da estimação pela amplificação das frequências dominadas pelo ruído. Neste caso assim como visto na seção sobre Regularização (3.2), faz-se necessário buscar novas soluções para o problema.

Duas classes de soluções principais surgem quando há a necessidade de lidar com o ruído presente no sinal que se deseja restaurar: a regularização, que consiste em formular uma função objetivo que estabilize a solução de forma a diminuir a amplificação do ruído no processo de restauração; ou o uso de filtros projetados para diminuir o ruído presente no sinal. No caso da regularização, como visto anteriormente (seção 3.2), é possível estabelecer dois passos distintos: o primeiro equivalente à minimização de $\|Hf - g\|$ e em seguida selecionar aquela para a qual $\|f\|$ é mínima. Ainda, é possível combinar ambos os passos em um único problema de

minimização, adicionando $\|f\|$ à função de custo. O uso de filtros, da mesma forma, permite estabelecer dois passos distintos, no qual se realiza primeiro a filtragem do sinal e, em seguida, iniciam-se os procedimentos de restauração. A pré-filtragem do sinal foi anteriormente explorada para microscopia confocal por Kempen, Vliet e Verveer (1997a, 1997b) e Colicchio et al. (2005) e usada principalmente em conjunto com filtros lineares ou ainda diretos. Ainda, utilizada por Homem, Zorzan e Mascarenhas (2007) em imagens de microscopia convencional para posterior aplicação do algoritmo Richardson-Lucy. Em se tratando de um algoritmo iterativo de restauração, faz sentido a idéia de filtrar o sinal a cada iteração, ou seja, filtrar cada estimativa dada pelo algoritmo iterativo. Esta abordagem foi utilizada anteriormente na reconstrução de imagens tomográficas por Ingesson e Pickalov (1996), que utilizaram um filtro de média como um passo de suavização de um algoritmo iterativo.

Assim, o algoritmo iterativo GP foi modificado para filtrar as frequências encontradas além do limite de difração:

$$e_{n+1}(\mathbf{x}) = \mathfrak{F}^{-1} \{B_{\Phi} [B_{\Omega} E_n(\mathbf{u}) + \text{Filtro}_{\Omega} ((1 - B_{\Omega}) \cdot \mathfrak{F} \{B_T e_n(\mathbf{x})\})]\}, \quad (4.8)$$

onde o operador Filtro_{Ω} é um filtro de suavização a ser definido, que opera nas frequências para além de Ω .

O algoritmo proposto inclui um filtro para as frequências extrapoladas, encontradas além do limite de difração Ω . É uma tentativa de preservar o sinal ao mesmo tempo em que impede a amplificação do ruído. Além disso, tenta-se diminuir a extrapolação de frequências dominadas pelo ruído, um problema considerado fundamental na extrapolação espectral de imagens como citado por Hunt (1995) e Sementilli, Hunt e Nadar (1993).

A principal motivação para a filtragem é a redução na variação na região das frequências dominadas pelo ruído, possibilitando restaurar o sinal por meio de algoritmos, diminuindo o impacto de sua sensibilidade ao ruído. Apesar da redução da variação contribuir para a solução, esta abordagem é delicada visto que o resultado do filtro também complica a formulação e derivação do método e assim torna difícil provar sua convergência. Para o algoritmo poder ser aplicado é preciso intercalar uma iteração RL com uma iteração do Gerchberg-Papoulis com Suavização. Assim teremos o algoritmo 4.1 na página seguinte.

No algoritmo acima, RL representa uma iteração do algoritmo Richardson-Lucy, GP-S uma iteração do algoritmo Gerchberg-Papoulis suavizado, “res” é o resíduo (Equação 4.3 na página 44) e ϵ é um valor usado como condição de parada.

- Calcular: $\hat{f}_1 = \text{RL}[g]$
- Calcular: $\hat{e}_1 = \text{GP-S}[\hat{f}_1]$
- Atribuir: $n = 2$
- Repetir enquanto $\text{res} > \varepsilon$
 - Calcular: $\hat{f}_n = \text{RL}[\hat{e}_{n-1}]$
 - Calcular: $\hat{e}_n = \text{GP-S}[\hat{f}_n]$.

Algoritmo 4.1: Algoritmo RLSGP

4.3.1 Filtros

Como citado anteriormente, diversos filtros podem ser usados para suavizar as frequências extrapoladas. O filtro deverá ser projetado preferencialmente a partir do estudo do ruído presente no sinal em cada aplicação. Para efeito de primeiros experimentos a serem realizados nesta abordagem, serão definidos os filtros mais simples de duas classes principais, os filtros lineares e não lineares:

- **Filtro Linear:** Média,
- **Filtro Não-linear:** Mediana.

As características de cada um destes filtros é distinta. Tanto a média quanto a mediana comprovadamente diminuem ou, ao menos, mantem a variância do sinal, o que reduz a presença de ruído no sinal (RESTREPO; CHACON, 1994). Na Figura 4.5 na página seguinte, um exemplo de aplicação destes filtros sobre um sinal corrompido por ruído Poisson, onde é possível perceber que a mediana preserva melhor as transições bruscas enquanto a média suaviza mais o sinal. Por isto, o filtro da mediana é mais utilizado em microscopia, como citado por Wu, Merchant e Castleman (2008).

Filtros de maior complexidade, especificidade ou ainda adaptativos podem também ser utilizados. No entanto, a escolha do filtro deve ser feita levando em consideração o custo computacional do algoritmo, para que este não se torne inviável (INGESSON; PICKALOV, 1996).

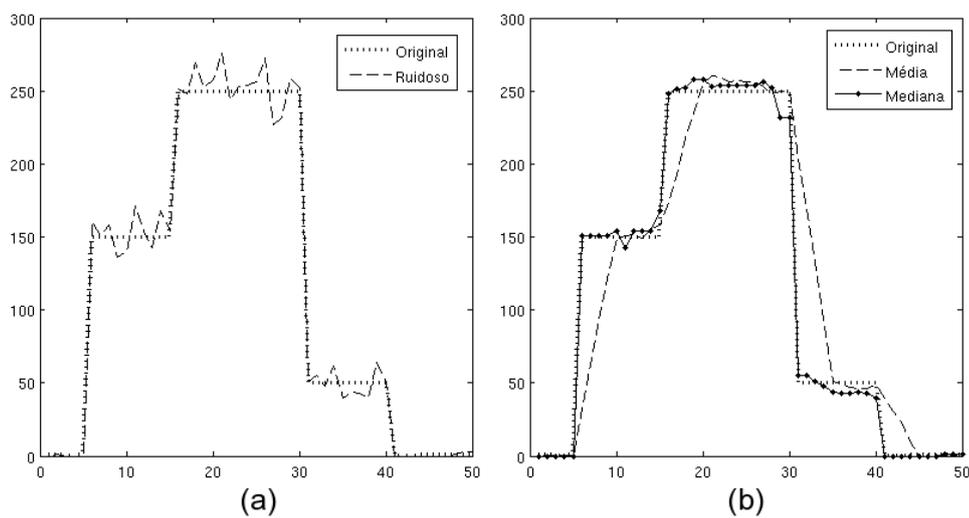


Figura 4.5: Comparação entre os filtros média e mediana em sinal corrompido com ruído Poisson: sinais original e ruidoso (a); sinais original e filtrados por média e mediana (b)

5 *Método*

Neste capítulo, serão apresentados experimentos realizados com os métodos desenvolvidos. Inicialmente, uma breve descrição da aplicação será apresentada. A seguir, as PSFs e as imagens utilizadas nos experimentos serão descritas, bem como os métodos de avaliação utilizados e demais detalhes dos experimentos realizados.

5.1 **Acompanhamento de Cultivo Celular por Imagens de Microscopia**

Nos últimos anos, o uso de imagens tem sido de grande utilidade tanto para o estudo de mecanismos e estruturas moleculares e celulares, quanto para acompanhamento de processos bioquímicos, na detecção de determinadas estruturas, classificação de estado do cultivo, viabilidade celular, entre outros. Métodos de processamento e análise de imagem estão frequentemente envolvidos no acompanhamento de bioprocessos como nos trabalhos de Kimura et al. (2004), Garofano et al. (2005) e Hisiger e Jolicoeur (2005).

Neste trabalho utilizamos imagens de cultivo celular da linhagem celular **RetroPack**TM **PT67**. Estas células são de grande importância em pesquisa biomédica, na produção de proteínas terapêuticas e vírus para terapia gênica, pois são relativamente fáceis de cultivar e transfectar¹. A motivação para o uso das células referidas é a necessidade do acompanhamento do seu cultivo por meio de imagens.

As células são rotuladas com a proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*). Esta proteína emite fluorescência na região verde do espectro visível. Em sua forma selvagem, possui dois picos de excitação, um menor a 475nm e um maior a 395nm, com pico de emissão a 507nm. A GFP é usada comumente para estudo de expressão gênica em culturas de células ou de tecidos.

Foram utilizadas amostras de um cultivo celular em placas com as seguintes características:

¹Introdução de material estranho à célula por algum método

- **Meio:** Dmem (*Dulbecco's modified eagle medium*), GIBCO lot.n.416989, acrescido de SFBI 10% (soro fetal bovino (HYCLONE) inativado a 56 °C, por 45 minutos) e de bicarbonato de sódio.
- **Cultivo:** estufa com 5% de CO₂, temperatura de 37 °C, humidade 80%.

5.2 Geração das Funções de Espalhamento Pontual

Para que seja possível deconvoluir as imagens, é necessário conhecer a PSF do microscópio. O cálculo da PSF tridimensional discreta é dependente de uma série de informações relativas ao processo de aquisição da imagem. Foram geradas PSFs de acordo com o modelo teórico proposto por Gibson e Lanni (1989, 1991). A geração foi feita utilizando o software XCOSM (XCOSM, 2000). Foram utilizadas, no total, quatro PSFs, cada uma relativa às diferentes características da aquisição das imagens. Os parâmetros usados no cálculo das funções são listados na Tabela 5.1. Além de serem usadas na deconvolução, são também usadas para borrar as imagens sintéticas de forma a simular o processo de degradação do instrumento.

Tabela 5.1: Parâmetros para as PSFs teóricas utilizadas nos experimentos

<i>Parâmetros</i>	<i>PSF 1</i>	<i>PSF 2</i>	<i>PSF 3</i>	<i>PSF 4</i>
Resolução lateral (plano x, y)	128	256	256	256
Resolução na direção z	128	32	32	64
Aumento Lateral da Lente	100x	20x	40x	40x
Abertura Numérica	1,30	0,45	0,60	0,60
Comprimento de onda da emissão	530nm	500nm	500nm	506nm
Tamanho do pixel no plano	0,1436 μ m	0,100 μ m	0,100 μ m	0,101 μ m
Distância entre os planos	0,1436 μ m	0,200 μ m	0,200 μ m	0,200 μ m
Índice de refração do meio de imersão	1,51	1,00	1,00	1,00
Índice de refração do espécime	1,33	1,33	1,33	1,33

5.3 Imagens Utilizadas nos Experimentos

Quando se trata da área de restauração de imagens, duas classes de imagens podem ser usadas para realizar os experimentos:

- **Imagens sintéticas:** também chamadas de *phantoms* ou imagens simuladas. São criadas para que, conhecida a imagem original, seja possível conduzir a degradação da imagem pela função de transferência e estatística do ruído de forma controlada e, posteriormente,

restaurá-la. Assim, é possível comparar a imagem restaurada com a original. Ainda, podem ser construídas de modo a possuir características específicas para observar o comportamento dos métodos sob determinadas condições.

- **Imagens reais:** obtidas diretamente pelo instrumento de interesse. São importantes para observar a viabilidade prática dos métodos desenvolvidos. Não é possível avaliar a restauração destas por meio de erros e índices. Assim, o resultado é avaliado por inspeção visual e ainda pela observação do espectro da imagem, comparando-se as imagens restauradas por diferentes algoritmos.

Para realizar os experimentos deste trabalho, uma série de imagens das duas classes acima foi utilizada, sendo quatro imagens sintéticas e quatro imagens reais. Nos experimentos com imagens sintéticas, estas foram convoluídas com PSFs de acordo com o modelo teórico proposto por Gibson e Lanni (1989, 1991), geradas conforme descrito na seção 5.2.

Ruído modelado por uma distribuição de Poisson foi adicionado às imagens, conforme descrito em Homem (2003). Este procedimento é importante quando se necessita estudar o comportamento dos algoritmos em condições de ruído. Neste trabalho, apenas uma imagem simulada não foi degradada por ruído Poisson. Isto foi realizado para observar a extrapolação em imagens livres de ruído. As demais imagens foram borradas pela PSF teórica, corrompidas com ruído Poisson. Ainda, em todas as imagens foi considerado um valor de fundo constante e arbitrário.

Abaixo, as imagens utilizadas e suas características:

- **Imagens Sintéticas:**

1. **Retângulos:** possui forma bem definida com elementos geométricos e elementos de baixo e alto contraste, dimensões: 128x128x128 voxels, construída por Homem (2003), borrada por PSF 1, intensidade de fundo = 8 (ver imagem original na Figura 5.1 na página seguinte).
2. **Bead Simulado:** esfera comumente utilizada para testes em microscopia, dimensões: 128x128x128 voxels, construída por Homem (2003), nos experimentos será degradada por PSF 1 e ruído Poisson, intensidade de fundo = 4 (ver imagem original na Figura 5.2 na página 56).
3. **Cultura de Células Simulada 20x:** construída de modo a conter elementos fundamentais de uma célula, geralmente rotulados nas aplicações de cultura celular - elementos estruturais da membrana e núcleo, simulando aumento lateral de 20x, e

portanto, com células menores e em maior quantidade, dimensões: 256x256x32 voxels, degradada por PSF 2 e ruído Poisson, intensidade de fundo = 8 (ver imagem original na Figura 5.3 na página seguinte).

4. **Cultura de Células Simulada 40x:** construída do mesmo modo que a anterior, mas simulando aumento lateral de 40x, e portanto, com células maiores e em menor quantidade e ainda com objetos elípticos em diferentes alturas em relação ao eixo z, dimensões: 256x256x64 voxels, degradada por PSF 3 e ruído Poisson, intensidade de fundo = 12 (ver imagem original e projeção em x na Figura 5.4 na página 57).

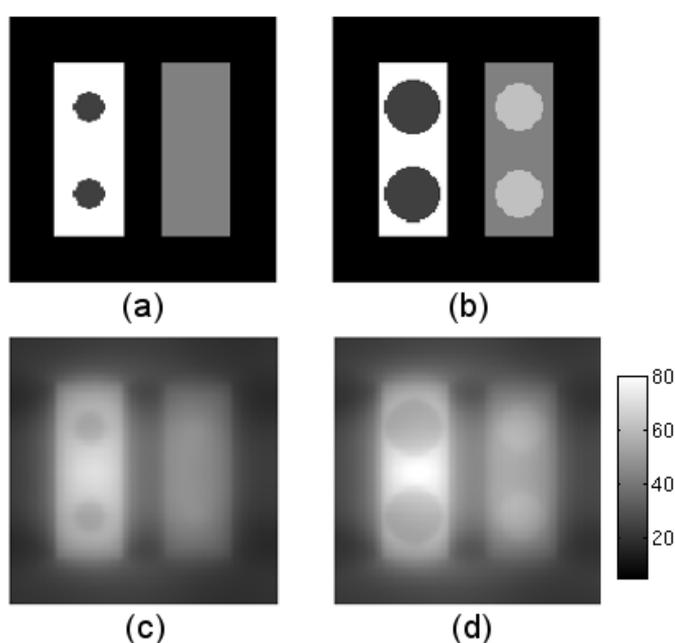


Figura 5.1: Duas seções radiais da imagem sintética retângulos: original seções 32 (a) e 48 (b), e degradada seções 32 (c) e 48 (d)

- **Imagens Reais:**

- **RetroPack GFP:** quatro imagens tridimensionais do cultivo desta célula foram obtidas com uso de microscópio *wide-field* (ver Figura 5.5 na página 58):
 1. aumento lateral 20x, 32 seções, presença de fundo na imagem.
 2. aumento lateral 40x, 32 seções, baixa exposição.
 3. aumento lateral 40x, 32 seções.
 4. aumento lateral 40x, 64 seções.

Para que o algoritmo fosse testado para diferentes condições de aquisição de imagem, a imagem RetroPack 1 foi obtida a partir de uma cultura cujo substrato apresentou resposta a

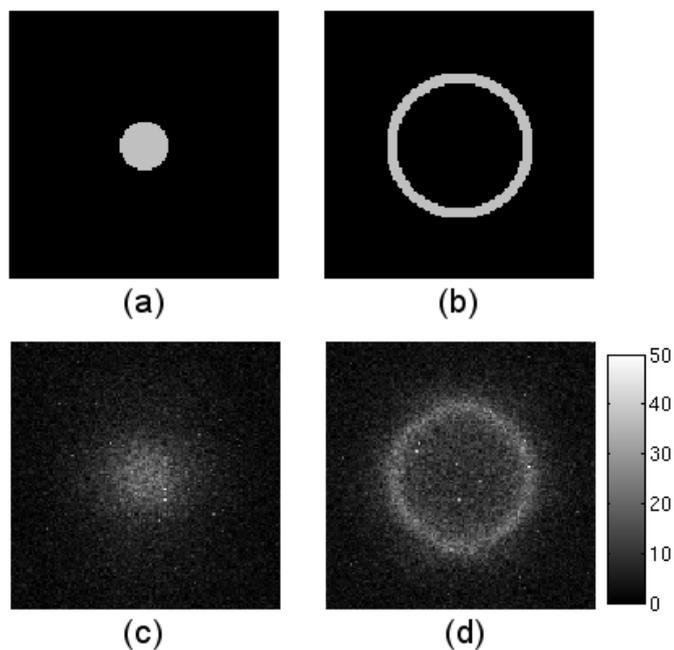


Figura 5.2: Duas seções radiais da imagem sintética bead: original seções 32 (a) e 64 (b), e degradada seções 32 (c) e 64 (d)

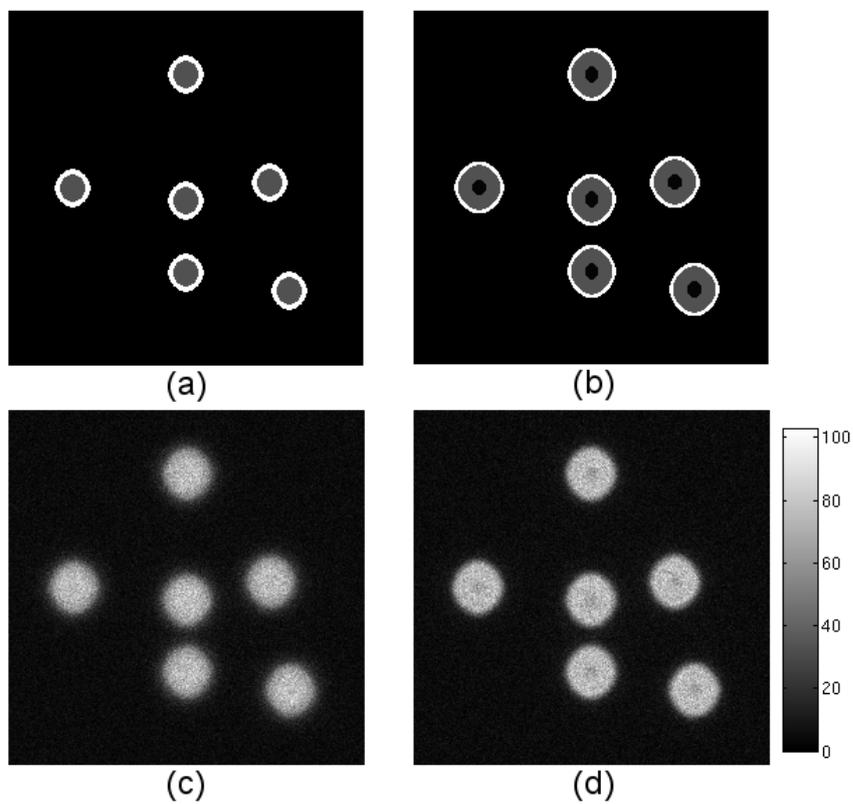


Figura 5.3: Duas seções radiais da imagem sintética cultura de células 20x: original seções 8 (a) e 16 (b), e degradada seções 8 (c) e 16 (d).

