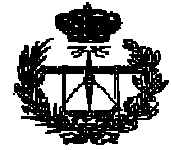




E.T.S.I.T.

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIEROS DE TELECOMUNICACIÓN



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

PROYECTO FIN DE CARRERA

**Caracterización de la batida ciliar mediante
análisis de imagen para el diagnóstico precoz de
la discinesia ciliar primaria**

Alumno: **José Manuel Sánchez Vílchez**

Director: **David Moratal Pérez**

Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular y
Departamento de Ingeniería Electrónica
Universitat Politècnica de València

ÍNDICE

1. OBJETIVOS DEL PROYECTO FIN DE CARRERA	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 DISCINESIA CILIAR PRIMARIA	2
2.1.1 Cilios y flagelos.....	3
2.1.2 Funciones y tipos de cilios.....	4
2.1.3 El proceso de aclaramiento mucociliar.....	4
2.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA DISCINESIA CILIAR PRIMARIA	5
2.2.1 Diagnóstico precoz de la discinesia ciliar primaria.....	5
2.2.2 Estudio de la batida ciliar mediante análisis de imagen.....	6
2.3 PATRÓN DEL MOVIMIENTO CILIAR	6
2.3.1 Modelado del patrón del movimiento ciliar	6
2.3.2 Frecuencias características del batido ciliar	7
3. MATERIALES	8
3.1 METODOLOGÍA DE ADQUISICIÓN DE LAS MUESTRAS.....	8
3.2 MODELO CÁMARA EMPLEADO Y CARACTERÍSTICAS	10
4. METODOLOGÍA EMPLEADA	11
4.1 PREPROCESADO DE LA IMAGEN	11
4.1.1 Tipos de filtrado utilizados.....	11
4.1.2 Detección de bordes y extracción de características	16
4.2 SEGMENTACIÓN.....	19
4.2.1 Características generales de la segmentación	19
4.2.2 Fundamentos de los contornos activos.....	20
4.2.3 Modelos paramétricos.....	21
4.3 CORREGISTRACIÓN.....	25
4.3.1 Características generales del corrección	25
4.3.2 Tipos de transformaciones geométricas usadas en la corrección.....	28
4.3.3 Entropía conjunta.....	30
4.3.4 Correlación cruzada.....	32
4.3.5 Algoritmo automático de registro	33
4.3.6 Registro mediante la transformada Fourier-Mellin (TFM).....	36
4.4 CARACTERIZACIÓN DEL BATIDO CILIAR	40
4.4.1 Fundamentos del método de flujo óptico.....	40
4.4.2 Análisis de la frecuencia de la batida ciliar mediante el estudio de la intensidad de los píxeles	42
4.4.2.1 Análisis ciliar por FFT	44
4.4.2.2 Análisis ciliar por PWELCH.....	46
5. RESULTADOS.....	48
5.1 FASE DE SEGMENTACIÓN	48
5.2 FASE DE CORREGISTRACIÓN	54
5.2.1 Corregistro automático por entropía conjunta	54
5.2.2 Corregistro automático por correlación cruzada	55
5.2.3 Corregistro por transformada Fourier-Mellin.....	55
5.3 FASE DE CARACTERIZACIÓN CILIAR.....	58
5.3.1 Análisis de la frecuencia fundamental de la batida ciliar mediante el estudio de la intensidad de los píxeles	58
5.3.2 Influencia de la dimensión de la ROI.....	75
5.3.3 Módulo de validación de frames para secuencias más complejas	75
5.3.4 Análisis de la frecuencia fundamental de la batida ciliar mediante flujo óptico	77
5.3.5 Análisis del patrón temporal de la señal mediante análisis de los píxeles	80
6. DISCUSIÓN.....	81
6.1 SEGMENTACIÓN POR CONTORNOS ACTIVOS	81

6.1.1	<i>Frames corregidos con correlación cruzada.....</i>	81
6.1.2	<i>Problemas con contornos circulares.....</i>	82
6.1.3	<i>Problemas con contornos cuya forma varía.....</i>	82
6.2	CORREGISTRACIÓN MEDIANTE LA TRANSFORMADA FOURIER-MELLIN	83
6.3	ANÁLISIS DE LA BATIDA CILIAR.....	83
6.3.1	<i>Flujo óptico</i>	83
6.3.2	<i>Análisis de la batida ciliar: Intensidad de los píxeles</i>	83
6.3.3	<i>Comparativa entre flujo óptico y el estudio intensidad de los píxeles.....</i>	84
6.3.4	<i>Influencia del tiempo de obturación en la adquisición.....</i>	84
7.	CONCLUSIONES.....	86
7.1	LÍNEAS FUTURAS	87
7.2	PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE PROYECTO FIN DE CARRERA	87
8.	REFERENCIAS	88

1. Objetivos del Proyecto Fin de Carrera

El principal objetivo propuesto para este Proyecto Fin de Carrera es la caracterización, mediante análisis de imagen, del batido ciliar con el fin de buscar parámetros que permitan un diagnóstico más rápido y eficaz de la discinesia ciliar primaria. Los algoritmos a desarrollar deberían conformar una herramienta que fuese capaz de realizar un análisis sobre secuencias de video con movimiento ciliar, para mostrar la información pertinente acerca del patrón y la frecuencia del movimiento.

Para ello se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Definición de los principales parámetros para la caracterización de la Discinesia Ciliar Primaria a partir del análisis de imagen de secuencias de video con movimiento ciliar.
- Desarrollar un algoritmo que permita segmentar automáticamente la célula (se trata de secuencias dinámicas de video).

La correcta *segmentación* del contorno de la célula servirá para localizar de forma automática la célula bajo estudio y para la posterior corrección de la misma.

- Elaborar un algoritmo que permita una *corrección* de la célula. Esta herramienta es necesaria para fijar la célula, ya que ésta se moverá a lo largo de la secuencia de video.
- Marcar una región de interés para poder estudiar y caracterizar el movimiento ciliar dentro de esa región, así como la frecuencia de dicho movimiento.
- Agrupar todos los algoritmos usados para el análisis de las secuencias de video, de forma que se pueda obtener el análisis del batido ciliar de forma automática o semi-automática a través de una interfaz amigable con el usuario final.

2. Introducción

2.1 Discinesia ciliar primaria

La discinesia ciliar primaria (**DCP**) es un trastorno que está caracterizado por un movimiento y estructura anormal en **los cilios y los flagelos**. Este defecto provoca alteraciones en el barrido de los cilios, como pueda ser la ausencia, anormalidad o descoordinación de los cilios en su conjunto.

Las manifestaciones de la disfunción ciliar congénita se caracterizan porque se presentan ya desde el nacimiento, por su evolución clínica crónica y constante y por su amplia distribución, pues afectan de forma simultánea a todos los órganos en los que los cilios ejercen su función.

Los pacientes que sufren dicha enfermedad pueden tener:

- Otitis media (inflamación del oído)
- Rinitis y sinusitis recurrentes (inflamaciones del revestimiento mucoso de la nariz y de la mucosa de los senos paranasales, respectivamente)
- Tos crónica
- Pólipos nasales
- Asma que no responde a tratamiento
- Bronquiectasias (dilataciones irreversibles de los bronquios con consiguiente rotura de la pared bronquial).
- Neumonía

Esta patología genera un déficit en el **aclaramiento mucociliar**, que se manifiesta clínicamente como infecciones crónicas de vías aéreas constantes desde el nacimiento, con lo que se impide que el moco se renueve, favoreciendo la acumulación de secreciones e infecciones constantes. La DCP también tiene consecuencias en la esterilidad, esto se explica porque la estructura genética y morfológica de los cilios y la de los flagelos es la misma.

Aproximadamente el 40-50 % de los pacientes diagnosticados de DCP sufren de **situs inversus**, que es una alineación aleatoria y errónea de los órganos internos del cuerpo, como es el caso del **síndrome de Kartagener** [1]. Esta disfunción tiene su origen durante el desarrollo embrionario (embriogénesis), en el que los cilios disfuncionales carecen de capacidad para ordenar los órganos.

La amplia distribución ciliar en el organismo y sus numerosas funciones hacen que su disfunción, origine, además de la discinesia ciliar primaria, otras ciliopatías [2] tales como:

- Hifrocefalia congénita
- Ceguera progresiva
- Hipoacusia neurosensorial (Síndrome de Usher)
- Retraso mental
- Insuficiencia renal crónica (riñón poliquístico y nefronoptosis)
- Polidactilia

- Síndrome de Bardet Biedl: Obesidad, hipogonadismo, debilidad mental, defectos craneales, retinitis pigmentosa, sindactilia
- Complejas enfermedades congénitas cardíacas, especialmente desórdenes de la lateralidad
- Atresia biliar
- Atresia esofágica, reflujo severo

Sin embargo, la DCP es el síndrome clínico más frecuente y con mayor repercusión relacionado con la disfunción ciliar, pues afecta aproximadamente a 1 de cada 10.000-60.000 personas. En España suele afectar aproximadamente a 2.600 personas. La DCP también es conocida como síndrome de inmovilidad ciliar (SIC) y es un trastorno hereditario, que también engloba enfermedades en las que los cilios son completamente inmóviles (SIC), el movimiento es anormal o ineficaz (DCP) o hay ausencia de ellos (aplasia ciliar).

2.1.1 Cilios y flagelos

Los cilios y flagelos son proyecciones de la célula, rodeadas por la membrana celular que ejercen diversas funciones biológicas. Están presentes en los protozoos, en los animales y en algunas plantas.

La diferencia principal entre cilios y los flagelos no solo radica en su estructura externa, sino también en las funciones que llevan a cabo y el tipo de movimiento que tienen. De hecho, los flagelos, con un movimiento ondulatorio, tienen la función de propulsar células en medios líquidos, como ocurre con los espermatozoides, que poseen flagelos para proveerles de movilidad y poder desplazarse. Los cilios normalmente se sitúan en células estacionarias y gracias al impulso debido al movimiento en forma de remo que presentan, son capaces de mover líquidos o elementos que éste contiene.

Tal y como se ve en la siguiente imagen, el flagelo presenta una parte que permanece rígida durante el movimiento, la parte que une la cabeza con la cola.

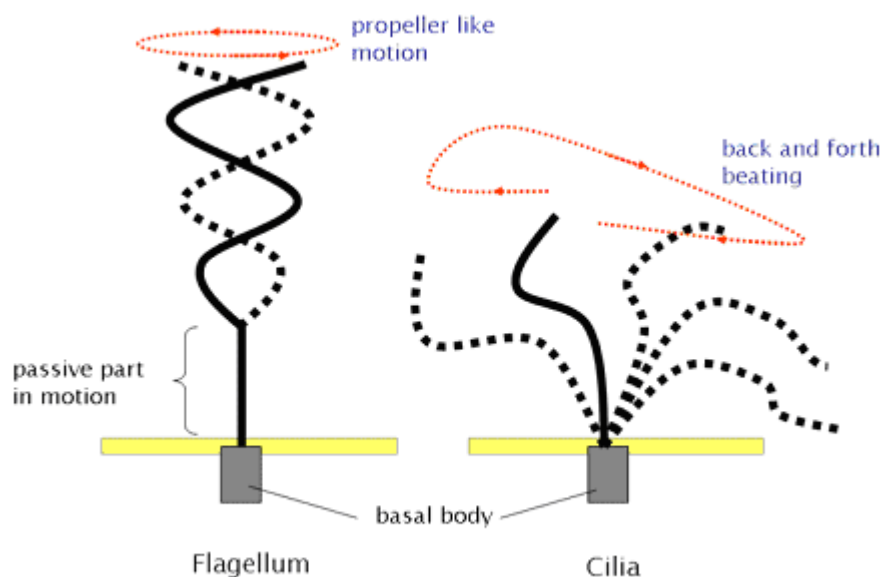


Figura 1. Diferencias en el movimiento de un cilio y de un flagelo: El flagelo tiene una parte que está pasiva en el movimiento, en cambio el cilio mueve todo su cuerpo durante el movimiento [3].

2.1.2 Funciones y tipos de cilios

Existen múltiples categorías de cilios en el cuerpo humano, al menos 9, y dada esta diversidad, es normal que los cilios tengan múltiples funcionalidades biológicas. Los cilios intervienen en la limpieza de las vías respiratorias, en el desplazamiento de los espermatozoides, mediante su movimiento ondulatorio que les permite desplazarse en medios acuosos.

También tienen presencia en aspectos como la regulación del balance hídrico en los órganos excretores, la circulación de fluidos en el sistema nervioso o incluso la división celular. Además, casi todas las células en algún momento de su evolución tienen estructuras ciliares, las cuales intervienen en la división celular.

Esta amplia variedad de funciones implica una gran complejidad morfológica y genética. La función transportadora imprime movilidad a la propia célula, como es el caso del espermatozoide o a los materiales situados sobre la superficie celular, como es el caso de las células ciliadas del aparato respiratorio, transportadoras de moco, o las células de las trompas de Falopio, transportadoras del óvulo o a los transportadores del líquido cefalorraquídeo en los ventrículos cerebrales.

En funciones sensoriales, como la vista, el tacto o el oído, tienen también importantes tareas a realizar. De hecho, existen trastornos de la audición y de la visión (retinitis pigmentosa), calificados bajo el nombre de *Síndrome de Usher*, que están íntimamente ligados a estas disfunciones ciliares.

2.1.3 El proceso de aclaramiento mucociliar

El *aclaramiento mucociliar* es un mecanismo de defensa básico y muy importante contra las infecciones de la nariz, senos y bronquios. Tiene por objetivo expulsar los gérmenes residentes en el sistema respiratorio.

Para ello existen miles de cilios en la mucosa de las vías respiratorias. Tal y como muestra la siguiente figura, la estructura de la mucosa tiene dos partes: una capa inferior acuosa, en la que se encuentra inmerso casi la totalidad del cilio y una capa superior viscosa (gel) que es la que arrastra las partículas e impurezas y que es desplazada por los cilios a consecuencia del golpe efectivo de los mismos. Gracias al empuje neto producido por el movimiento global de los cilios, existe un flujo neto de moco en la dirección propicia para su correcta expulsión hacia la faringe.

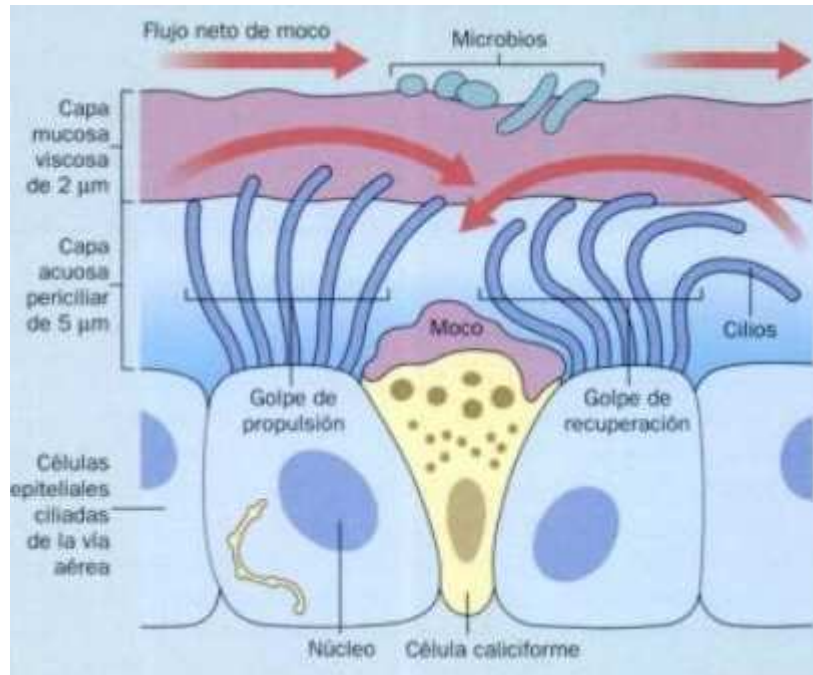


Figura 2. Estructura del aparato mucociliar [4].

2.2 Diagnóstico clínico de la discinesia ciliar primaria

2.2.1 Diagnóstico precoz de la discinesia ciliar primaria

El diagnóstico precoz de la DCP tiene significativos efectos beneficiosos sobre el conjunto de personas afectadas. La función pulmonar de estos pacientes es mucho peor cuando se diagnostican en la edad adulta y no han llevado un tratamiento adecuado. Pero la escasa frecuencia de este síndrome ha hecho que su diagnóstico sea muchas veces tardío y que su incidencia esté infravalorada, sobretodo cuando no va asociada al *situs inversus*.

Normalmente, en casos donde los pacientes no padecen un *situs inversus* asociado con los respiratorios, hay que realizar estudios ciliares específicos. Pero antes, es necesario descartar completamente otras causas de infecciones crónicas respiratorias.

Existen varios tipos de pruebas que son comúnmente utilizadas en el diagnóstico de esta patología:

- Determinación del óxido nítrico nasal exhalado
- Medida del transporte mucociliar (aclaramiento mucociliar)
- Estudio de la ultraestructura ciliar
- Pruebas genéticas
- Estudio de la batida ciliar mediante análisis de imagen

2.2.2 Estudio de la batida ciliar mediante análisis de imagen

El diagnóstico de la Discinesia ciliar primaria se fundamenta en el análisis de la frecuencia y la forma de la batida ciliar. El estudio de la ultraestructura ciliar mediante microscopía electrónica (ME) es también diagnóstico en caso de que se encuentren defectos ciliares típicos de la DCP, pero el 10-20% de los pacientes con DCP muestran una ultraestructura normal, por lo que una normalidad no excluye el diagnóstico.

Para analizar la batida ciliar se hace un estudio de la movilidad ciliar de las células ciliadas del epitelio respiratorio mediante una cámara digital de alta velocidad acoplada a un microscopio.

Un análisis adecuado facilitaría la determinación de la frecuencia y el patrón-forma de la batida ciliar, ya que ambas determinaciones son necesarias, dado que la frecuencia de batida puede ser normal, pero su patrón de movimiento puede ser discinético y sufrir algún tipo de descoordinación.

2.3 Patrón del movimiento ciliar

2.3.1 Modelado del patrón del movimiento ciliar

El patrón de movimiento ciliar tiene dos ciclos característicos: una fase de movimiento eficaz (*power stroke*), en la que el cilio se extiende en toda su longitud para realizar el barrido, y una de recuperación (*recovery stroke*), que es el periodo de tiempo que emplea el cilio para volver a su posición inicial e iniciar de nuevo el batido ciliar. Dicho movimiento es similar al movimiento del brazo de un nadador, retrocediendo en posición extendida y volviendo a iniciar la batida ciliar.

Este patrón de movimiento es el que presenta cada cilio por separado, pero el movimiento en conjunto de todos los cilios ha de ser coordinado y realizarse en un mismo sentido, como podría ser el movimiento de un trigal azotado por el viento. La coordinación del movimiento es necesaria para que el efecto global de los cilios tenga un efecto de empuje neto en una determinada dirección. Además, el movimiento se ha de realizar a la velocidad adecuada para que la batida sea efectiva en su función.

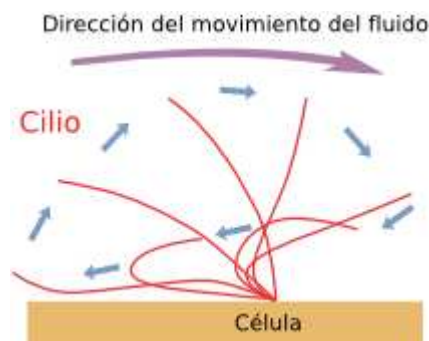


Figura 3. Dibujo explicativo del movimiento del cilio durante la batida, con sus dos fases características. Cuando el cilio va hacia la derecha es la fase de batida, y cuando va hacia la izquierda es la fase en que se recupera. El movimiento ciliar tiene un patrón similar al brazo de un nadador [5].

2.3.2 Frecuencias características del batido ciliar

Uno de los parámetros más representativos para el diagnóstico de la discinesia ciliar primaria, es su frecuencia de batida. También es cierto que no es el único parámetro a tener en cuenta a la hora de realizar un diagnóstico, ya que se han de tener en cuenta más elementos, como es el patrón de movimiento que presentan los cilios o que todo el conjunto de cilios tenga un movimiento coordinado en la misma dirección.

Un rango de normalidad, podría definirse como un rango de frecuencias en el que la mayoría de pacientes no padecen dicha patología. Pero también habrá pacientes que estén dentro de este rango de normalidad y que padezcan la enfermedad. Existen diversos estudios que intentan cuantificar los pacientes que sufren o no sufren la patología y qué frecuencia ciliar promedio presentan.

Existen múltiples estudios sobre esta patología, intentando establecer patrones frecuenciales anómalos. En el estudio de *Mark Jorissen et al.* (**Figura 4**), se puede ver un rango que engloba desde los 6 hercios hasta los 10 hercios, donde está ubicada la mayoría de pacientes sin sufrir la patología. Tan sólo como dato orientativo, una frecuencia de batida por encima de 9 Hz, de 540 batidas por minuto, debería considerarse normal.

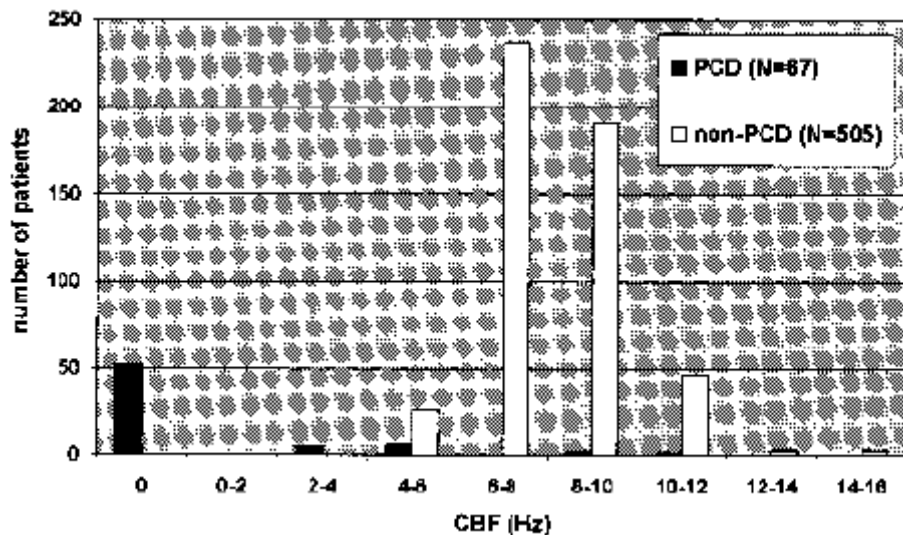


Figura 4. Frecuencia de la batida ciliar en pacientes con DCP (negro) y en pacientes sin DCP (blanco), donde los pacientes sin DCP suelen tener una frecuencia de batida en el rango de los 6 a los 10 hercios [6].

3. Materiales

3.1 Metodología de adquisición de las muestras

Todas las secuencias que se analizan en el presente proyecto provienen de células ciliadas del epitelio aéreo. El procedimiento para obtener muestras válidas de pacientes es muy sencillo, de duración no mayor a cinco minutos, consistente en un leve raspado en cierta zona de la mucosa nasal, denominada meato medio. En la siguiente imagen se indica la zona de donde se extraen las muestras.

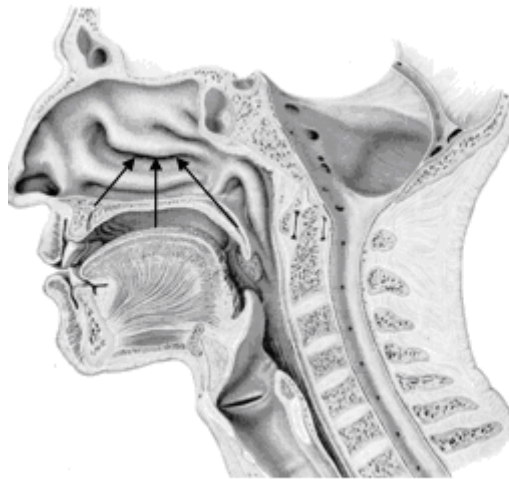


Figura 5. Ilustración de la estructura nasal. Las flechas indican la zona donde se realiza la biopsia, denominada meato medio [7].

Las herramientas usadas en la prueba:

- Endoscopio rígido
- Tubo Eppendorf
- Espéculo nasal tipo Killian
- Espejo Ziegler
- Cureta cortante



Figura 6. Espejo Ziegler y cureta nasal cortante [7]

La cureta nasal cortante se utiliza para raspar la pared nasal y extraer así la muestra que se analizará posteriormente. Para ello, en todo momento, el doctor se ayuda del espéculo nasal tipo Killian, del endoscopio rígido y del espejo Ziegler, con el que puede mejorar la visión de la zona a tratar y precisar mejor de donde extrae la muestra.

