

# Estabilização de imagens de vídeo de microscopia intravital aplicado à detecção e rastreamento automático de leucócitos

Bruno C. G. Silva<sup>1</sup>, Paulo G. Freire<sup>2</sup>, Danielle Bernardes<sup>3</sup>, Juliana C. Tavares<sup>3</sup>,  
Rodrigo F. Mello<sup>1</sup>, Ricardo J. Ferrari<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação (ICMC)  
Universidade de São Paulo (USP) – São Carlos, SP – Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Computação – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)  
São Carlos, SP – Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Fisiologia e Biofísica – Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Belo Horizonte, MG – Brasil

rferrari@dc.ufscar.br

**Abstract.** *The automatic detection and tracking of leukocytes in intravital video microscopy can help researchers in developing more effective therapeutic strategies. However, one problem with the in vivo analysis is the movement from the breathing of the animal, which makes it difficult to track due to momentary loss of focus of the vessels, causing distortion and blurr to the images. Therefore, this paper proposes a multiresolution technique for the stabilization of intravital microscopy images based on the registration of the video frames.*

**Resumo.** *A detecção e o rastreamento automáticos de leucócitos em imagens de vídeo de microscopia intravital podem auxiliar pesquisadores no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes. Entretanto, um dos problemas com análises in vivo é o movimento proveniente da respiração do animal, o qual dificulta o rastreamento de leucócitos devido à perda momentânea do foco dos vasos, ocasionando distorção e borramento nas imagens. Portanto, este trabalho propõe uma técnica multiresolução para a estabilização das imagens de microscopia intravital baseada no co-registro dos quadros do vídeo.*

## 1. Introdução

A microscopia intravital é uma ferramenta importante no estudo dos mecanismos celulares e moleculares das interações leucócito-endotélio na microcirculação dos mais diversos tecidos e em várias condições inflamatórias. A análise das imagens, em geral realizada visualmente, permite a contagem e a avaliação dos leucócitos rolantes e aderidos nas paredes dos vasos sanguíneos. No entanto, a análise visual é um trabalho repetitivo, consome muito tempo e, dependendo do grau de resposta inflamatória, a precisão das medições pode ser significativamente afetada devido à fadiga visual do observador.

Um dos maiores desafios no desenvolvimento de métodos automáticos em microscopia intravital é a estabilização dos movimentos do vídeo, ocasionado principalmente pela respiração do animal. Tal movimento ocasiona mudanças momentâneas no plano focal do microscópio e, conseqüentemente, gera borramentos e distorções nas imagens. Apenas alguns poucos trabalhos apresentados na literatura tratam desse problema

[Acton and Goobic 2005]. Acredita-se que ao se estabilizar as imagens de vídeo de microscopia intravital, o rastreamento se tornará mais robusto e permitirá a avaliação de movimento dos leucócitos.

## 2. Metodologia

### 2.1. Banco de imagens

As imagens de vídeo utilizadas neste projeto foram obtidas de eventos microcirculatorios de vasos cerebrais de camundongos utilizando um microscópio Zeiss Imager M.2 (Thornwood, NY) com objetiva 20XLD. As imagens apresentam 8 bits de profundidade, taxa de amostragem de 16 quadros por segundo e resolução espacial de 1.89 pixels/ $\mu\text{m}$ . A matriz imagem possui  $592 \times 420$  pixels.

### 2.2. Pré-processamento

O filtro bilateral [Tomasi and Manduchi 1998] foi usado como uma etapa de pré-processamento para a redução de ruído das imagens, aplicado previamente à estabilização dos quadros do vídeo. A utilização do filtro bilateral realça o contraste das bordas dos vasos sanguíneos, aumentando a estabilidade do processo de co-registro dos quadros.

### 2.3. Técnica de co-registro

O método proposto (Figura 1) envolve o ajuste iterativo dos parâmetros  $p$  da transformação  $T(p)$ . Os pixels da imagem móvel  $M(x)$  são mapeados nos pixels da imagem fixa  $F(x)$  usando uma métrica de similaridade  $S(p|F, M, T)$ . Um otimizador que aplica o método do gradiente descendente busca o melhor conjunto de parâmetros  $p$  num espaço de parâmetros que minimiza o valor da função de similaridade entre as imagens  $F$  e  $M$ . O método utiliza um esquema multiresolução, no qual o processo de estimação do conjunto ótimo de parâmetros é iniciado na imagem de menor resolução (topo da pirâmide na Figura 1). Os parâmetros obtidos nos níveis mais altos da pirâmide são propagados para os níveis inferiores. Essa abordagem permite tanto a redução do tempo de processamento do algoritmo quanto o aumento da robustez do método.