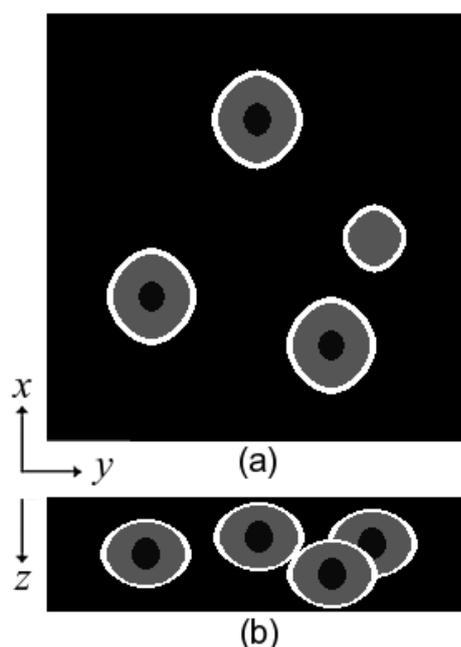


Figura 5.4: Imagem sintética cultura de células 40x original: seção radial n.28 (a) visão $(y - z)$ da projeção ao longo do eixo x (b).

fluorescência, e, portanto, possui fundo. A imagem RetroPack 2 foi obtida de modo a observar o comportamento do algoritmo em condições de baixa exposição e, portanto, tem maior intensidade de ruído. As imagens RetroPack 3 e 4 foram obtidas em condições especiais, em que há fundo aproximadamente nulo e baixo ruído.

Para a deconvolução das imagens reais, foram consideradas as PSFs 2 e 3, conforme a seção 5.2 na página 53, a depender das características de aquisição da imagem (tamanho da imagem, objetiva utilizada, etc.).

5.3.1 Cores e visualização

Na visualização das imagens sintéticas e reais originais, o mapa de cores utilizado foi de 256 tons de cinza. Para as imagens sintéticas degradadas, o mapa de cores foi normalizado para melhor exibição, conforme escala ao lado das imagens.

Uma observação importante é que, em geral, imagens de microscopia de fluorescência são coloridas. Para simplificar o problema de restaurar e visualizar as imagens, foram feitos experimentos usando imagens em tons de cinza. O uso dos métodos aqui propostos pode, no entanto, ser diretamente aplicado às imagens coloridas, por meio do tratamento dos canais de cor em separado e posterior composição dos canais restaurados para visualização.

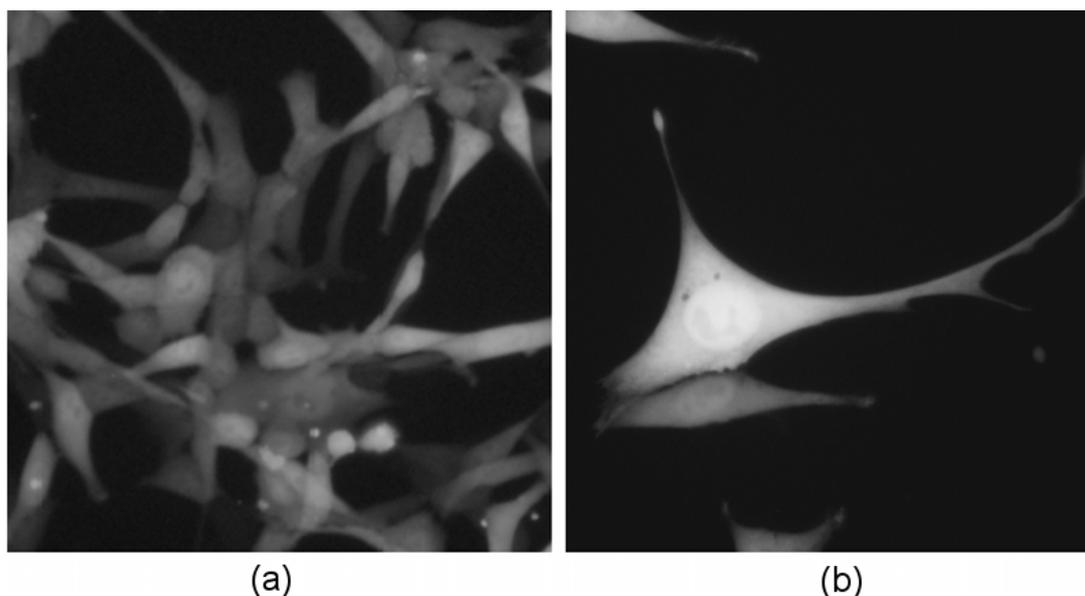


Figura 5.5: Amostras de imagens de cultivo da célula RetroPack: com aumento de 20x (a), com aumento de 40x (b).

5.4 Métodos de Avaliação da Restauração e Extrapolação

A avaliação é uma importante e difícil parte das pesquisas em restauração e extrapolação bem como em outras aplicações de processamento de imagens. As medidas usuais, geralmente baseadas no erro médio quadrático, nem sempre estão correlacionadas com a qualidade percebida pelo sistema visual humano (WANG; BOVIK; LIGANG-LU, 2002; GIROD, 1993). O presente trabalho tem como principal contribuição a melhoria na extrapolação, que adiciona informações antes não existentes na imagem e por isto métodos de avaliação isolados podem não mostrar a melhoria obtida visualmente. Assim, serão usadas medidas diversas para avaliar e comparar as imagens restauradas.

Para este trabalho, como anteriormente citado, utilizaremos imagens sintéticas e imagens reais com comparação entre diversos métodos. Serão usadas as seguintes medidas para avaliação dos resultados:

1. Melhoria na relação sinal-ruído (ISNR), estimando a melhoria da imagem segundo a relação sinal-ruído, medida comumente usada para avaliar imagens restauradas.
2. I-divergência (IDIV), usada para comparar imagens em algoritmos com restrição de não negatividade (CSISZAR, 1991).
3. Índice de qualidade universal da imagem (UIQI), um método para avaliar qualidade de imagens que considera contraste, correlação e luminância da imagem; medida recen-

temente desenvolvida e comumente utilizada para avaliar imagens após compressão ou filtragem (WANG; BOVIK, 2002).

4. Função dos coeficientes de autocorrelação da imagem, para visualizar o espalhamento do espectro.
5. Medida dos coeficientes de Fourier da região de banda prática da imagem.

Os três primeiros métodos podem ser usados apenas em imagens sintéticas pois requerem o conhecimento da imagem original. Os dois últimos itens podem ser usados tanto em imagens sintéticas quanto em imagens reais sendo, no caso das imagens reais, apenas referenciais para medir a extrapolação obtida já que não é possível garantir que as frequências extrapoladas equivalem exatamente às frequências perdidas. No entanto, a inspeção visual em conjunto com estas medidas permite tirar conclusões mais concretas do que com a visualização apenas.

5.4.1 Melhoria na Relação Sinal-Ruído (ISNR)

A porção de ruído presente em uma imagem pode ser estimada por meio da medida da relação sinal-ruído (SNR, do inglês *signal-to-noise ratio*), a razão entre a potência do sinal e a potência do ruído que corrompe o sinal, definida como:

$$\text{SNR}_{\text{dB}} = 10 \log_{10} \left(\frac{\sigma_f^2}{\sigma_n^2} \right), \quad (5.1)$$

onde σ_f^2 é a variância da imagem e σ_n^2 a variância do ruído.

De forma geral, esta medida compara o nível do sinal em relação ao ruído presente nele. Quanto maior a razão, menos corrompido está o sinal. O SNR é expresso em termos da escala logarítmica decibel devido à larga faixa dinâmica que diferentes sinais podem assumir.

Para medir o desempenho de um algoritmo de restauração, uma medida baseada no SNR é comumente utilizada, a Melhoria na Relação Sinal-Ruído (ISNR, do inglês *improvement in signal-to-noise ratio*), dada por:

$$\text{ISNR}_{\text{dB}} = 20 \log_{10} \left(\frac{\|g - f\|}{\|\hat{f} - f\|} \right), \quad (5.2)$$

onde g , f e \hat{f} são, respectivamente, as imagens observada, original e restaurada. Quando maior o ISNR obtido, mais a imagem restaurada se aproxima da original. Apesar de limitado, este método permite observar características interessantes dos métodos iterativos, como a velocidade com que a imagem restaurada se aproxima da original.

5.4.2 I-Divergência (IDIV)

De acordo com Csiszar (1991), quando um algoritmo possui a característica de impor ou garantir a não negatividade, a medida mais consistente para verificar a distância entre duas imagens é a I-divergência (IDIV, em inglês *I-divergence*). Para comparação entre imagens tridimensionais, a I-divergência pode ser calculada pela seguinte equação (DEY et al., 2004a):

$$\text{IDIV} = \sum_{\mathbf{x}} \left\{ f \cdot \ln \left[\frac{f}{\hat{f}} \right] - (f - \hat{f}) \right\} \quad (5.3)$$

5.4.3 Índice de Qualidade Universal da Imagem (UIQI)

Desenvolvido por Wang e Bovik (2002), o UIQI foi criado para superar dificuldades das medidas de erro convencionais, medindo características relacionadas à percepção visual. Segundo os autores, a visão humana extrai informação estrutural do campo de visualização e a qualidade visual está estritamente ligada a estas informações. No entanto, um alto “erro” não necessariamente significa alta distorção estrutural. Uma imagem cujo contraste foi melhorado pode possuir o mesmo erro em relação à imagem original que uma imagem que foi contaminada por ruído branco, como mostram Wang, Bovik e Ligang-Lu (2002).

Assim, o UIQI é uma tentativa de medir a distorção estrutural, ao invés do erro na imagem e pode ser escrito na seguinte forma:

$$\text{UIQI} = \frac{4\sigma_{xy} \cdot \bar{x}\bar{y}}{(\sigma_x^2 + \sigma_y^2) \cdot (\bar{x}^2 + \bar{y}^2)}, \quad (5.4)$$

sendo x e y imagens original e de teste, respectivamente. As barras indicam a média das imagens, e σ^2 a variância das imagens sendo calculados para x , por exemplo, como:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i, \quad (5.5)$$

$$\sigma_x^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2, \quad (5.6)$$

e σ_{xy} é a correlação entre x e y , calculada como:

$$\sigma_{xy} = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}), \quad (5.7)$$

A Equação 5.4 pode ser reescrita em termos de três componentes, cada qual focando em uma característica a ser medida:

$$\text{UIQI} = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y} \cdot \frac{2\bar{x}\bar{y}}{(\bar{x})^2 + (\bar{y})^2} \cdot \frac{2\sigma_x \sigma_y}{\sigma_x^2 + \sigma_y^2}, \quad (5.8)$$

O primeiro termo representa o coeficiente de correlação entre x e y , cujo intervalo dinâmico é $[-1, 1]$. O segundo termo, com intervalo de valor $[0, 1]$, calcula a proximidade da média de luminância entre x e y . O terceiro termo mede a similaridade entre as variâncias dos sinais no intervalo $[0, 1]$, de forma a detectar a diferença de contraste entre as imagens. O intervalo de valores do UIQI é $[-1, 1]$, sendo que o melhor valor, 1, é obtido apenas quando $x = y$.

5.4.4 Avaliação da Extrapolação

A avaliação da extrapolação obtida é também um desafio. Apesar de esperarmos que o UIQI possa contribuir nesta tarefa, desejamos formas de medir especificamente a extrapolação. Para conseguir observar a capacidade de extrapolação, alguns métodos podem ser usados tanto em imagens sintéticas quanto reais. Conchello (1998), por exemplo, ao analisar esta propriedade utilizou uma medida do limite de banda prático da imagem e observou o espalhamento do espectro da imagem restaurada. Hunt (1995) comparou os espectros das imagens restauradas por alguns métodos com o espectro das imagens original e degradada.

Neste trabalho duas ferramentas serão usadas neste sentido: a curva dos coeficientes de autocorrelação e os componentes de frequência encontrados na banda prática da imagem.

Os coeficientes de autocorrelação podem ser calculados em qualquer uma das direções x , y ou z da imagem. Para a direção z , por exemplo, podem ser calculados como:

$$A_z(k) = \frac{1}{MN(O-k)} \sum_{x=1}^M \sum_{y=1}^N \sum_{z=1}^{O-k} [f(x, y, z) \cdot f(x, y, z+k)], \quad (5.9)$$

onde M , N e O são as dimensões da imagem. Normalizando os coeficientes temos:

$$\gamma_z(k) = \frac{A_z(k)}{A_z(1)} \quad (5.10)$$

Este gráfico pode ser usado para avaliação devido ao fato que imagens cuja curva dos coeficientes de autocorrelação decai mais rapidamente possuem espectro mais espalhado.

Para calcular o número de coeficientes existente na banda prática da imagem, usamos um método descrito por Conchello (1998), que define a banda prática da imagem como a região

onde o módulo da transformada de Fourier é maior do que 1% do seu valor de pico, ou seja:

$$|\hat{F}(\mathbf{u})/\hat{F}(\mathbf{0})| > 0.01, \quad (5.11)$$

Esta medida pode dar uma informação numérica de o quanto os algoritmos extrapolaram as frequências e pode, assim, ser usada para comparar diferentes métodos.

5.5 Detalhes dos Experimentos

5.5.1 Parâmetros

Para execução de alguns dos algoritmos deste trabalho, é necessária a definição de parâmetros. Em todos os casos, estes foram encontrados experimentalmente para cada imagem sintética, por meio de testes com as imagens sintéticas. Os parâmetros encontrados para as imagens sintéticas de cultura de células foram usados nas imagens reais de mesmo aumento lateral. A Tabela 5.2 lista os parâmetros utilizados em cada imagem, onde λ_{RTV} e λ_{RTM} são os parâmetros de regularização dos algoritmos de, respectivamente, Total Variation e Tikhonov-Miller, ε_L o limite inferior e ε_H o limite superior do resíduo para a definição da restrição espacial adaptativa.

Tabela 5.2: Parâmetros para execução dos algoritmos nas imagens

	λ_{RTV}	λ_{RTM}	ε_L	ε_H
<i>Sintéticas</i>				
Retângulos	–	–	0,006	0,040
Bead	0,0015	0,00010	0,002	0,020
Células 20x	0,0010	0,00007	0,002	0,030
Células 40x	0,0015	0,00010	0,003	0,050
<i>Reais</i>				
RetroPack 1 (20x 32s.)	0,0010	0,00007	0,002	0,030
RetroPack 2 (40x 32s.)	0,0015	0,00010	0,003	0,050
RetroPack 3 (40x 32s.)	0,0015	0,00010	0,003	0,050
RetroPack 4 (20x 64s.)	0,0010	0,00007	0,003	0,030

5.5.2 Condição de Parada

Ainda que os algoritmos tenham convergência garantida, em muitos casos práticos uma condição de parada pode ser utilizada. Um critério comum na literatura é o resíduo, dado por:

$$\text{res} = \frac{\|\hat{f}_n - \hat{f}_{n-1}\|}{\|\hat{f}_n\|} \quad (5.12)$$

Assim, quando $\text{res} < \varepsilon$, sendo ε um limiar positivo, o processo iterativo é interrompido. Para os experimentos realizados neste trabalho, foi considerado $\varepsilon = 0,001$.

5.5.3 Redução de Artefatos de Borda no Uso de Restrição de Suporte Espacial

Uma das dificuldades na implementação da restrição de suporte espacial finito da imagem, é o aparecimento de artefatos de borda, devido à transição abrupta das intensidades da imagem para os valores nulos impostos pela restrição. Estes artefatos estão presentes especialmente nos algoritmos iterativos, pois a cada iteração os artefatos são agravados pelas constantes operações sobre as imagens. Assim, o uso desta restrição pode tornar-se inviável do ponto de vista prático, ainda que seja teoricamente importante.

Para tornar viável a aplicação da restrição de suporte espacial, faremos uso de um método comumente utilizado para realização da convolução no domínio da frequência, e detalhado no Apêndice C.1.1, juntamente com métodos similares. O método escolhido consiste em suavizar a região da transição com o uso de uma função Gaussiana, e foi preferido por produzir o menor impacto na imagem dentre os métodos.

5.5.4 Sistema de Aquisição

Para aquisição das imagens deste trabalho, os seguintes equipamentos foram utilizados

- Microscópio Ótico Invertido — Olympus IX-71
 - Objetiva 20x LUCPlanFLN UIS2, N.A. 0,45 – $\infty/0-2/fn22$ – seca
 - Objetiva 40x LUCPlanFLN UIS2, N.A. 0,60 – $\infty/0-2/fn22$ – seca
- Câmera CCD — DP-70

5.5.5 Ambiente de Processamento

Os experimentos foram executados em um computador portátil com as seguintes configurações:

- Processador: Intel Centrino Core 2 Duo T7300 2GHz (Cache 4MB, FSB 667MHz)
- Memória RAM: 2 GB

Os softwares utilizados:

- Sistema Operacional: Linux, distribuição Kubuntu Hardy Heron (v.8.04) 64 bits.
 - Versão do kernel: 2.6.24-18
 - Tamanho da área de swap utilizada: 2 GB
- MATLAB R2007b (7.5.0.338) 64bits

6 *Resultados e Discussões*

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados do uso dos métodos desenvolvidos com aplicação nas imagens, conforme definido no capítulo 6. Inicialmente serão apresentados e discutidos os resultados com imagens sintéticas, em seguida os resultados com imagens reais.

Serão apresentados os resultados das imagens restauradas pelos algoritmos:

- Richardson-Lucy com restrição espacial (RLE),
- Richardson-Lucy com restrição espacial adaptativa (RLE-A),
- Richardson-Lucy com restrição espacial baseada no fundo da imagem (RLE-B),
- RLE com passo de suavização linear, usando filtro de média (RLE-SL),
- RLE com passo de suavização não linear, usando filtro da mediana (RLE-SNL).

A título de comparação, foram incluídos também os algoritmos existentes na literatura:

- Richardson-Lucy (RL),
- Richardson-Lucy com regularização Total Variation (RL-TV),
- Richardson-Lucy com regularização Tikhonov-Miller (RL-TM).

Ao final, os resultados serão avaliados em termos do desempenho da restauração e ainda a complexidade computacional dos algoritmos e a velocidade observada nos experimentos. A capacidade de extrapolação será discutida com destaque na última seção.

6.1 **Resultados com Imagens Sintéticas**

Os resultados serão apresentados para cada uma das quatro imagens sintéticas da seguinte forma: uma tabela contendo as medidas IDIV, ISNR, UIQI e os componentes de frequência

encontrados na região da banda prática da imagem (Tabela 6.1, Tabela 6.2 na página 69, Tabela 6.3 na página 70 e Tabela 6.4 na página 72), e uma figura contendo seções das imagens restauradas (seções radiais $(x - y)$ e/ou axiais $(z - y)$). Para as imagens *Retângulos* e *Células 40x*, serão ilustrados gráficos da I-divergência (IDIV) em relação ao número de iterações. Curvas dos coeficientes de autocorrelação na direção axial serão apresentadas também para as imagens *Retângulos* e *Células 40x*.

As imagens restauradas exibidas e os resultados numéricos mostrados nas tabelas são aqueles relativos à melhor imagem obtida por cada método tendo em vista o critério da I-divergência, devido ao fato deste critério ter se tornado um padrão na literatura para avaliar a restauração de imagens limitadas em banda. O número de iterações necessárias e os tempos de execução para cada algoritmo foram incluídos nas tabelas. Os números em negrito indicam os melhores resultados em cada coluna.

A imagem sintética *Retângulos* foi restaurada apenas com os algoritmos RL, RLE, RLE-A e RLE-B pois é livre de ruído e não necessita de uso de passos de suavização ou de regularização. Todas as outras imagens foram restauradas utilizando todos os métodos descritos no Capítulo 5 na página 52.