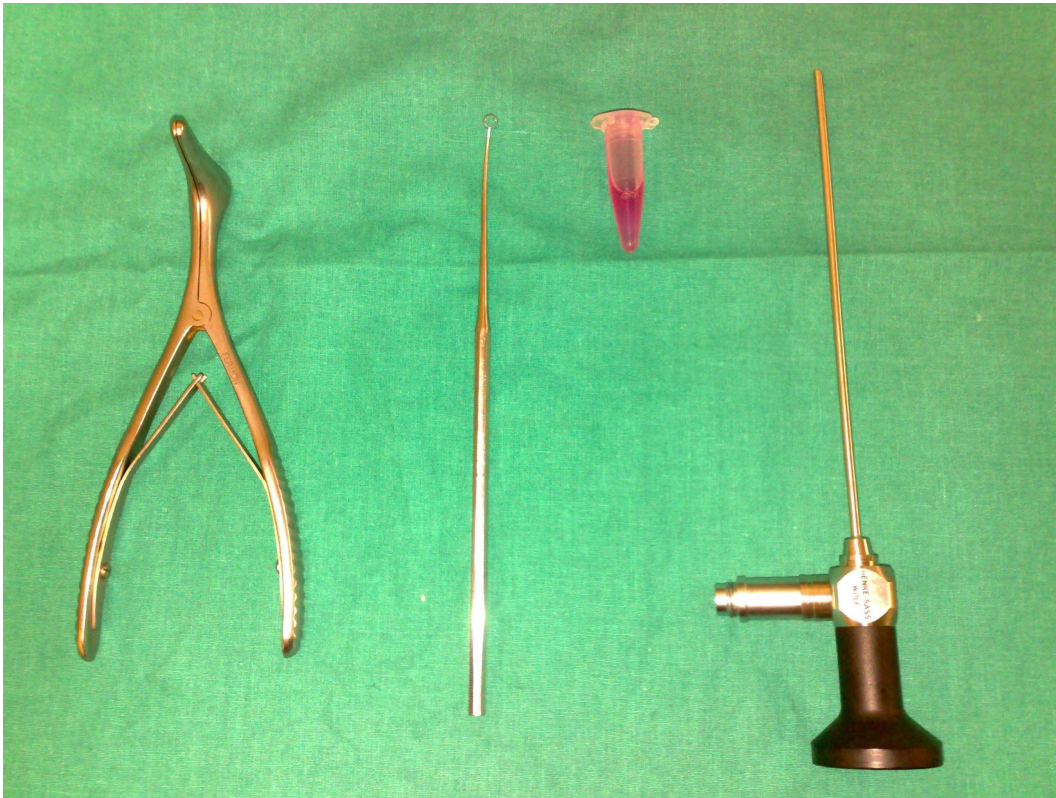


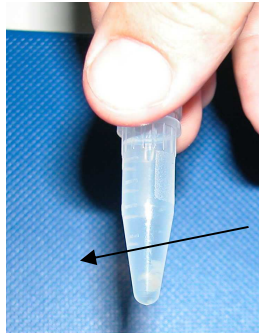
Figura 7. Algunas de las herramientas utilizadas en la biopsia realizada para la obtención de muestras. De izquierda a derecha: Espéculo nasal tipo Killian, cureta nasal cortante, tubo Eppendorf y endoscopio rígido.



Figura 8. Ejemplo de la extracción de una muestra sobre el autor de este Proyecto Fin de Carrera mediante raspado nasal. En la imagen se ve como se usa la cureta cortante para realizar el raspado, ayudado por el espéculo nasal. Aunque molesto, no es excesivamente doloroso.

Para la conservación de la muestra obtenida se usará un tubo Eppendorf de 1.5 ml, con medio de cultivo estéril y a temperatura ambiente. Además está suplementado con un 10% de

suero bovino fetal, 2 mM de glutamina, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y amfotericina B (2.5 µg/ml).



Biopsia de epitelio del meato medio en medio de cultivo estéril

Figura 9. Tubo Eppendorf, recipiente de donde se guarda la muestra obtenida [7].

3.2 Modelo cámara empleado y características

El sistema está compuesto por un conjunto de elementos hardware, tales como:

- **HP Workstation xw6200 Xeon 3.4 GHz** con :
 - Display de pantalla plana - TFT - 20.1"
 - Memoria RAM 4 GB
 - Disco duro 74 GB
 - DVD grabadora
 - Sistema operativo Windows XP Professional
- Tarjeta de adquisición de imágenes : **NI PCIe-1429, Full Configuration Camera Link Image Acquisition**
- **CCD Digital Quad Speed Progressive Scan Camera JAI CV-A33 CL**, con capacidad de adquisición de 118 fps (*frames* o imágenes por segundo)
- Fuente de alimentación de la cámara: **Multimetrix® XA3051** (Continuously Monitors Voltage & Current Simultaneously, Single output DC power supply 150 W; 30V/5A)
- Microscopio invertido **Nikon Eclipse TE 100**.



Figura 10. Estación de trabajo HP Workstation XW6200 Xeon 3.4 GHz [7].

4. Metodología empleada

4.1 Preprocesado de la imagen

4.1.1 Tipos de filtrado utilizados

Cuando se obtiene una secuencia de vídeo, existen muchas fuentes de error, que son cualquier entidad en las imágenes de dicha secuencia, como datos que no son útiles en la computación que se pretende llevar a cabo. En operaciones de tratamiento de imagen que sean sumamente complejas, como la segmentación, es necesaria una extracción de las características más relevantes de la imagen. Para ello, es necesario tener una imagen libre de ruido, que no influya degradando el mapa de bordes de la imagen y con la consiguiente degradación del mapa de fuerzas, en adelante llamado GVF.

Un filtrado espacial es un tipo de operación en que se altera el valor de un píxel en función de los valores de los píxeles que lo rodean (también conocidos como vecinos). El término espacial se usa para distinguir que la alteración del píxel se realiza dependiendo de los valores de los píxeles vecinos sin modificarlos.

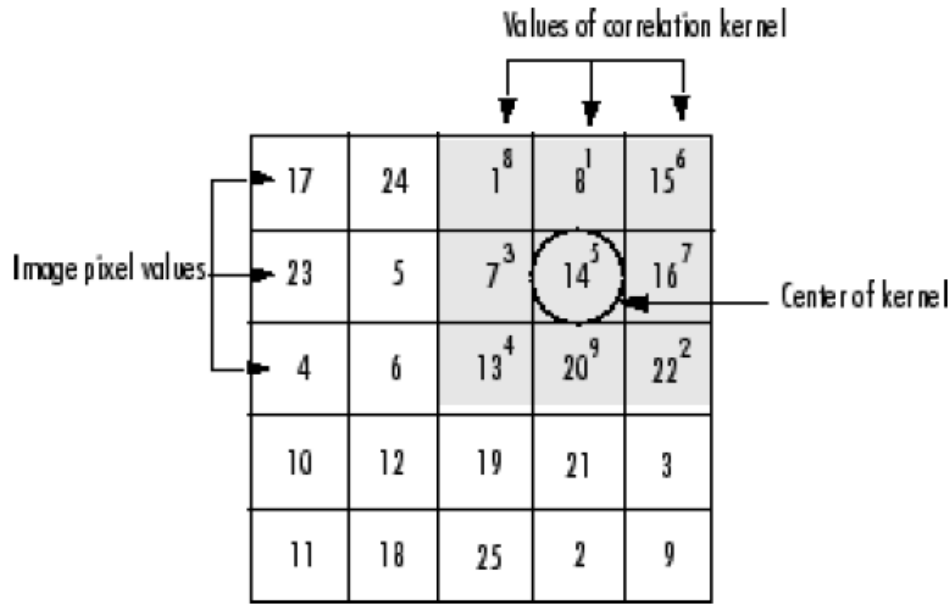


Figura 11. En este caso, dada la máscara $\begin{pmatrix} 8 & 1 & 6 \\ 3 & 5 & 7 \\ 4 & 9 & 2 \end{pmatrix}$, para el cálculo del píxel (2,4) cuyo valor actual es 14, su valor final será: $8 \times 1 + 1 \times 8 + 6 \times 15 + 3 \times 7 + 5 \times 14 + 7 \times 16 + 4 \times 13 + 9 \times 20 + 2 \times 22 = 585$ [8].

Cuando la función usada para alterar el valor del píxel depende de forma lineal de los píxeles vecinos se aplicará un filtrado espacial lineal, que es la expresión siguiente para cada píxel de la imagen [8].

$$g(x, y) = \sum_{s=-a}^{s=a} \sum_{t=-b}^{t=b} w(s, t) \cdot f(x + s, y + t) \quad (1.1)$$

La variable $w(s,t)$ representa los términos de la matriz que contendrá los coeficientes del filtro, que a su vez define los píxeles del entorno que serán utilizados como argumento del filtro lineal que alterará el valor del píxel. La variable $f(x+s,y+t)$ es el valor de los píxeles de la vecindad definida por la máscara $w(s,t)$. Esta ecuación tan solo es la expresión matemática de lo explicado en la figura anterior (**Figura 11**).

Uno de los principales problemas del filtrado está en los bordes, ya que dichos píxeles no tienen los mismos vecinos para realizar el cálculo y, por tanto, no pueden ser calculados de forma normal. Para resolver el problema de los bordes, se extiende la imagen con un marco de ceros, obteniendo una imagen filtrada resultante con un marco negro o blanco, pero esta solución falsea la imagen original, ya que crea un marco inexistente que sólo es producto del filtrado.

El efecto del relleno con ceros no sería tan notable si el tamaño de la máscara fuera pequeño en relación con la imagen pero dado el tamaño de las imágenes tratadas en el presente proyecto (78 x 86 píxeles), el efecto tiene una presencia bastante notable en la imagen. Además, el marco de ceros crea una alta variación de intensidad que queda reflejada en el GVF, atrayendo la curva hacia dicho marco y dificultando en gran medida la segmentación.

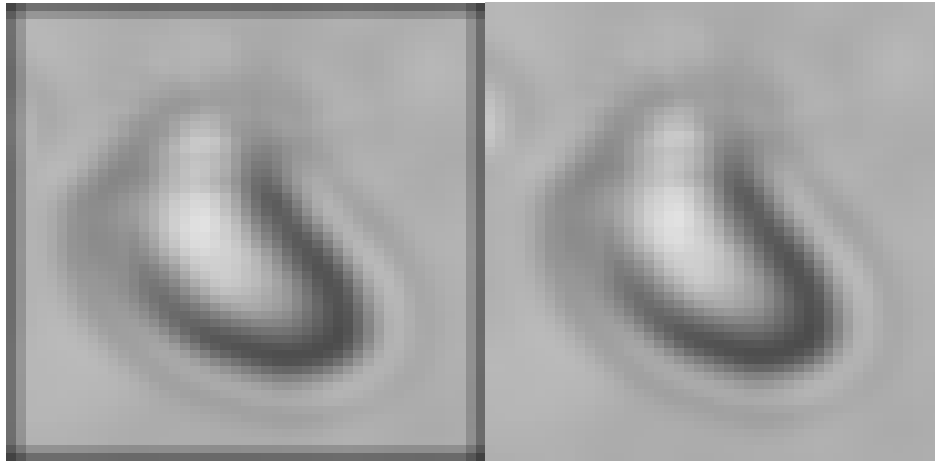


Figura 12. Problemática de los bordes en el filtrado: A la izquierda los bordes de la imagen se rellenan con ceros, a la derecha, los bordes se rellenan con valores replicados.

Para evitar dicho problema, se realiza un relleno de la imagen original tal y como muestra la imagen (**Figura 13**), para que los píxeles situados en los bordes tengan un vecindario como todos los demás, presentando un valor mucho más acorde y que no nos degrada el GVF. Este relleno depende del tamaño de la máscara, pues a mayor tamaño de ésta, mayor número de vecinos que se necesitará replicar.

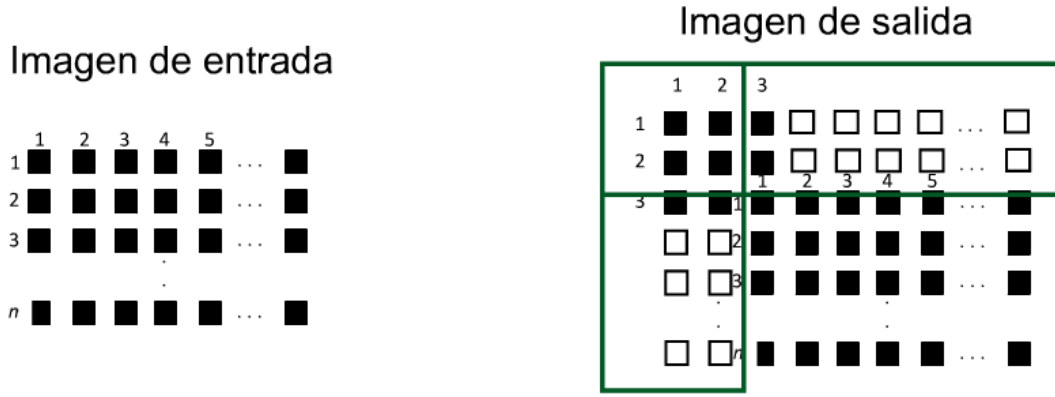


Figura 13. Solución adoptada para evitar el efecto de bordes del filtrado. La imagen inicial es rellenada para que los píxeles del borde de la imagen tengan 4 vecinos, como los píxeles interiores [9].

A continuación se detallarán los casos particulares de filtro lineales utilizados.

Filtrado gaussiano

Este caso particular de filtro paso bajo se utiliza sobretodo para reducir el ruido de la imagen y suavizar los bordes para facilitar el guiado de la curva hacia el contorno deseado. Consigue resultados parecidos al filtro de media, aunque debido a su particular promediado, preserva mejor los bordes y no tiene un suavizado tan brusco como el filtro de media.

Responde a la ecuación:

$$w(s, t) = \frac{e^{-\frac{s^2 + t^2}{\sigma^2}}}{2\pi\sigma^2} \quad (1.2)$$

Donde el término de desviación estándar σ influye en el tamaño de la máscara y su valor varía dependiendo de la fase de extracción de las características de la imagen. En cuanto al tamaño de la máscara, cuanto mayor sea, mayor será el difuminado de la imagen, ya que cada píxel tendrá una mayor región de la que dependerá su valor.

Unos de los grandes inconvenientes que presenta es el compromiso existente entre el difuminado de los bordes y la cantidad de ruido eliminado. Para ello, se han de hacer comprobaciones para ver cual será el resultado óptimo usando diferentes valores de los parámetros para el filtrado. Al ser un filtro lineal cuyo valor del píxel es una media de los del entorno, las variaciones locales de cada píxel son altamente reducidas.



Figura 14. Diversos ejemplos de filtrado con filtro gaussiano [10].

En este estudio, se ha optado por un tamaño de máscara de 5 x 5 píxeles y con $\sigma=3$, ya que con ellos se consigue un GVF bastante nítido que facilitará el correcto guiado hacia el contorno de la célula.

Este filtrado es esencial en la etapa de segmentación, pues al filtrar paso bajo, el alto contraste de la discontinuidad se emborrona, esparciéndose por los alrededores de la discontinuidad, permitiendo que en el GVF tenga una mayor presencia, como se observa en la siguiente figura:

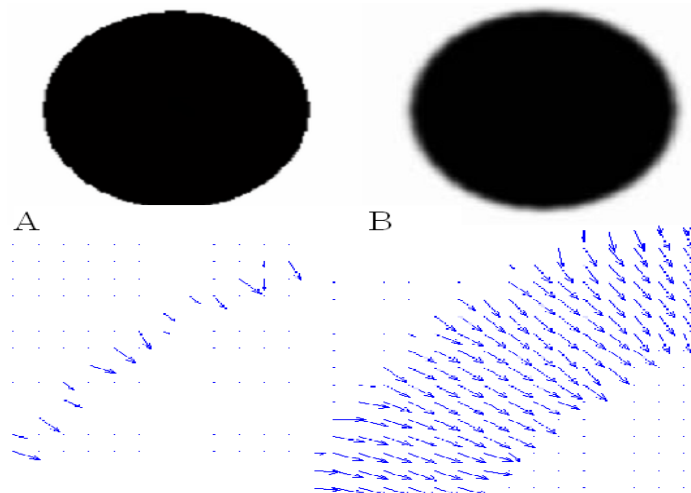


Figura 15. A) Imagen sin filtro paso bajo: La discontinuidad crea una alta frecuencia que es casi puntual, teniendo una presencia en el GVF muy poco estimable. B) Imagen filtrada paso bajo: Tras el filtrado, la discontinuidad se esparce por los alrededores dejando un rastro en el GVF más claro que nos permitirá realizar un mejor seguimiento del contorno [11].

Filtrado laplaciano

Este tipo de filtro paso alto destaca los píxeles cuya variación con respecto a sus vecinos es significativa. Es útil para resaltar los grandes cambios en la imagen, como son los contornos de la imagen o características relevantes de las que el GVF se servirá para guiarse.

Si se denota a la imagen $f(x, y)$, se define el operador laplaciano como:

$$\nabla^2 f(x, y) = \frac{\partial^2 f(x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f(x, y)}{\partial y^2} \quad (1.3)$$

La máscara usada, de tamaño 3 x 3 píxeles, depende del parámetro α . Este parámetro tiene valores en el rango [0,1]. En el estudio de dicho filtrado, no se encontraron diferencias significativas con diferentes valores de alfa, por tanto se deja con $\alpha=0.5$.

$$W = \begin{bmatrix} \frac{\alpha}{1+\alpha} & \frac{1-\alpha}{1+\alpha} & \frac{\alpha}{1+\alpha} \\ \frac{1-\alpha}{1+\alpha} & \frac{-4}{1+\alpha} & \frac{1-\alpha}{1+\alpha} \\ \frac{\alpha}{1+\alpha} & \frac{1-\alpha}{1+\alpha} & \frac{\alpha}{1+\alpha} \end{bmatrix}$$

Figura 16. Expresión de la máscara $w(s,t)$ en el Laplaciano [12].

El filtrado Laplaciano se ha usado para resaltar las zonas de alta frecuencia, como los principalmente los contornos, ya que esa información será trascendental para obtener un buen resultado en la fase de detección de bordes.

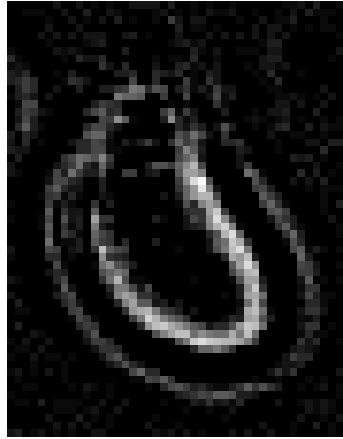


Figura 17. Laplaciano de la gaussiana con $\alpha=0.5$

4.1.2 Detección de bordes y extracción de características

Bordes y tipos de detectores

Un borde es cualquier discontinuidad que tiene la imagen en alguno de sus puntos. Existen múltiples detectores de bordes, y según las características de cada imagen particular se han ido utilizando unos u otros.

El gradiente siempre se ve como la principal herramienta para determinar el contorno de una imagen, ya que los puntos de ese contorno tienen un módulo del gradiente muy alto. La problemática del uso del gradiente viene vinculada estrechamente al ruido que posee la imagen, o a grandes fluctuaciones que enmascaran el contorno de interés, ya que crea discontinuidades en la imagen que hacen que el gradiente pueda estar detectando contornos que no sean reales. Para solucionarlo es imprescindible realizar un buen preprocesado de la imagen, y más importante aún: una buena detección de bordes.

Operadores basados en el gradiente

La derivada se usa para cuantificar una variación, una discontinuidad o un borde. Cuando se habla de dos dimensiones, como en el caso de las imágenes, se utilizará el gradiente, donde los valores altos de la derivada nos indican los puntos donde existen cambios bruscos de intensidad, resaltando los contornos y dando un resultado nulo del gradiente en las zonas de intensidad similar.

El resultado del gradiente será un vector de dos componentes $\nabla f = \begin{bmatrix} \frac{\partial f}{\partial x} & \frac{\partial f}{\partial y} \end{bmatrix}$ en cada uno de los píxeles de la imagen, siempre apuntando a la dirección de máxima variación de intensidad. En la siguiente figura se muestran varios ejemplos:

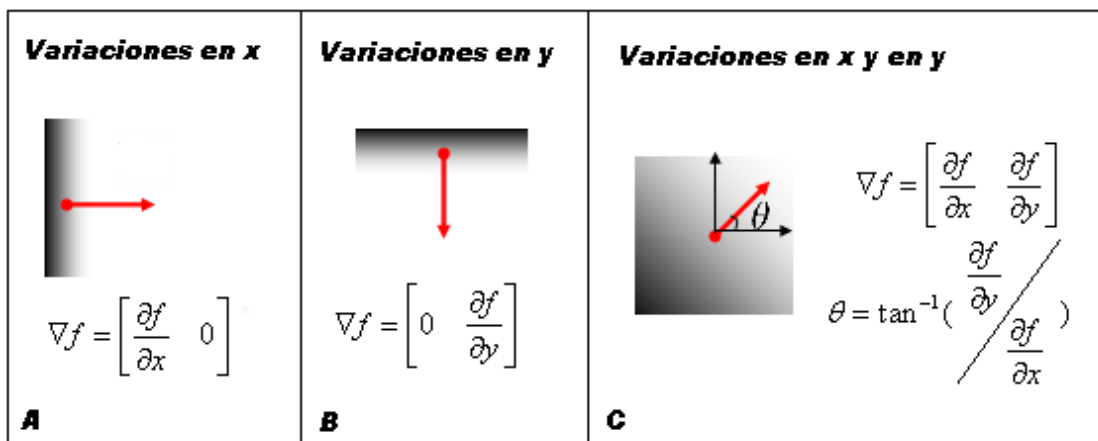


Figura 18. Posibles variaciones de intensidad del gradiente: A) Variación de intensidad en x (sin variación en y), B) Variación en y (sin variación en x), C) Variación de intensidad en x y en y

Cuando se habla del gradiente, se ha de exigir que las funciones sean continuas y derivables, cosa que no ocurre con las imágenes, ya que son discretas y por tanto se han de usar aproximaciones como las que siguen:

$$\begin{aligned}\nabla_{x1} f(x, y) &= f(x, y) - f(x - 1, y) \\ \nabla_{y1} f(x, y) &= f(x, y) - f(x, y - 1)\end{aligned}\quad (1.4)$$

Se distinguen las siguientes técnicas basadas en el gradiente:

- Operador de Roberts
- Operador de Sobel
- Operador de Prewitt

Todos ellos, también denominados operadores basados en máscaras direccionales, son muy sensibles al ruido sobretodo al tener tan solo información de dos píxeles, por ello no han sido usados en el presente estudio. A modo de ejemplo de su funcionamiento, se mostrará el detector de bordes de Roberts.

Detector de bordes de Roberts

El operador de Roberts es el más sencillo y que menos se usa, excepto en aplicaciones de alta velocidad. En la siguiente ilustración un ejemplo del uso de cuatro combinaciones de máscaras para las direcciones (45, 135, -45, -135), donde cada una de las máscaras es distinta para obtener los respectivos bordes de cada dirección. Lo que se hace es filtrar la imagen original con 4 máscaras distintas (una para cada dirección) y posteriormente se suman cada una de ellas para obtener la imagen con el contorno.

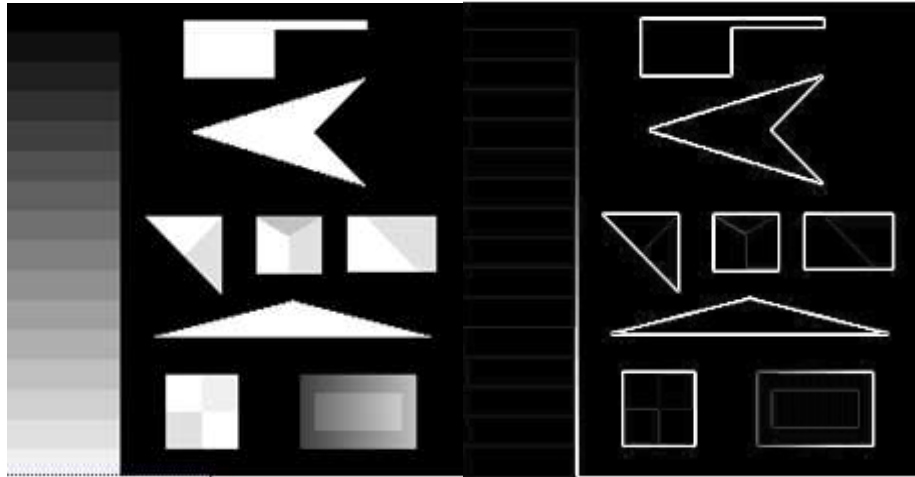


Figura 19. Imagen original y detección de bordes resultante [9].

Detector de bordes de Canny

Es un detector de bordes basado en el cruce por cero. Tras haber experimentado con todos los detectores anteriormente mencionados habiendo variado sus parámetros, los resultados de este detector obtienen una mejor representación de las características relevantes para la fase de segmentación, por lo cual, se ha optado por usarlo como detector de bordes en el presente estudio.

Existen casos muy simples, donde el contorno está claramente determinado por un fondo negro y uniforme (**Figura 19**), sin existir grandes variaciones en dicho fondo que puedan causar ambigüedad alguna a la hora de extraer un contorno de una forma clara y robusta. En el estudio, se define robustez como la capacidad de obtener un mismo contorno o muy parecido variando los parámetros del detector de bordes.

Los parámetros que usa este detector son los siguientes:

- Umbrales de intensidad inferior y superior
- Desviación σ

Los umbrales de intensidad son para filtrar los bordes que se desean, uno para los bordes más fuertes y otro para los más débiles, dotando así al algoritmo de gran flexibilidad. Además, solo incluye en el resultado de la detección los bordes débiles si están directamente conectados a los fuertes, lo cual lo hace un método robusto frente a ruido.

Respecto a las fases en que se basa dicho detector:

Fase 1

Suavizado de la imagen mediante convolución con filtro gaussiano

Fase 2

Se aplica un operador de gradiente para realzar las regiones de la imagen con valores elevados de la primera derivada espacial (se realzan los bordes).

Fase 3

El algoritmo se mueve a través de los bordes realzados, dando valor 0 a los puntos de la imagen que quedan fuera del borde. Asimismo, usa dos umbrales (T_1 y T_2 , con $T_2 > T_1$), donde el seguimiento a través de los bordes empieza en aquellos puntos en que el valor del borde esté por encima de T_1 siguiendo hasta el punto donde el borde quede por debajo de T_2 . De este modo se asegura que los bordes más ruidos no se rompan en varios fragmentos.

En la siguiente imagen se muestra la fase de extracción de bordes con la primera imagen de la secuencia de vídeo con la célula aislada rotando (**Figura 20**).

En cuanto a la metodología seguida para determinar los parámetros óptimos para una correcta segmentación, se probó a segmentar con múltiples valores de los umbrales y de la desviación. Tras ello, se comprobó que con un umbral inferior de 0, uno superior de 0.2 y una desviación de 0.5 existía una correcta segmentación. Se intentó lograr que se detectara solo el contorno de interés, pero no se lograron grandes resultados, dejando estos valores como finales.