O conjunto inicial de parâmetros é obtido aplicando uma transformação rígida que move o centro de massa da imagem  $M$  (quadro móvel) para a mesma posição espacial do centro de massa da imagem  $F$  (quadro fixo). Esse procedimento maximiza as chances de obtenção de um conjunto ótimo de parâmetros  $p$ . Visto que a estrutura dos vasos

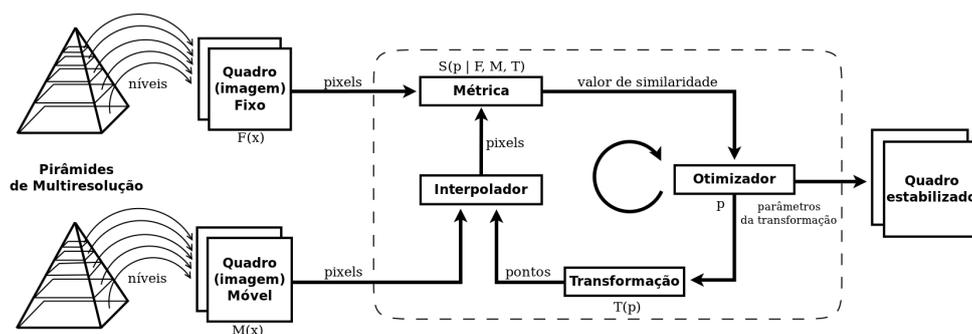
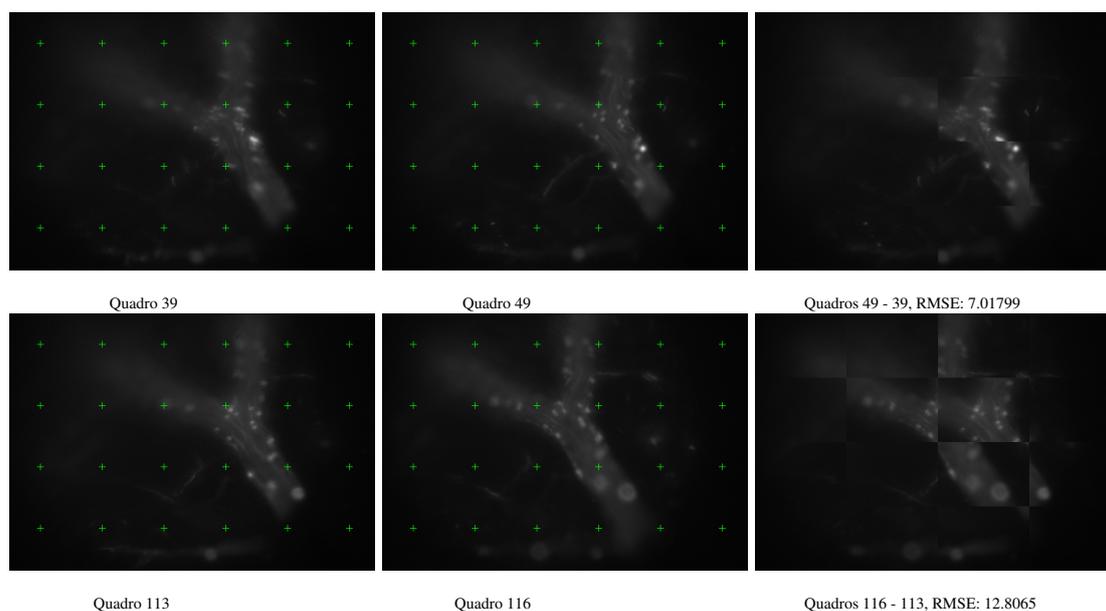


Figura 1. Diagrama de blocos do método proposto.

sanguíneos nas imagens não sofrem deformação ao longo do experimento, optou-se pela utilização de uma transformação afim  $x' \mapsto Ax + T$  [D. Mattes and Eubank 2001]. Os coeficientes da matriz  $A$  representam os parâmetros de rotação, escala e cisalhamento, e  $T$  é o vetor coluna que mapeia translações da imagem móvel. O mapeamento dos pontos da imagem  $M$  na imagem  $F$  é realizado usando interpolação linear. A métrica  $S(p|F, M, T)$  utilizada foi a informação mútua [Viola and Wells 1997, D. Mattes and Eubank 2001], que é uma medida da dependência estatística entre duas variáveis aleatórias que, no caso, correspondem à distribuição dos níveis de cinza nas imagens  $F$  e  $M$ .