Tabela 6.1: Resultados da avaliação da restauração da imagem sintética *retângulos*

	# Iter.	IDIV	ISNR	UIQI	# Freq.BP.	Tempo Ex.
RL	800	8,62	8,54	0,88	897	8m35s
RLE	800	5,94	8,40	0,90	1287	12m15s
RLE-A	800	3,15	8,75	0,91	1321	14m30s
RLE-B	800	5,85	8,31	0,90	1297	13m05s

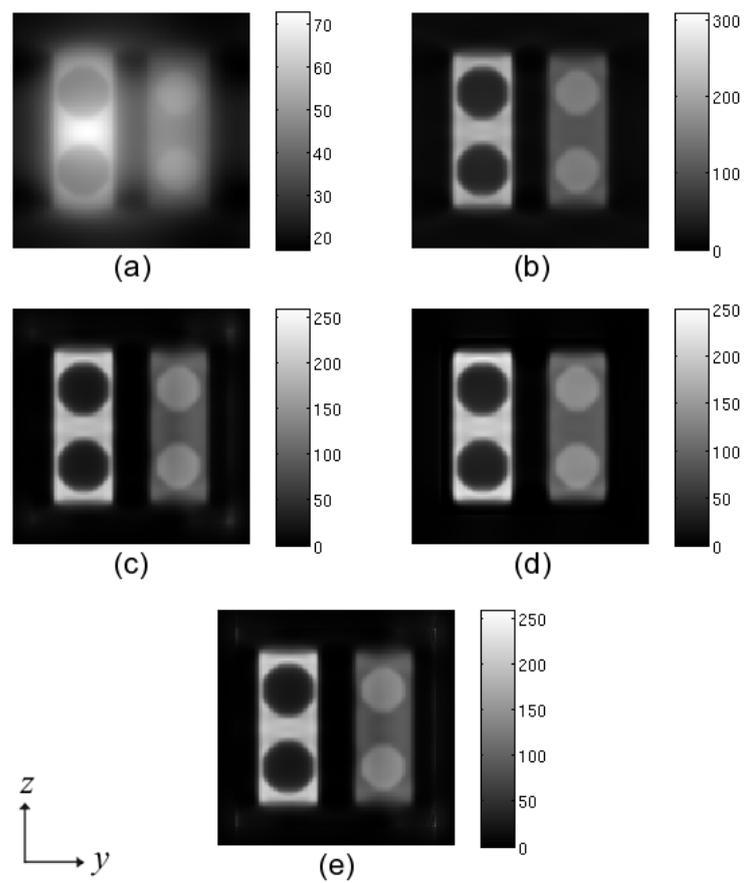


Figura 6.1: Seção axial (n.42) da restauração da imagem sintética *retângulos*: degradada (a), RL (b), RLE (c), RLE-A (d), RLE-B (e)

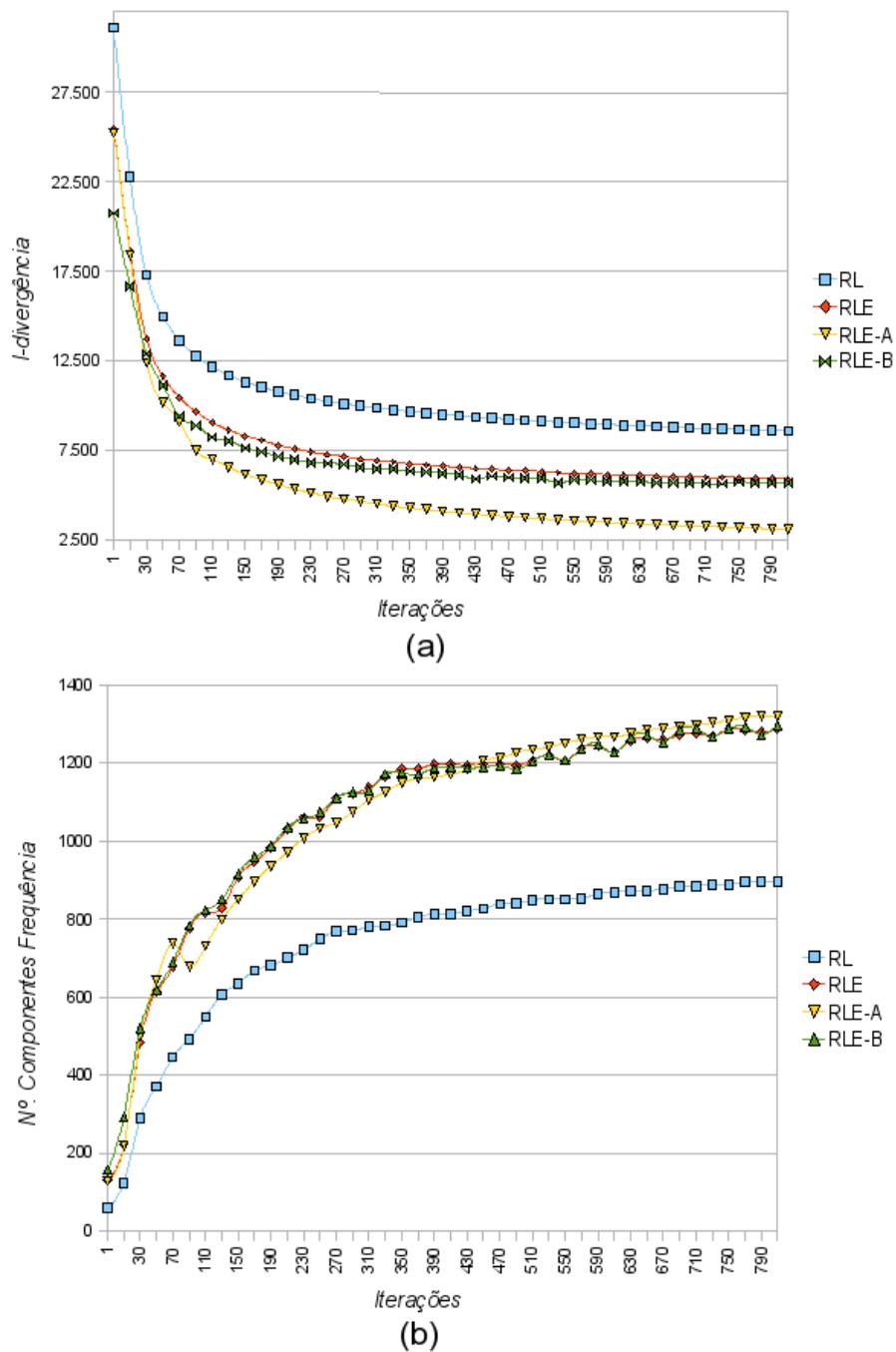


Figura 6.2: Gráfico da I-divergência (a) e Número de componentes de frequência da banda prática da imagem (b), em função do número de iterações, para a restauração da imagem sintética *retângulos*

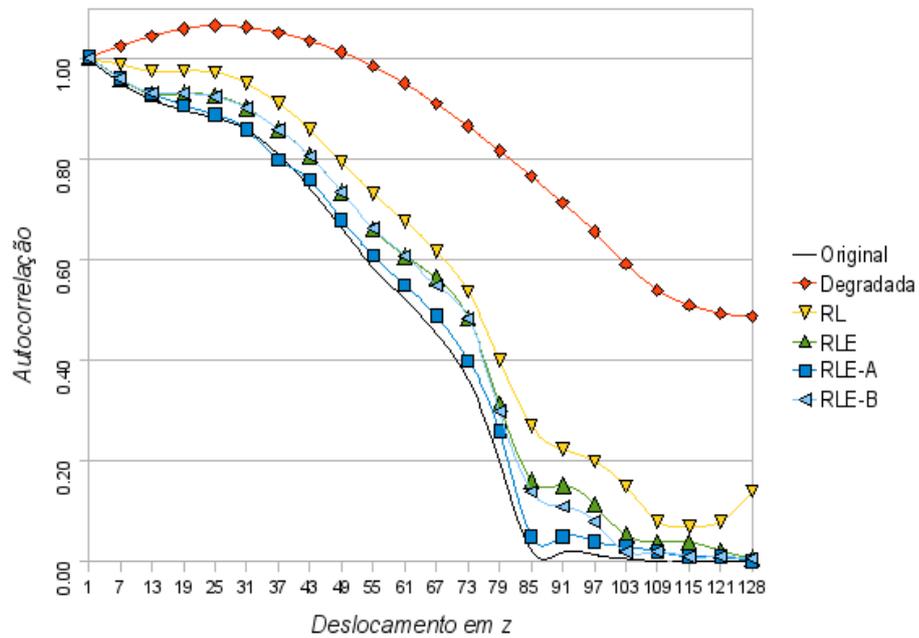


Figura 6.3: Gráfico dos coeficientes de autocorrelação para a imagem sintética *Retângulos*

Tabela 6.2: Resultados da avaliação da restauração da imagem sintética *bead*

	# Iter.	IDIV	ISNR	UIQI	# Freq.BP.	Tempo Ex.
RL	380	5,50	4,43	0,44	3857	3m45s
RL-TV	570	5,30	5,22	0,47	3807	32m10s
RL-TM	370	6,50	3,47	0,39	1629	5m40s
RLE	220	1,91	4,70	0,48	4343	6m10s
RLE-SL	200	1,86	5,12	0,49	10003	17m05s
RLE-SNL	200	1,85	5,04	0,50	10447	17m35s
RLE-A	150	1,84	4,81	0,48	12541	4m15s
RLE-B	220	2,41	5,00	0,49	8643	5m30s

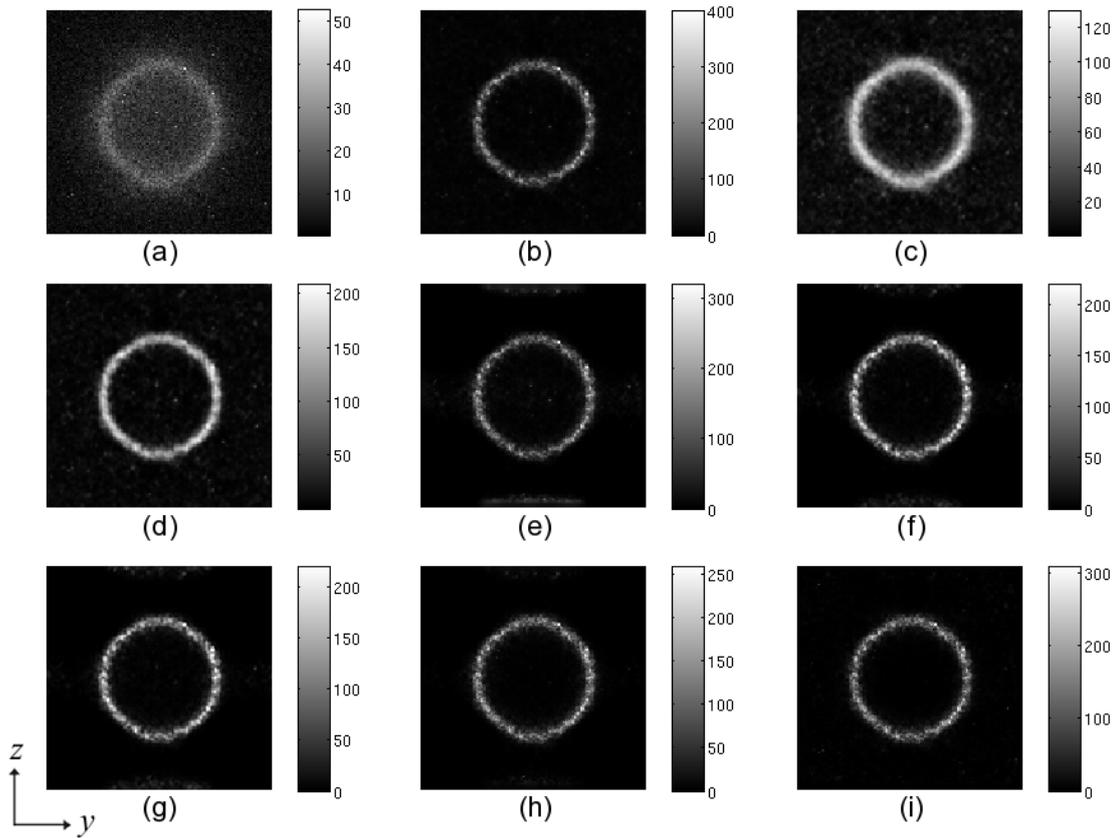


Figura 6.4: Seção axial central (n.64) da restauração da imagem sintética *bead*: degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)

Tabela 6.3: Resultados da avaliação da restauração da imagem sintética *celulas 20x*

	# Iter.	IDIV	ISNR	UIQI	# Freq.BP.	Tempo Ex.
RL	340	4,88	1,75	0,11	5217	5m05s
RL-TV	720	4,07	2,02	0,13	5259	46m50s
RL-TM	340	4,17	1,99	0,13	4825	5m30s
RLE	320	3,88	2,04	0,16	9457	6m25s
RLE-SL	380	3,78	2,15	0,16	9839	22m05s
RLE-SNL	380	3,78	2,15	0,16	9877	22m00s
RLE-A	340	3,18	2,09	0,15	10227	4m15s
RLE-B	220	3,18	1,99	0,15	11465	5m30s

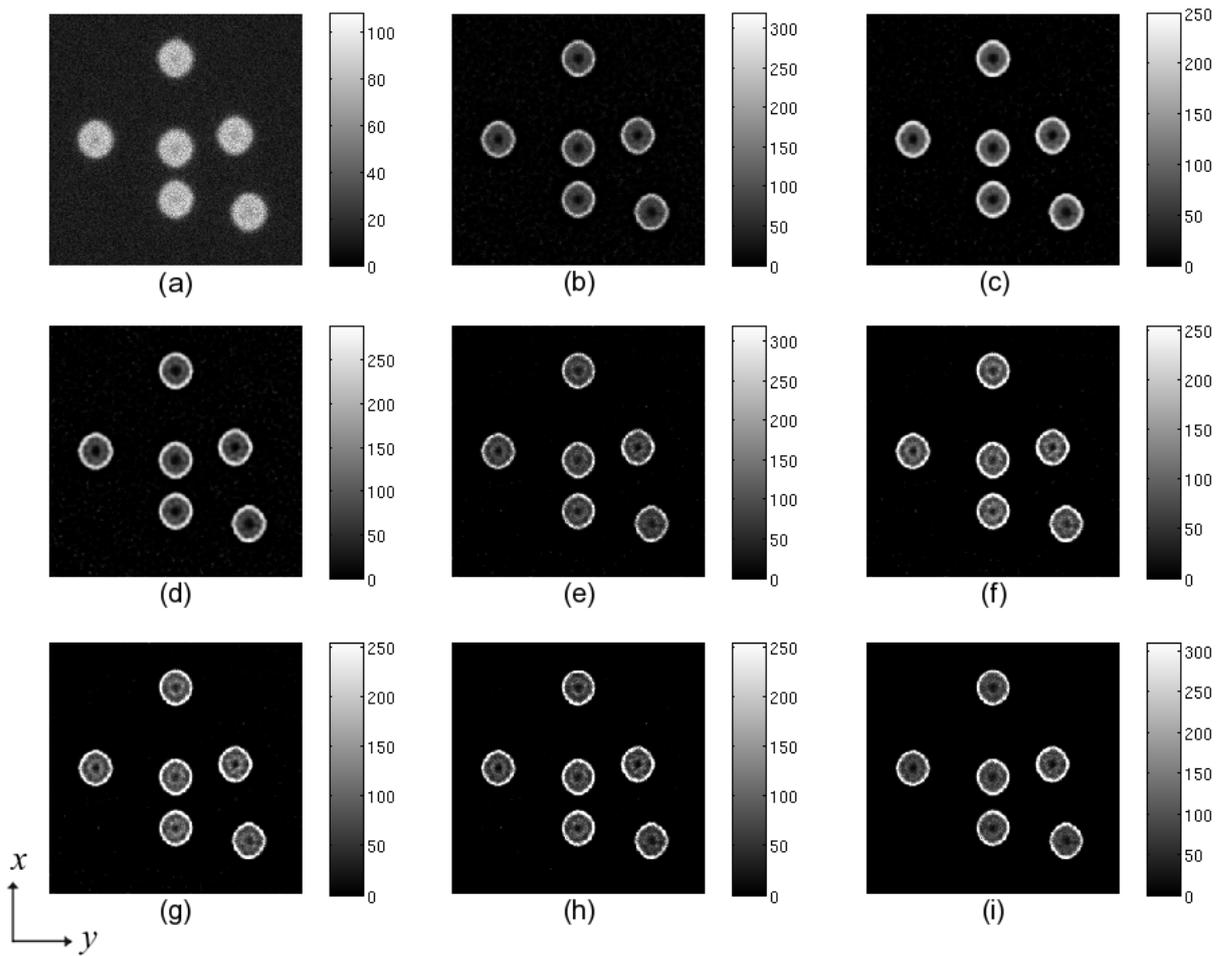


Figura 6.5: Seção radial central (n.16) da restauração da imagem sintética *células 20x*: degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)

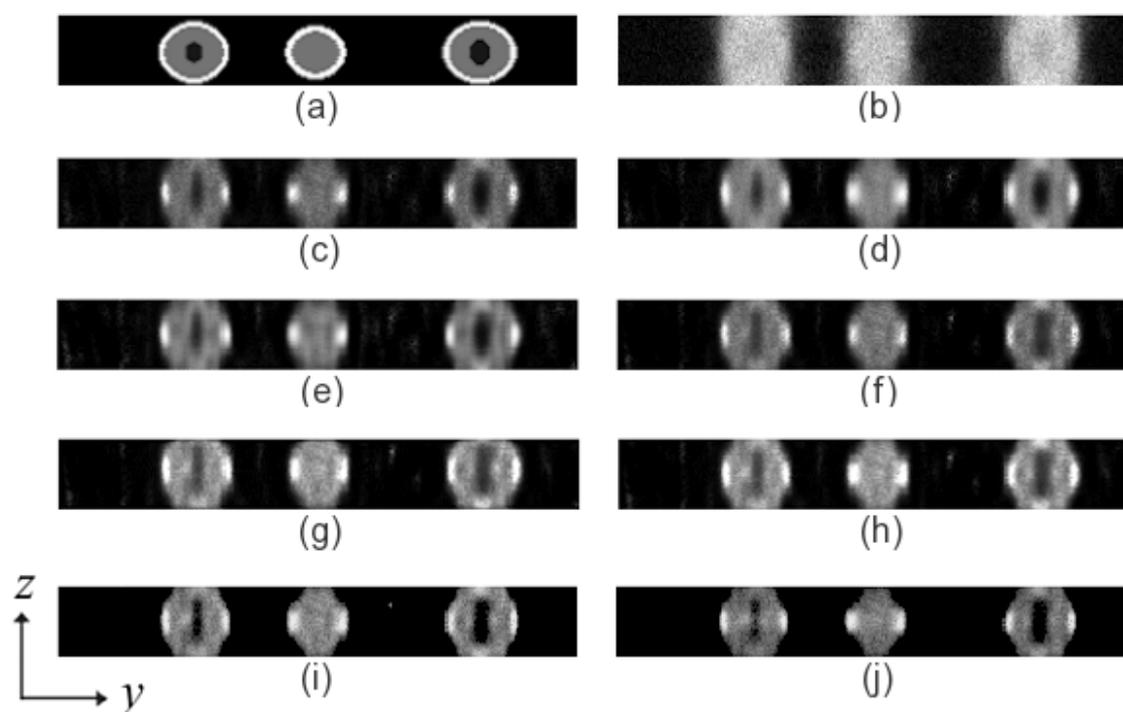


Figura 6.6: Seção axial central (n.128) da restauração da imagem sintética *celulas 20x*: original (a), degradada (b), RL (c), RL-TM (d), RL-TV (e), RLE (f), RLE-SL (g), RLE-SNL (h), RLE-A (i), RLE-B (j)

Tabela 6.4: Resultados da avaliação da restauração da imagem sintética *celulas 40x*

	# Iter.	IDIV	ISNR	UIQI	# Freq.BP.	Tempo Ex.
RL	490	4,79	3,36	0,27	5747	15m45s
RL-TV	800	3,44	3,90	0,28	8083	112m10s
RL-TM	400	3,68	3,70	0,27	5155	13m15s
RLE	660	2,29	4,05	0,28	14761	21m00s
RLE-SL	740	2,82	4,01	0,29	11629	91m05s
RLE-SNL	740	2,82	4,01	0,29	11629	90m20s
RLE-A	670	2,25	4,04	0,27	15195	26m15s
RLE-B	230	3,05	3,00	0,46	13543	9m25s