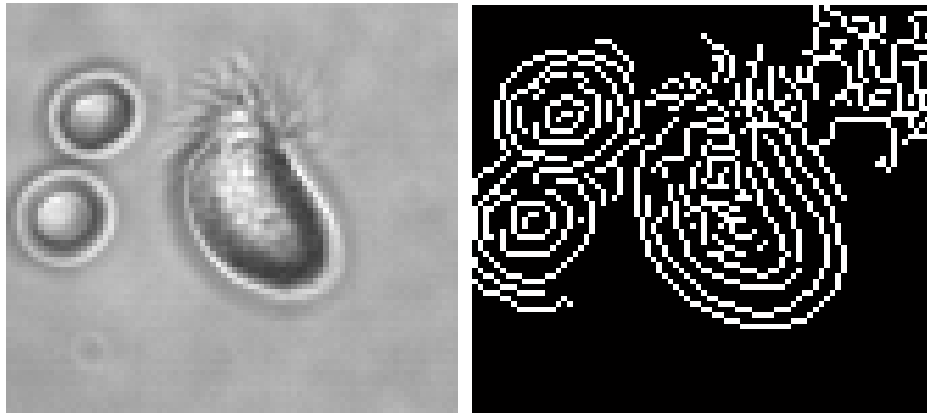


Figura 20. Extracción de bordes por Canny, con un umbral inferior de 0, un superior de 0.2 y una desviación de 0.5



Figura 21. Ejemplo de la fase de extracción de bordes por el método de Canny [13].

4.2 Segmentación

4.2.1 Características generales de la segmentación

La segmentación de imágenes constituye un primer paso para la mayoría de las tareas de análisis cuantitativo de imágenes. Su objetivo es obtener una partición de la imagen en regiones coherentes como paso previo al análisis de su contenido. No es una tarea nada sencilla, ya que la forma del objeto a segmentar no es siempre regular o no tiene siempre unos límites claramente definidos.

Existen numerosas aplicaciones de la segmentación, en multitud de campos:

- Industria
 - Supervisión automática de procesos industriales
 - Control de calidad
 - Vigilancia o detección de fallos
- Análisis de fotografías aéreas o por satélite

- Clasificación de diferentes tipos de vegetación para el estudio de su degradación
- Clasificación y control de cultivos en agricultura
- Detección de objetos
- Medicina
 - Detección de células en citología
 - Localización de fracturas
 - Análisis de ecografías
 - CATs (TAC) e imágenes de rayos X en traumatología

A modo de ejemplo, en la figura 22, se muestran algunas aplicaciones de la segmentación:

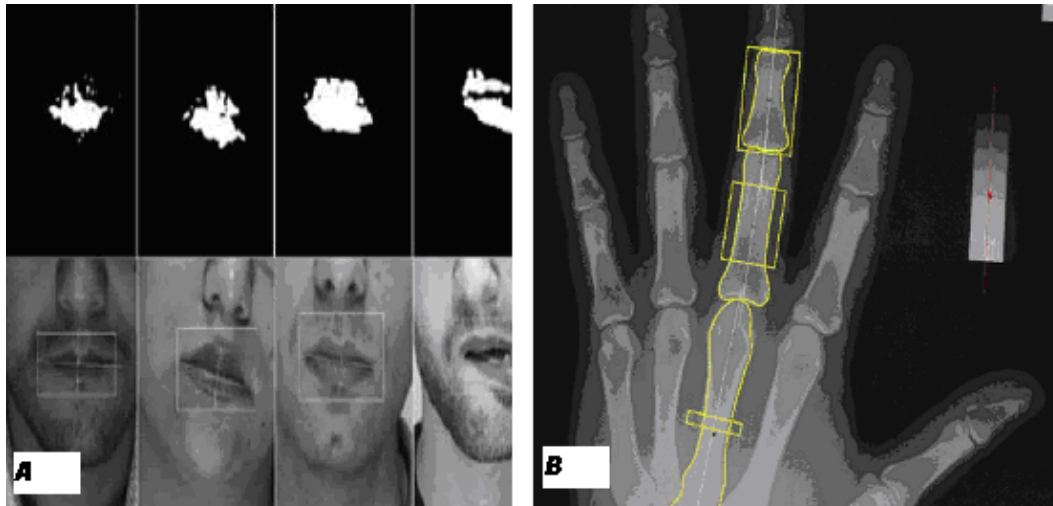


Figura 22. Aplicaciones de la segmentación en medicina: A) Segmentación de gestos bucales en secuencias de vídeo, aplicación industrial, B) Segmentación de la falange medial, proximal y metacarpiano mediante radiografía [14].

4.2.2 Fundamentos de los contornos activos

El algoritmo de la segmentación por contornos activos fue introducido por **Michael Kass, Andrew Witkin y Demetri Terzopoulos** [15]. En los contornos activos confluyen dos disciplinas diferentes: la geometría y la física. La geometría sirve para establecer un modelo matemático para la forma del contorno y la física se encarga de modelar las propiedades dinámicas de la curva, como la tensión o rigidez de la misma, y como influyen esos parámetros en la adaptación de la curva al contorno de interés.

Este método establece un modelo paramétrico de la curva que nos permite tener una representación compacta del modelo deformable, a la vez que una descripción analítica para los objetos a segmentar. Es una herramienta cuya principal ventaja reside en el hecho de que compensa las irregularidades de los métodos clásicos de segmentación, al tener el modelo deformable ciertas propiedades de suavidad y continuidad definidas por leyes físicas.

4.2.3 Modelos paramétricos

Según la descripción de Klass en su modelo clásico, introducido en 1987, un *snake* es una curva definida como $u(s) = [x(s), y(s)]$, $s \in [0, 1]$ definida sobre el dominio de la imagen \mathbb{R}^2 , deformándose a partir de una cierta forma inicial. El criterio de deformación es minimizar cierta función de energía y tiene como fin ajustarse a determinadas características de la imagen, como puede ser un contorno, produciéndose como respuesta a fuerzas externas que se ven contrarrestadas por fuerzas internas, que intentan mantener la condición de suavidad de la curva.

Los modelos paramétricos permiten tener una representación muy compacta que se traduce en una mayor rapidez de cómputo. La desventaja principal es que necesitan una inicialización del contorno lo bastante cercana al contorno deseado como para conseguir buenos resultados. Estos modelos no son apropiados en casos en los que existen cambios topológicos, como cuando las curvas se dividen o se funden, pues consiguen resultados muy pobres. En este proyecto, se usaron este tipo de modelos, pues es necesaria gran rapidez de cómputo, ya que las secuencias tienen un gran número de *frames*.

El *snake* se mueve por la imagen tratando de minimizar una cierta función de energía definida como:

$$E(u) = E_{\text{int}}(u) + E_{\text{ext}}(u) \quad (1.5)$$

Donde E_{int} y E_{ext} son la energía interna y externa asociada a la curva o *snake*.

La expresión de la **energía interna** vendrá dada por la siguiente expresión:

$$E_{\text{int}}(u) = \int_0^1 \frac{1}{2} \left[\alpha |u'(s)|^2 + \beta |u''(s)|^2 \right] ds \quad (1.6)$$

Existen ciertos parámetros que son útiles para manipular el comportamiento físico y se refieren a las características intrínsecas del modelo *snake*:

- El parámetro α se define como la elasticidad de la curva, controlando la longitud de la curva. Valores elevados de α implican que la curva tratará de ajustarse al contorno optimizando longitud, con lo que su forma será más circular. Por el contrario, cuando aparezcan regiones cóncavas, o con algún tipo de rugosidad, será necesario que los valores de este parámetro sean bajos para poder ajustarse a dichas regiones.
- El parámetro β es la rigidez de la curva. Controla la flexibilidad, la capacidad de la curva para adaptarse a cambios bruscos de contorno.
- El parámetro γ controla la viscosidad de la curva. Tiene un funcionamiento similar a β , y es capaz de determinar la capacidad de desplazamiento de la curva por la imagen.
- El parámetro **Kappa** actúa como peso de la fuerza externa, controlando la importancia de las fuerzas externas, dadas por el GVF, en el guiado frente a las internas.

- El parámetro de presión **Kappap**, propuesto en el modelo “Balloon”

En cuanto a la **energía externa**, se obtiene a partir de la imagen, definiéndose como:

$$E_{ext}(u) = \int_0^1 P(u(s)) ds \quad (1.7)$$

donde $P(u(s))$ es una función que depende de parámetros extraídos de la imagen. La curva es atraída por los mínimos locales de esta función, que dependiendo de las características de la imagen que sean de interés presenta una forma u otra. Existen varios modelos para esta función según la aplicación y el tipo de imagen a segmentar, distinguiéndose principalmente tres:

$$P(x, y) = -I(x, y) \quad (1.8)$$

$$P(x, y) = -|\nabla I(x, y)|^2 \quad (1.9)$$

$$P(x, y) = -\|\nabla [\nabla G_\sigma(x, y) * I(x, y)]\|^2 \quad (1.10)$$

donde $I(x, y)$ es una función que define la imagen en niveles de gris para cada punto, $G_\sigma(x, y)$ es una función gaussiana con desviación estándar σ y ∇ es el operador gradiente.

La expresión (1.4) provoca el movimiento de la curva hacia los puntos de la imagen con mayor intensidad. Si nos interesa que el **snake** se adapte a determinados contornos de la imagen se puede usar la expresión (1.5), ya que provoca el movimiento del **snake** hacia las zonas de mayor gradiente, es decir, hacia los bordes de los objetos.

Algo que se debería hacer para mejorar la segmentación es un filtrado paso bajo antes de hacer el cálculo del gradiente (1.6), con lo que aumenta el rango de captura del **snake** por aparecer los contornos más difuminados. Este filtrado se usa en el presente proyecto, para ampliar el rango de captura del **snake** y poder guiar la curva con más efectividad.

La curva u que minimiza la expresión (1.1) debe satisfacer la ecuación de Euler:

$$\begin{cases} (\alpha u)' - (\beta u)'' - \nabla P(u) = 0 \\ u(0), u'(0), u(1) \text{ y } u'(1) \text{ conocidos} \end{cases} \quad (1.11)$$

Cada uno de los términos de la ecuación de Euler puede ser visto como una fuerza aplicada a la curva, por lo que tal ecuación se puede describir como un balance de fuerzas de la forma:

$$F_{int} + F_{ext}^{(p)} = 0 \quad (1.12)$$

donde $F_{int} = (\alpha u)' - (\beta u)''$ y $F_{ext}^{(p)} = -\nabla P(u)$. Las fuerzas internas son las encargadas de mantener la forma de la curva, tensión y rigidez, mientras que las fuerzas externas empujan la curva hacia los contornos de interés. Estas fuerzas son calculadas a partir de la imagen, formando mapas de vectores de fuerza que guían al **snake**.

Una forma de hallar una solución a la ecuación (1.7) es hacer que la curva $u(s)$ sea dinámica y varíe su posición en función del tiempo t . La ecuación a resolver quedará:

$$u_t(s,t) = (\alpha u'(s,t))' - (\beta u''(s,t)) - \nabla P(u(s,t)) \quad (1.13)$$

Cuando se estabiliza la solución $u(s,t)$, el término $u_t(s,t)$ desaparece y obtenemos una solución. Esta ecuación puede ser resuelta numéricamente usando distintas técnicas, como por ejemplo, diferencias finitas.

El método tradicional de los contornos activos requiere el cálculo de una función $f(x, y) = -P(x, y)$ a partir de la imagen, según las ecuaciones (1.5) y (1.6), que proporciona un mapa de contornos. El gradiente de este mapa de contornos ∇P proporciona vectores normales a los contornos, de valor elevado en los puntos cercanos a los bordes, pero prácticamente nulo en zonas homogéneas alejadas.

El método “*GVF snakes*”, propuesto por Xu y Prince, propone modificar el cálculo del campo de gradientes utilizando un proceso de difusión de modo que los vectores de este campo apunten hacia los contornos aún en zonas homogéneas alejadas de los contornos de interés, con lo que el snake es capaz de avanzar hacia dichos contornos aunque haya sido inicializado lejos de estos contornos. Así, las fuerzas externas se calcularán a partir de la imagen formando mapas vectorizados de fuerza, denominados GVF, que guían la curva por la imagen.

Un GVF, cuyas siglas vienen de Gradient Vector Flow (campo de flujo de vectores), se define como el campo $V(x, y) = [u(x, y), v(x, y)]$ que minimiza la función de energía

$$\mathcal{E} = \iint \left[\mu(u_x^2 + u_y^2 + v_x^2 + v_y^2) + |\nabla f|^2 |V - \nabla f|^2 \right] dx dy \quad (1.14)$$

En los puntos alejados de los contornos el valor de ∇f se hace muy pequeño, por lo que domina el primer término de la ecuación, mientras que a medida que nos aproximamos al contorno el segundo término va aumentando su valor. Este hecho produce que V sea prácticamente igual al gradiente original cuando el valor de éste es elevado y que en las zonas elevadas los vectores vayan progresiva y suavemente aumentando su valor cuando más se acercan al contorno. El término μ equilibra los dos términos y se elige según las características de ruido de la imagen.

Básicamente, un GVF es una matriz que representa mediante vectores las variaciones de intensidad en la imagen. A mayor módulo de dichos vectores, mayor variación de intensidad existe en esa dirección.

Aquí se muestra un ejemplo de un mapa GVF:

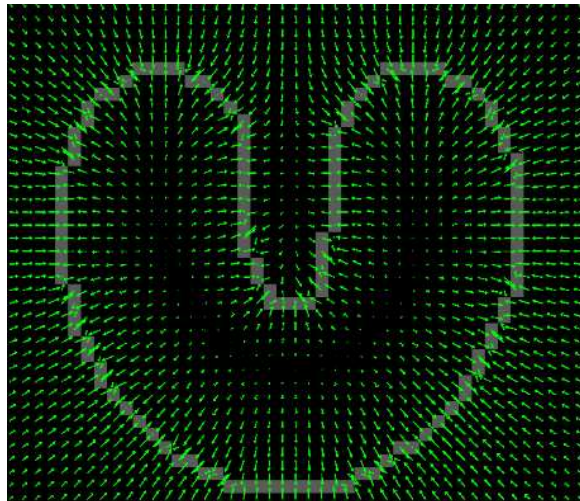


Figura 23. Mapa vectorizado de fuerzas GVF de un contorno blanco en un fondo uniformemente negro [16].

Se puede observar que existe un contorno blanco claramente diferenciado del fondo negro. Dicho contorno crea una gran variación de intensidad, reflejada en el GVF con vectores cuyo módulo aumenta progresivamente conforme nos acercamos a dicho contorno. En las zonas del fondo negro, al no haber tan grande variación, los vectores tendrán un módulo bastante inferior.

Partiendo de una curva (**Figura 24**), que no ha de estar ajustada al contorno que se pretende alcanzar como objetivo, se ve como se adapta al contorno conforme avanzan las iteraciones del algoritmo de contornos activos. Cada uno de los puntos de la curva se mueve proporcionalmente a los vectores de fuerza del GVF.

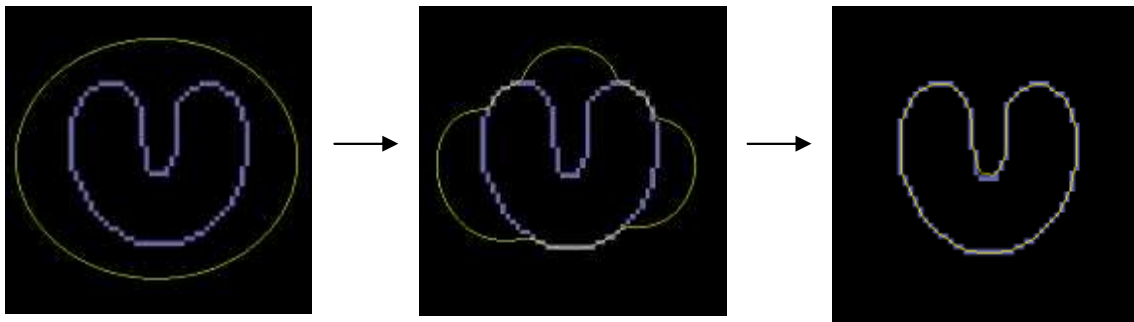


Figura 24. Sobre la imagen inicial se define una curva inicial (en amarillo) que se va adaptando movida por fuerzas externas contrarrestadas por fuerzas internas hasta adaptarse totalmente al contorno [16].

El modelo clásico de Kass presenta tres grandes limitaciones:

- La curva inicial debe estar lo más próxima posible al contorno de interés, de otro modo puede que no avance lo suficiente como para detectarlo, quedándose en contornos alejados.
- La snake no puede separarse en varias *snakes* independientes, por lo que no puede hacer frente a cambios topológicos que impliquen una división del contorno.
- En objetos con contornos activos cóncavos o esquinas abruptas la detección se complica en gran medida.

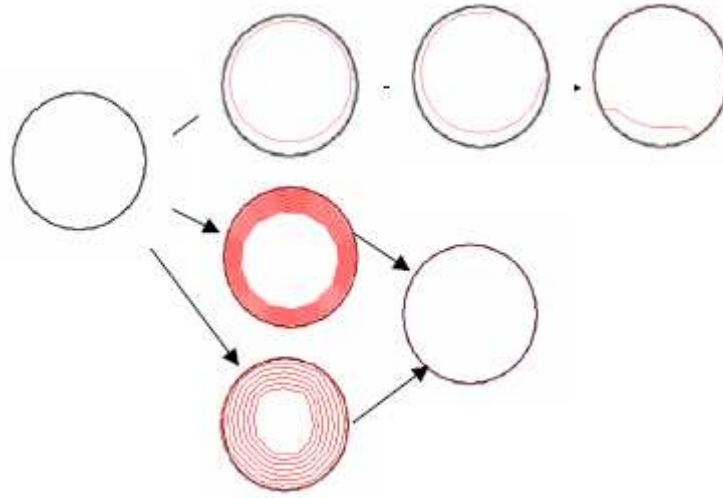


Figura 25. Ejemplo en la deformación con la técnica clásica (imagen superior), balloons (imagen central) y GVF snakes (imagen inferior) [13].

El problema de la inicialización se puede minimizar si añadimos términos extra a la fuerza externa de la ecuación (1.8), de modo que se incremente el rango de captura de la curva y sea forzado a avanzar hacia los contornos deseados. Los métodos “*Balloon*” y “*GVF snakes*” proponen varias soluciones para superar dicha limitación.

El método Balloon, propuesto por Cohen, propone usar una fuerza externa de la forma

$$F_{ext} = k_1 \vec{n}(s) - k \frac{\nabla P}{\|\nabla P\|} \quad (1.15)$$

Donde $\vec{n}(s)$ es el vector unitario a la curva en el punto $u(s)$ y k_1 es el término que controla la amplitud de esta fuerza. Dicha fuerza se conoce también como fuerza de presión, ya que dependiendo del signo de k_1 ‘hincha’ o ‘deshincha’ al *snake* inicial. Pasando de largo de contornos débiles, pues podrían ser discontinuidades aisladas, y deteniéndose solamente en aquellos contornos de valor elevado. Además de esta fuerza de presión, Cohen propuso también una modificación del modelo de fuerza externa de modo que los puntos que están más alejados de los contornos de interés presentan valores más elevados. Estas fuerzas, llamadas ‘Fuerzas Potenciales de Distancia’, basadas en el cálculo de mapas de distancia euclídea, mejoran el problema de la inicialización, pero no solucionan el problema de adaptación en contornos cóncavos.

4.3 Correstración

4.3.1 Características generales del correstración

La correstración es una herramienta necesaria cuando se pretende realizar una comparación de dos o más imágenes que han sido obtenidas, bien con referencias geométricas distintas (escalados, desplazamientos o orientaciones distintas en cada una de ellas) o bien con distintas condiciones de adquisición.

El proceso de la corrección de imágenes busca minimizar las diferencias en las referencias geométricas de las imágenes mediante un alineamiento de las mismas, de tal forma que sus características comunes sean fácilmente relacionadas. Formalmente, la corrección se debería definir como *“el procedimiento de búsqueda de la transformación geométrica que pone en concordancia espacial dos imágenes”*.

En imagen médica, se puede establecer una clara clasificación:

- Modalidades anatómicas o estructurales: Describen la morfología (resonancia magnética [RM], TAC y rayos X)
- Modalidades funcionales: Describen información del metabolismo de la anatomía subyacente (tomografía por emisión de positrones [PET])

A continuación se listan algunas aplicaciones de la corrección:

- Observar la evolución temporal de un mismo objeto o fenómeno, alineando todas las imágenes obtenidas de éste. Se adquieren imágenes de un mismo objeto en instantes diferentes que son captadas por distintos dispositivos (Ej.: extravasación en angiografías fluoresceínicas)
- Comparación de un mismo órgano de diferentes pacientes: Para saber la diferencia de una cierta disfunción en determinado órgano, es muy útil comparar las pruebas obtenidas en un paciente que no la padezca y en el que la padece.
- Correlacionar información obtenida de diversas modalidades de imagen. Correlacionar imágenes RM, que dan buena discriminación de tejidos sanos y enfermos con tomografía computerizada (CT) que dan buena resolución en la localización espacial para cirugía. También se puede correlacionar imágenes PET, que dan información funcional para la detección de tumores hepáticos con CT, de nuevo para una localización precisa, ya que PET da una resolución espacial muy baja.



Figura 26. Corrección de una imagen resonancia magnética con una imagen PET. Con esto, obtenemos dos tipos de información completamente diferente en un mismo píxel, integrando la información de ambas en una sola imagen [17].

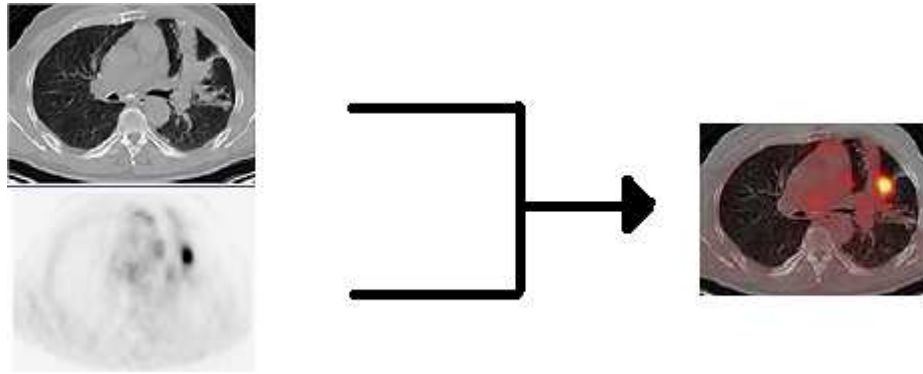


Figura 27. Corrección de imagen TAC con una imagen PET [18].

Existen infinidad de métodos para realizar el registro, cada uno de ellos con técnicas distintas. La fase de la corrección es una fase compleja, ya que todos los métodos de registro son, en general, difíciles de manejar y lentos computacionalmente.

Una de las grandes problemáticas de la corrección, se debe a que, dada la gran diversidad de imágenes sobre las que se aplica un registro, es imposible especificar un algoritmo que sirva para todas las situaciones. Hay que comprobar como funciona cada algoritmo con las imágenes de interés y analizar la velocidad de convergencia del algoritmo y si es posible ir mejorándola de alguna manera.

Aquí se lista una breve enumeración de algunos algoritmos de registro de imágenes:

- **Correlación cruzada**
- **Transformada Fourier-Mellin**
- **Entropía conjunta**

En cuanto a los métodos de registro que existen, éstos se detallan en la siguiente tabla:

	EN QUÉ CONSISTE	DESVENTAJAS
MANUAL	Giros y traslaciones de una imagen hasta que coincide geoméricamente con la otra	Realización manual de todo el proceso. Dependencia del algoritmo del usuario
SEMI-AUTOMÁTICO	Registro por pares de puntos	El resultado se debe comprobar visualmente pues puede no converger, cosa que quita la automaticidad del proceso.
AUTOMÁTICO	Optimizan una función de coste que está relacionada con el grado de concordancia de las dos imágenes	El coste computacional y la complejidad del algoritmo aumenta considerablemente

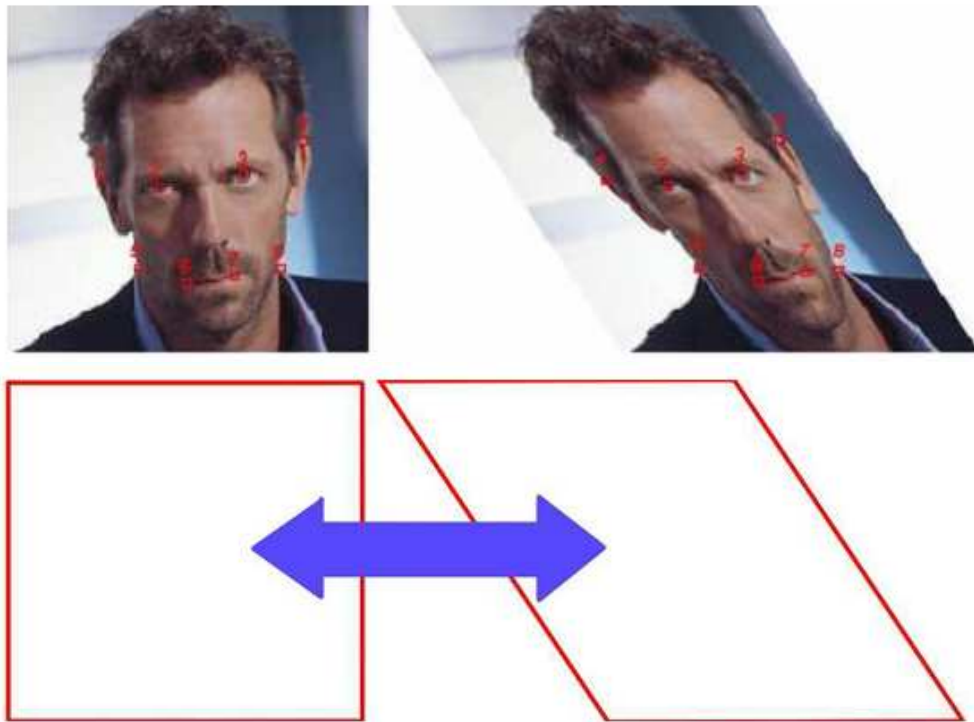


Figura 28. Un ejemplo de corrección por pares de puntos. Se trata de encontrar la transformación geométrica que sufre cada uno de los puntos para pasar de la imagen origen a la imagen destino [17].

4.3.2 Tipos de transformaciones geométricas usadas en la corrección

Una transformación geométrica es una aplicación que hace corresponder a cada punto del plano otro punto del plano. Como consecuencia, una figura mediante esta aplicación se transforma en otra figura distinta.

En el presente proyecto, al manejar secuencias de vídeo con elementos en dos dimensiones, solo hablaremos de las transformaciones bidimensionales, donde son evidentemente menos complejas que las 3D (hay menos cantidad de datos y de parámetros).