### 3. Resultados Preliminares e Discussões

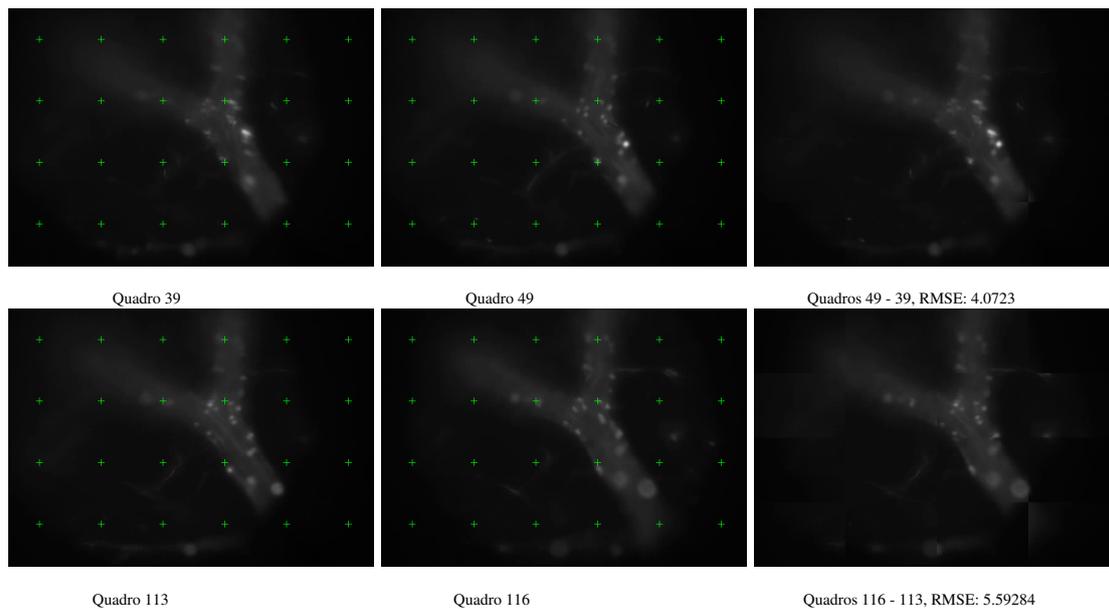


**Figure 2. Quadros extraídos do vídeo original antes do método de estabilização.**

As Figuras 2 e 3 ilustram duas sequências de quadros de um vídeo de microscopia intravital e os resultados da subtração dos mesmos. O espaçamento entre os quadros nas Figuras 2 e 3 foi aplicado para melhor visualização do efeito do método de estabilização. Símbolos em forma de cruz, igualmente espaçados, foram inseridos nas imagens para melhor visualização.

Por análise visual do padrão tabuleiro de xadrez nas Figuras 2 e 3 (colunas à direita), gerado a partir da combinação de blocos consecutivos extraídos de duas imagens de entrada para produzir uma imagem de padrão quadriculado como saída, é possível verificar claramente na região de borda dos vasos sanguíneos o efeito do movimento proveniente da respiração do animal, que neste caso é muito maior nas imagens sem estabilização. Em comparação, na Figura 3 nota-se que após o co-registro dos quadros, apenas os movimentos dos leucócitos são perceptíveis.

Em adição à análise visual, o valor da raiz do erro médio quadrático (*root mean square error* - RMSE) foi calculado para cada imagem resultante da subtração dos quadros nas Figuras 2 e 3. Confirmando tal análise, os valores do RMSE são menores para as imagens com aplicação do método de estabilização.



**Figure 3. Quadros extraídos do vídeo após método de estabilização proposto.**

#### 4. Conclusões

Um método para a estabilização de imagens de vídeo de microscopia intravital foi apresentado neste trabalho. Embora os resultados obtidos sejam bastante promissores, o efeito do borramento e da distorção causado pelo movimento do animal em alguns quadros é excessivo e, mesmo após a estabilização do vídeo, o rastreamento dos leucócitos é prejudicado. Duas frentes de pesquisa estão sendo investigadas para solucionar esse problema. A primeira envolve o desenvolvimento de um aparato mecânico para melhor fixação do animal sob o microscópio. A segunda abordagem refere-se ao desenvolvimento de um método automático para a restauração de quadros com excesso de borramento.

#### 5. Agradecimentos

Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processos 481923/2010-1, 152885/2011-0 e 139179/2011-9) pelo suporte financeiro.

#### References

- Acton, S. T. and Goobic, A. (2005). Image stabilization and registration for tracking cells in the microvasculature. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 52(2):287 – 299.
- D. Mattes, D. R. Haynor, H. V. T. K. L. and Eubank, W. (2001). Non-rigid multi- modality image registration. *In Medical Imaging 2001: Image Processing*, 4322:1609–1620.
- Tomasi, C. and Manduchi, R. (1998). Bilateral filtering for gray and color images. *In Proceedings of the Sixth International Conference on Computer Vision, ICCV '98*, pages 839–846, Washington, DC, USA. IEEE Computer Society.
- Viola, P. and Wells, W.M., I. (1997). Alignment by maximization of mutual information. *International Journal of Computer Vision*, 24(2):137–154.