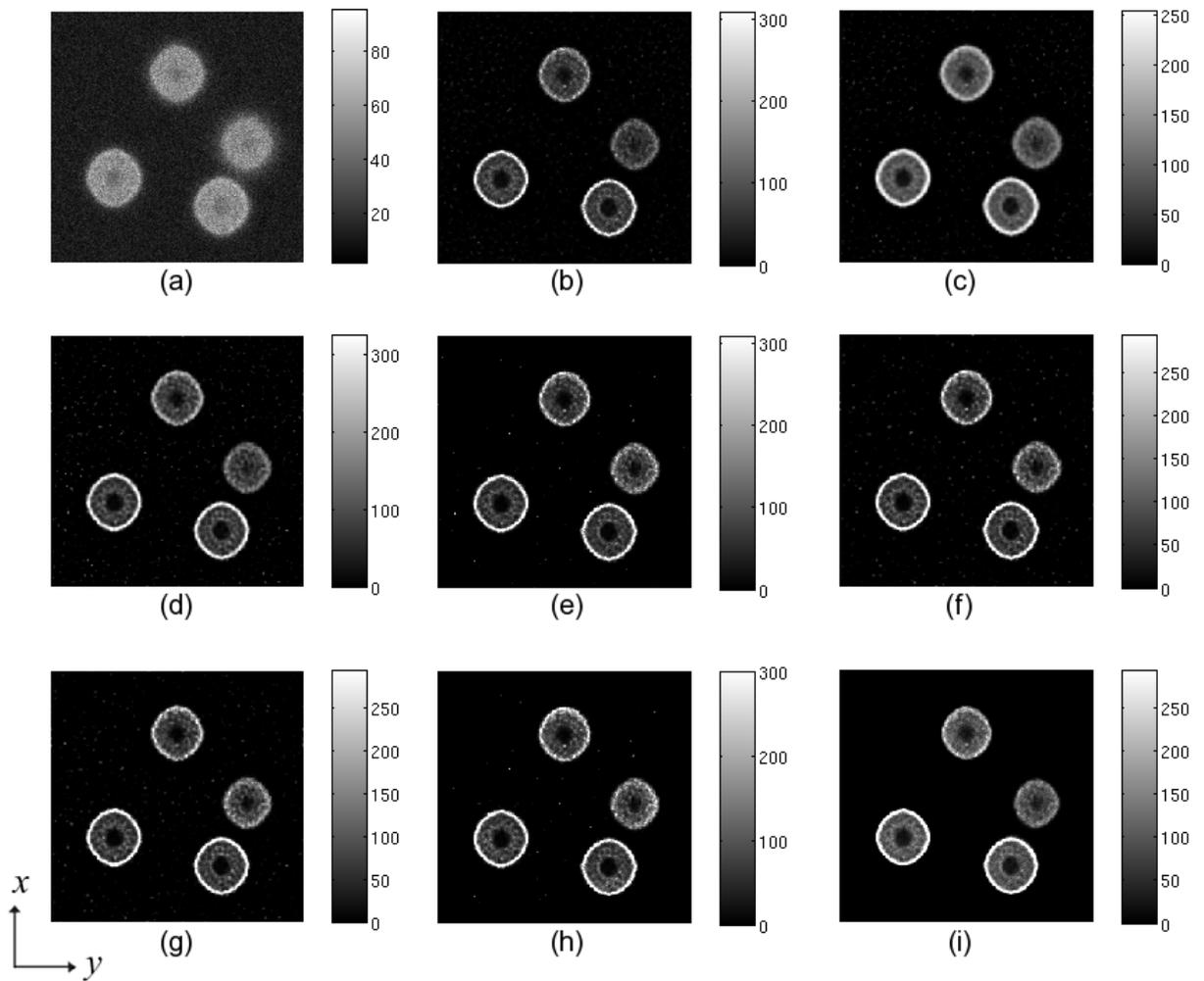


Figura 6.7: Seção radial (n.32) da restauração da imagem sintética *células 40x*: degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)

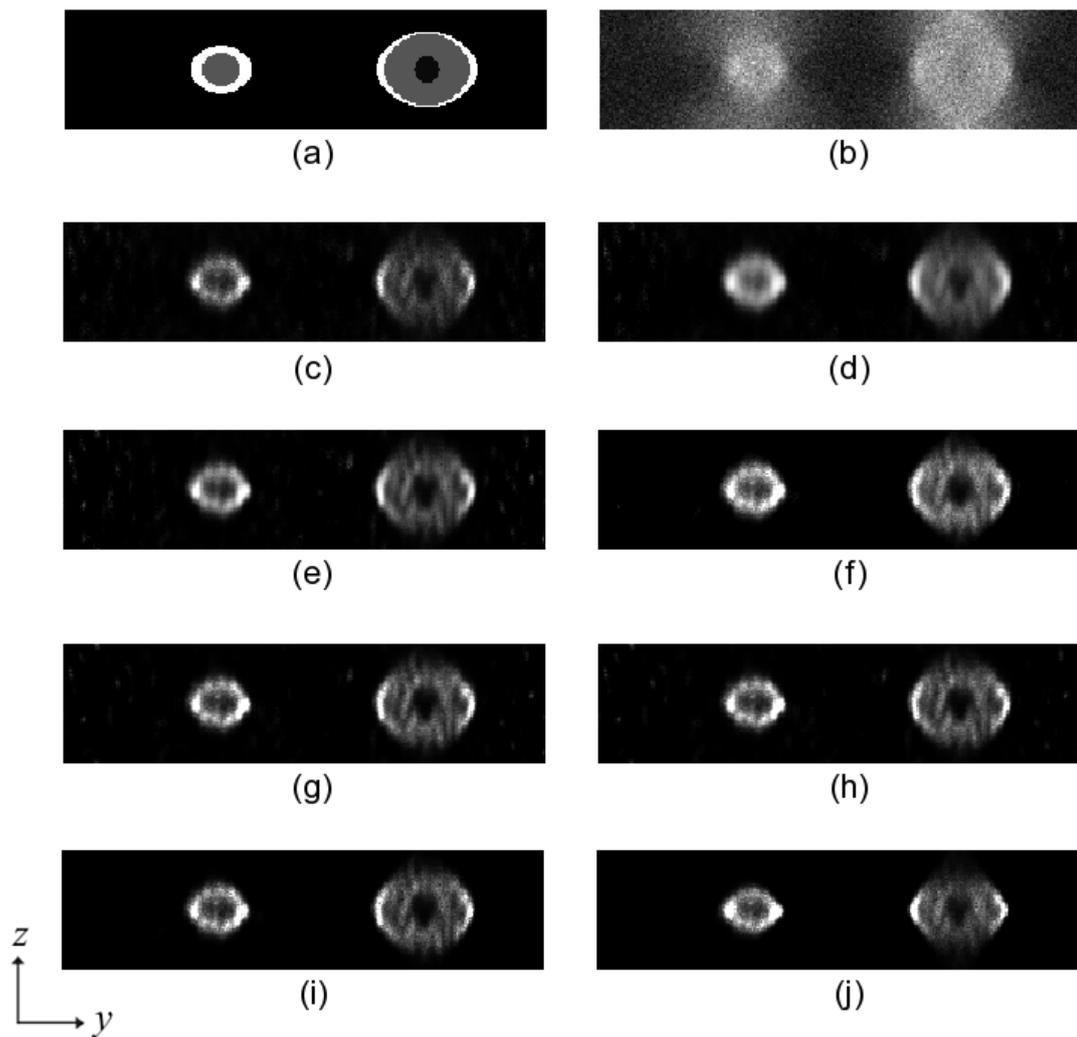


Figura 6.8: Seção axial (n.177) da restauração da imagem sintética *células 40x*: original (a), degradada (b), RL (c), RL-TM (d), RL-TV (e), RLE (f), RLE-SL (g), RLE-SNL (h), RLE-A (i), RLE-B (j)

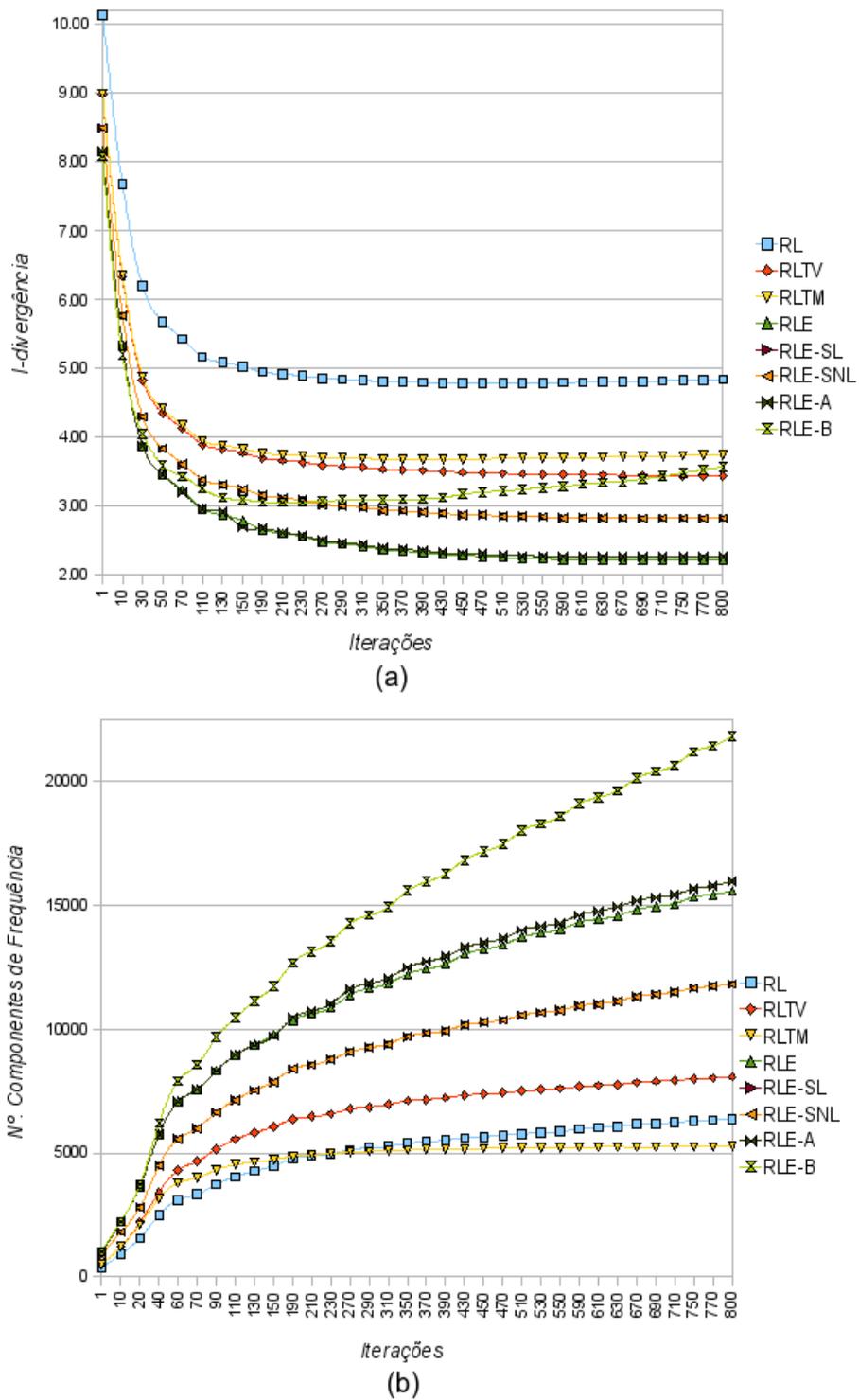


Figura 6.9: Gráfico da I-divergência (a) e Número de componentes de frequência da banda prática da imagem (b), em função do número de iterações, para a restauração da imagem sintética células 40x

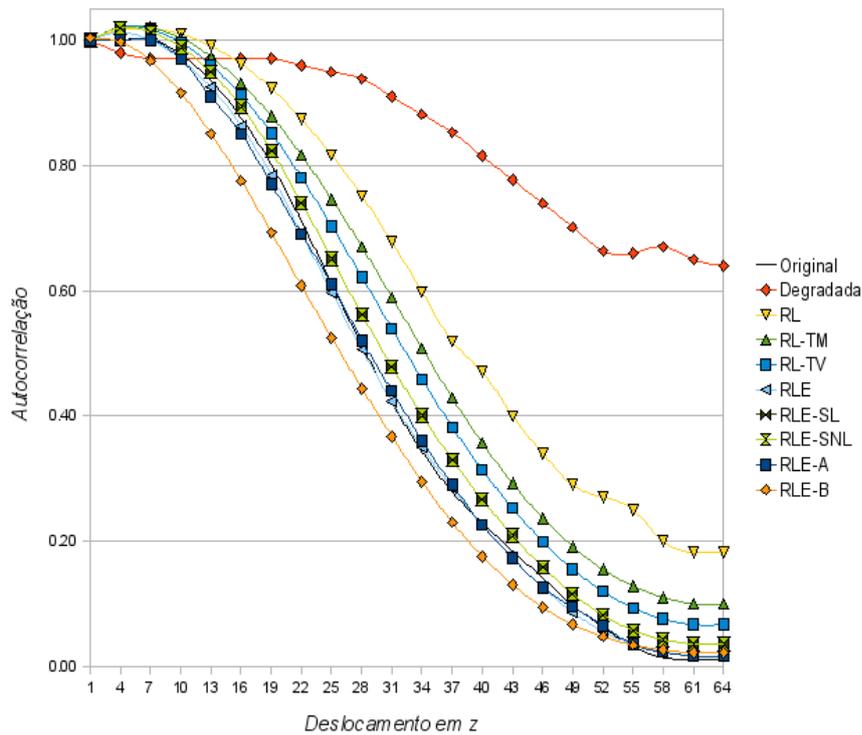


Figura 6.10: Gráfico dos coeficientes de autocorrelação para a imagem sintética *Células 40x*

6.2 Resultados com Imagens Reais

Para cada uma das quatro imagens reais, os resultados serão apresentados na seguinte forma: tabelas contendo os componentes de frequência encontrados na banda prática da imagem, juntamente com o número de iterações e o tempo de execução de cada algoritmo (Tabela 6.5 na próxima página, Tabela 6.6 na página 78, Tabela 6.7 na página 78 e Tabela 6.8 na página 81), figuras contendo seções radiais (planos $(x - y)$) e figuras contendo seções axiais (planos $(z - y)$) das imagens restauradas.

Para a imagem *RetroPack 1*, é exibido um detalhe de tamanho 64x64 pixels das seções n.14 (fora de foco) na Figura 6.11 na próxima página, para permitir melhor visualização das diferenças entre os algoritmos. São também mostradas as curvas dos coeficientes de autocorrelação na direção axial para as imagens *RetroPack 3* (Figura 6.14 na página 81) e *RetroPack 4* (Figura 6.17 na página 83)

Tabela 6.5: Resultados da extrapolação da imagem real *RetroPack 1*

	# Iter.	# Freq.BP.	# Tempo Ex.
RL	320	1365	5m20s
RL-TM	225	1093	3m40s
RL-TV	310	1319	12m50s
RLE	270	2049	4m30s
RLE-SL	290	1461	11m25s
RLE-SNL	290	1467	11m35s
RLE-A	190	2131	3m55s
RLE-B	240	2809	4m15s

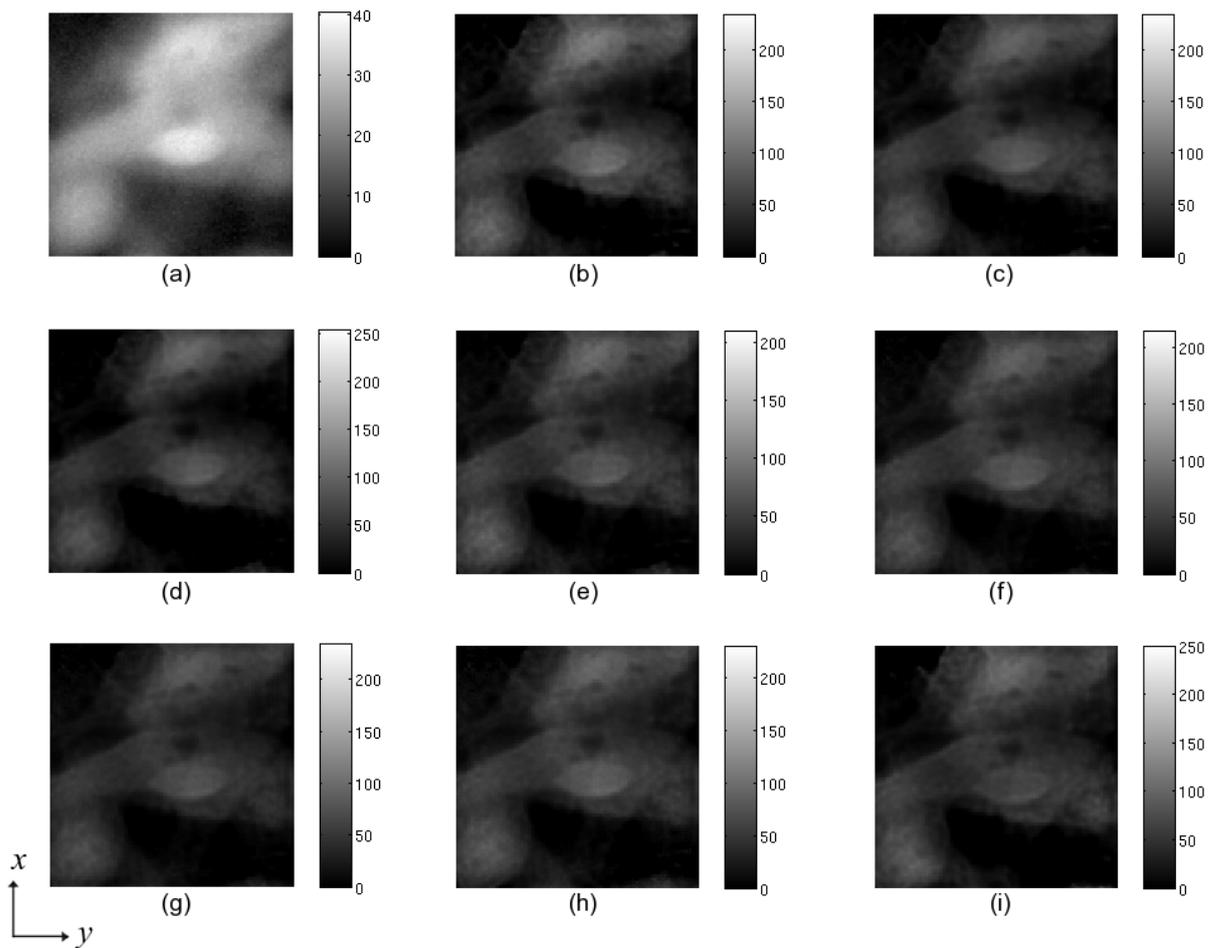


Figura 6.11: Detalhe das seções radiais (n.14) da restauração da imagem real *RetroPack 1*: degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)

Tabela 6.6: Resultados da extrapolação da imagem real *RetroPack 2*

	<i># Iter.</i>	<i># Freq.BP.</i>	<i># Tempo Ex.</i>
RL	145	2322	3m50s
RL-TM	125	2080	3m30s
RL-TV	150	2102	12m05s
RLE	135	2643	3m40s
RLE-SL	150	2631	6m15s
RLE-SNL	150	2637	6m10s
RLE-A	120	2743	3m25s
RLE-B	110	3012	3m45s

Tabela 6.7: Resultados da extrapolação da imagem real *RetroPack 3*

	<i># Iter.</i>	<i># Freq.BP.</i>	<i># Tempo Ex.</i>
RL	110	2142	1m20s
RL-TM	95	1826	1m35s
RL-TV	125	2140	7m40s
RLE	120	2764	2m25s
RLE-SL	120	2672	4m15s
RLE-SNL	120	2676	4m20s
RLE-A	122	2796	2m45s
RLE-B	125	2874	2m51s

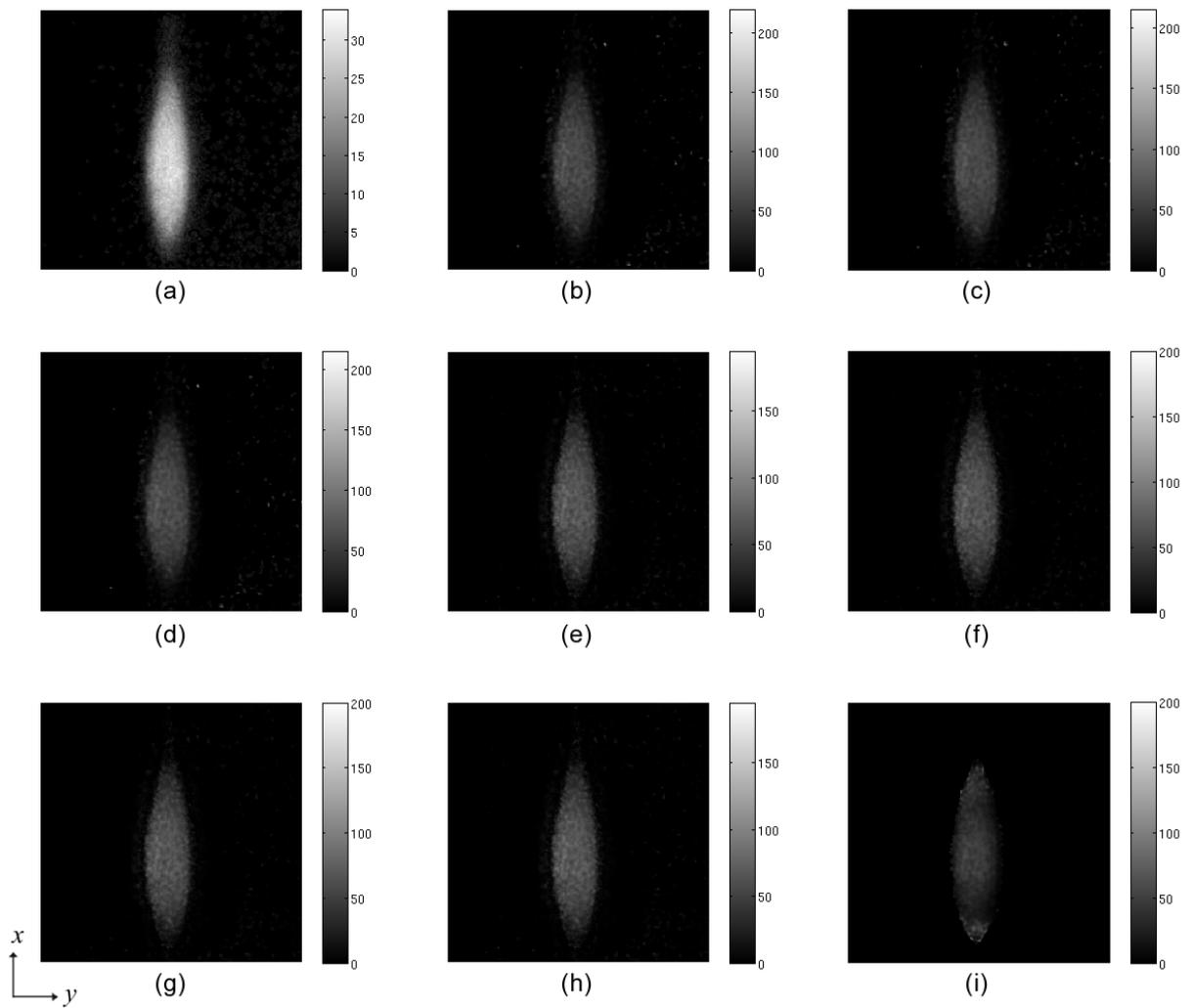


Figura 6.12: Seção radial central (n.16) da restauração da imagem real *RetroPack 2*: degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)