Las transformaciones más usuales son las traslaciones, rotaciones, escalados y simetrías. Donde todas ellas mantienen la forma y proporción de las figuras, solo hacen desplazamientos, giros o modifican su tamaño por igual en todas las dimensiones.

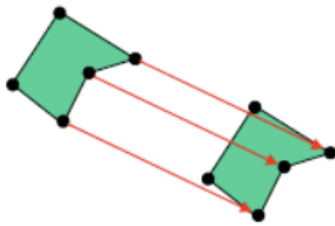
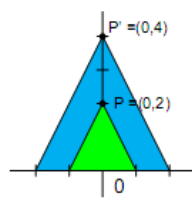
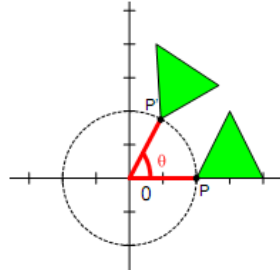
<p>Traslación.</p> $T = \begin{bmatrix} 1 & 0 & T_x \\ 0 & 1 & T_y \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$	
<p>Escalado.</p> $T = \begin{bmatrix} S_x & 0 & 0 \\ 0 & S_y & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$	
<p>Rotación.</p> $T = \begin{bmatrix} \cos\theta & -\sin\theta & 0 \\ \sin\theta & \cos\theta & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$	
$P = \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix} \quad P' = T \times P = \begin{bmatrix} x' \\ y' \end{bmatrix}$	

Figura 29. Matriz de giro, translación y escalado.

El corregistro del que se hará uso necesita una transformación la cual incluye giros y desplazamientos únicamente. Una **transformación rígida** está compuesta tan solo por estas dos transformaciones básicas: rotación y translación. El objeto no se deforma ni se dimensiona de forma alguna.

Transformación rígida	
$W = \begin{bmatrix} \cos\theta & -\sin\theta & 0 \\ \sin\theta & \cos\theta & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 & T_x \\ 0 & 1 & T_y \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos\theta & -\sin\theta & T_x \cos\theta - T_y \sin\theta \\ \sin\theta & \cos\theta & T_x \sin\theta + T_y \cos\theta \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$	
$P = \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix} \quad P' = W \times P = \begin{bmatrix} x' \\ y' \end{bmatrix}$	

Figura 30. Matriz de la transformación rígida, como combinación de las dos transformaciones básicas de rotación y escalado

4.3.3 Entropía conjunta

El contenido de información de una señal I se suele medir a través de la entropía de Shannon, definida como:

$$H(I) = - \sum_{v \in I} p(v) \log(p(v)) \quad (1.16)$$

donde v es cada valor de la señal que realmente aparece en I (si se prefiere, cada símbolo distinto) y $p(v)$ es la densidad de probabilidad de dichos valores, que en una imagen particular es estimada a través de su histograma.

En general, el histograma es un vector unidimensional cuyos índices son los posibles valores de la señal (0-255) y cuya ordenada son el número de píxeles que tienen un determinado valor de señal.

La figura 31 muestra un ejemplo de histograma:

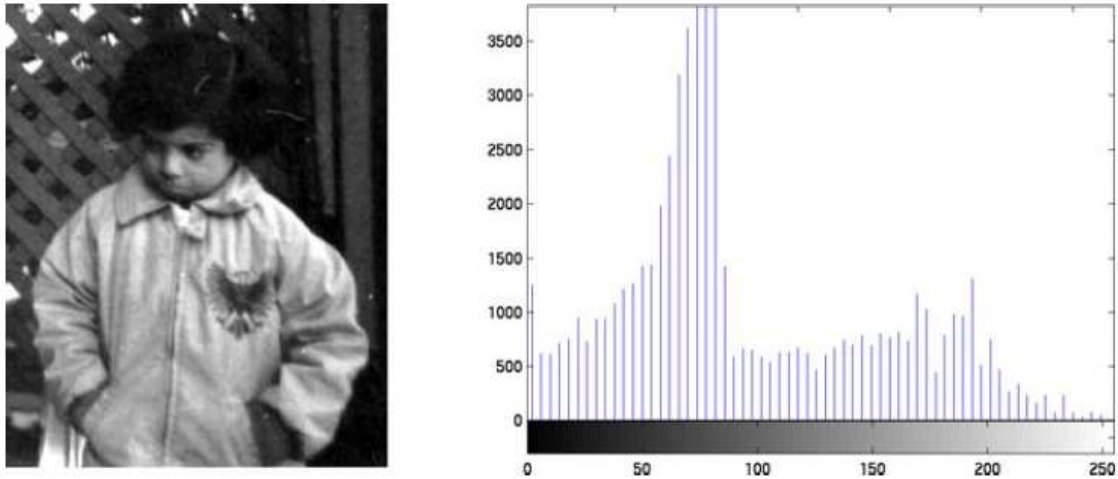


Figura 31. Imagen en blanco y negro y su correspondiente histograma. En el eje x los valores posibles de la imagen, que van de 0 a 255. En el eje y, el número de píxeles que tienen ese determinado valor de señal.

En el caso de dos imágenes se puede trabajar con la probabilidad conjunta de los procesos que las generan, entendiendo por tal la probabilidad de observar un valor v_1 en cierto punto de una de las imágenes si se observó v_2 en el punto correspondiente de la otra imagen. Se puede estimar mediante el histograma conjunto, que siempre es un vector de dos dimensiones.

$$C(v_1, v_2) = \# \{ (x, y, (z)) / I_1(x, y, (z)) = v_1 \text{ y } I_2(x, y, (z)) = v_2 \}$$

donde $(x, y, (z))$ es cada píxel de cada una de las imágenes.

A partir de esto se puede estimar la *información mutua* de dos señales A y B como:

$$I(A, B) = H(A) + H(B) - H(A, B) = Hm(B, A) \quad (\text{es simétrica}) \quad (1.17)$$

donde la entropía conjunta se define como:

$$H(A, B) = - \sum_{(v_1, v_2 \in C)} C(v_1, v_2) \log(C(v_1, v_2)) \quad (1.18)$$

La entropía conjunta $H(A, B)$ es la cantidad de información que comparten las dos imágenes, y es lo que se pretende maximizar.

Básicamente, para el cálculo del histograma conjunto, a cada punto (x,y) del plano le corresponde un nivel de intensidad en función del número de veces que un píxel de intensidad x en la imagen A se corresponde con un píxel y en la imagen B. Cuando se tienen dos imágenes alineadas, al tener bastantes píxeles que coinciden, existen ciertos puntos del histograma con intensidades elevadas (normalmente alrededor de una recta).

Obsérvese que si A y B son la misma señal, la información mutua $I(A, B)$ es cero. En cambio, si las señales son señales independientes, el término $H(A, B)$ tiene un valor nulo y en consecuencia $H(A, B) = H(A) + H(B)$.

La técnica de la entropía conjunta se basa en encontrar la transformación geométrica que minimiza la información mutua. Esto es minimizar $I(A, B)$, aunque esto es lo mismo que maximizar $H(A, B)$.

Una de las desventajas de esta herramienta es que tiene un coste computacional muy alto, pues se ha de calcular el histograma conjunto para cada una de las transformaciones que se realicen.

A continuación, un breve ejemplo del uso de la entropía conjunta, en el área de medicina, con imágenes de RM (resonancia magnética) y CT (tomografía computerizada):

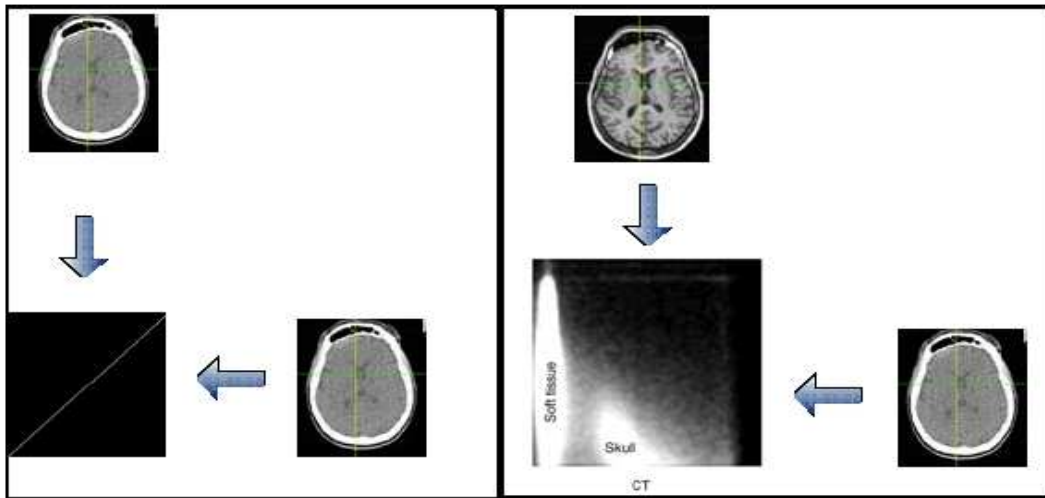


Figura 32. Cuando las dos imágenes son la misma, el histograma conjunto se alinea entorno a una recta. El objetivo es alinearlas lo mejor posible para que dicho histograma sea lo más parecido a la recta del caso ideal [20].



Figura 33. Conforme se desalinean las imágenes, el histograma conjunto se va esparciendo, alejándose de la recta del caso de las dos imágenes iguales [18].



Figura 34. Un ejemplo en aplicaciones con movimiento en imágenes: Conforme la diferencia entre imágenes aumenta (existe movimiento), al reducirse su parecido los puntos entorno a la recta empiezan a dispersarse [19].

4.3.4 Correlación cruzada

La correlación cruzada es una herramienta matemática capaz de cuantificar el parecido entre dos matrices, en este caso imágenes. Es un valor entre -1 y 1, y su expresión es la siguiente:

$$r = \frac{\sum_m \sum_n (A_{mn} - \bar{A})(B_{mn} - \bar{B})}{\sqrt{(\sum_m \sum_n (A_{mn} - \bar{A})^2)(\sum_m \sum_n (B_{mn} - \bar{B})^2)}} \quad (1.19)$$

donde \bar{A} y \bar{B} son las medias de A y B, respectivamente

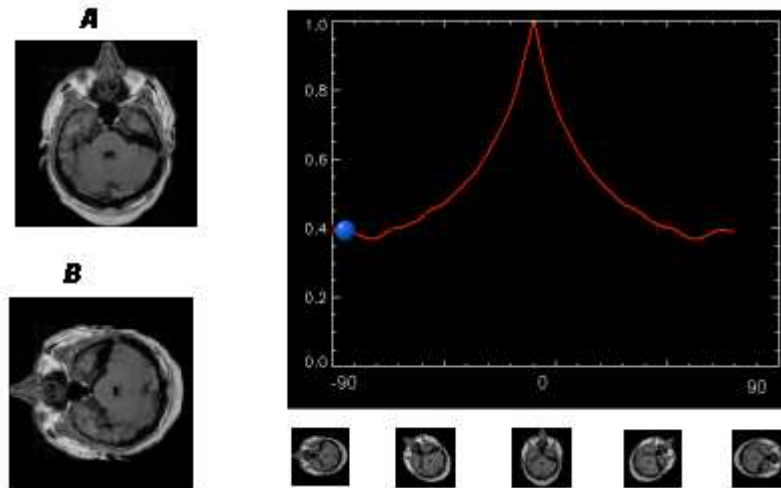


Figura 35. El diagrama representa la correlación cruzada entre las imágenes A y B en función del ángulo que se gira la imagen B. Se va rotando la imagen B y se calcula la correlación cruzada con la imagen A y se representan los valores de la correlación. El máximo de correlación (el máximo de parecido) se da para un cierto ángulo de giro, con el que se girará la imagen B finalmente [20].

Esta herramienta suele tener un coste computacional menor, sobretodo porque la correlación se calcula más rápido que la entropía conjunta. En cuanto a la correlación, se sigue calculando para cada transformación de la imagen, quedándose con la transformación que tiene mayor parecido (en términos de correlación) con la imagen original.

Un aspecto a tener en cuenta es que hay que aplicar la correlación cruzada con imágenes que tengan la misma naturaleza (mismas características de iluminación, mismas condiciones de adquisición, etc). Esto ha de ser así ya que la correlación cruzada depende exclusivamente de la intensidad de las imágenes, y no tiene sentido aplicarse en esos casos.

4.3.5 Algoritmo automático de correregistro

Este algoritmo se ha probado usando las dos técnicas de correregistración anteriores: entropía conjunta y correlación cruzada. Se basa en realizar giros y desplazamientos (transformaciones rígidas) sobre una de las imágenes e ir comparándola con la imagen referencia, almacenar dichas comparaciones y luego escoger el ángulo, junto al desplazamiento en x y en y, para el cual se maximiza el parecido de las dos imágenes. Los resultados de la comparación serán en términos de correlación o de entropía, según se use una variante u otra, ya que este algoritmo se puede combinar con las dos técnicas indistintamente.

En el algoritmo de correregistro, existe una imagen que no se transforma durante el proceso, denominada imagen fija, y otra que sí lo hará (imagen móvil). Por comodidad, la imagen fija es el primer *frame* de la secuencia. El algoritmo parte de un determinado **vector de ángulos**, y para cada uno de ellos va desplazando la imagen móvil y la va comparando con la de referencia, almacenando los resultados de la comparación de cada desplazamiento en una matriz.

Para almacenar los valores de correlación cruzada o de entropía conjunta de cada transformación (los desplazamientos correspondientes a cada ángulo), se usa una estructura matricial de 2 dimensiones. Para cada ángulo tendremos una matriz de dos dimensiones con los valores de correlación o de entropía conjunta para cada una de las posiciones probadas.

$$\begin{bmatrix} corr(1,1) & corr(1,2) & \cdots & corr(1,j) & \cdots & corr(1,N) \\ corr(2,1) & corr(2,2) & \cdots & corr(2,j) & \cdots & corr(2,N) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ corr(i,1) & corr(i,2) & \cdots & corr(i,j) & \cdots & corr(i,N) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ corr(M,1) & corr(M,2) & \cdots & corr(M,j) & \cdots & corr(M,N) \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} entr(1,1) & entr(1,2) & \cdots & entr(1,j) & \cdots & entr(1,N) \\ entr(2,1) & entr(2,2) & \cdots & entr(2,j) & \cdots & entr(2,N) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ entr(i,1) & entr(i,2) & \cdots & entr(i,j) & \cdots & entr(i,N) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ entr(M,1) & entr(M,2) & \cdots & entr(M,j) & \cdots & entr(M,N) \end{bmatrix}$$

Figura 36. Matrices usadas para almacenar los valores de correlación y de entropía para cada ángulo. Realmente es una estructura matricial de 3 dimensiones (ángulo, desplazamiento en x, desplazamiento en y). Para cada ángulo probado se desplaza la imagen en la dimensión x (i posiciones) y en la y (j posiciones), comparándose con la original y almacenando dicho resultado en la posición (i,j). Si la correlación o entropía no supera la inicialmente calculada se le da valor nulo.

Un esquema del proceso de correregistro, a un nivel general, sería el siguiente:

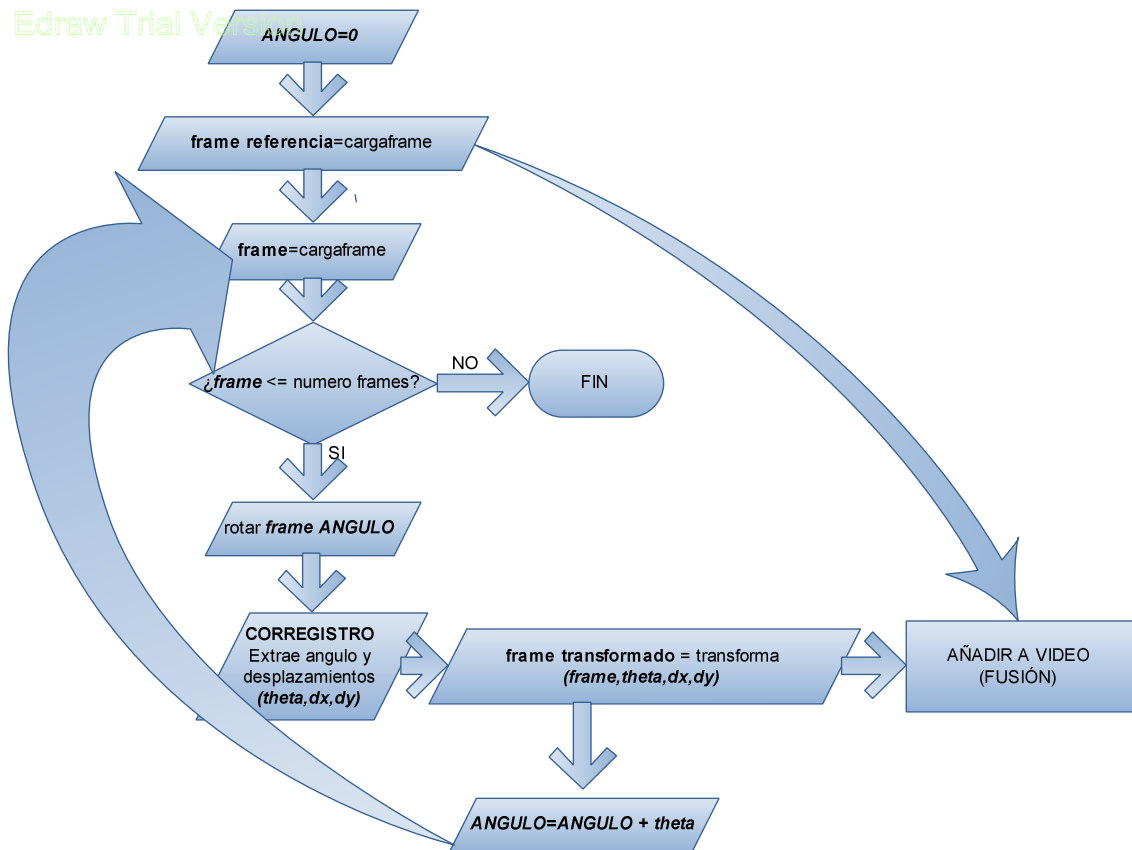


Figura 37. Flujograma global del proceso de correregistro automatizado

De esta forma, se obtiene una imagen cuya transformación, bien maximiza la correlación o minimiza la entropía conjunta. Nótese que si la comparación entre la imagen fija y la imagen móvil sin transformar (denominada base) no es superada por ninguna de las transformaciones, no se almacena, con lo que se están descartando ciertas transformaciones que no mejoran la función objetivo.

La figura 37 muestra un esquema del proceso de correregistro a un nivel general.

Las principales desventajas de éste método son:

- Necesidad de realizar una **transformación provisional** para poder comparar con la imagen original para cada desplazamiento y para cada ángulo
- Estructura del programa principal con **demasiados bucles anidados**: lentitud que hace el algoritmo inviable (1 *frame* cada 2 minutos con correlación cruzada). Para el caso de entropía conjunta, la lentitud llegaba a hacer completamente inviable el algoritmo (1 *frame* cada 3 minutos).
- **Grandes cambios de iluminación** durante la secuencia: La correlación es altamente sensible a estos cambios.
- Si el **vector de ángulos es grande** el algoritmo es tan lento que es inviable su uso en tales circunstancias. Inicialmente se probaba con un vector que iba de 0.1 grados a 2 grados, con paso de 0.1 grados (20 elementos).

Todos estos inconvenientes no fue posible resolverlos, aunque se pudo conseguir optimizar algo el proceso. En primer lugar se pensó en reducir el vector de ángulos. Para ello, se usa el **método de la bisección**, donde el intervalo de búsqueda queda reducido a dos puntos únicamente. El algoritmo sólo tendrá que comprobar dos ángulos y todos los desplazamientos posibles de cada uno de ellos.

El método de la bisección es un algoritmo de búsqueda de raíces de ecuaciones, que trabaja dividiendo el intervalo a la mitad y seleccionando el subintervalo que tiene la raíz.

Se llama a la función con dos ángulos iniciales, -1 y 1, donde esto es un giro de un grado a izquierda y otro giro de un grado a derecha. Esto se hace así porque el vídeo que se pretende corregrabar tiene un giro uniforme hacia derechas, pero también un pequeño giro menos perceptible a izquierdas, justamente cuando coge impulso la célula. La función hace las dos transformaciones, y se queda con la que mayor correlación o entropía da, y entonces se la vuelve a llamar partiendo dicho intervalo de nuevo, tal y como muestra la siguiente figura.

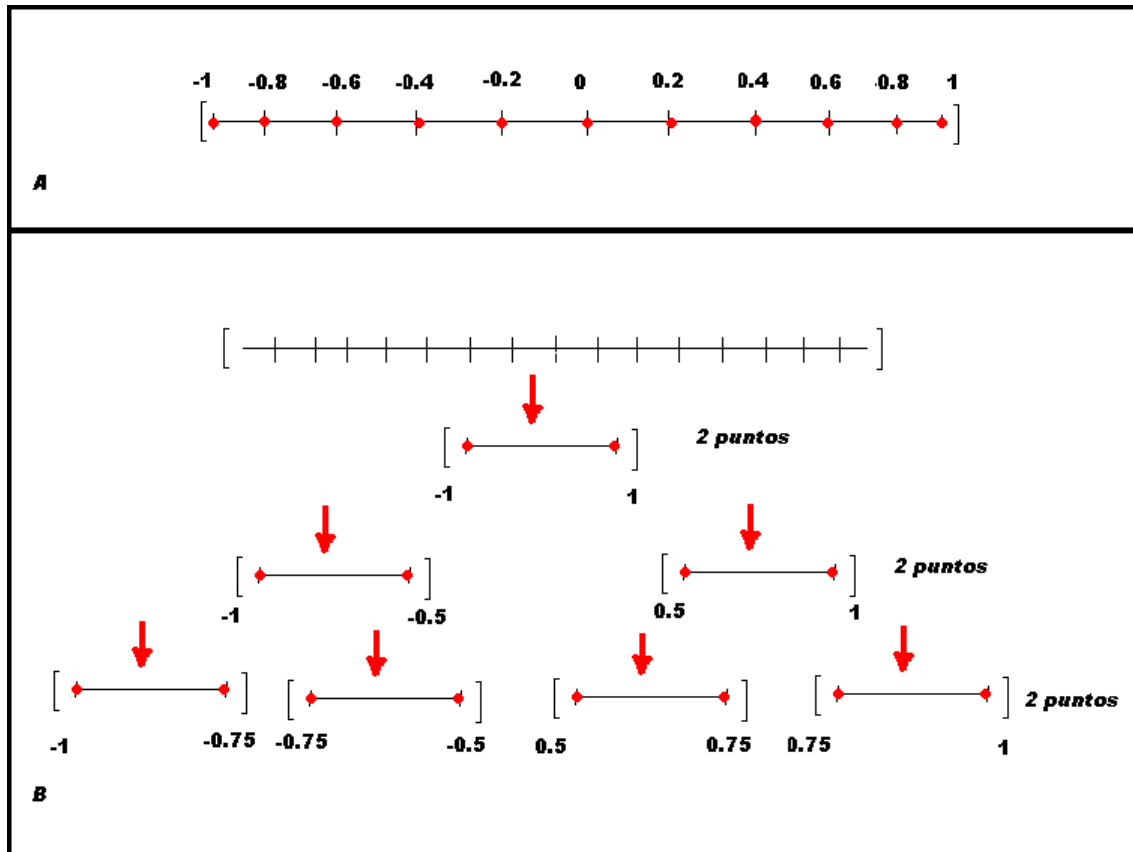


Figura 38. En la figura A, con ángulos desde -1 hasta 1 (11 puntos), la función que corregrista será llamada con un vector de 11 elementos. En cambio, con el método de bisección (figura B), será reducido el vector a uno de dos componentes, con lo que el coste computacional se minimizará en gran medida.

4.3.6 Registro mediante la transformada Fourier-Mellin (TFM)

La transformada Fourier-Mellin realmente hace uso de dos transformadas más un cambio de variable. El esquema general de la transformada de Fourier-Mellin se muestra en la figura 39.

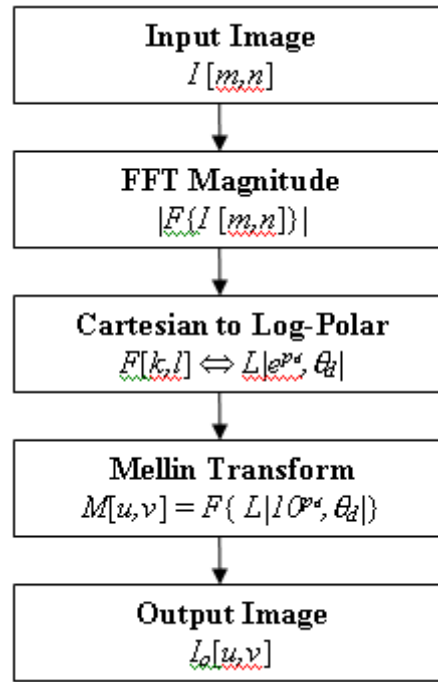


Figura 39. La TFM es una herramienta muy útil para reconocimiento de patrones, debido a sus propiedades de invarianza en rotación, translación y escalado [22].

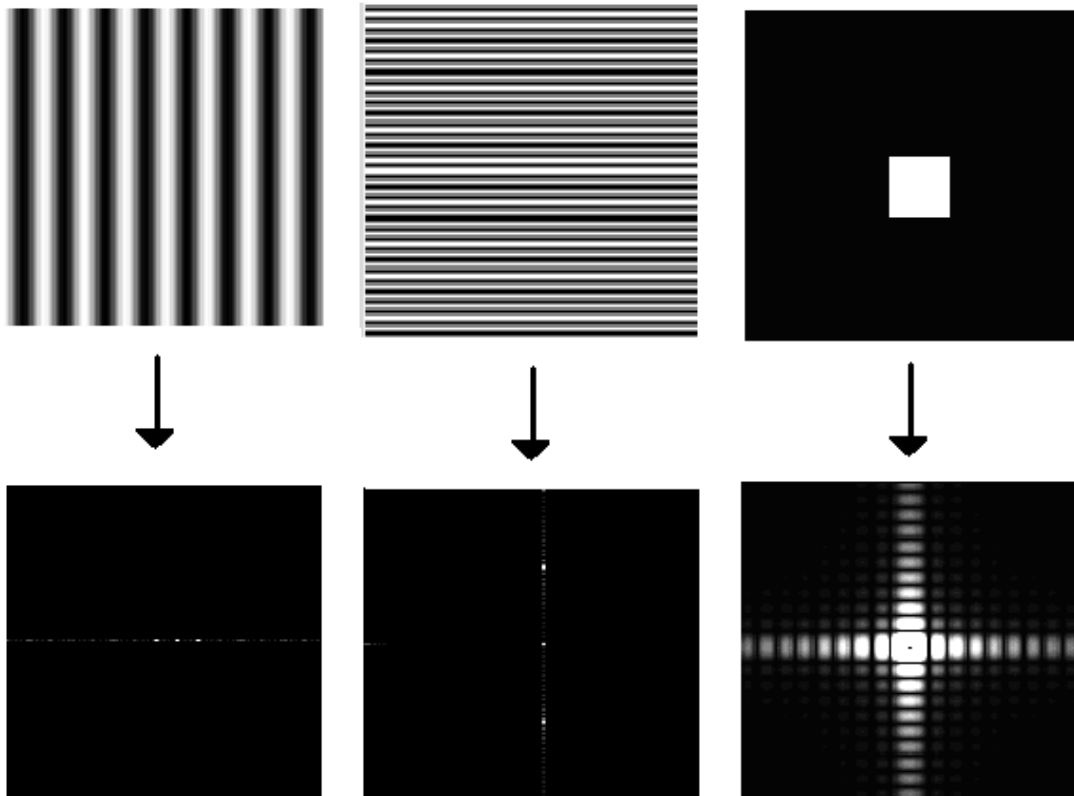


Figura 40. FFTs de imágenes con líneas horizontales, verticales y de un cuadro. Arriba las imágenes sobre las que se calcula la FFT, abajo sus respectivas transformadas. [23].

Para un análisis de la transformada de Fourier-Mellin (FMT) se parte de la función:

$$f(r, \theta), \forall (r, \theta) \in R_+^* \cdot S^1$$

donde r es la variable radial, definida en \mathbb{R}^+ (incluyendo el 0), y θ es la variable angular, medida en radianes y definida en el intervalo $[0, 2\pi]$.

Para este tipo de funciones de dos variables $f(r, \theta)$, la transformada de Fourier-Mellin se define mediante la siguiente ecuación:

$$M_f(k, v) = \frac{1}{2\pi} \int_0^\infty \int_0^{2\pi} f(r, \theta) r^{-jv} e^{-jk\theta} d\theta \frac{dr}{r} \quad (1.22)$$

El resultado de la FMT es una nueva función de dos variables k y v . La variable k definida para todos los números enteros positivos y negativos, incluyendo el cero, y la variable v está definida para todos los números reales.

Uno de los problemas que presenta la ecuación (1.9) es la singularidad que presenta el término $\frac{1}{r}$ en $r = 0$, donde si $f(r, \theta)$ no tiende a cero en ese punto provoca la divergencia del resultado. Para evitarlo, se puede modificar la transformada, de forma que se sume una constante σ a la potencia de r , de tal forma que esta nunca sea -1. Esta nueva transformada se denominada transformada Fourier-Mellin analítica (AFMT) y se escribe de la siguiente forma:

$$M_{f_\sigma}(k, v) = \frac{1}{2\pi} \int_0^\infty \int_0^{2\pi} f(r, \theta) r^{\sigma-jv} e^{-jk\theta} d\theta \frac{dr}{r} \quad (1.23)$$

Para que esta integral converja, la constante σ debe tener un valor real positivo mayor a cero. Un valor bastante típico para esta constante es $\frac{1}{2}$.

Una de las propiedades más interesantes que tiene la AFMT, es la relacionada con el **teorema de traslación en coordenadas log-polares**. Para dos funciones con similitud plana, de tal forma que $g(r, \theta) = f(\alpha r, \theta + \beta)$, donde α y β son constantes que representan cambios de escala y orientación respectivamente, dicho teorema es:

$$M_{g_\sigma}(k, v) = \alpha^{-\sigma+jv} e^{jk\beta} M_{f_\sigma}(k, v) \quad (1.24)$$

Para realizar el cálculo de la rotación de un objeto se hace teniendo en cuenta la siguiente expresión, denominada **función de emparejamiento**, en función de $f(r, \theta)$:

$$E_{f,g}(\rho, \varphi) = \left(\int_0^\infty \int_0^{2\pi} r^{2\sigma} |f(r, \theta) - g(\rho r, \theta + \varphi)|^2 d\theta \frac{dr}{r} \right)^{1/2} \quad (1.25)$$

Si asumimos que las funciones a comparar son iguales en escala, esto es $\rho=1$, y que solamente se diferencian en fase, la función de emparejamiento quedará, en función de las funciones $M_{g_\sigma}(k, v)$ y $M_{f_\sigma}(k, v)$:

$$E_{f,g}(\rho, \varphi) = \left(\int_{-\infty}^{\infty} \sum_{k \in \mathbb{Z}} \left| M_{f_{\sigma}(r, \theta)}(k, v) - e^{jk\varphi} M_{g_{\sigma}}(k, v) \right|^2 dv \right)^{1/2} \quad (1.26)$$

Esto es cuando se comparan dos imágenes de idéntica forma pero con distinta orientación, donde el valor φ que hiciese mínima su función de emparejamiento sería el ángulo que forman ambas imágenes entre sí.

La transformación log-polar puede ser usada para describir la rotación y el escalado como un simple desplazamiento. La figura 41 muestra una imagen con la que se puede observar dicha transformación

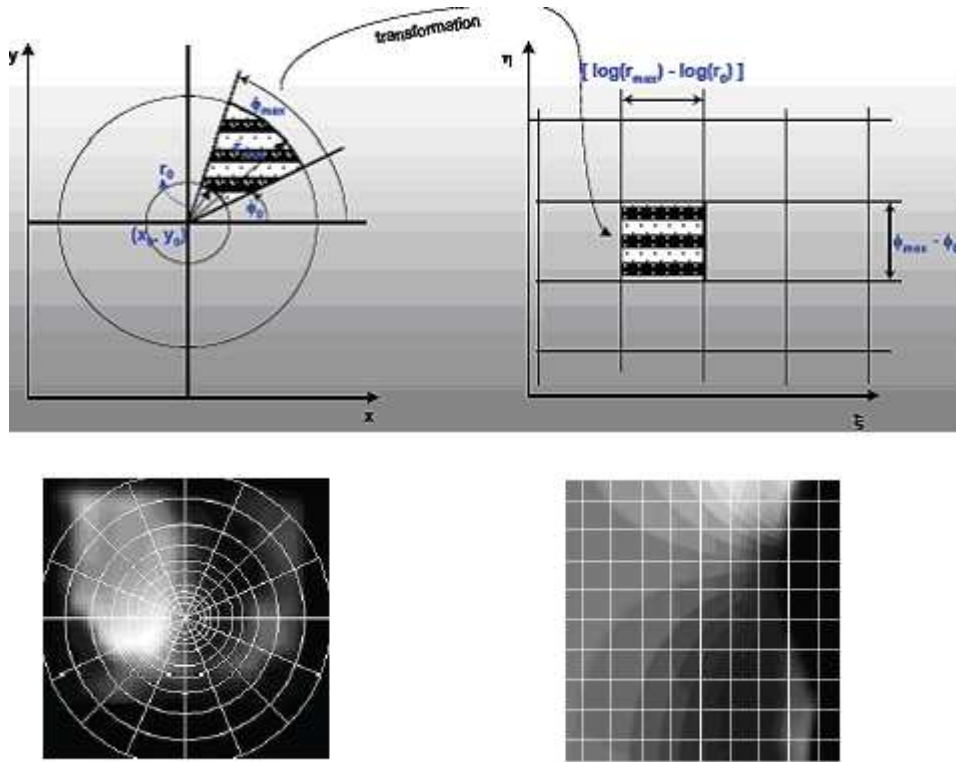


Figura 41. Ejemplo de la transformación log-polar, conversión usada en la FMT [24].

Una de las principales aplicaciones de la FMT es la corrección, sobretodo cuando se ha de usar transformaciones rígidas (rotaciones y traslaciones). Aunque existen unas cuantas que también son de gran interés:

- Reconocimiento de objetos
- Marcado de agua
- Preprocesado de imágenes de huellas digitales

4.4 Caracterización del batido ciliar

4.4.1 Fundamentos del método de flujo óptico

Para definir el concepto de flujo óptico, es necesario saber que es un campo de movimiento. Un campo de movimiento es *“un desplazamiento inducido en los píxeles de la imagen por el movimiento relativo de los objetos en la escena”*. A partir del campo de movimiento no es posible recuperar el movimiento real de los objetos de la escena.

El flujo óptico podría definirse entonces como el *movimiento aparente* de los niveles de intensidad en una imagen, con lo que es una aproximación del campo de movimiento. Lo que pretende este algoritmo es codificar el desplazamiento de cada uno de los píxeles que forman la imagen. A continuación un breve ejemplo mediante una imagen de un objeto en movimiento.

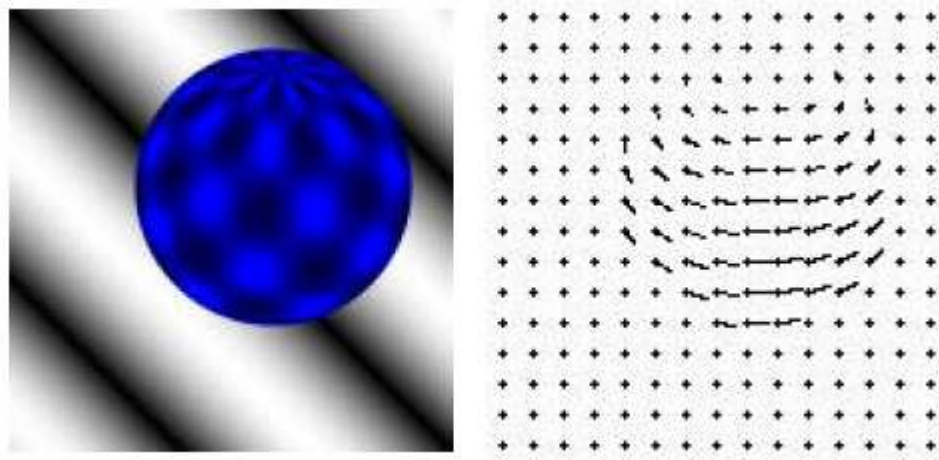


Figura 42. A la izquierda una pelota moviéndose hacia la izquierda. A la derecha, el cálculo del flujo óptico de la secuencia, donde se puede ver dicho movimiento representado como un campo vectorial [25].

La gran complejidad en el método del flujo óptico reside en que la relación entre el flujo óptico en el plano de la imagen y la velocidad de los objetos en el mundo tridimensional no es necesariamente obvia, ya que se está proyectando en el plano de la imagen (2D) el movimiento tridimensional de los puntos presentes en ella.

La intensidad de la imagen en una secuencia de vídeo tiene variación con la posición, por ser imagen, y con el tiempo, por ser una secuencia de vídeo. Por ello se la tratará a la intensidad como una función de tres variables $I(x, y, t)$.

Una de las primeras condiciones que se ha de establecer es que la intensidad se conserve lo largo del tiempo, asumiendo que las únicas variaciones de intensidad existentes son debidas al movimiento de elementos de la imagen, esto es $\frac{\partial I(x, y, t)}{\partial t} = 0$.

Tras esta restricción, la ecuación de flujo óptico, más conocida como OFE, tiene la siguiente expresión:

$$\frac{\partial I(x, y, t)}{\partial x} v_x + \frac{\partial I(x, y, t)}{\partial y} v_y + \frac{\partial I(x, y, t)}{\partial t} = 0 \quad (1.27)$$

Los flujos posibles en cada punto están situados en una recta perpendicular al gradiente espacial., en la siguiente imagen se muestra el ejemplo:

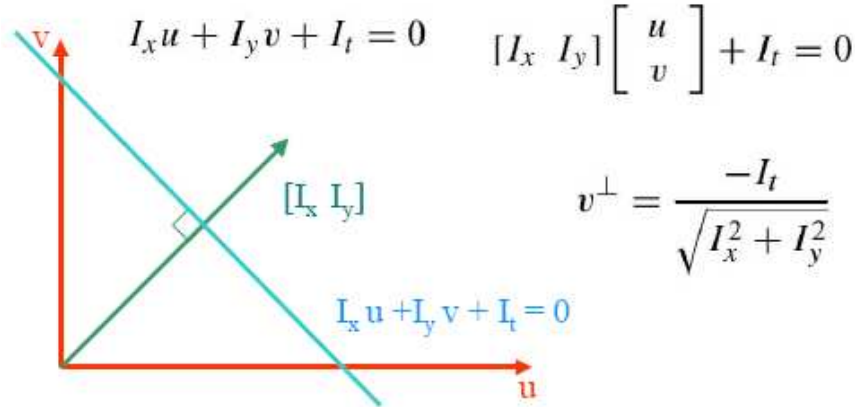


Figura 43. Flujos posibles de cada punto en el método de flujo óptico [25].

Las **técnicas basadas en correlación** son las que más se emplean para el cálculo del flujo óptico. Se basan en el patrón de niveles de gris alrededor del punto de interés y en la búsqueda del patrón más similar en la siguiente imagen. Se parte de la hipótesis de que el patrón de niveles de gris es aproximadamente constante entre imágenes sucesivas y que la textura local contiene suficiente información no ambigua.

Estos algoritmos de correlación, parten de la idea de encontrar el bloque de píxeles en el instante siguiente que mejor concuerde con cada bloque del instante anterior, tal y como indica la siguiente imagen:

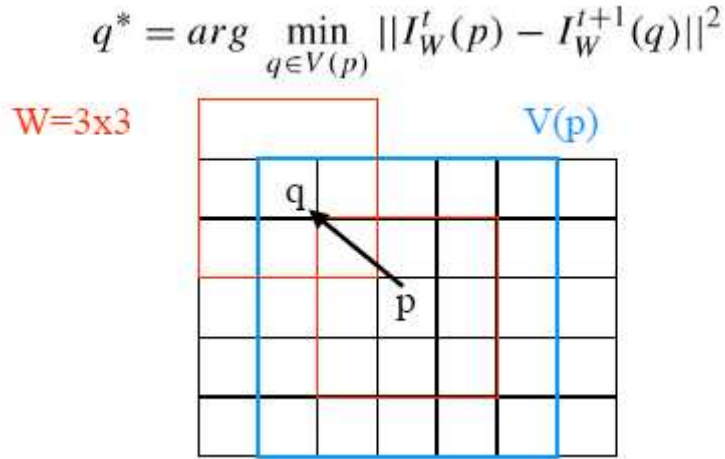


Figura 44. Partiendo de un punto p, con una ventana $W=3 \times 3$ píxeles, se busca el bloque de píxeles de la imagen siguiente que mayor correlación tenga con la actual. El punto q es el punto con mayor correlación con el punto p [25].

Las **técnicas diferenciales** calculan la velocidad a partir de las derivadas espacio-temporales de la intensidad de la imagen. Las técnicas básicas emplean derivadas de primer orden basadas en la traslación de la imagen. Se basan en la conservación en el tiempo del gradiente espacial:

$$\frac{\partial \nabla I(x, y, t)}{\partial t} = 0, \quad \nabla I(x, y, t) = \begin{bmatrix} \frac{\partial I(x, y, t)}{\partial x} \\ \frac{\partial I(x, y, t)}{\partial y} \end{bmatrix} \quad (1.28)$$

La variante de flujo óptico empleada es la de **Proesman**. Dicha técnica usa la combinación de dos técnicas: basadas en la correlación y diferenciales.



Figura 45. Resultado de la aplicación de la variante Proesman del método de flujo óptico [26].

Además se usa un modelo piramidal para reducir el coste computacional que tiene el algoritmo básico. Este algoritmo se basa en un modelo piramidal de N niveles, para optimizar el coste computacional.

Las potenciales aplicaciones de una herramienta tan potente como el flujo óptico son:

- Segmentación de objetos
- *Tracking* o seguimiento de objetos
- Compresión de imágenes (p.e. MPEG)
- Eliminación de vibración en secuencias

4.4.2 Análisis de la frecuencia de la batida ciliar mediante el estudio de la intensidad de los píxeles

El movimiento ciliar es un movimiento cíclico, con dos ciclos que tienen funcionalidades bastante diferentes, el de recuperación y el de barrido. Todo movimiento cíclico o periódico tiene unas características que se repiten con el tiempo, además ese tiempo es cuantificable y recibe el nombre de *periodo*.

Para analizar la frecuencia de la batida ciliar, idealmente, se sitúa una ventana de un píxel en la región ciliar. Este píxel tendrá un nivel de intensidad de gris distinto para cada *frame*. Se obtendrá una cierta señal, que tendrá un valor distinto de intensidad para cada *frame* analizado. Se analizará dicha señal y se extraerán sus componentes frecuenciales, esperando obtener valores entre 6 y 10 hercios, correspondientes a las personas que no sufren la patología de la discinesia.

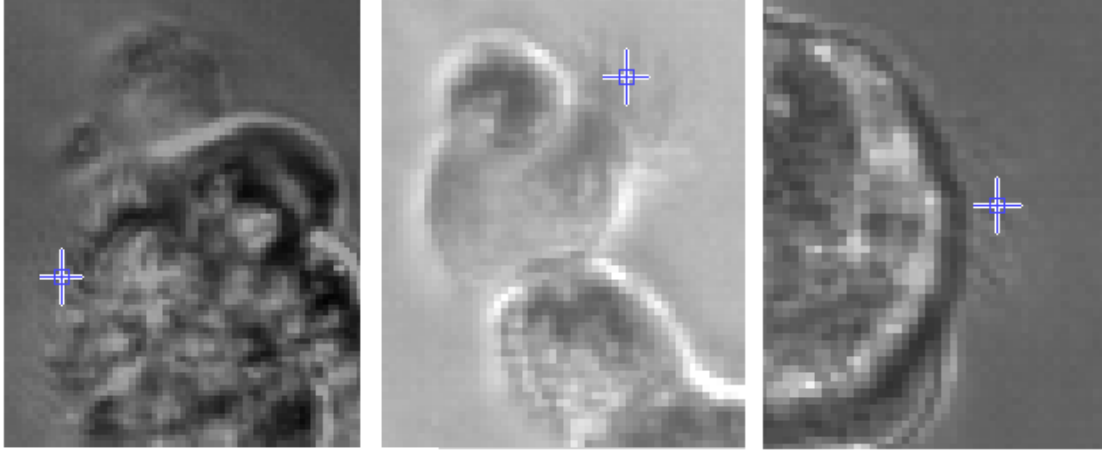


Figura 46. Varios ejemplos de secuencias de vídeo correspondientes a células epiteliales, junto con el píxel que es analizado durante toda dicha secuencia.

Muestreo de señales continuas

Las señales que se trabajan en la teoría son continuas, denominadas analógicas, pero cuando se trabaja en la computación, el procesamiento por el hardware o software es siempre digital, con lo que se ha de convertir dichas señales analógicas en señales digitales o discretas.

El proceso que se encarga de realizar dicha función se denomina muestreo, y nos permite obtener una señal discreta a partir de una señal continua en el tiempo. Se basa en medir la señal en momentos periódicos de tiempo, normalmente en múltiplos del periodo de muestreo T_s . En términos de ecuaciones, teniendo una secuencia analógica $x(t)$, es posible obtener una secuencia discreta $x[n]$ de la siguiente forma:

$$x[n] = x(nT_s) \quad (1.29)$$

Si se denota a $x_\delta(t)$ como la señal obtenida multiplicando la secuencia de números $\{x(nT_s)\}$ por un tren de deltas espaciados T_s , entonces se puede expresar según la ecuación:

$$x_\delta(t) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} x(nT_s)\delta(t - nT_s) = x(t) \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(t - nT_s) \quad (1.30)$$

donde a $x_\delta(t)$ se la denomina señal muestreada ideal.

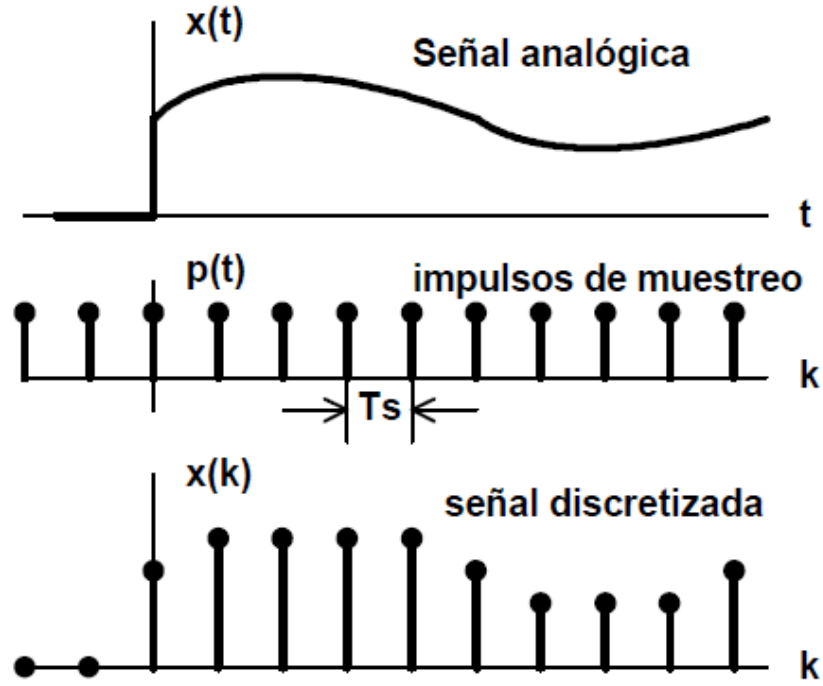


Figura 47. Proceso ideal de muestreo de una señal analógica [27].

El muestreo normalmente es un proceso reversible, siempre y cuando se respete el conocido *teorema de Nyquist*, el cual nos dice que para poder reconstruir $x(t)$ a partir de $x[n]$ es necesario que la frecuencia de muestreo F_s , donde $F_s = 1/T_s$, cumpla $F_s \geq 2W$, donde W es el ancho de banda de $x(t)$.

4.4.2.1 Análisis ciliar por FFT

Toda repetición periódica en el tiempo tiene una dualidad en la frecuencia. La transformada de Fourier (TF) permite realizar una transformación del tipo:

$$n(\text{tiempo}) \Leftrightarrow w(\text{pulsación})$$

$$X(e^{jw}) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} x[n]e^{-jwn} \quad (1.31)$$

Al igual que en dos dimensiones, se usará la versión rápida (FFT).

La FFT permite transformar los datos muestreados en el dominio del tiempo al dominio de la frecuencia.

Caracterización de la batida ciliar mediante análisis de imagen
para el diagnóstico precoz de la discinesia ciliar primaria

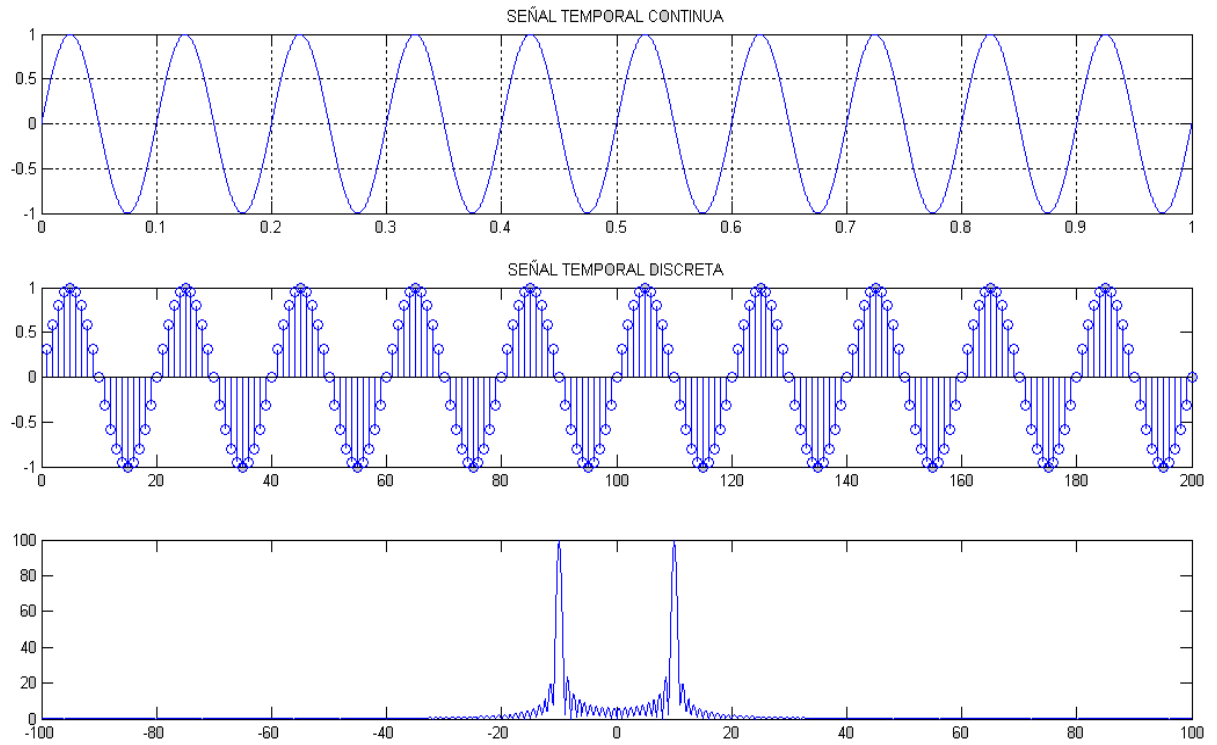


Figura 48. Ejemplo de una señal discreta, tras haber sido muestreada, de periodo 0.1 segundos y su correspondiente FFT, donde obtenemos un pico a la frecuencia de 10 hercios.

4.4.2.2 Análisis ciliar por PWELCH

El método de Welch se basa en el promediado de periodogramas modificados, y aporta mayor claridad a espectros que no son nítidos. Se usa normalmente para estimar la densidad espectral de potencia (DEP) de una determinada señal.