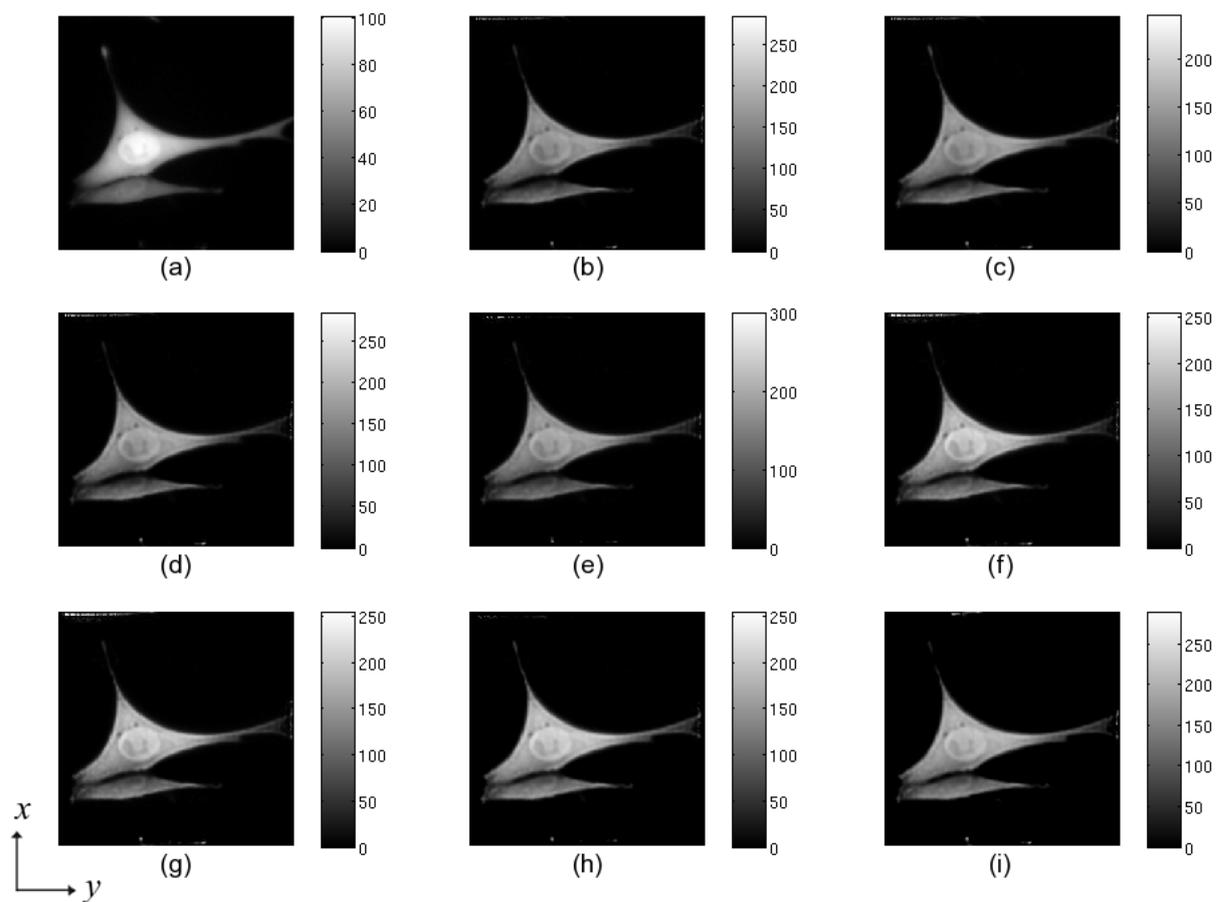


Figura 6.13: Seção radial central (n.16) da restauração da imagem real *RetroPack 3*: degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)

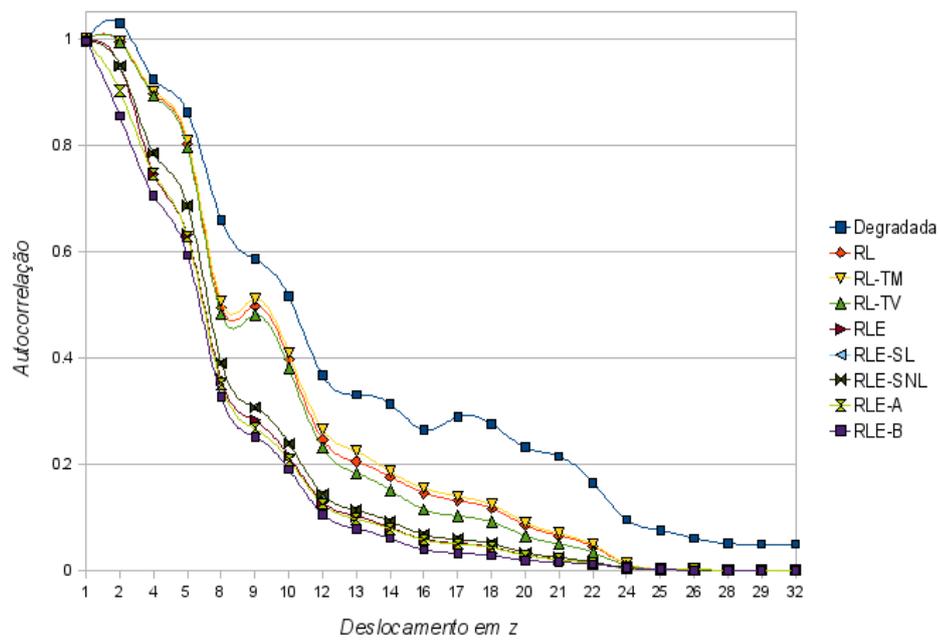


Figura 6.14: Gráfico dos coeficientes de autocorrelação para a imagem real *RetroPack 3*

Tabela 6.8: Resultados da extrapolação da imagem real *RetroPack 4*

	# Iter.	# Freq.BP.	# Tempo Ex.
RL	190	9344	6m30s
RL-TM	160	6592	5m35s
RL-TV	200	9436	22m15s
RLE	210	10702	8m15
RLE-SL	230	10694	17m00s
RLE-SNL	210	10358	17m00s
RLE-A	210	11318	9m25s
RLE-B	180	11608	8m00s

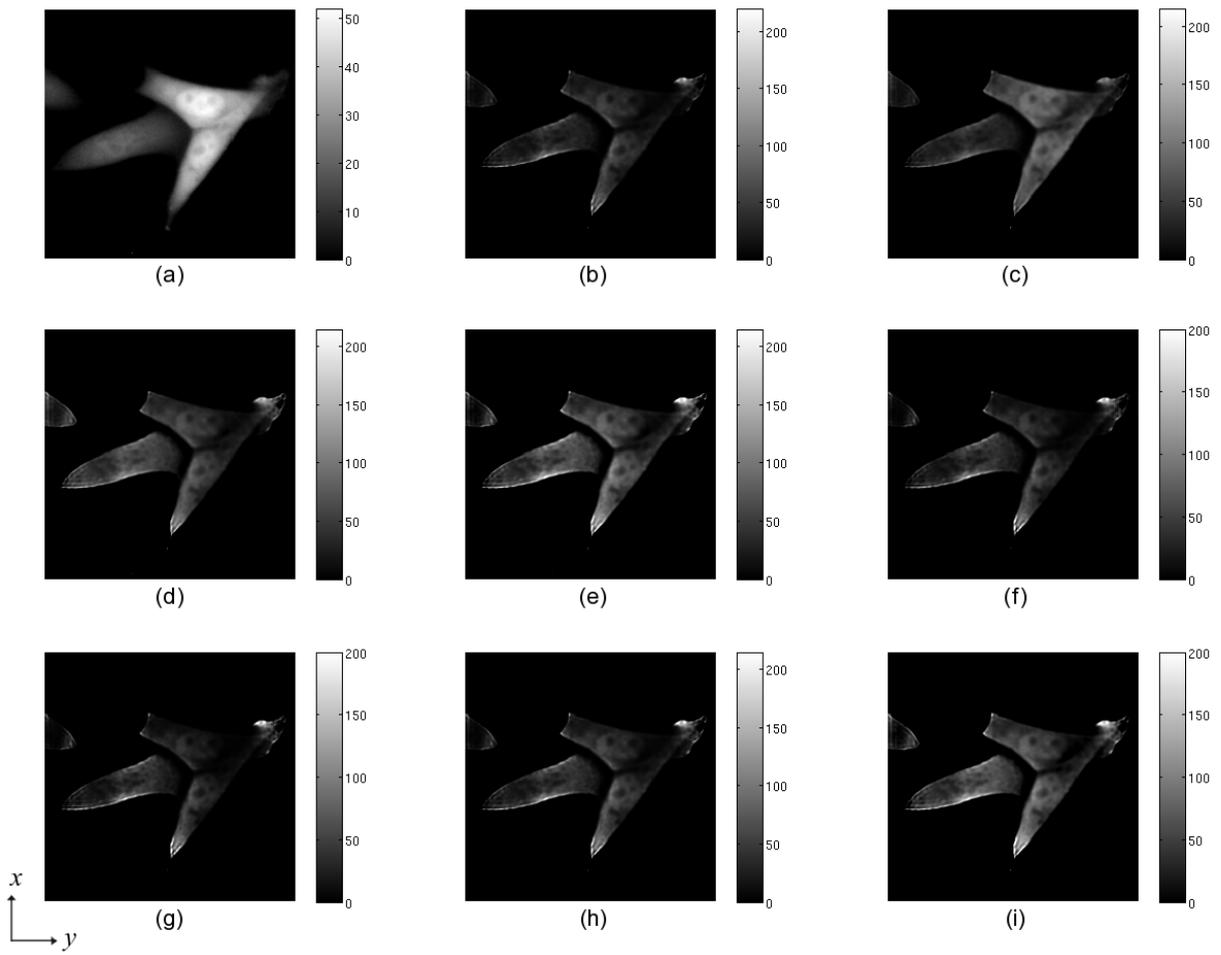


Figura 6.15: Seção radial (n.31) da restauração da imagem real *RetroPack 4*: degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)

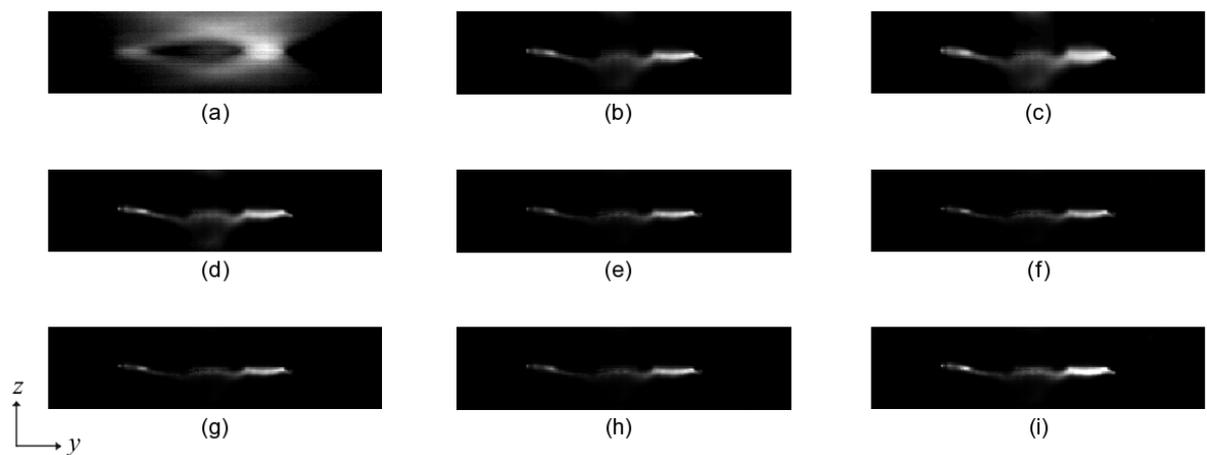


Figura 6.16: Seção axial (n.134) da restauração da imagem real *RetroPack 4*: degradada (a), RL (b), RL-TM (c), RL-TV (d), RLE (e), RLE-SL (f), RLE-SNL (g), RLE-A (h), RLE-B (i)

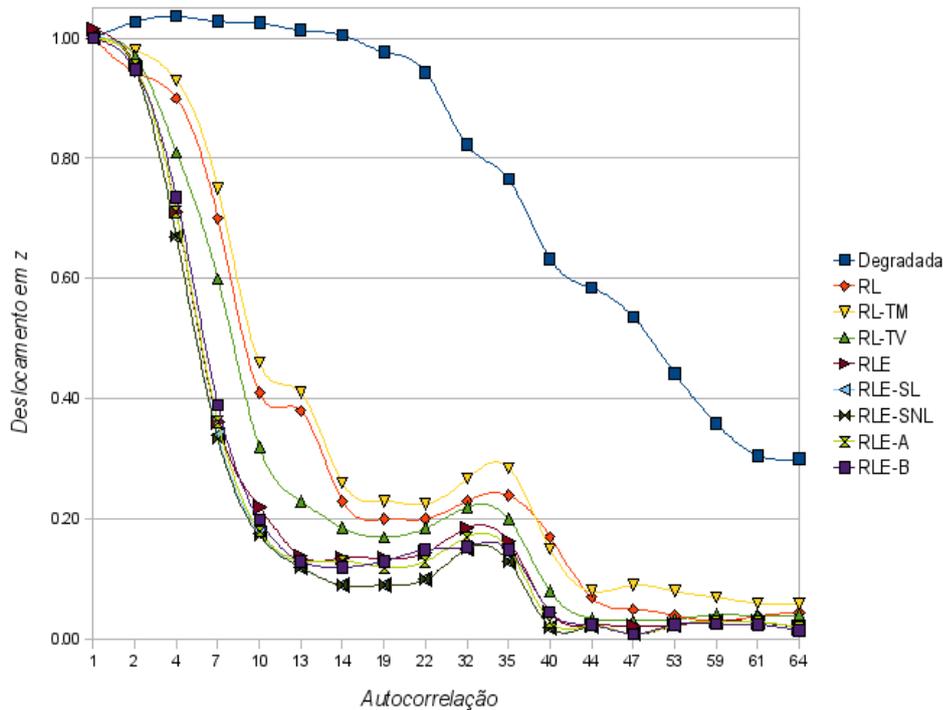


Figura 6.17: Gráfico dos coeficientes de autocorrelação para a imagem real *RetroPack 4*

6.3 Discussão

Os resultados apresentados serão discutidos sob os pontos de vista do desempenho da restauração, complexidade e velocidade, e extrapolação.

6.3.1 Desempenho da Restauração

Os experimentos revelaram resultados interessantes quanto ao desempenho dos algoritmos propostos neste trabalho. Considerando a I-divergência como principal método de avaliação, como sugerido por Dey et al. (2004a), verificamos que os métodos propostos convergiram mais rapidamente, como é possível observar nos gráficos das Figuras 6.2 na página 68 e 6.9 na página 75, mostrando que a I-divergência decai mais rapidamente para o algoritmo RLE e suas variações. Nas mesmas figuras, é mostrado que o número de coeficientes da banda prática da imagem também cresce mais rapidamente. Em muitos casos, os algoritmos propostos obtêm melhores resultados quando comparados aos métodos já propostos por outros autores (RL, RL-TM e RL-TV), o que pode ser observado nas Tabelas 6.1 na página 66, 6.2 na página 69, 6.3 na página 70 e 6.4 na página 72. Este resultado é muito importante pois o RL é ainda nos dias atuais um dos métodos mais eficazes na restauração de imagens de microscopia, segundo Wu, Merchant e Castleman (2008).

Os algoritmos que utilizam regularização, RL-TM e RL-TV, obtiveram resultados como esperado. Destacamos o algoritmo RL-TV pela sua capacidade de regularizar sem suavizar excessivamente a imagem. No entanto, este algoritmo mostrou-se de convergência muito lenta, como será discutido com maior detalhe posteriormente. O algoritmo RL-TM, por regularizar a solução de maneira a não preservar detalhes da imagem, reduz ligeiramente a capacidade de extrapolação do algoritmo RL. O algoritmo RL-TV, no entanto, por suavizar regiões planas e preservar regiões de borda da imagem, melhorou em alguns experimentos a capacidade de extrapolação do algoritmo RL.

O método RLE mostrou resultados interessantes, produzindo os menores índices de I-divergência e as maiores quantidades de componentes de frequência na banda prática das imagens. Nas imagens restauradas, é possível observar melhor restauração na direção axial (eixo z) quando usado o método RLE e suas variações. Os algoritmos variantes do RLE também apresentaram resultados com características peculiares para cada variação do algoritmo: os algoritmos RLE-SL e RLE-SNL, por suavizarem as frequências extrapoladas, obtiveram melhoria na relação sinal-ruído, mas pouca melhoria no contraste e em relação à I-divergência. Uma observação interessante é que, apesar dos algoritmos RLE-SL e RLE-SNL usarem filtros de suavização distintos, os resultados são muito similares, provavelmente porque o número de frequências extrapoladas é baixo em comparação às outras frequências da imagem. O desenvolvimento e alguns resultados obtidos com os algoritmos RLE-SL e RLE-SNL foram apresentados em duas conferências, na forma de artigo completo (PONTI-JUNIOR; MASCARENHAS; SUAZO, 2007) e (PONTI-JUNIOR et al., 2008).

Os métodos RLE-A e RLE-B, em particular, se apresentaram sensíveis respectivamente aos parâmetros e à estimação do fundo da imagem. O RLE-A é sensível aos parâmetros ε_H e ε_L , que neste trabalho foram definidos de forma empírica. Apesar dos valores dos parâmetros não variarem muito para os diferentes experimentos, sendo os valores ótimos encontrados na ordem de 2^{-4} para o ε_L e da ordem de 5^{-2} para o ε_H (ver Tabela 5.2 na página 62 para maiores detalhes), uma escolha errada pode piorar o desempenho do algoritmo. Ainda assim, a velocidade de convergência e melhores índices de avaliação obtidos por este algoritmo colocam este algoritmo como promissor. Os bons resultados são observados também em imagens reais, onde observamos ganho em detalhes nas regiões de borda das imagens, em especial nos planos fora de foco, como pode ser observado na Figura 6.11 na página 77 e também ganho em contraste, como pode ser observado na Figura 6.15 na página 82.

O RLE-B é sensível à correta detecção e remoção do fundo da imagem. Em casos de ruído e alta intensidade de fundo, observou-se que o RLE-B possui desempenho inferior, pois a es-

estimação do fundo da imagem torna-se mais difícil. Como o método utilizado é relativamente simples, pequenos erros de estimação do fundo podem gerar erros na restauração, o que ficou evidente principalmente nas imagens *Celulas 40x* (veja Figuras 6.8 na página 74 e 6.9) e *RetroPack 2* (ver Figura 6.12). Os resultados neste caso, apesar de possuírem altos índices UIQI e banda prática, devido à região de fundo da imagem subtraída, apresenta restauração irregular na direção axial. Na restauração da imagem *Células 40x*, por exemplo, quando vista no plano $(z-y)$, o formato da célula aproxima-se de um losango, ao invés de uma elipse. Quando a imagem a ser restaurada possui melhor relação sinal-ruído, este método tem bom desempenho, como no caso da imagem *Retângulos* (veja Figuras 6.1 na página 67 e 6.2) e *RetroPack 3* (ver Figura 6.13 na página 80, obtendo bons índices de qualidade e melhoria na extrapolação).