Partiendo de una secuencia $x[n]$ a analizar, realiza los siguientes pasos:

- Se divide $x[n]$ en k secciones de N_{FFT} puntos, pudiendo estar éstos solapados. La expresión de k es:

$$k = \frac{N - N_{solapados}}{N_{FFT} - N_{solapados}} \quad \text{donde } N_{solapados} \text{ es el número de muestras solapadas y } N \text{ la longitud de } x[n].$$

- Se inventana cada una de las secciones
- Se calcula el espectro de cada sección mediante la FFT
- Se obtiene el promedio de los espectros de cada sección
- Se obtiene la DEP

Este método realiza un procesamiento sobre la señal de análisis que la FFT por sí misma no realiza. Es una mejora de la FFT a efectos de inventanado y promediado, consiguiendo mejorar los resultados que se logran por FFT.

En el presente proyecto se ha usado el método de Welch, con los siguientes parámetros:

- FFTs de 1024 puntos ($N_{FFT} = 1024$)
- Número de muestras solapadas 200 ($N_{solapados} = 1024$)
- Inventanado Hamming

Inventanado de una señal

Se denomina inventanado de una señal $x[n]$, a la multiplicación de esa señal por una ventana $w[n]$, cuya función es trincar $x[n]$, para hacerla finita en el tiempo.

Existen varios tipos de ventanas, siendo la ventana rectangular la más sencilla:

$$w[n] = 1, \quad \forall n$$

De todas las existentes, el método de Welch usa la ventana Hamming, cuya expresión es:

$$w[n+1] = 0.54 - 0.46 \cos\left(2\pi\left(\frac{n}{m+1}\right)\right), \quad n = 1, \dots, m \quad (1.32)$$

Caracterización de la batida ciliar mediante análisis de imagen
para el diagnóstico precoz de la discinesia ciliar primaria

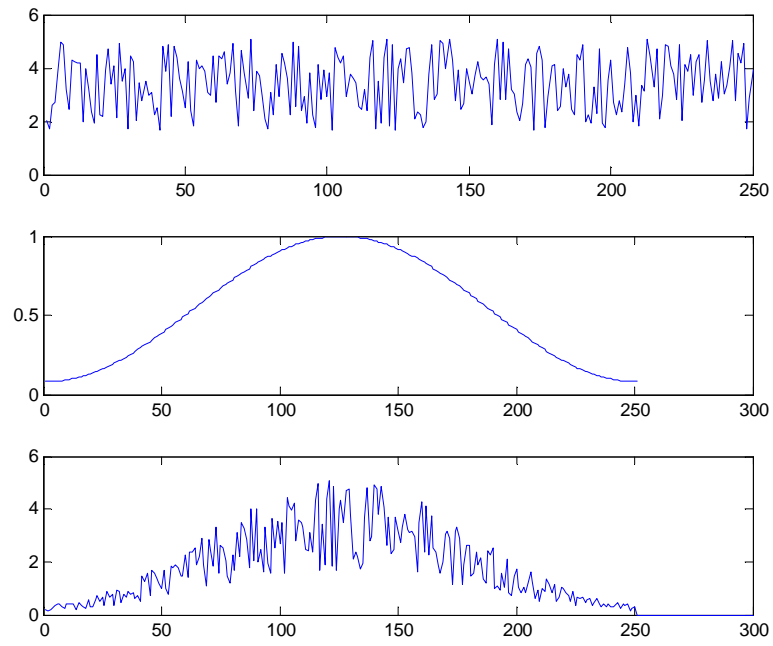


Figura 49. Efecto del enventanado sobre una cierta señal. Arriba, secuencia $x[n]$. En medio, ventana $w[n]$ Hamming. Bajo, secuencia $x[n]$ enventanada (esto es $x[n]w[n]$)

5. Resultados

5.1 Fase de segmentación

El funcionamiento de este algoritmo está basado en los contornos activos, como se introdujo anteriormente. Se basa en el funcionamiento de dos funciones principales, *frameini* y *framek*.

La función *frameini* pide una serie de puntos al usuario, denominados *puntos de control*. Con dichos puntos crea una curva que, con la función *snakedeform*, que tiene en cuenta el GVF, es capaz de deformarse para así adaptarse al contorno del primer *frame*. Dicho contorno se le pasa como parámetro inicial a *framek*, función que realiza la misma función que *frameini* pero adapta el contorno de un *frame* al contorno del siguiente *frame* de la secuencia.

Respecto a la influencia de los *puntos de control*, en todas las secuencias estudiadas se ha establecido una media de 15-20 puntos, teniendo en cuenta los siguientes límites:

- Pocos puntos limitan la flexibilidad en la adaptación de la curva
- Gran cantidad de puntos reducen mucho la velocidad del algoritmo

Con los *puntos de control* introducidos se crea una curva, que será una primera estimación del contorno a determinar. La función *frameini*, al igual que *framek*, irá llamando, iteración tras iteración, a la función *snakedeform* que se encarga de deformar dicha curva inicial teniendo en cuenta el GVF. El objetivo final de dicha deformación es ceñirse al contorno de la célula en ese *frame* inicial. Para ello, el número de iteraciones que se ha establecido es de 50, con la posibilidad de que el usuario pueda frenar en todo momento el proceso si ve que la curva ajusta lo bastante al contorno.

La función *snakedeform* es la más función más compleja, ya que sus argumentos de entrada tienen influencia directa sobre el guiado de la curva, pues tienen que ver con el comportamiento físico de la curva durante la fase de guiado. Estos argumentos, denominados *alpha*, *beta*, *gamma*, *kappa* y *presión*, han de tener unos valores determinados para que la curva se guíe correctamente hacia el contorno deseado.

Tanto en *frameini* como en *framek*, la determinación de los valores óptimos de *alpha*, *beta*, *gamma*, *kappa* y la *presión*, ha sido mediante pruebas con diferentes valores y ver el resultado de la adaptación de la curva al contorno.

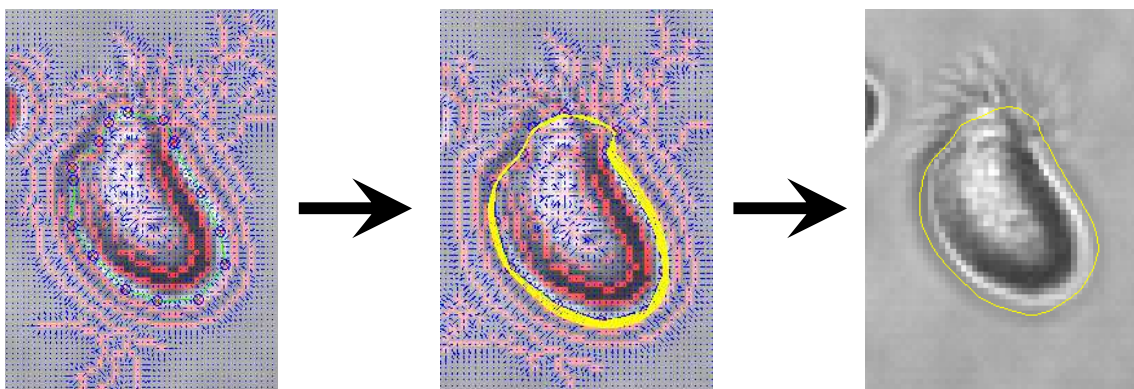


Figura 50. Ejemplo del funcionamiento de *frameini* con la secuencia '*Batida_ciliar_normal.avi*'. A la izquierda los puntos de control de los que parte el algoritmo, mediante interacción del usuario. En la

imagen del centro se ve como la curva inicial se va adaptando al contorno (amarillo). A la derecha, el contorno final obtenido tras 50 iteraciones.

A continuación se muestran los resultados de la fase de segmentación en las secuencias:

Batida ciliar normal.avi

Es la secuencia de vídeo con la que más ha resultado la fase de la segmentación. Se ha logrado determinar el contorno de dicha célula de forma óptima en casi todos los *frames* analizados. Tal y como se ve en la figura, la célula presenta una clara rotación a derechas, además de un pequeño desplazamiento. En cambio, no presenta ningún tipo de variación de forma.

En lo referente al proceso de adaptación del contorno inicial, con *frameini*, los parámetros para el guiado de la curva que se usaron fueron:

Alpha	Beta	Gamma	Kappa	Presión	Iteraciones
1	1.8	1.3	-1	0.1	50

Estos parámetros son los mismos en todas las secuencias estudiadas, así que no habrá variación de los mismos. Los que pueden cambiar sustancialmente son los parámetros de *framek*.

Así, en el seguimiento del contorno en los *frames* de la secuencia, con *framek*, se llegó a las siguientes tablas:

Imágenes normales (Correlación cruzada ≥ 0.98), valores por defecto

Alpha	Beta	Gamma	Kappa	Presión	Iteraciones
0.5	2	1.3	-1	0.01	5

Imágenes rápidas (Correlación cruzada < 0.98)

Alpha	Beta	Gamma	Kappa	Presión	Iteraciones
0.5	2	1.3	-2	0.1	10

Obsérvese aquí que las iteraciones durante el seguimiento son pocas, ya que no hicieron falta más para obtener un correcto seguimiento del contorno.

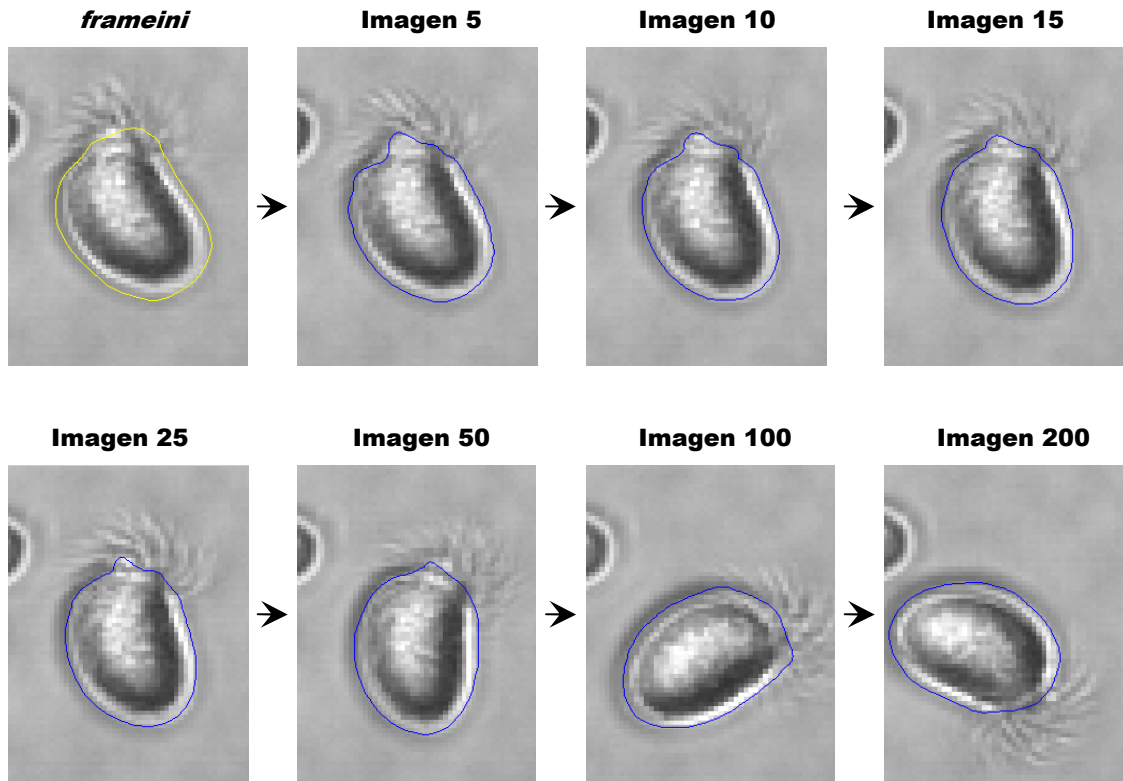


Figura 51. Ejemplo del seguimiento de la célula de la secuencia '*Batida_ciliar_normal.avi*' mediante la función *framek*

cilio1.avi

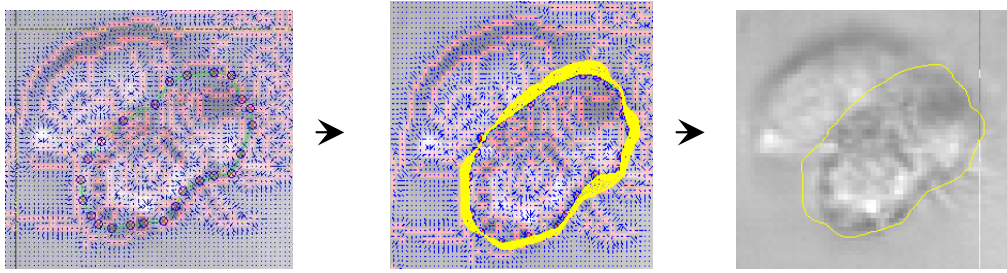
Una secuencia un tanto particular, ya que no es una única célula la que se mueve, sino que realmente es una composición de dos. Se pensó en segmentar el contorno formado por las dos células, pero segmentando tan solo el contorno de una de ellas, la segmentación mejoró considerablemente sus prestaciones. La razón de hacerlo así es porque la segmentación solo la usamos para tener una referencia y poder dejar rígida la célula. Es lo mismo segmentar toda la célula que una parte de ella si se consigue que la zona de referencia permanezca estable durante toda la secuencia, o su variación sea mínima.

Uno de los principales problemas de esta secuencia, al igual que en '*cilio2.avi*', es que los cilios se aprecian mucho menos que en las demás secuencias, lo cual dificultará mucho el posterior análisis ciliar.

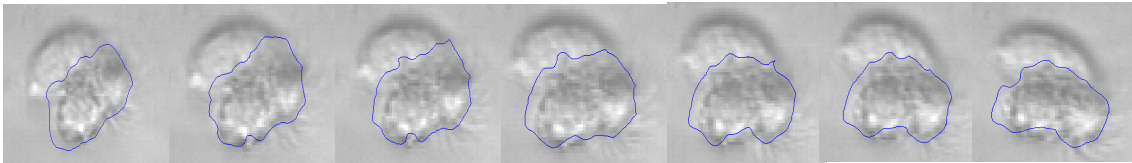
La secuencia también presenta una rotación a derechas, no tan importante como en el caso anterior, y un leve desplazamiento, pero no existe variación de la forma de la célula en ningún caso.

Aquí se muestra lo que realiza la función *frameini*:

Caracterización de la batida ciliar mediante análisis de imagen
para el diagnóstico precoz de la discinesia ciliar primaria



A continuación, el seguimiento del contorno en sucesivos *frames* de la secuencia, realizado por la función *framek*:

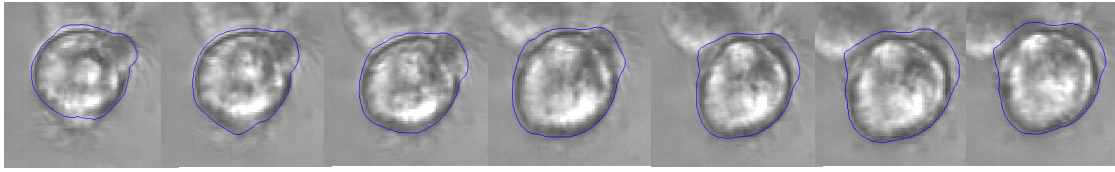


cilio2.avi

Aquí se muestra lo que realiza la función *frameini*:



A continuación, el seguimiento del contorno en sucesivos *frames* de la secuencia, realizado por la función *framek*:



ciliomovil.avi

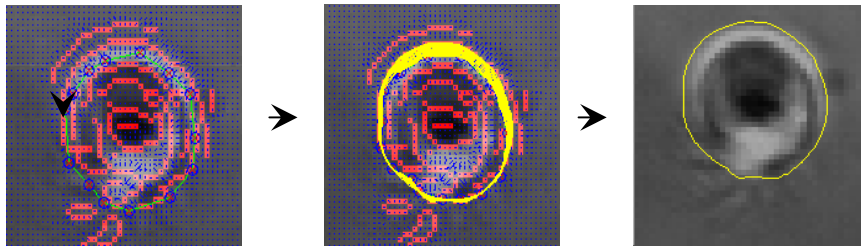
Esta secuencia tiene la particularidad de que existen múltiples cambios en la forma de la célula. Para resolver dicho problema se aumentaron las iteraciones de *framek*, ya que así la curva dispone de más iteraciones en cada *frame* para darle tiempo a adaptarse al nuevo contorno.

En consecuencia, los parámetros para el seguimiento en *framek*, se tuvieron que modificar. También se da el caso que las condiciones de iluminación varían sensiblemente respecto casos anteriores, con lo cual, se quedaron en estos valores:

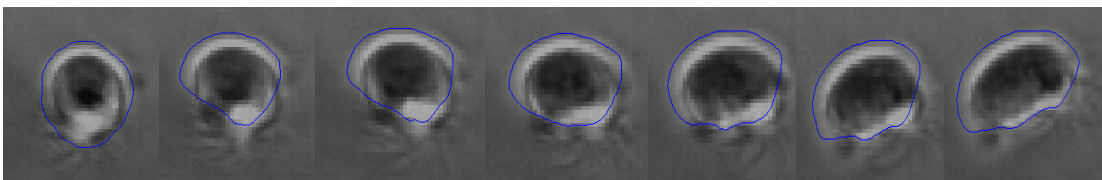
Alpha	Beta	Gamma	Kappa	Presión	Iteraciones
0.3	2	1.3	-1	0.01	50

De todas formas, no existe una segmentación perfecta, sobretodo cuando la célula tiene cambios bruscos en su forma. Se usaron técnicas de correlación pero sin mejorar los resultados.

Aquí se muestra lo que realiza la función *frameini*:



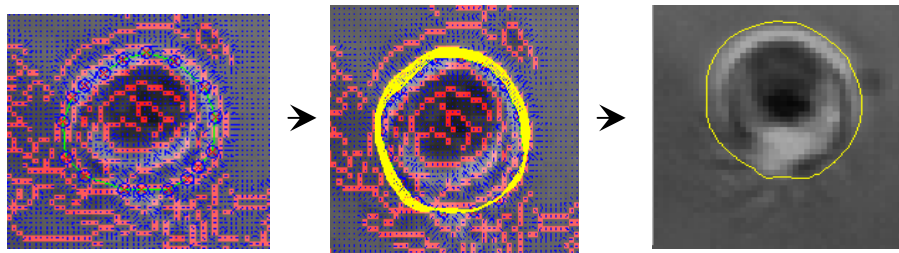
A continuación, el seguimiento del contorno en sucesivos *frames* de la secuencia, realizado por la función *framek*:



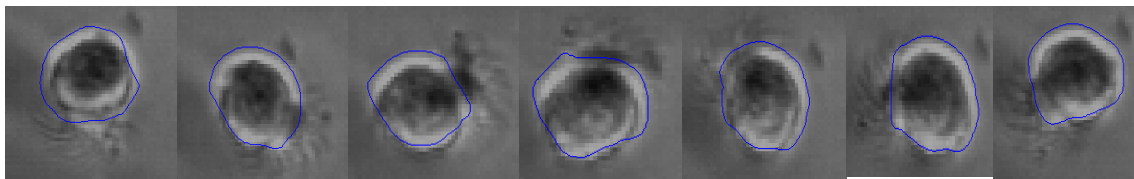
ciliomovil2.avi

Al ser una secuencia bastante parecida a '*ciliomovil1.avi*', ya que fue adquirida en las mismas condiciones de iluminación, se trabajó con los mismos valores de los parámetros de los *snakes*.

Aquí se muestra lo que realiza la función *frameini*:



A continuación, el seguimiento del contorno en sucesivos *frames* de la secuencia, realizado por la función *framek*:



5.2 Fase de corrección

5.2.1 Corregistro automático por entropía conjunta

La entropía conjunta no suele funcionar muy bien cuando las imágenes son muy parecidas, como en este caso, donde los *frames* presentan giros y desplazamientos, unos respecto a otros.

La mayor desventaja del algoritmo de entropía conjunta es la limitación para corregir la rotación de la célula. Consigue compensar dicho giro en los primeros *frames*, pero no después.

Los motivos de sus limitaciones son:

- La entropía conjunta no suele funcionar bien si las imágenes son muy parecidas (imágenes giradas y desplazadas).
- Las imágenes de la secuencia son sumamente pequeñas

Todo esto acompañado de una gran lentitud del algoritmo, por el gran coste computacional de las operaciones.

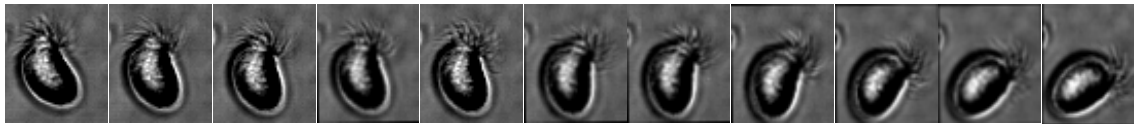


Figura 52. Ejemplo de la secuencia corregida por entropía mutua. El giro de la célula no es compensado, en su gran mayoría.

5.2.2 Corregistro automático por correlación cruzada

Este algoritmo, en la gran mayoría de *frames*, es capaz de compensar los giros que se producen entre imagen e imagen. Presenta algún problema con los *frames* iniciales, cuando la célula está comenzando a girar, pues no es capaz de compensarlos debidamente.

Los desplazamientos que tiene la secuencia son más difíciles de compensar para este algoritmo, ya que degrada la estimación de la imagen corregistrada, dando lugar a bruscos desplazamientos en la secuencia final.

En cuanto al coste computacional, se mejora respecto a la entropía conjunta, pero aun no es suficiente como para ser un algoritmo automático y eficaz en el diagnóstico.

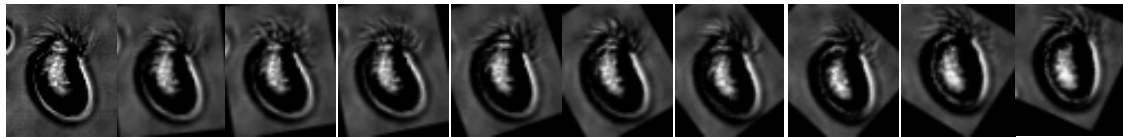


Figura 53. Diversos frames de la secuencia corregistrada mediante la correlación cruzada. Se observa que el contraste ha sido mejorado, esto es por la correlación cruzada, que mejora sensiblemente sus prestaciones a la hora de compensar el giro de la célula.

Una de las desventajas de un algoritmo basado correlación cruzada es que depende demasiado de la intensidad de la imagen. Es necesario preparar la imagen, enfatizando los contrastes, ya que la correlación cruzada actúa mejor cuando el contraste es más elevado.

La otra desventaja de este algoritmo es que corregistra, pero aún la célula no permanece rígida del todo. Posiblemente el minúsculo tamaño de los *frames* de la secuencia tenga que ver con la limitación, y aunque se intentó volver corregistrar el vídeo ya corregistrado, no se obtuvo mejora alguna del proceso.

5.2.3 Corregistro por transformada Fourier-Mellin

Este método es el que mejores resultados es capaz de obtener, bastante emparejado con el método de la correlación cruzada. Además de ser capaz de corregistrar las secuencias analizadas, su velocidad es mucho mayor que cualquiera de los dos métodos anteriores. A continuación se muestran unos cuantos *frames* de dos secuencias que han sido corregistradas satisfactoriamente.

El método basado en la TFM sigue teniendo la limitación de no dejar la célula completamente rígida. De hecho, analizando la secuencia corregistrada se detectan saltos bruscos de posición de la célula coincidentes con errores en la detección del contorno.

Dejar completamente rígida la célula sería algo ideal, además que los resultados de la TFM dependen de lo buena que sea la segmentación y esta última fase depende de la resolución y tamaño de la imagen original.

Batida ciliar normal.avi

Esta secuencia no tiene cambios de forma, tan sólo un leve desplazamiento y una clara rotación a derechas. El corregistro funciona bien, excepto en algunas ocasiones en las que el contorno pasado por segmentación no está bien definido y acarrea problemas en la TFM. Esta secuencia fue adquirida a 1/120 segs de tiempo de obturación.

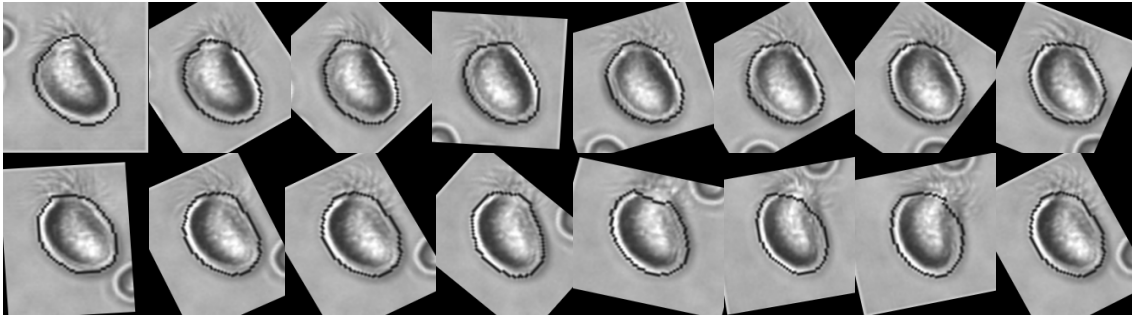


Figura 54. De izquierda a derecha y de arriba a abajo. Secuencia resultante corregistrada del vídeo '*Batida_ciliar_normal.avi*.'

cilio_1.avi

Esta secuencia tiene un movimiento muy parecido a la anterior, sólo que la rotación no es tan rápida. En cuanto a la calidad de la misma, hay que decir que los cilios son mucho menos perceptibles que en la anterior. En cuanto al corregistro, ocurren los mismos problemas que en el caso anterior, existen ciertos fallos en la compensación del giro. El tiempo de obturación es el mismo que en la anterior.