Uma característica comum a todos os métodos aqui utilizados é a predominância de maiores valores de intensidade na seção radial central das imagens, possível de ser observado nas imagens em visão axial $(z-y)$. A restauração parece privilegiar a região central das imagens e, por consequência, os planos afastados do centro tendem a perder em luminosidade e contraste. A provável explicação para este fato é o uso de PSFs invariantes no espaço. Apesar desta propriedade simplificar o problema e diminuir o custo computacional, pode ser responsável tanto pela diferença de iluminação, quanto por uma suave distorção da geometria dos objetos.

6.3.2 Complexidade e Velocidade

É interessante ainda analisar os algoritmos em termos da complexidade e velocidade, relacionados ao esforço computacional. Faremos uma breve análise da complexidade computacional dos algoritmos usados neste trabalho com base na notação O , a partir de análises feitas nos trabalhos de Leiserson et al. (2002) e Pitas (2000).

O algoritmo RL, juntamente com os algoritmos RL-TM, RLE, RLE-B e RLE-A possuem complexidade relacionada à FFT que possui complexidade conhecida $O(n \log n)$. Como os algoritmos citados realizam, além da FFT, apenas operações aritméticas e atribuições, podemos considerar a complexidade do algoritmo igual à da FFT, ou seja, $O(n \log n)$, onde n é o número de voxels da imagem de entrada.

Em relação aos algoritmos RL-TV, RLE-SN e RLE-SNL, devido às operações de gradiente realizada pelo TV e de filtragem realizada pelos RLE-SL e RLE-SNL, estes possuem complexidade $O(n)$. Consideramos a complexidade de RLE-SN e RLE-SNL como linear apenas porque a máscara usada para a filtragem é de tamanho muito inferior ao da imagem. Caso as máscaras fossem de tamanho similar à imagem, a complexidade dos algoritmos seria quadrática (PITAS, 2000).

A complexidade computacional dos algoritmos reflete na velocidade observada nos experimentos. O tempo medido correspondente aos melhores resultados (no caso das imagens sintéticas) ou a um resíduo menor ou igual a 0,001 (no caso das imagens reais), foram compatíveis com a complexidade. Os algoritmos RL-TV, RLE-SN e RLE-SNL levaram mais tempo para chegar ao resultado do que os outros. Os algoritmos RL e RL-TM, por outro lado, foram os mais rápidos na maioria dos testes, em especial o RL, por ser o algoritmo usado como base no trabalho, e portanto, possuindo o menor número de operações. Considerando o ganho de desempenho em relação à complexidade e à velocidade, destacamos os algoritmos RLE, RLE-A e RLE-B, por produzirem, em geral, melhores resultados que o RL, mesmo possuindo complexidade computacional similar aos algoritmos RL e RL-TM pela notação O . Considerando apenas uma iteração, os algoritmos propostos são ligeiramente mais lentos do que o algoritmo RL. No entanto, na maioria dos casos, estes necessitaram de menor número de iterações para obter uma solução aceitável, e portanto, podem, no tempo total, ser mais rápidos do que o RL e RL-TM.

6.3.3 Avaliação da Extrapolação

Os esforços neste trabalho foram dirigidos no sentido de melhorar a capacidade de extrapolação durante a restauração das imagens tridimensionais, com o intuito de obter imagens com melhor resolução, em especial na direção do eixo z . A partir da análise das curvas de autocorrelação e do número de componentes de frequência, podemos observar que os métodos que impõem a restrição de suporte espacial finito (RLE e variantes), geram imagens cujo espectro é mais espalhado, o que indica que o uso dos métodos propostos melhora a capacidade de extrapolação. Lembramos que não há garantias de que este espectro mais espalhado seja equivalente àquele cujas frequências foram perdidas no processo de aquisição. No entanto, os experimentos realizados mostraram melhores resultados também por inspeção visual, sendo notadas principalmente as seguintes características: ganho em regiões de bordas, ganho em contraste e menor borramento na direção do eixo z .

Os algoritmos propostos mostraram-se, em alguns casos, instáveis, aumentando o ruído ou gerando artefatos na imagem. Isto se explica pelo fato de incorporarem restrições que interferem no processo de restauração. Um exemplo é o algoritmo RLE-B, que, ao impor o fundo da imagem como restrição, causa, por vezes, a modificação das intensidades da imagem de forma que a restauração é prejudicada, em especial na direção axial. O algoritmo RLE-A, da mesma forma, exige a definição de parâmetros e, caso a região de suporte espacial se aproxime muito dos objetos da imagem, são notadas distorções na iluminação. Este algoritmos, por outro lado,

quando em condições favoráveis, mostraram ser capazes de gerar resultados muito superiores aos outros em termos do aumento da banda prática da imagem.

6.3.4 Métodos de Avaliação

O método de avaliação da I-divergência mostrou-se bastante sensível para medir as diferenças entre as imagens restauradas por diferentes algoritmos, em especial no uso com imagens tridimensionais. Por outro lado, o UIQI não se mostrou sensível como esperado, provavelmente porque sua formulação tem como base imagens bidimensionais “naturais” (WANG; BOVIK, 2002), que em geral possuem suas dimensões completamente preenchidas por diferentes intensidades. Como muitas vezes as imagens tridimensionais médicas e biomédicas são relativamente esparsas, isto é, possuem grandes regiões nulas, o bloco deslizante que o método UIQI usa para fazer o cálculo da qualidade deve ser grande o suficiente para capturar informações da imagem, o que nem sempre é prático. O UIQI, no entanto, pode ser usado para avaliar a restauração de imagens naturais, como descrito no trabalho com imagens de sensoriamento remoto de Papa et al. (2008). O cálculo da região de banda prática da imagem e a observação das curvas dos coeficientes de autocorrelação foram muito úteis na análise da extrapolação, tendo corroborado os resultados esperados.

7 *Conclusões*

Inúmeros desafios surgem durante o desenvolvimento de métodos para restaurar imagens de microscopia de fluorescência *wide-field*. Primeiramente, é problema inerentemente tridimensional. Além disso este equipamento causa perda de altas frequências e parte das baixas frequências da imagem, e ainda possui ruído dependente do sinal. Portanto, os algoritmos precisam ser capazes de recuperar informações antes não presentes nas imagens, e ainda serem robustos para lidar com diferentes condições de ruído. Na literatura existiam diversos métodos, muitos destes apenas em âmbito teórico, aplicados a sinais unidimensionais ou a imagens em condições não realistas. Estes métodos, no entanto, apontavam os principais fatores para a melhoria na extrapolação, sendo o ponto de partida para este trabalho. Os primeiros desafios surgiram da unificação das teorias e na implementação das técnicas de forma viável. Em seguida em criar métodos capazes de lidar com condições realistas e ainda melhorar os resultados anteriores. Outro desafio foi encontrar métodos eficazes para avaliar a restauração, tendo em vista, principalmente, a extrapolação obtida, sendo necessário o uso de várias medidas, na tentativa de diferenciar os resultados obtidos pelos diferentes algoritmos.

Como principal resultado, desenvolvemos um método iterativo de restauração com melhoria na extrapolação. Os resultados obtidos são promissores pois mostram o potencial de extrapolação dos métodos em condições reais, quando muitos métodos existentes na literatura, requerem a ausência de ruído, e funcionam bem apenas para imagens controladas. A melhoria obtida com o algoritmo RLE e suas variantes foi observada tanto em imagens livres de ruído, quanto na presença deste, e ainda com imagens borradas por diferentes PSFs. Os algoritmos derivados do RLE apresentaram características positivas e negativas distintas.

Os algoritmos com passo de suavização, RLE-SL e RL-SNL, apresentaram melhoria na relação sinal-ruído, mas requerem maior esforço computacional, não proporcional ao aumento no desempenho da restauração, o que pode desencorajar o seu uso. Os algoritmos RLE-A e RLE-B, ainda que dependentes de novos parâmetros e técnicas — em especial a definição dos limiares para o RLE-A e a correta extração do fundo para o RLE-B —, superaram as expectativas pela melhoria nos resultados mesmo mantendo o esforço computacional similar ao

algoritmo clássico. Em muitos experimentos os algoritmos propostos foram superiores ao RL-TV, considerado na literatura como sendo um dos métodos de melhor desempenho. Creditamos isto ao uso de imagens de microscopia *wide-field*, com forte borramento e a morfologia das imagens médicas e biológicas, que dificultam ao algoritmo *Total Variation* a estimação das regiões planas e de borda.

Verificamos com os algoritmos propostos neste trabalho, o potencial do uso de restrições adaptativas e da detecção de informações espaciais da imagem que possam ser usadas como conhecimento *a priori* dentro da restauração. No entanto, observamos que o RLE apresentou-se mais estável que o RLE-A e o RLE-B. Isto porque é um método mais simples e com menor número de parâmetros, com relação mais clara entre a teoria e a prática.

O problema da restauração de imagens de microscopia, em especial o de restaurar frequências perdidas no processo de imageamento, continua em aberto e requer estudos contínuos e aprofundados para que as soluções existentes sejam melhoradas. Este trabalho e suas conclusões podem servir de base para trabalhos futuros, que utilizem restrições adaptativas e/ou extraídas diretamente da imagem observada. Novos trabalhos poderiam ainda explorar a combinação de restrições e a regularização (como a *Total Variation*). A dedução destes algoritmos por meio de outras funções objetivo (como o critério da I-Divergência), ou ainda baseando-se em métodos de otimização diferentes, buscando resultados melhores e de forma mais rápida. O uso de PSFs variantes no espaço pode também melhorar o desempenho da restauração, como mostrado por alguns autores. A busca por métodos que utilizem estas PSFs com menor custo computacional e de maneira mais eficiente, é, portanto, um interessante avanço a ser alcançado. Trabalhos futuros pode modelar os algoritmos propostos neste trabalho com base em POCS, por meio do uso de imagem-protótipo baseada no resultado obtido pelo algoritmo de Richardson-Lucy e de outras projeções que promovam extrapolação espectral.

Referências Bibliográficas

- AGARD, D. A. Optical sectioning microscopy: cellular architecture in three dimensions. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, v. 13, p. 191–219, 1984.
- AGARD, D. A.; HIRAOKA, Y.; SEDAT, J. W. Three dimensional microscopy: image processing for high resolution subcellular imaging. In: WAMPLER, J. E. (Ed.). *New Methods in Microscopy and Low Light Imaging*. San Diego, EUA: SPIE, 1989. v. 1161, p. 24–30.
- AGARD, D. A. et al. Fluorescence microscopy in three dimensions. In: WAMPLER, J. (Ed.). *Methods in Cell Biology*. San Diego, EUA: Academic Press, 1989. p. 353–377.
- AGHDASI, F.; WARD, R. K. Reduction of boundary artifacts in image restoration. *IEEE Trans. Image Proc.*, v. 5, n. 4, p. 611–618, 1996.
- AGUET, F.; VILLE, D. van de; UNSER, M. Model-based 2.5-D deconvolution for extended depth of field in brightfield microscopy. *IEEE T. Image. Process.*, v. 17, n. 7, p. 1144–1153, 2008.
- ANDREWS, H. C.; HUNT, B. R. *Digital Image Restoration*. 2. ed. Nova Iorque, EUA: Prentice-Hall, 1977.
- AVINASH, G. B. Data-driven, simultaneous blur and image restoration in 3-D fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, v. 183, n. 2, p. 145–157, 1996.
- AYERS, G. R.; DAINTY, J. C. Iterative blind deconvolution method and its applications. *Optics Letters*, v. 13, n. 7, p. 547–549, 1988.
- BARNES, C. W. Object restoration in a diffraction-limited imaging system. *J. Opt. Soc. Am.*, v. 56, p. 575–578, 1966.
- BERTERO, M.; BOCCACCI, P. *Introduction to Inverse Problems in Imaging*. Bristol, Reino Unido: IOP, 1998.
- BHATTARCHARJEE, S.; SUNDARESHAN, M. K. Mathematical extrapolation of image spectrum for constraint-set design and set-theoretic superresolution. *J. Opt. Soc. Am. A*, v. 20, n. 8, p. 1516–1527, 2003.
- BIGNAMI, G. F. The microscope coat of arms... or, the sting of the bee and the moons of Jupiter. *Nature*, v. 405, n. 6790, p. 999, 2000.
- BOROJEVIC, R. *Biotecnologia na Área de Saúde Humana e Animal, Bioengenharia e Biomimética*. 2006. Fórum de Competitividade em Biotecnologia da Anbio. Acesso em: 10/03/2008. Disponível em: <http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct_tendencias_futuras_saude.pdf>.

- BOULANGER, J.; KERVRANN, C.; P., B. Estimation of dynamic background for fluorescence video-microscopy. In: *IEEE Proc. Int. Conf. Image Processing*. Atlanta, EUA: IEEE, 2006. p. 2509–2512.
- BOVIK, A. C. Basic tools for image Fourier analysis. In: *The Handbook of Image and Video Processing*. 2. ed. Nova Iorque, EUA: Academic, 2005. p. 57–72.
- CARRINGTON, W. A. et al. Superresolution three-dimensional images of fluorescence in cells with minimal light exposure. *Science*, v. 268, p. 1483–1487, 1995.
- CASTLEMAN, K. R. *Digital Image Processing*. Nova Iorque, EUA: Prentice Hall, 1996.
- COLICCHIO, B. et al. Improvement of the LLS and MAP deconvolution algorithms by automatic determination of optimal regularization parameters and pre-filtering of original data. *Optics Communications*, v. 224, p. 37–49, 2005.
- COMBETTES, P. L. Convex set theoretic image recovery: history, current status and new directions. *J. Visual Comm. and Im. Represent.*, v. 3, n. 4, p. 307–315, 1992.
- CONCHELLO, J.-A. Superresolution and convergence properties of the expectation-maximization algorithm for maximum-likelihood deconvolution of incoherent images. *J. Opt. Soc. Am. A*, v. 15, n. 10, p. 2609–2619, 1998.
- CONCHELLO, J.-A.; MCNALLY, J. G. Fast regularization technique for expectation maximization algorithm for optical sectioning microscopy three-dimensional microscopy. In: ACHARYA, R.; GOLDFOF, D. (Ed.). *Three-Dimensional microscopy: image acquisition and processing*. San Diego, EUA: SPIE, 1996. v. 2655, p. 199–208.
- CSISZAR, I. Why least squares and maximum entropy? an axiomatic approach to inference for linear inverse problems. *Ann. Statistics*, v. 19, n. 4, p. 2032–2066, 1991.
- DANUSER, G. Super-resolution microscopy using normal flow decoding and geometric constraints. *J. Microscopy*, v. 204, n. 2, p. 136–149, 2001.
- DAVIDSON, M. W.; ABRAMOWITZ, M. *Optical Microscopy*. 1999. Olympus America Inc. Acesso em: 22/04/2008. Disponível em: <<http://www.olympusmicro.com/primer/microscopy.pdf>>.
- DEMPSTER, A.; LAIRD, N.; RUBIN, D. Maximum likelihood from incomplete data via the em algorithm. *J. Roy. Stat. Soc. B*, v. 39, n. 1, p. 1–38, 1977.
- DEY, N. et al. *3D microscopy deconvolution using Richardson-Lucy algorithm with Total Variation regularization*. Rel. Tec. n.5272, Institut National de Recherche en Informatique et en Automatique (INRIA). Paris, França, 2004.
- DEY, N. et al. A deconvolution method for confocal microscopy with total variation regularization. In: *IEEE Proceedings of 2nd International Symposium on Biomedical Imaging*. Arlington, EUA: IEEE, 2004. p. 1223–1226.
- DEY, N. et al. Richardson-lucy algorithm with Total Variation regularization for 3D confocal microscope deconvolution. *Microscopy Research and Technique*, v. 69, n. 4, p. 260–266, 2006.

- DOBSON, D. C.; VOGEL, C. R. Convergence of an iterative method for total variation denoising. *SIAM J. Numer. Anal.*, v. 32, n. 5, p. 1779–1791, 1997.
- FERREIRA, P. J. G. S. Interpolation and the discrete Papoulis-Gerchberg algorithm. *IEEE T. Signal. Proces.*, v. 42, n. 10, p. 2596–2606, 1994.
- FRIEDEN, B. R. Band-unlimited reconstruction of optical objects and spectra. *J. Opt. Soc. Am.*, v. 57, p. 43, 1961.
- GALATSANOS, N. P.; KATSAGGELOS, A. K. Methods for choosing the regularization parameter and estimating the noise variance in image restoration and their relation. *IEEE T. Image. Process.*, v. 1, p. 322–336, 1992.
- GAROFANO, G. J. R. et al. Application of the wavelet image analysis technique to monitor cell concentration in bioprocess. *Braz. J. Chem. Eng.*, v. 22, n. 4, p. 573–583, 2005.
- GERCHBERG, R. W. Super-resolution through error energy reduction. *Opt. Acta*, v. 21, p. 709–720, 1974.
- GIBSON, F. S.; LANNI, F. Diffraction by a circular aperture as a model for three-dimensional optical microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, v. 6, n. 9, p. 1357–1367, 1989.
- GIBSON, F. S.; LANNI, F. Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, v. 8, n. 11, p. 1601–1613, 1991.
- GIROD, B. What's wrong with mean-squared error? In: WATSON, A. B. (Ed.). *Digital Images and Human Vision*. Cambridge, USA: MIT, 1993. p. 207–220.
- GOODMAN, J. W. *Introduction to Fourier Optics*. 2. ed. Nova Iorque, EUA: McGraw Hill, 1996.
- GOPALAKRISHNAN, V. K. et al. Restoration of three dimensional microscopic images using the row action projection method. In: *IEEE Proceedings of the IV International Symposium on Circuits and Systems*. Orlando, EUA: IEEE, 1999. v. 4, p. 33–36.
- GUBIN, L. G.; POLYAK, B. T.; RAIK, E. V. The method of projection for finding the common point of convex sets. *USSR Comput. Math. and Math. Phys.*, v. 7, p. 1–24, 1967.
- HANSON, K. M. Bayesian and related methods in image reconstruction from incomplete data. In: STARK, H. (Ed.). *Image Recovery: theory and applications*. Orlando, EUA: Academic, 1987. p. 79–125.
- HARRIS, J. L. Diffraction and resolving power. *J. Opt. Soc. Am.*, v. 54, p. 931–936, 1964.
- HAYNER, D. A. et al. Algorithms and experimental results on image reconstruction from limited data. In: *Proceedings of the IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing 82*. Paris, França: IEEE, 1982. v. 7, p. 1557–1560.
- HERMANSEN, F. Nonexpansive monotonicity constraint operator for constrained iterative deconvolution. *Proc. IEEE*, v. 74, n. 2, p. 374–375, 1986.
- HIRAOKA, Y.; SEDAT, J. W.; AGARD, D. A. Determination of three-dimensional imaging properties of a light microscope system. *Biophys. J.*, v. 57, p. 325–333, 1990.