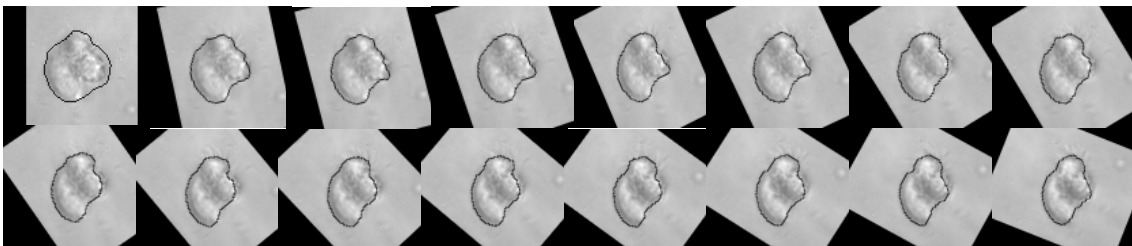


Figura 55. De izquierda a derecha y arriba a abajo. Secuencia resultante corregistrada del vídeo '*cilio_1.avi*'.

ciliomovil.avi

Esta secuencia tiene varios cambios en la forma, pues pasa de formar circular a algo más elíptica. La segmentación no se puede usar en la TFM cuando el contorno es circular, ya que obviamente no se tiene referencia alguna para realizar la corrección de la rotación. Entonces, se ha trabajado con los *frames* de la secuencia en los cuales la célula tiene forma más elíptica, cuyo resultado se muestra a continuación:

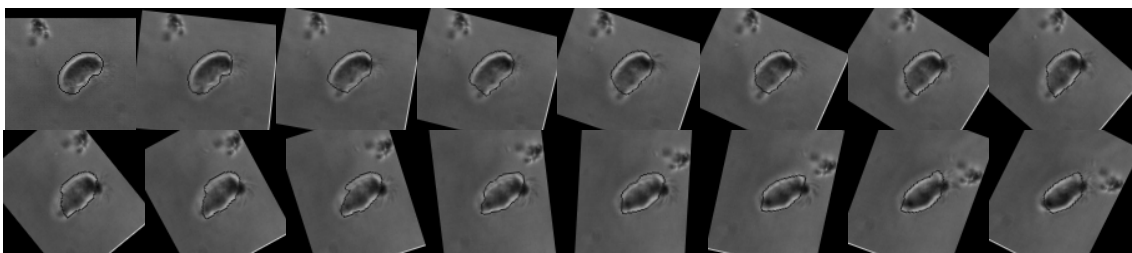


Figura 56. De izquierda a derecha y arriba a abajo. Secuencia resultante corregistrada del vídeo '*ciliomovil.avi*'.

En cuanto al tiempo de obturación, se usó el de 1/10000 segs, consiguiendo una iluminación mucho más uniforme.

ciliomovil3.avi

La secuencia siguiente es como las dos iniciales, pero con una iluminación mejorada. De hecho, también fue adquirida con 1/10000 segs de tiempo de obturación.

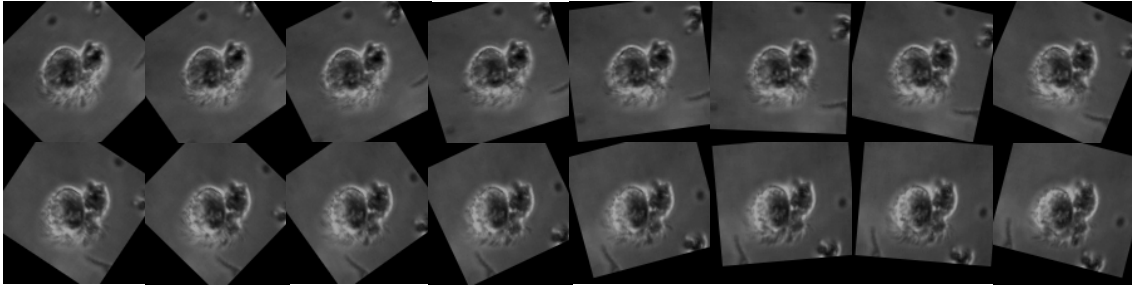


Figura 57. De izquierda a derecha y arriba a abajo. Secuencia resultante corregistrada del vídeo '*ciliomovil3.avi*'.

5.3 Fase de caracterización ciliar

5.3.1 Análisis de la frecuencia fundamental de la batida ciliar mediante el estudio de la intensidad de los píxeles

La caracterización ciliar se basa en un análisis mediante regiones de interés (ROIs). Se sitúa una ROI en la región ciliar y se analiza su contenido a través de toda la secuencia, sin variar la posición de dicha ROI.

Aquí se muestran los procedimientos utilizados y las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.

En el análisis de ventanas con más de un píxel, se ha realizado un promediado de las intensidades de los píxeles de esa ventana. Esta técnica es muy sencilla de implementar y a la vez necesaria con imágenes donde los resultados con una ROI de un píxel no son concluyentes.

El promediado tiene como ventajas:

- Eliminar características en frecuencia aisladas de algún píxel
- El promediado da una información más fiable al tener en cuenta más muestras en la imagen.

Pero para usar esta técnica hay que ser especialmente cuidadoso en situar ROIs donde sólo haya información ciliar, a fin de que en el análisis se estén midiendo variaciones de los cilios, no de algún otro tipo de intensidades, como puede ser la variación de intensidad del fondo o cualquier otra fuente de ruido.

Repecto al análisis frecuencial, se debe tener en cuenta que las señales analizadas son intensidades de píxeles, variables entre 0 y 255, con lo que esa señal en el tiempo tiene una media muy grande comparada con la variación que tienen los cilios. En consecuencia, su componente de continua es demasiado alta en comparación la variación ciliar y su correspondiente frecuencia.

A continuación un breve ejemplo de las señales temporales obtenidas tras dicho análisis:

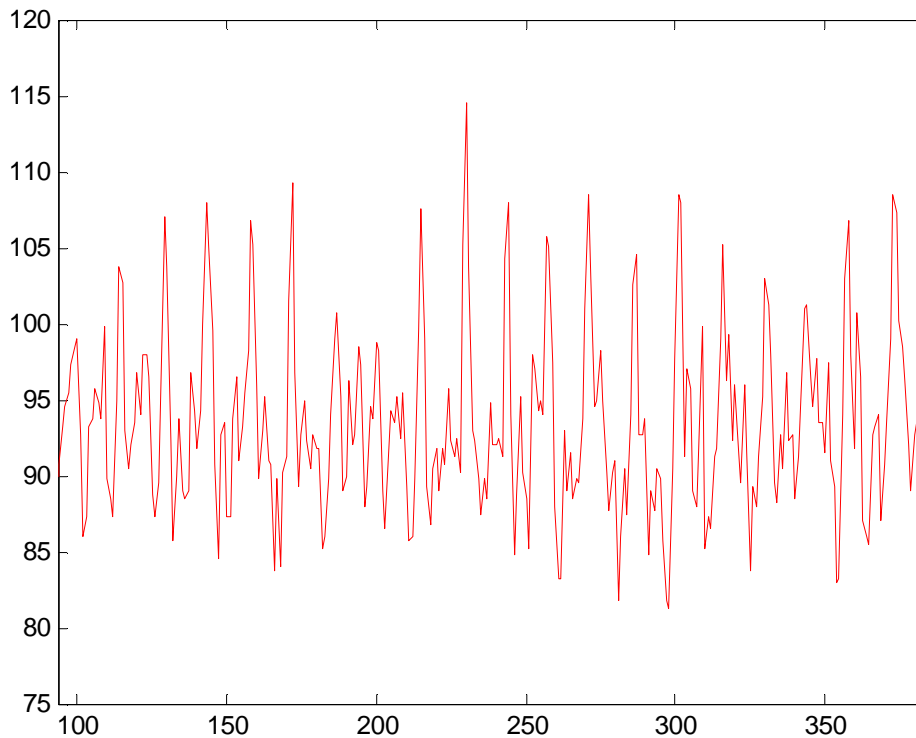


Figura 58. Fragmento de la señal que contiene los niveles de intensidad de la secuencia en la ROI seleccionada. Se puede observar que su media, en torno a 95, es mucho mayor que la variación máxima de la señal, 35. El objetivo es analizar dichas variaciones pero al tener dicha media, nos la enmascarará.

Las consecuencias de este problema son inmediatas: la FFT solo muestra una componente de continua, ya que la media enmascara por completo las variaciones ciliares. Para resolver el problema se resta la media a la señal original y se analiza esta nueva señal.

celula1000n.avi

Análisis de un píxel

Al analizar un solo píxel, no se tiene que realizar ningún promediado. Lo malo es que la información de un píxel puede ser fraudulenta en algunos *frames* de la secuencia, con lo que no se tendrá el respaldo de alguna otra información adicional.

De todas formas, en esta secuencia no es el caso, ya que la información frecuencial es nítida y clara: *una componente frecuencial en torno a los 8 hercios*. Existe otro pico de importancia menor, situado en los 16.3 hercios. Este pico parece ser un armónico, ya que está al doble de frecuencia que el fundamental.

El pico de continua no es relevante en cuanto al análisis, ya que al estar analizando un único píxel, habrá muchas ocasiones que la variación de intensidad sea muy pequeña.

Caracterización de la batida ciliar mediante análisis de imagen
para el diagnóstico precoz de la discinesia ciliar primaria

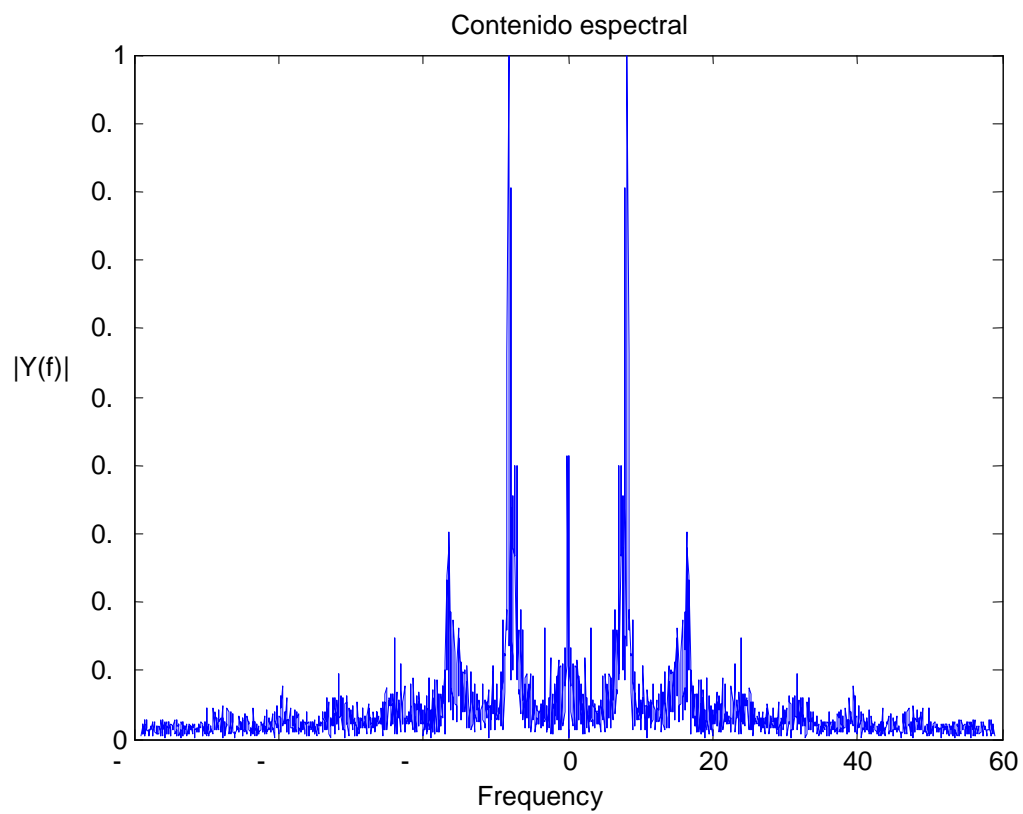
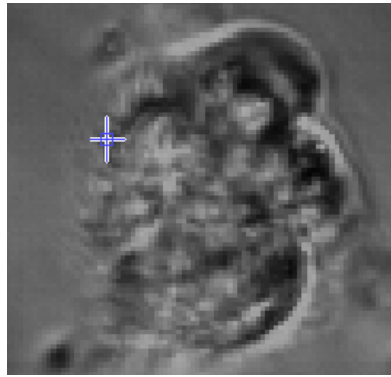


Figura 59. La FFT muestra un pico dominante a 8.2 hercios y uno secundario a 16.3 hercios

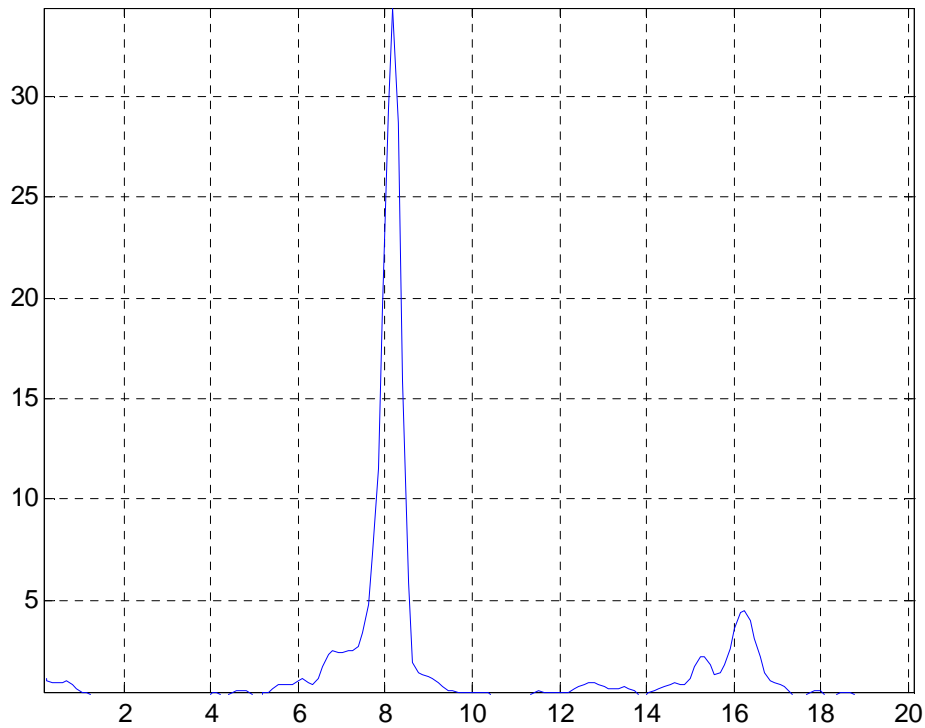


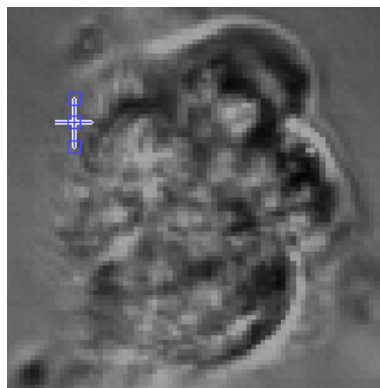
Figura 60. El método de Welch confirma lo que la FFT: un pico dominante a 8.2 hercios. Este método nos muestra el pico secundario en 16.1 hercios

El método de pwelch consigue resultados más fiables siempre, ya que se basa en múltiples promediados de la FFT. Aún así, los resultados son los mismos, solo que el pico secundario queda aún más por debajo que con la aplicación directa de la FFT.

ROI vertical

La ROI que se ha utilizado en este caso es de 10 píxeles, en vertical, tal y como indica la siguiente imagen. En cada *frame* se hará un promediado de las intensidades, como sigue:

$$\frac{(I_1 + \dots + I_n)}{n} \quad \text{en este caso } n=10$$



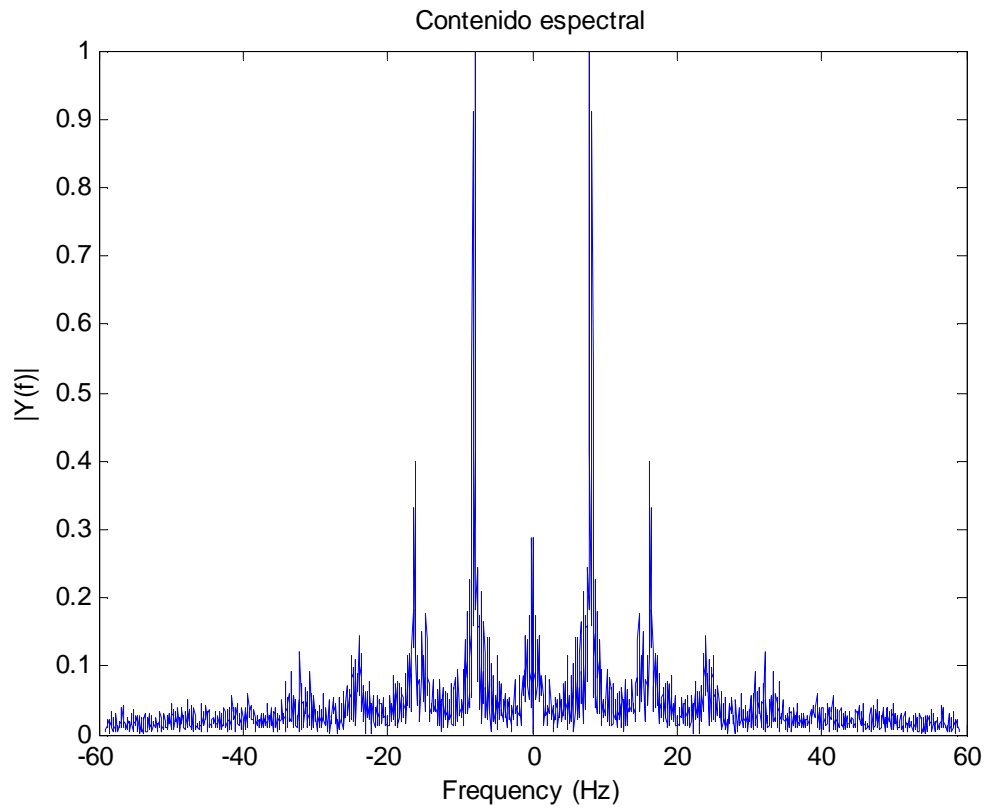


Figura 61. La FFT muestra un pico dominante a 7.9 hercios y uno secundario a 15.9 hercios

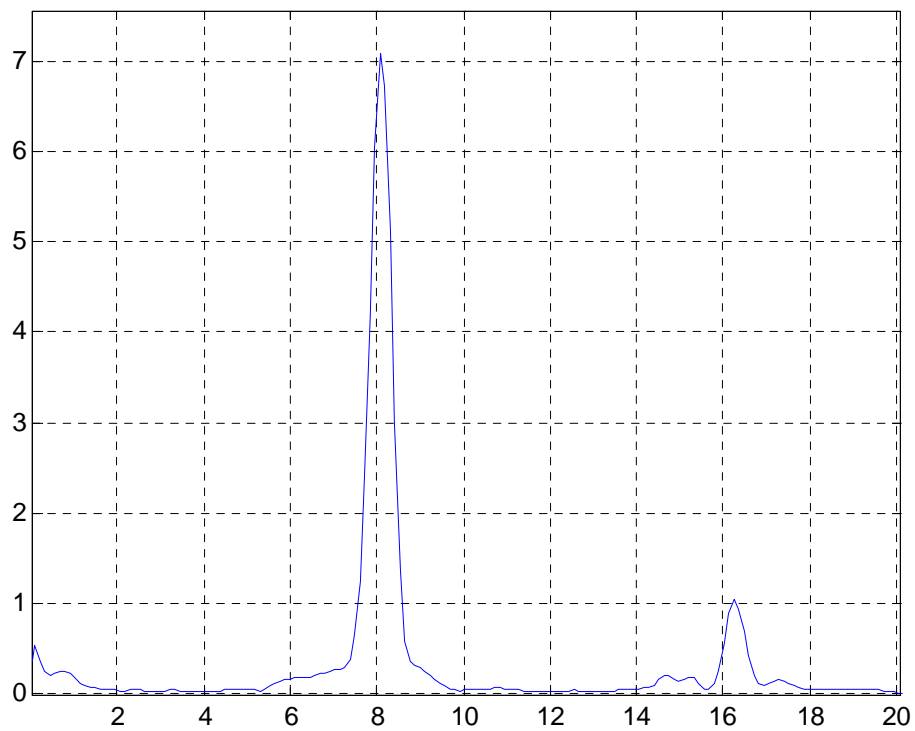


Figura 62. El método de Welch muestra resultados altamente similares: Pico dominante a 7.9 hercios y uno secundario a 16.1 hercios

ROI horizontal

Se ha analizado una ROI horizontal de 10 píxeles, como la mostrada en la figura, haciendo un promediado como anteriormente.

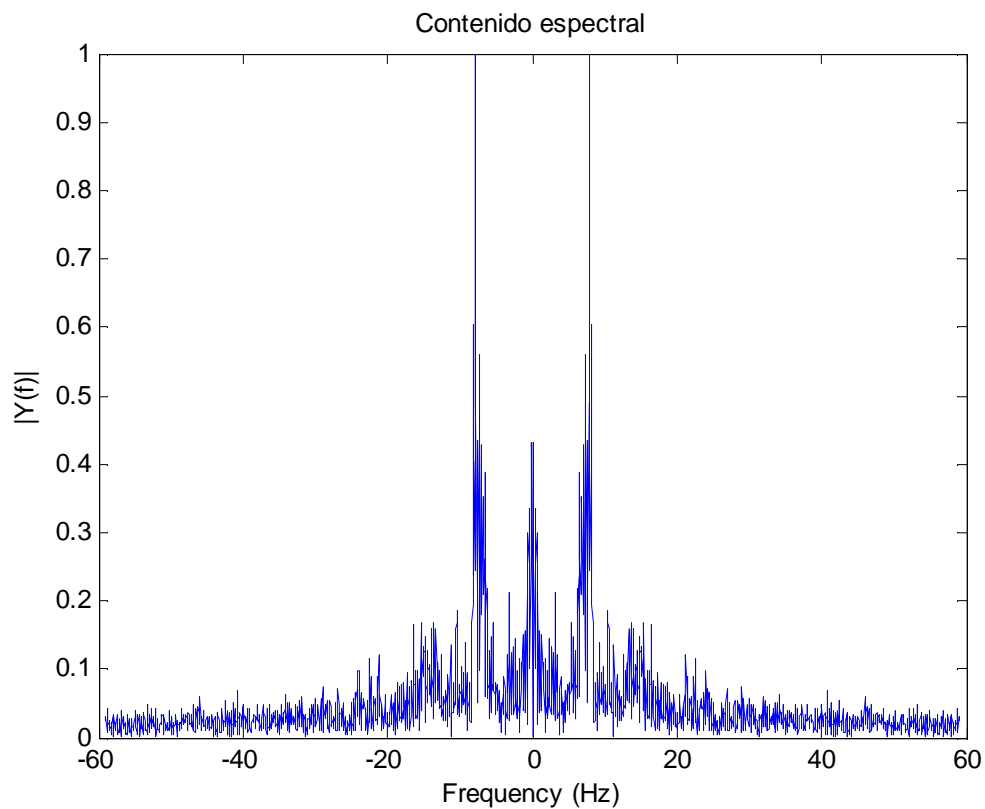
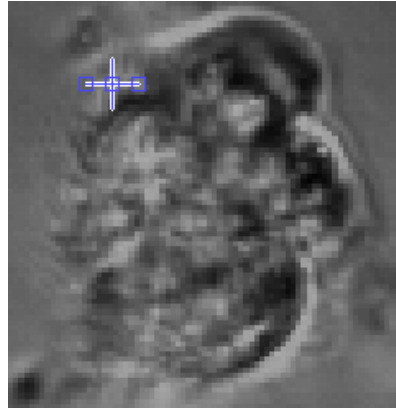


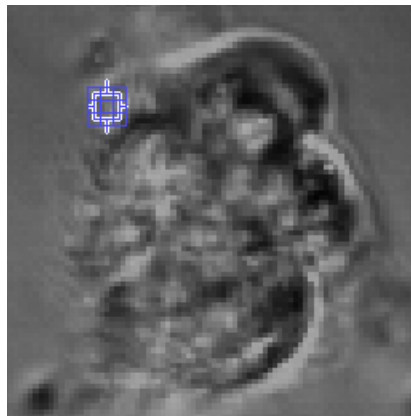
Figura 63. La FFT muestra un único pico dominante a 7.9 hercios sin ninguno secundario relevante



Figura 64. El método de Welch nos confirma lo que la FFT: Pico dominante a 7.9 hercios, sin ningún pico secundario relevante

ROI cuadrada

La ROI escogida es la mostrada en la imagen, de tamaño 5 x 5. El análisis muestra un pico fundamental, como en todos los casos anteriores, sobre 8 hercios, seguido por lo que parece ser su armónico.



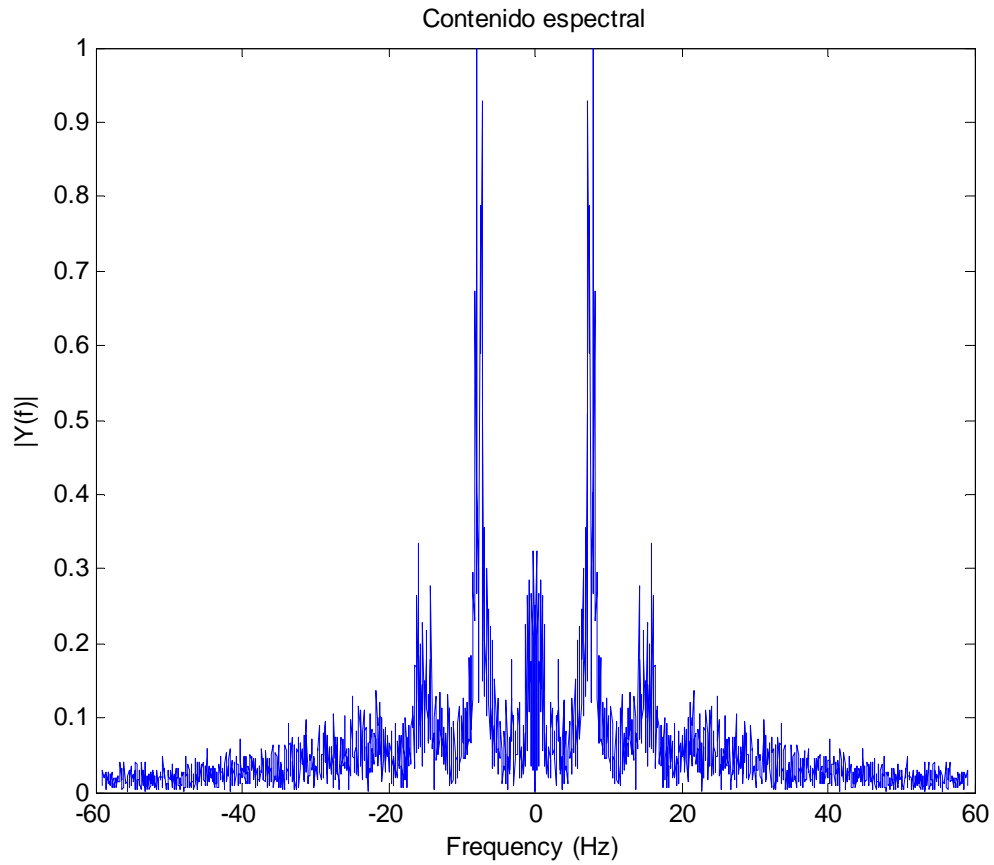


Figura 65. La FFT muestra un pico dominante a 7.9 hercios y uno secundario a 15.9 hercios.