- HISIGER, S.; JOLICOEUR, M. Plant cell culture monitoring using an in situ multiwavelength fluorescence probe. *Biotechnology Prog.*, v. 21, n. 1, p. 580–589, 2005.
- HOLMES, T. J. Maximum likelihood image restoration adapted for noncoherent optical imaging. *J. Opt. Soc. Am. A*, v. 5, n. 5, p. 666–673, 1988.
- HOLMES, T. J. Expectation-maximization restoration of band-limited truncated point-process intensities with application in microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, v. 6, n. 7, p. 1006–1014, 1989.
- HOLMES, T. J.; LIU, Y. H. Richardson-lucy/maximum likelihood image restoration algorithm for fluorescence microscopy: further testing. *App. Optics*, v. 28, n. 22, p. 4930–4938, 1989.
- HOLMES, T. J.; LIU, Y. H. Acceleration of maximum-likelihood image restoration for fluorescence microscopy and other noncoherent imagery. *J. Opt. Soc. Am. A*, v. 8, p. 893–907, 1991.
- HOM, E. F. Y. et al. Aida: an adaptative image deconvolution algorithm with application to multi-frame and three-dimensional data. *J. Opt. Soc. Am. A*, v. 24, n. 6, p. 1580–1600, 2007.
- HOMEM, M. R. P. *Reconstrução Tridimensional de Imagens Com o Uso de Deconvolução a Partir de Seções Bidimensionais Obtidas em Microscopia Óptica*. Tese (Doutorado em Física Computacional) — Universidade de São Paulo - Instituto de Física de São Carlos, 2003.
- HOMEM, M. R. P. et al. Biological image restoration in optical-sectioning microscopy using prototype image constraints. *Real Time Imaging*, v. 8, p. 475–490, 2002.
- HOMEM, M. R. P.; ZORZAN, M. R.; MASCARENHAS, N. D. A. Improving the Richardson-Lucy algorithm in deconvolution microscopy through poisson noise reduction. In: *Anais em CD-Rom do III Workshop de Visão Computacional*. São José do Rio Preto, Brasil: [s.n.], 2007. (Workshop de Visão Computacional).
- HOPKINS, H. H. The frequency response of a defocused optical system. *Proc. Roy. Soc. London B*, v. 231, p. 91–103, 1955.
- HUNT, B. Super-resolution of imagery: understanding the basis for recovery of spatial frequencies beyond the diffraction limit. In: *Information, Decision and Control, 1999. IDC 99. Proceedings*. Adelaide (Australia): IEEE, 1999. p. 243–248.
- HUNT, B. R. Super-resolution of images: algorithms, principles, performance. *Int. J. Imag. Sys. Tech.*, v. 6, p. 297–304, 1995.
- INGESSON, L. C.; PICKALOV, V. V. An iterative projection-space reconstruction algorithm for tomography systems with irregular coverage. *J. Phys. D*, v. 29, p. 3009–3016, 1996.
- JAIN, A. K. *Fundamentals of Digital Image Processing*. Nova Iorque, EUA: Prentice Hall, 1989.
- JANSSON, P. A. *Deconvolution of Images and Spectra*. Nova Iorque, EUA: Academic, 1997.
- JIRÍ, J. *Medical Image Processing, Reconstruction and Restoration: concepts and methods*. Boca Raton, EUA: CRC, 2006.
- JOSHI, S.; MILLER, M. Maximum a posteriori estimation with Good's roughness for three-dimensional optical-sectioning microscopy. *J. Opt. Am. Soc. A*, v. 10, n. 5, p. 1078–1085, 1993.

KEMPEN, G. M. P. van. *Image Restoration in Fluorescence Microscopy*. Tese (Doutorado) — Delft University of Technology, Jan 1999.

KEMPEN, G. M. P. van; VLIET, L. J. van. The influence of the background estimation on the superresolution properties of non-linear image restoration algorithms. In: CABIB, D. et al. (Ed.). *Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing VI*. San Jose, EUA: SPIE, 1999. (Progress in Biomedical Optics, v. 3605), p. 179–189.

KEMPEN, G. M. P. van; VLIET, L. J. van. Background estimation in nonlinear image restoration. *J. Opt. Soc. Am. A*, v. 17, n. 3, p. 425–433, 2000.

KEMPEN, G. M. P. van; VLIET, L. J. van. The influence of the regularization parameter and the first estimate on the performance of tikhonov regularized non-linear image restoration algorithms. *J. Microscopy*, v. 198, n. 1, p. 63–75, 2000.

KEMPEN, G. M. P. van; VLIET, L. J. van; VERVEER, P. J. Application of image restoration methods for confocal fluorescence microscopy. In: COGSWELL, C.; CONCHELLO, J.-A.; WILSON, T. (Ed.). *Three-Dimensional Microscopy: image acquisition and processing IV*. San Jose, EUA: SPIE, 1997. v. 2984, p. 114–124.

KEMPEN, G. M. P. van; VLIET, L. J. van; VERVEER, P. J. Improving the restoration of textured objects with prefiltering. In: BAL, H. et al. (Ed.). *Proc. 3rd Annual Conference of the Advanced School for Computing and Imaging*. Heijen, Holanda: ASCI, Delft, 1997. p. 174–179.

KIMURA, E. et al. Monitoring apoptosis with fluorescent Zn²⁺ indicators. *Science STKE*, v. 223, p. 1–18, 2004.

LAGENDJIK, R. L.; BIEMOND, J. *Iterative Identification and Restoration of Images*. Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic, 1991.

LANTÉRI, H. et al. Ringing reduction in image restoration algorithms using a constraint on the inferior bound of the solution. *Signal Processing*, v. 82, p. 1482–1504, 2002.

LEISERSON, C. E. et al. *Algoritmos: teoria e prática*. São Paulo, Brasil: Campus, 2002.

LUCY, L. B. An iterative technique for the rectification of observed distributions. *The Astronomical Journal*, v. 79, n. 6, p. 745–765, 1974.

LYON, R. F. *Wave diffraction simulation*. 2007. (Imagem PNG). Acesso em: 28/04/2008. Disponível em: <<http://www.dicklyon.com/phototech/>>.

MARKHAM, J.; CONCHELLO, J.-A. Fast maximum-likelihood image-restoration algorithms for three-dimensional fluorescence microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, v. 18, n. 5, p. 1062–1071, 2001.

MARQUES, M. et al. The Papoulis-Gerchberg algorithm with unknown signal bandwidth. In: CAMPILHO, A. C.; KAMEL, M. S. (Ed.). *3rd International Conference on Image Analysis and Recognition (1)*. Póvoa de Varzim, Portugal: Springer, 2006. (Lecture Notes in Computer Science, v. 4141), p. 436–445. ISBN 3-540-44891-8.

MCNALLY, J. G. et al. Artifacts in computational optical-sectioning microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, v. 11, n. 3, p. 1056–1067, 1994.

- MILLER, K. Least squares methods for ill-posed problems with a prescribed bound. *SIAM J. Math. Anal.*, v. 1, n. 1, p. 52–74, 1970.
- MONVEL, J. de et al. Image-adaptative deconvolution for three-dimensional deep biological imaging. *Biophys. J.*, v. 85, p. 3991–4001, 2003.
- OLYMPUS-AMERICA. *Olympus Microscopy Resource Center*. 2008. Acesso em: 22/04/2008. Disponível em: <<http://www.olympusmicro.com>>.
- PAPA, J. P. et al. Convex restriction sets for CBERS-2 satellite image restoration. *Int. J. Remote Sens.*, v. 29, n. 2, p. 443–458, 2008.
- PAPOULIS, A. A new algorithm in spectral analysis and band-limited extrapolation. *IEEE T. Circuits. Syst.*, v. 22, n. 9, p. 735–742, 1975.
- PHILLIPS, D. L. A technique for the numerical solution of certain integral equations of the first kind. *J. Assoc. Comput. Mach.*, v. 9, p. 84–97, 1962.
- PITAS, I. *Digital Image Processing Algorithms and Applications*. Nova Iorque, EUA: John Wiley & Sons, 2000.
- PONTI-JUNIOR, M. P.; MASCARENHAS, N. D. A.; SUAZO, C. A. T. A restoration and extrapolation iterative method for band-limited fluorescence microscopy images. In: *IEEE Proceedings of 20th Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing*. Belo Horizonte, Brasil: IEEE, 2007. p. 271–280.
- PONTI-JUNIOR, M. P. et al. Deconvolution of 3D fluorescence microscopy images by combining the filtered Gerchberg-Papoulis and Richardson-Lucy algorithms. In: *Anais do IV Workshop de Visão Computacional*. Bauru, SP, Brasil: [s.n.], 2008.
- PREZA, C.; MILLER, M. I.; CONCHELLO, J.-A. Image reconstruction for 3-D light microscopy with a regularized linear method incorporating a smoothness prior. In: ACHARYA, R.; GOLDBOF, D. (Ed.). *Proceedings of the IS&T/SPIE symposium on Electronic Imaging, Science and Technology, Biomedical Image Processing and Biomedical Visualization*. San Jose, EUA: SPIE, 1993. v. 1905, p. 129–139.
- REEVES, S. J. Fast image restoration without boundary artifacts. *IEEE T. Image. Process.*, v. 14, n. 10, p. 1448–1453, 2005.
- RESTREPO, A.; CHACON, L. A smoothing property of the median filter. *IEEE T. Signal. Proces.*, v. 42, n. 6, p. 1553–1555, jun. 1994.
- RICHARDSON, W. H. Bayesian-based iterative method of image restoration. *J. Opt. Soc. Am.*, v. 62, n. 1, p. 55–59, 1972.
- RUDIN, L. I.; OSHER, S.; FATEMI, E. Nonlinear total variation based noise removal algorithms. *Physica D*, v. 60, p. 259–268, 1992.
- RUSHFORTH, C. K.; HARRIS, R. W. Restoration, resolution and noise. *J. Opt. Soc. Am.*, v. 58, p. 539–545, 1968.
- SABATIER, P. C. Past and future of inverse problems. *J. Math. Physics*, v. 41, n. 6, p. 4082–4124, 2000.

- SARDER, P.; NEHORAI, A. Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images. *Signal Processing Magazine*, v. 23, n. 3, p. 32–45, 2006.
- SEMENTILLI, P.; HUNT, B.; NADAR, M. Analysis of the limit to super-resolution in incoherent imaging. *J. Opt. Soc. Am. A*, v. 10, n. 11, p. 2265–2276, 1993.
- SEZAN, M. I.; STARK, H. Image restoration by the method of convex projection: part 2 - applications and numerical results. *IEEE T. Med. Imaging.*, MI-1, p. 95–101, 1982.
- SEZAN, M. I.; TRUSSEL, H. J. Prototype image constraints for set-theoretic image restoration. *IEEE T. Signal. Proces.*, v. 30, p. 2275–2285, 1991.
- SHAFER, R. W.; MERSEREAU, R. M.; RICHARDS, M. A. Constrained iterative restoration algorithms. *Proc. IEEE*, v. 69, n. 4, p. 432–450, 1981.
- SHEPP, L. A.; VARDI, Y. Maximum likelihood reconstruction for emission tomography. *IEEE T. Med. Imaging.*, MI-1, p. 113–121, 1982.
- SHEPPARD, C. J. R.; GU, M. Approximation to the three-dimensional optical transfer function. *J. Opt. Soc. Am. A.*, v. 8, p. 692–694, 1991.
- SLAVIK, J. *Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology*. Boca Raton, EUA: CRC, 1993.
- SLEPIAN, O.; POLLAK, H. O. Prolate spheroidal wave function, Fourier analysis and uncertainty. *Bell Sys. Tech. J.*, v. 40, p. 43, 1961.
- SNYDER, D. L.; MILLER, M. I. *Random Point Processes in Time and Space*. Nova Iorque, EUA: Springer Verlag, 1991.
- SONG, L. et al. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.*, v. 68, p. 2588–2600, 1995.
- STARK, H.; YANG, Y. *Vector Space Projections*. Nova Iorque, EUA: John Wiley & Sons, 1998.
- TARANTOLA, A. *Inverse Problem Theory*. Filadélfia, EUA: Society for Industrial and Applied Mathematics, 2005. ISBN 0-89871-572-5.
- TIKHONOV, A. N. Solution of incorrectly formulated problems and the regularization method. *Soviet. Math. Dokl.*, v. 4, p. 1035–1038, 1963. Tradução de artigo de mesmo autor e título em: *Dokl Akad Nauk SSSR* 151, 1963, 501-504.
- TIKHONOV, A. N.; ARSEININ, V. A. *Solution of Ill-posed Problems*. Washington (EUA): Winston & Sons, 1977.
- VERVEER, P. J. *Computational and Optical Methods for Improving Resolution and Signal Quality in Fluorescence Microscopy*. Tese (Doutorado) — Delft University of Technology, Dec 2001.
- VLIET, L. J. van et al. Image detectors for digital image microscopy. In: WILKINSON, M.; SCHUT, F. (Ed.). *Digital Image Analysis of Microbes: imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications. Modern Microbiological Methods*. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons, 1998. p. 37–64.

WANG, Z.; BOVIK, A. C. A universal image quality index. *IEEE Signal. Proc. Let.*, v. 9, n. 3, p. 81–84, 2002.

WANG, Z.; BOVIK, A. C.; LIGANG-LU. Why is image quality assessment so difficult? In: *Proceedings of the IEEE Internatinal Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP'02)*. Orlando, EUA: IEEE, 2002. v. 4, p. 3313–3316.

WEHRY, E. L.; ROGERS, L. B. Fluorescence and phosphorescence of organic molecules. In: _____. *Fluorescence and Phosphorescence Analysis*. Nova Iorque, EUA: John Wiley & Sons, 1966. cap. 3.

WILLIS, B. et al. Iterative, constrained 3-D image reconstruction of transmitted light bright-field micrographs based on maximum likelihood estimation. *J. Microscopy*, v. 169, p. 347–361, 1993.

WU, Q.; MERCHANT, F. A.; CASTLEMAN, K. R. *Microscope Image Processing*. San Diego, EUA: Academic, 2008.

XCOSM. *X-Windows interface to Computational Optical Sectioning Microscopy*. 2000. Acesso em: 18/07/2008. Disponível em: <<http://www.essrl.wustl.edu/preza/xcosm>>.

YOULA, D. C. Generalized image restoration by the method of alternating orthogonal projections. *IEEE T. Circuits. Syst.*, v. 25, p. 694–702, 1978.

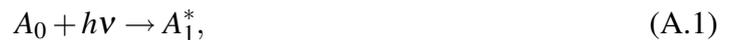
YOULA, D. C.; WEBB, H. Image restoration by the method of convex projections: part 1 - theory. *IEEE T. Med. Imaging.*, MI-1, p. 81–94, 1982.

APÊNDICE A – Fluorescência

A.1 Processo de Fluorescência

A fluorescência ocorre quando uma molécula A passa para um estado fundamental¹, após estar eletronicamente excitada.

Fase de Excitação:



Fase de Fluorescência (emissão):



onde, h é a constante de Plank e ν é a frequência da luz.

O estado A_0 é chamado estado fundamental da molécula fluorescente e o estado A_1^* é chamado primeiro estado de excitação (eletrônica).

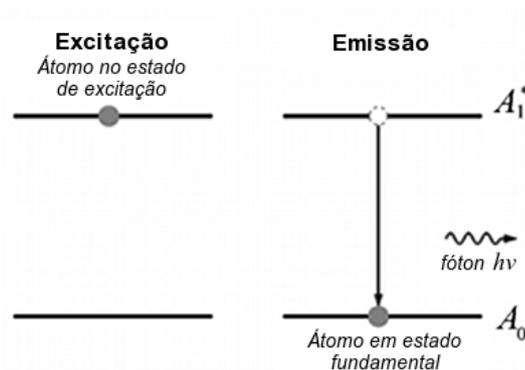


Figura A.1: Mudança de estado de um átomo com emissão de fóton

Uma molécula em seu estado de excitação pode ir ao estado fundamental por dissipação da energia em calor, fosforescência ou ambos. Ainda, é possível que ocorra por interação com uma segunda molécula pelo processo de *quenching of fluorescence*, que realiza a diminuição

¹Estado de quantidade de mínima energia de uma dada partícula ou sistema

da emissão de fluorescência. Quando há presença desta segunda molécula, que chamaremos de Q , a fase de fluorescência passa por duas etapas: primeiro a molécula fluorescente A transfere energia para a molécula Q ; em seguida Q retorna para o seu estado fundamental, e emite luz em comprimento de onda diferente da molécula original ou não emite luz (WEHRY; ROGERS, 1966).



onde A é o fluorocromo e Q é a molécula responsável pela diminuição da fluorescência (*quenching*).

A.2 Eficiência e Tempo de Vida do Processo de Fluorescência

A eficiência é dada pelo rendimento quântico da fluorescência. Pode ser definida como a razão do número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos. De forma simplificada:

$$\Phi = \frac{k_0}{k_A}, \quad (\text{A.5})$$

onde k_0 é o número de fótons emitidos e k_A o número de fótons absorvidos.

Os valores para o rendimento quântico da fluorescência variam entre 0.0 (0%) — quando não há emissão — e 1.0 (100%) — quando cada fóton absorvido resulta em um fóton emitido. Compostos com rendimentos quânticos da ordem de 0.1 são ainda considerados fluorescentes.

O tempo de vida da fluorescência refere-se ao decaimento da intensidade da fluorescência após um curto pulso de excitação:

$$F = F_0 \cdot \exp(-t/\tau). \quad (\text{A.6})$$

onde F_0 é a concentração inicial após a excitação e t é a variável de tempo. No caso mais simples, o decaimento é exponencial, com τ constante.

APÊNDICE B – Detalhes dos Algoritmos de Restauração

Este apêndice apresenta detalhes da derivação dos algoritmos de restauração de interesse deste trabalho, a título de complementar o texto. Alguns detalhes e passos adicionais foram inseridos nas derivações com o intuito de facilitar a compreensão.

B.1 Derivação do Algoritmo Richardson-Lucy (RL)

Nesta seção será apresentada a derivação do algoritmo de Richardson-Lucy com base nos trabalhos de Shepp e Vardi (1982) e Jansson (1997).

Sendo o objetivo obter a imagem f a dada a observação g e do conhecimento do modelo de formação da imagem (Equação 2.5), a partir da log-verossimilhança assumindo distribuição de Poisson (como visto na seção 3.1.2) um funcional a ser minimizado pode ser definido como:

$$L_1(f) = \int_{\mathbf{x}} [(h * f) - g \cdot \log(h * f)] d\mathbf{x}, \quad (\text{B.1})$$

equação que aqui repetimos com a intenção de facilitar a leitura.

Uma maneira de resolver o problema de minimização do funcional da equação B.1 é inserir uma perturbação, que será denominada ρs , onde s é a função de perturbação e ρ é um parâmetro escalar. O objetivo é escrever o problema de modo a simplificá-lo a encontrar o parâmetro scalar ρ que minimiza a função, ao invés da função f . Desta forma, o funcional é descrito por:

$$L_1(f + \rho s) = \int_{\mathbf{x}} [h * (f + \rho s) - g \cdot \log(h * (f + \rho s))] d\mathbf{x}. \quad (\text{B.2})$$

Colocando o termo $h * f$ em evidência, obtém-se:

$$L_1(f + \rho s) = \int_{\mathbf{x}} \left[(h * f) + \rho (h * s) - g \cdot \log \left[(h * f) \cdot \left(1 + \rho \frac{(h * s)}{(h * f)} \right) \right] \right] d\mathbf{x} \quad (\text{B.3})$$

Sendo $(h * f) \gg \rho(h * s)$, simplifica-se a equação para:

$$\begin{aligned} L_1(f + \rho s) &\approx \int_{\mathbf{x}} \left[(h * f) + \rho(f * s) - g \cdot \log(h * f) - \rho g \frac{(h * s)}{(h * f)} \right] d\mathbf{x} \\ &= L_1(o) + \rho \int_{\mathbf{x}} \left[(h * s) - g \frac{(h * s)}{(h * f)} \right] d\mathbf{x}. \end{aligned} \quad (\text{B.4})$$

A solução será procurada pelo cálculo de $\nabla L_1 = 0$. Definindo o produto escalar $\langle f, g \rangle = \int_{\mathbf{x}} (f \cdot g)(\mathbf{x}) d\mathbf{x}$, e usando diferenciação em L_1 :

$$\left\langle \frac{\partial L_1}{\partial f}(f), \rho s \right\rangle = \lim_{\rho \rightarrow f^+} \frac{L_1(f + \rho s) - L_1(f)}{\rho}, \quad (\text{B.5})$$

o que simplifica o problema para a minimização do funcional em termos do parâmetro ρ . Expressando o segundo termo da equação B.5 como um produto escalar:

$$\begin{aligned} \int_{\mathbf{x}} \left[(h * s) - g \frac{(h * s)}{(h * f)} \right] d\mathbf{x} &= \langle 1, (s * h) \rangle - \left\langle \frac{g}{(h * f)}, (h * s) \right\rangle \\ &= \langle h^*, s \rangle - \left\langle \frac{g}{(h * f)} * h^*, s \right\rangle \\ &= \int_{\mathbf{x}} s \left[h^* - h^* * \left(g \frac{1}{(h * f)} \right) \right] d\mathbf{x}, \end{aligned} \quad (\text{B.6})$$

onde h^* é o adjunto do operador h . Para a PSF h , existe a relação $h^*(\mathbf{x}) = h(-\mathbf{x})$. Desta forma $\nabla_f L_1 = \frac{\partial J_1}{\partial f}$ será representado como:

$$\nabla_f L_1(f) = h(-\mathbf{x}) * \left[1 - \frac{g(\mathbf{x})}{h(\mathbf{x}) * f(\mathbf{x})} \right] \quad (\text{B.7})$$

Minimizando a equação B.7 resolvendo $\nabla J_1(f) = 0$:

$$\int_{\mathbf{x}} h(-\mathbf{x}) d\mathbf{x} - h(-\mathbf{x}) * \frac{g(\mathbf{x})}{h(\mathbf{x}) * f(\mathbf{x})} = 0. \quad (\text{B.8})$$

Uma prática comum em ótica é trabalhar com a PSF normalizada — cuja soma dos elementos seja unitária, ou seja, $\int_{\mathbf{x}} h(-\mathbf{x}) d\mathbf{x} = 1$, de forma que a equação B.8 pode ser reescrita:

$$h(-\mathbf{x}) * \frac{g(\mathbf{x})}{h(\mathbf{x}) * f(\mathbf{x})} = 1. \quad (\text{B.9})$$

A partir da equação B.9, um algoritmo iterativo pode ser definido, se consideramos que a convergência se dá na forma $\frac{f_{n+1}(\mathbf{x})}{f_n(\mathbf{x})} = 1$. Assim, um algoritmo multiplicativo, adequado a dados modelados por distribuição de Poisson, pode ser escrito na forma:

$$f_{n+1}(\mathbf{x}) = f_n(\mathbf{x}) \cdot \left[h(-\mathbf{x}) * \frac{g(\mathbf{x})}{h(\mathbf{x}) * f_n(\mathbf{x})} \right], \quad (\text{B.10})$$

B.2 Derivação do Algoritmo Richardson-Lucy com Regularização Tikhonov-Miller (RLTM)

Nesta seção será apresentada a derivação do algoritmo de Richardson-Lucy com base no trabalho de Dey et al. (2004a). Neste algoritmo, a regularização é colocada em termos de um modelo *a priori*, o que passa o problema de maximizar a probabilidade *a posteriori* ao invés de buscar pela máxima verossimilhança. Assim, o modelo *a priori* do objeto pode ser escrito como:

$$p_R(f) = N_R e^{-\lambda_R \int_{\mathbf{x}} |\nabla f(\mathbf{x})|^2 d\mathbf{x}}, \quad (\text{B.11})$$

onde λ_R é o parâmetro de regularização e N_R uma constante de normalização para a probabilidade. É possível ver a semelhança com a equação 3.16 que adiciona a norma de f como regularizador na minimização. Seguindo a abordagem probabilística, e a partir do funcional da equação 3.14, adicionando o modelo do objeto, definimos o funcional a ser minimizado:

$$\begin{aligned} L_R(f) &= L_1(f) && + L_2(f) \\ L_R(f) &= \int_{\mathbf{x}} [(h * f) - g \cdot \log(h * f)] d\mathbf{x} && + \int_{\mathbf{x}} |\nabla f|^2 d\mathbf{x}. \end{aligned} \quad (\text{B.12})$$

A derivada do primeiro termo já foi definida na equação B.9, e assim, pelo mesmo método, minimizamos o termo de regularização $L_R(f)$ na forma:

$$\begin{aligned} L_2(f + \rho s) &= \int_{\mathbf{x}} |\nabla(f + \rho s)|^2 d\mathbf{x} \\ &\approx \int_{\mathbf{x}} |\nabla(f)|^2 d\mathbf{x} + 2\rho \int_{\mathbf{x}} (\nabla f \nabla s) d\mathbf{x} \\ &= L_2(f) + 2\rho \langle \nabla f, \nabla s \rangle \\ &= L_2(f) + 2\rho \langle \nabla^* \nabla f, s \rangle \\ &= L_2(f) - 2\rho \langle \Delta f, s \rangle \end{aligned} \quad (\text{B.13})$$

onde o operador Δ representa o Laplaciano, sendo $\Delta = -\nabla^* \nabla$ e, assim:

$$\Delta f = \frac{\partial^2 f}{\partial^2 x} + \frac{\partial^2 f}{\partial^2 y} + \frac{\partial^2 f}{\partial^2 z}. \quad (\text{B.14})$$

Aplicando a mesma equação como na seção B.1, por meio do cálculo de $L_R(f) = 0$ podemos definir o funcional minimizado em relação a f como:

$$\int_{\mathbf{x}} h(-\mathbf{x}) d\mathbf{x} - h(-\mathbf{x}) * \frac{g(\mathbf{x})}{h(\mathbf{x}) * f(\mathbf{x})} - 2\lambda_R \Delta f d\mathbf{x} = 0. \quad (\text{B.15})$$

O algoritmo regularizado RLTM (Richardson-Lucy Tikhonov-Miller), para o resultado da equação B.15, assim como para o algoritmo obtido anteriormente na seção B.1, será:

$$f_{n+1}^R(\mathbf{x}) = f_n(\mathbf{x}) \cdot \left[h(-\mathbf{x}) * \frac{g(\mathbf{x})}{h(\mathbf{x}) * f_n(\mathbf{x})} \right] \cdot \frac{f_n(\mathbf{x})}{1 + 2\lambda_R \Delta f_n(\mathbf{x})}. \quad (\text{B.16})$$

B.3 Derivação do Algoritmo Richardson-Lucy com Regularização Total Variaton (RLTV)

Nesta seção será apresentada a derivação do algoritmo de Richardson-Lucy com base nos trabalhos de Rudin, Osher e Fatemi (1992) e Dey et al. (2004a).

A regularização Total Variation utiliza um termo baseado na norma l^1 ao invés da norma l^2 da regularização de Tikhonov-Miller. Utilizando este modelo, o funcional a minimizar, conforme a seção 3.2.2 é escrito (DOBSON; VOGEL, 1997):

$$\begin{aligned} L_{RTV}(f) &= L_1(f) && + L_3(f) \\ L_{RTV}(f) &= \int_{\mathbf{x}} [(h * f) - g \cdot \log(h * f)] d\mathbf{x} && + \int_{\mathbf{x}} \sqrt{|\nabla f|^2 + \beta^2} d\mathbf{x}, \end{aligned} \quad (\text{B.17})$$

Por meio da adição de uma pequena perturbação a f , que novamente será denominada por ρs , têm-se:

$$\begin{aligned} L_3(f + \rho s) &= \int_{\mathbf{x}} \sqrt{(\nabla f)^2 + \rho^2 (\nabla s)^2 + 2\rho \nabla f \nabla s + \beta^2} d\mathbf{x} \\ &\approx \int_{\mathbf{x}} \sqrt{(\nabla f)^2 + \beta^2} \cdot \sqrt{1 + 2\rho \frac{\nabla f \nabla s}{(\nabla f)^2 + \beta^2}} \\ &\approx L_3(f) + \rho \int_{\mathbf{x}} \frac{\nabla f}{\sqrt{(\nabla f)^2 + \beta^2}} \nabla s d\mathbf{x} \\ &\approx L_3(f) + \rho \int_{\mathbf{x}} \frac{\nabla f}{|\nabla f|} \nabla s d\mathbf{x} \\ &= L_3(f) + \rho \left\langle \frac{\nabla f}{|\nabla f|}, \nabla s \right\rangle \\ &= L_3(f) + \rho \left\langle \nabla^* \frac{\nabla f}{|\nabla f|}, s \right\rangle \\ &= L_3(f) - \rho \int_{\mathbf{x}} \text{div} \left(\frac{\nabla f}{|\nabla f|} \right) s d\mathbf{x}. \end{aligned} \quad (\text{B.18})$$

na segunda aproximação acima foi considerada a relação $\sqrt{1 + \varepsilon} \approx 1 + \varepsilon/2$ para a hipótese de ε ser pequeno. Ainda, no último passo acima foi considerado que $\Delta^* = -\text{div}$. Seguindo a minimização do funcional utilizada nas equações B.8 e B.15, tem-se:

$$\int_{\mathbf{x}} h(-\mathbf{x}) d\mathbf{x} - h(-\mathbf{x}) * \frac{g(\mathbf{x})}{h(\mathbf{x}) * f(\mathbf{x})} - \lambda_{RTV} \text{div} \left(\frac{\nabla f}{|\nabla f|} \right) d\mathbf{x} = 0. \quad (\text{B.19})$$

Aqui, o parâmetro λ_{RTV} deverá ser definido arbitrariamente como discutido na seção 3.2.

O algoritmo regularizado RLTV (Richardson-Lucy Total Variation), derivado do funcional minimizado é:

$$f_{n+1}^{RTV}(\mathbf{x}) = f_n(\mathbf{x}) \cdot \left[h(-\mathbf{x}) * \frac{g(\mathbf{x})}{h(\mathbf{x}) * f_n(\mathbf{x})} \right] \cdot \frac{f_n(\mathbf{x})}{1 - \lambda_{RTV} \operatorname{div} \left(\frac{\nabla f}{|\nabla f|} \right)}, \quad (\text{B.20})$$

onde $\operatorname{div}()$ é o divergente. O Apêndice C mostra como é feita a discretização deste operador para implementação.

APÊNDICE C – Aspectos Computacionais

C.1 Convolução Linear no Domínio da Frequência

A operação de convolução é muito utilizada nos métodos de restauração de imagens. Em se tratando de uma operação de alto custo computacional, é comum o uso das propriedades do teorema da convolução da Transformada de Fourier para realizar a convolução no domínio da frequência. Este teorema valida a seguinte igualdade:

$$h(t) * g(t) = \mathfrak{F}^{-1} \{H(u) \cdot G(u)\}, \quad (\text{C.1})$$

onde $*$ representa uma convolução, h e g são sinais no domínio do espaço e suas respectivas maiúsculas representam suas transformadas de Fourier. Assim, um problema de convolução se reduz a um produto. Devido à existência de algoritmos otimizados de FFT (*Fast Fourier Transform* — Transformada Rápida de Fourier) e sua inversa IFFT (*Inverse Fast Fourier Transform* — Transformada Rápida de Fourier Inversa), é muito conveniente o uso destas técnicas para realizar convolução. No entanto, grande parte dos algoritmos são baseados na convolução linear, enquanto, na prática, a convolução realizada pelo procedimento acima é uma convolução circular. Por consequência, os resultados obtidos por meio do uso destes algoritmos podem não ser satisfatórios. O erro decorrente é conhecido como *wrap-around error*. Uma exceção a ser considerada é quando os sinais g e h possuem dados em regiões suficientemente pequenas em seu suporte, caso em que a convolução pode ser considerada aproximadamente linear, sendo o *wrap-around error* anulado.

Alguns procedimentos podem ser realizados de forma a garantir que convolução no domínio da frequência seja linear. O procedimento mais comum é o preenchimento por zeros (*zeropadding*), que simula o caso de sinais com regiões nulas (BOVIK, 2005). Assim, seja uma imagem g de tamanho $N \times M \times O$ e uma PSF h de tamanho $P \times Q \times R$, ambas g e h deverão ter seus suportes estendidos com preenchimento por zeros de forma que tenham tamanho $(N+P+1) \times (M+Q+1) \times (O+R+1)$, obtendo g' e h' , cuja convolução no domínio da frequência poderá ser

considerada como linear. Dependendo do tamanho do suporte da PSF esta operação pode gerar imagens de tamanho muito grande, inviabilizando este tipo de operação.

C.1.1 Artefatos de Borda

Mudanças abruptas nas intensidades da imagem podem produzir artefatos de borda quando esta imagem é submetida a algoritmos de restauração. Autores estudaram este assunto para aplicação em imagens, e sugerindo soluções para lidar com este problema (REEVES, 2005; AGHDASI; WARD, 1996). Para o uso de filtros e convoluções no domínio da frequência em imagem, como vimos, o preenchimento com zeros é uma das soluções aceitas. No entanto, os autores acima citados sugeriram outros métodos, dentre os quais podemos destacar:

1. **Suavização das regiões de borda:** é realizada extensão da imagem por um número arbitrário de pixels em todas as direções, copiando as intensidades originais da imagem, seguido pelo preenchimento com zeros; a região estendida é filtrada usando funções Gaussianas, por exemplo, para suavizar a transição entre as intensidades da imagem e a região truncada,
2. **Interpolação das regiões de borda:** após o preenchimento com zeros, realiza interpolação em região arbitrária, partindo da borda da imagem até os valores nulos da região truncada,
3. **Espelhamento:** extensão da imagem usando as intensidades da própria imagem, criando uma versão espelhada da imagem.

A Figura C.1 ilustra a aplicação dos métodos citados. Observe que para os métodos de interpolação e suavização a região com valores além do suporte da imagem é arbitrária sendo, no caso deste exemplo, definida como 15% do tamanho total em cada direção. É importante observar ainda que, para todos os métodos acima, a PSF deverá ser estendida e preenchida com zeros de forma a possuir a mesma dimensão das imagens.

Segundo Aghdasi e Ward (1996), o método do espelhamento é superior em resultados e em velocidade para aplicações em restauração de imagens, ainda que seja baseado na convolução circular, pois o preenchimento com zeros ocasiona o aparecimento de artefatos de borda que degradam a imagem. Observamos os mesmos resultados do autor e ainda ligeira diferença entre os três outros métodos, sendo o de preenchimento com zeros o método menos adequado, devido aos artefatos que surgem particularmente quando usado em algoritmos iterativos.

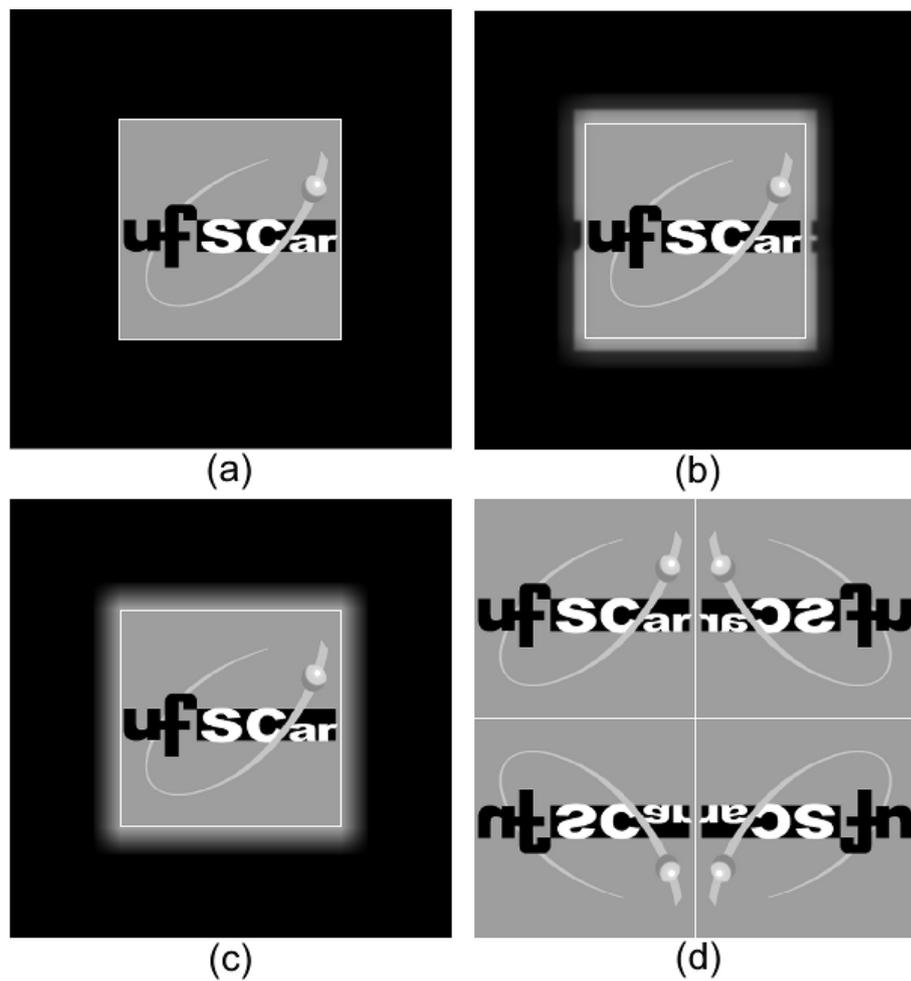


Figura C.1: Ilustração dos métodos de redução de artefatos em algoritmos baseados na convolução no domínio da frequência: preenchimento com zeros (a), suavização (b), interpolação (c), e espelhamento (d) — as linhas brancas indicam a região de suporte da imagem original.

C.2 Discretização dos Operadores

C.2.1 Algoritmo de Regularização Total Variation

Os operadores definidos no algoritmo LRTV são contínuos e, desta forma, é necessário definir sua forma discreta, que permita a implementação. A forma contínua do funcional apresentado, no caso 3D, aqui chamado de a é dada por:

$$L_{RTV}(a) = \lambda_{RTV} \int_{\mathbf{x}} |\nabla a| d\mathbf{x}. \quad (\text{C.2})$$

Usando a norma l^2 expandimos o termo para:

$$L_{RTV}(a) = \lambda_{RTV} \int_x \int_y \int_z \sqrt{a_x^2 + a_y^2 + a_z^2} dx dy dz, \quad (\text{C.3})$$

cuja derivada é:

$$\frac{\partial L_{RTV}}{\partial a}(a) = -\operatorname{div} \left(\frac{\nabla a}{|\nabla a|} \right). \quad (\text{C.4})$$

O trabalho de Rudin, Osher e Fatemi (1992) definem a forma do operador $\operatorname{div} \left(\frac{\nabla a}{|\nabla a|} \right)$ como sendo:

$$\begin{aligned} \operatorname{div} \left(\frac{\nabla a}{|\nabla a|} \right) &= \frac{1}{p_x} \Delta_x^- \frac{\Delta_+^x a_{ijk}}{\sqrt{(\Delta_+^x a_{ijk})^2 + m(\Delta_+^y a_{ijk}, \Delta_-^y a_{ijk})^2 + m(\Delta_+^z a_{ijk}, \Delta_-^z a_{ijk})^2}} \\ &+ \frac{1}{p_y} \Delta_y^- \frac{\Delta_+^y a_{ijk}}{\sqrt{(\Delta_+^y a_{ijk})^2 + m(\Delta_+^z a_{ijk}, \Delta_-^z a_{ijk})^2 + m(\Delta_+^x a_{ijk}, \Delta_-^x a_{ijk})^2}} \\ &+ \frac{1}{p_z} \Delta_z^- \frac{\Delta_+^z a_{ijk}}{\sqrt{(\Delta_+^z a_{ijk})^2 + m(\Delta_+^x a_{ijk}, \Delta_-^x a_{ijk})^2 + m(\Delta_+^y a_{ijk}, \Delta_-^y a_{ijk})^2}} \end{aligned} \quad (\text{C.5})$$

As variáveis p_x, p_y, p_z representam o tamanho das dimensões de um voxel, o que significa o tamanho do passo no algoritmo de diferenciação para cada direção. Podem ser escolhidos, por exemplo, como sendo 1 ou $1/N_x$, onde N_x é a dimensão da imagem no plano ($x - y$). Em geral $p_x = p_y$, no entanto $p_x \neq p_z$ e, portanto, o valor é geralmente diferente nas direções radial e axial.

As derivadas são definidas como:

$$\begin{aligned}
\Delta_+^x a_{ijk} &= \frac{1}{p_x} (a_{(i+1)jk} - a_{ijk}) \\
\Delta_-^x a_{ijk} &= \frac{1}{p_x} (a_{ijk} - a_{(i-1)jk}) \\
\Delta_+^y a_{ijk} &= \frac{1}{p_y} (a_{i(j+1)k} - a_{ijk}) \\
\Delta_-^y a_{ijk} &= \frac{1}{p_y} (a_{ijk} - a_{i(j-1)k}) \\
\Delta_+^z a_{ijk} &= \frac{1}{p_z} (a_{ij(k+1)} - a_{ijk}) \\
\Delta_-^z a_{ijk} &= \frac{1}{p_z} (a_{ijk} - a_{ij(k-1)})
\end{aligned} \tag{C.6}$$

As funções do tipo $m(b, c)$, são definidas como sugerido por Dey et al. (2006):

$$m(b, c) = \frac{\text{sinal}(b) + \text{sinal}(c)}{2} \min[|b|, |c|] \tag{C.7}$$

onde a função $\text{sinal}()$ retorna -1 para escalares negativos, $+1$ para escalares positivos e 0 para escalares nulos. Esta função resulta em 0 se b e c possuírem sinais opostos. Assim, $\Delta_{\pm}^{x,y,z} a_{ijk} = 0$ quando $\Delta_-^{x,y,z} a_{ijk}$ e $\Delta_+^{x,y,z} a_{ijk}$ possuem sinais diferentes.

As derivadas parciais dos limites no caso contínuo: $\frac{\partial f}{\partial x} = 0$, $\frac{\partial f}{\partial y} = 0$ e $\frac{\partial f}{\partial z} = 0$, para o funcional discreto tornam-se:

$$\begin{aligned}
a_{(0)jk} &= a_{(1)jk} & a_{(N_x+1)jk} &= a_{(N_x)jk} \\
a_{i(0)k} &= a_{i(1)k} & a_{i(N_y+1)k} &= a_{i(N_y)k} \\
a_{ij(0)} &= a_{ij(0)} & a_{ij(N_z+1)} &= a_{ij(N_z)}
\end{aligned} \tag{C.8}$$

Estas aproximações foram definidas para a implementação de todos os algoritmos referentes ao uso da regularização Total Variation.