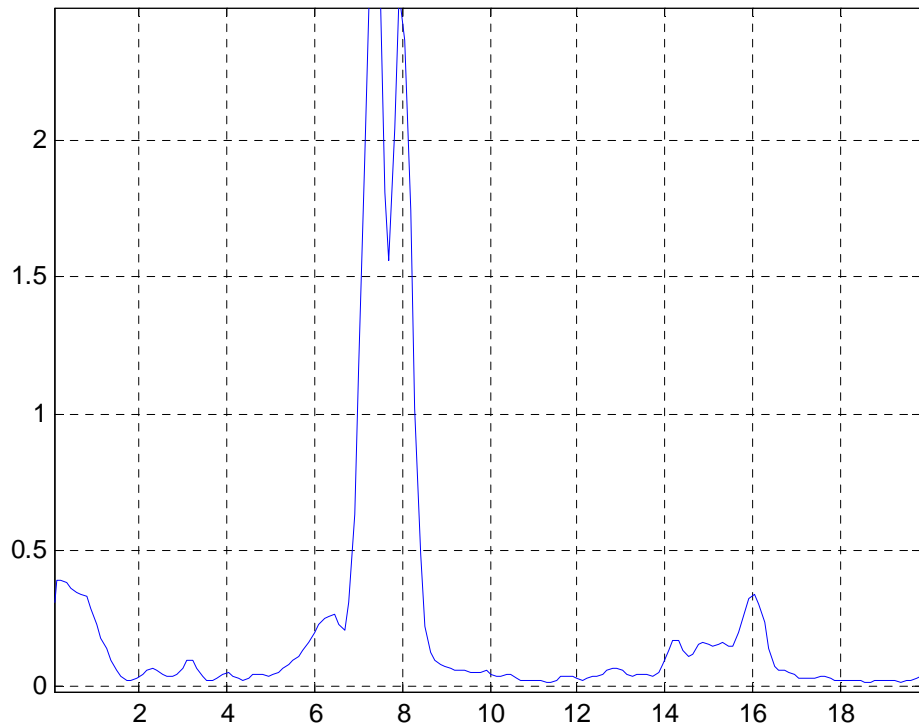


Figura 66. El método de Welch vuelve a confirmar lo que la FFT: un pico dominante a 7.9 hercios y un pico secundario a 16 hercios

Conclusión de la secuencia

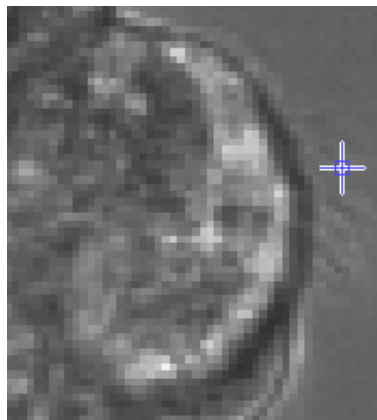
Al aumentar el tamaño de la ROI, como en el caso de la ROI cuadrada de tamaño 5 x 5 o de la vertical y horizontal de tamaño 10 píxeles, se ve que existe una disminución de 8.2 a 7.9 hercios.

Al analizar con una ROI de un píxel la secuencia, según el píxel escogido se obtienen otros valores. Un rango experimental cogiendo píxeles distintos es el que va desde los 7.1 hasta los 8.2 hercios.

normal.avi

Análisis de un píxel

Esta secuencia es una de las más particulares estudiadas hasta ahora. Su particularidad reside en su espectro, ante todo, ya que *tiene hasta 5 armónicos distintos sobre la frecuencia fundamental, cuyo valor es de 6 hercios. Estos armónicos están situados, aproximadamente, en 12, 18, 24 y 32 Hz, cuya amplitud decrece a mayor frecuencia.*



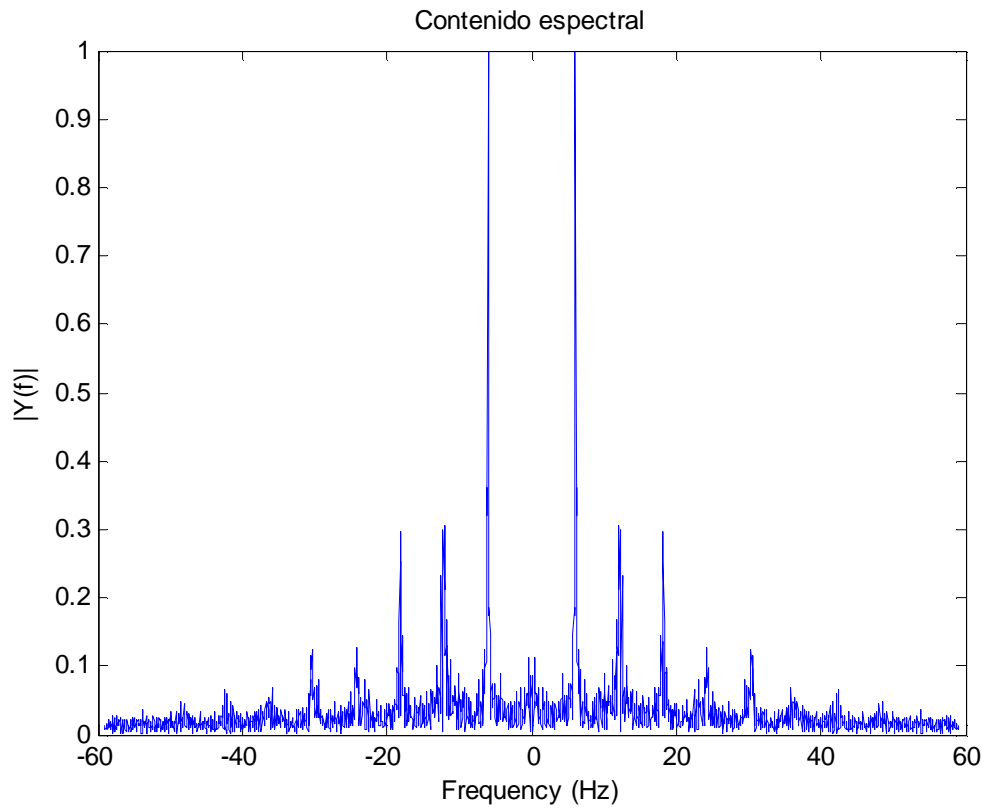


Figura 67. La FFT muestra un pico dominante a 6 Hz, pero también existen más picos: uno a 12.1 hercios y otro a 18.1 hercios. Parecen ser armónicos del primero, dado que están al doble y triple de frecuencia, respectivamente.

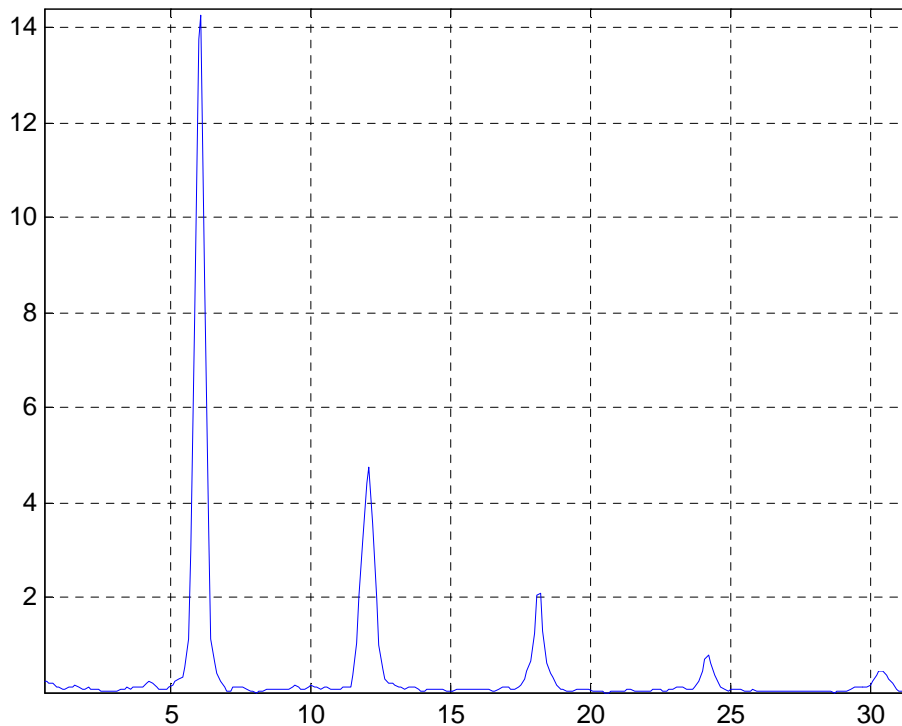
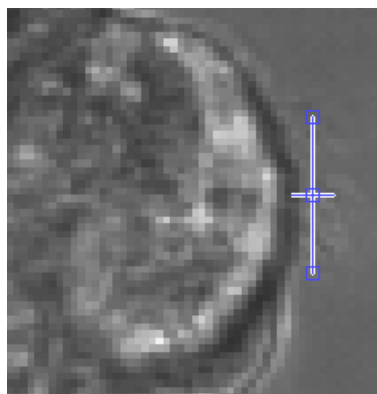


Figura 68. El método de Welch da resultados muy similares, casi idénticos: un pico dominante a 6.1 hercios con sus armónicos: un pico secundario a 12.1 hercios, y otro a 18.2 hercios, que son los más relevantes. Existen más picos, como tercer y cuarto armónico, pero de menor amplitud.

ROI vertical

En este caso se ha cogido una región de interés de 22 píxeles en vertical, tal y como se ve en la siguiente imagen. El espectro sale más nítido, sin armónicos claramente importantes, con su frecuencia fundamental en los 5.7 hercios.



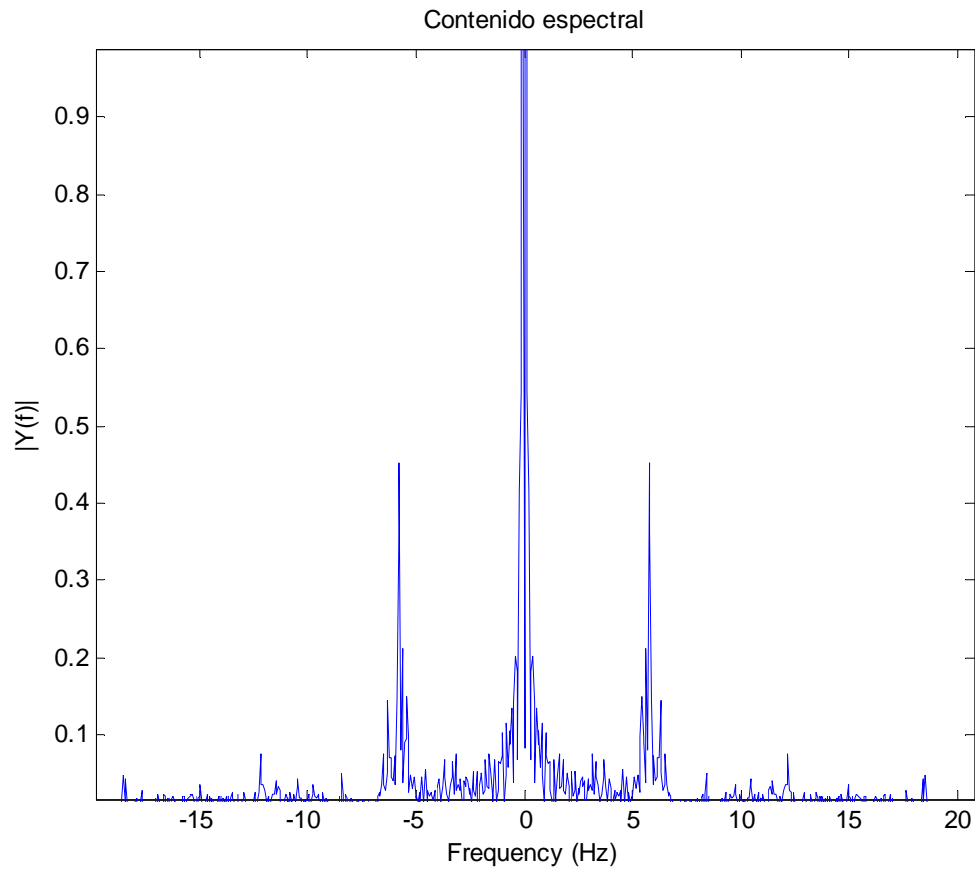


Figura 69. La FFT muestra un pico dominante a 5.7 hercios sin ningún pico secundario relevante

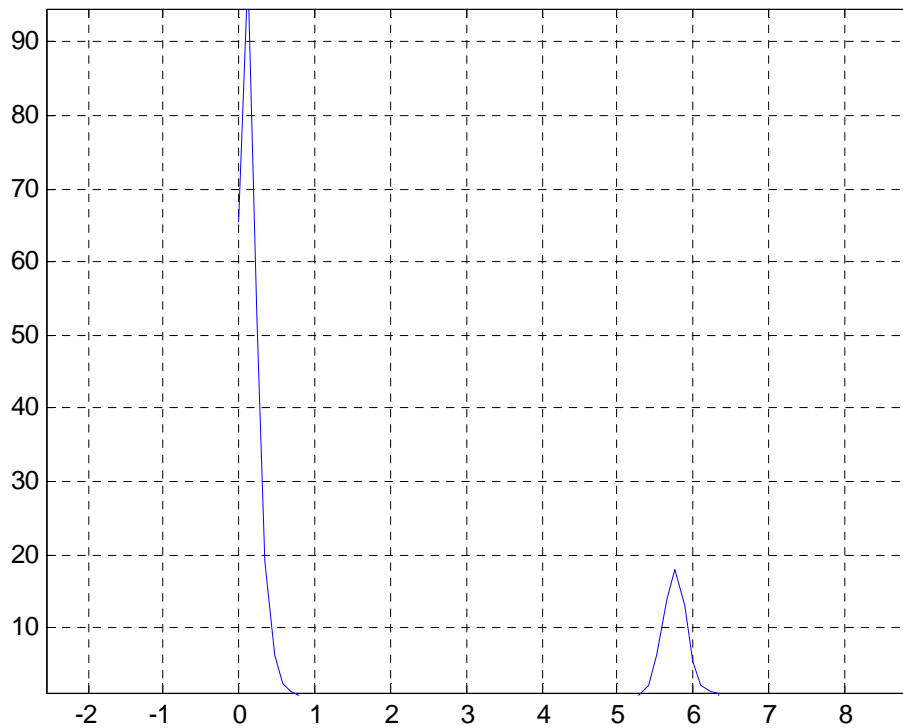
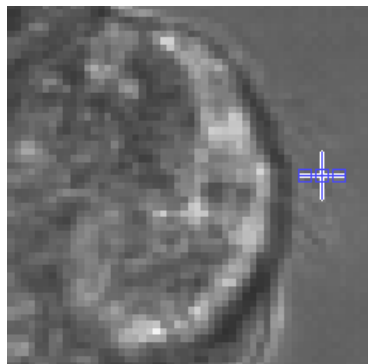


Figura 70. El método de Welch confirma lo que la FFT: un pico dominante a 5.7 hercios sin ningún pico secundario relevante

ROI horizontal

Se parte de una ROI horizontal, como la de la figura siguiente, formada por 5 píxeles. En el espectro vuelven a tener presencia todos los armónicos anteriores: 12 Hz, 18 Hz, 24 Hz y 32 Hz.



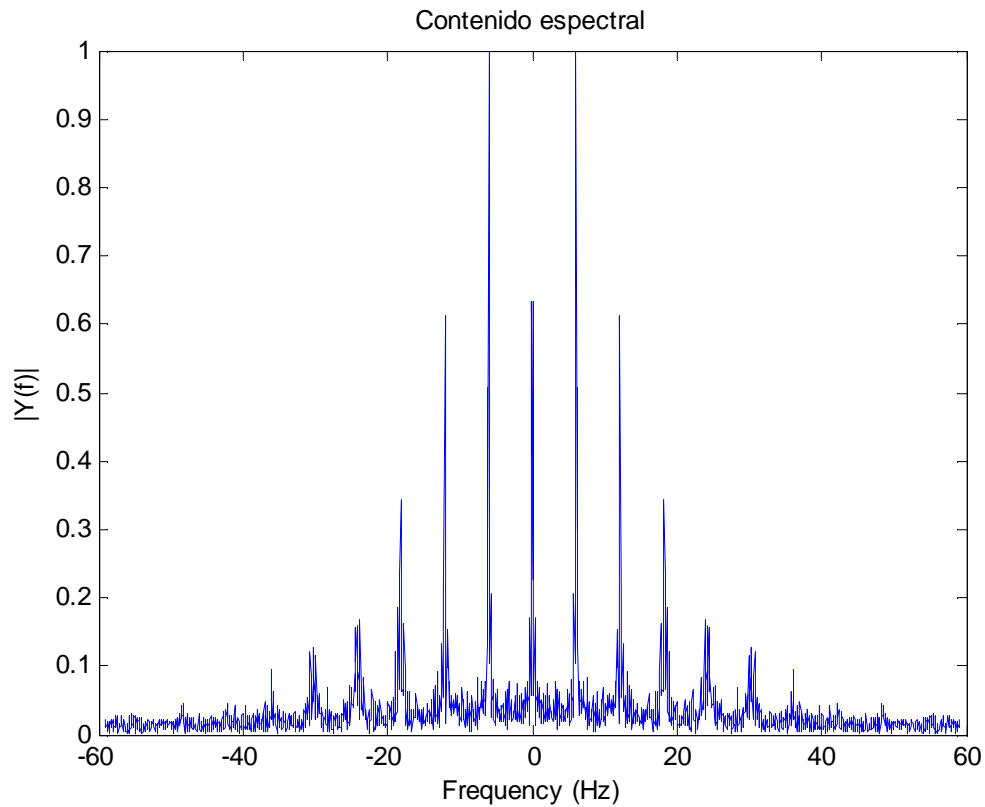


Figura 71. La FFT muestra un pico dominante a 6.1 hercios, un pico secundario a 12.2 hercios y todos los demás armónicos antes comentados.

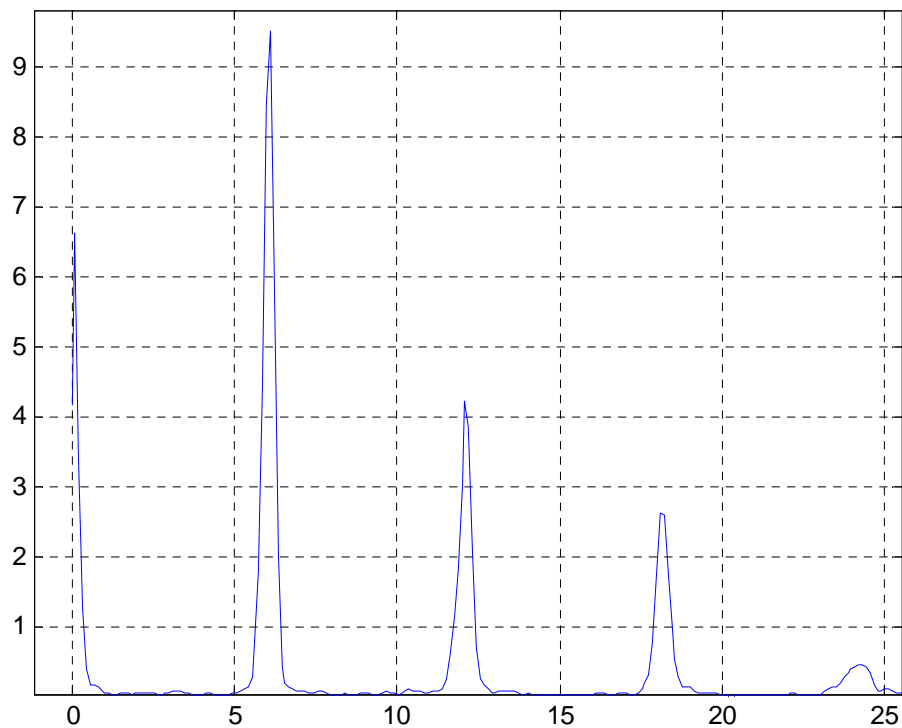


Figura 72. El método Welch confirma todos estos armónicos, junto con su pico dominante a 6.1 hercios.

ROI cuadrada

La ROI elegida es cuadrada, de tamaño 4 x 4 píxeles, en la posición de la figura. El espectro no varía demasiado, formando parte de él los mismos armónicos junto con su frecuencia fundamental.

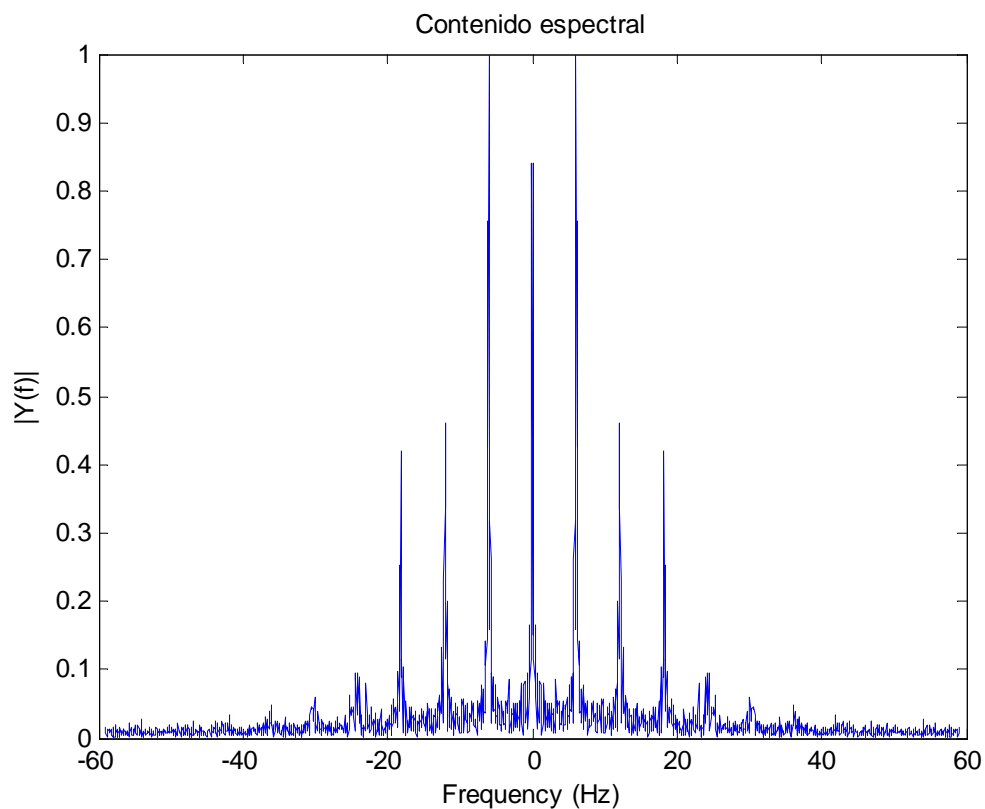
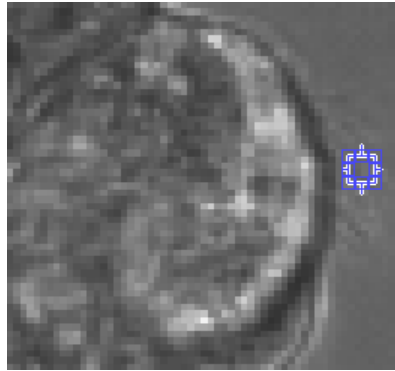


Figura 73. La FFT muestra el Pico dominante a 6 hercios junto con los armónicos.

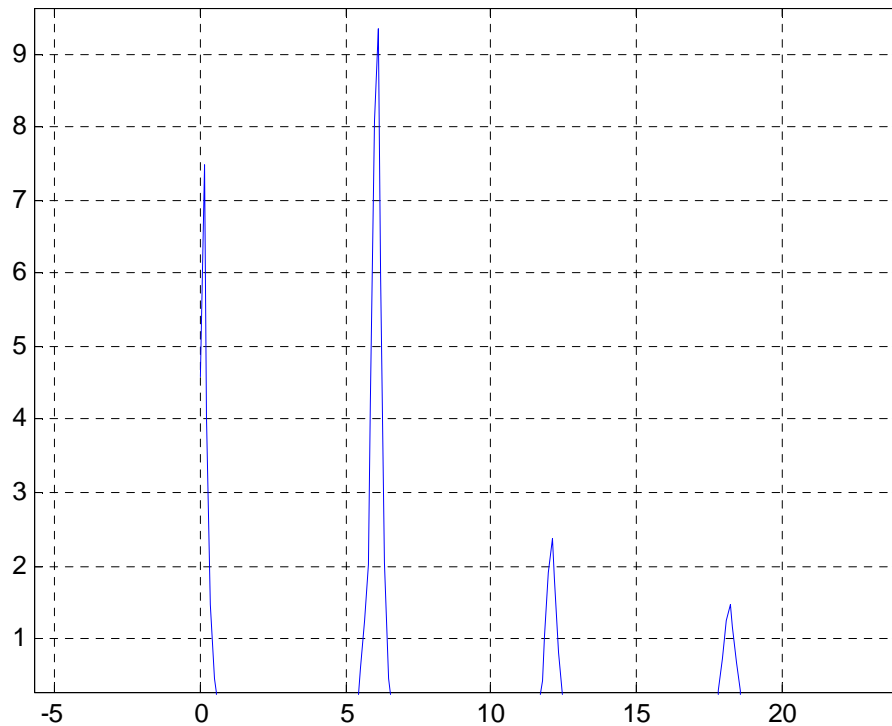


Figura 74. El método de Welch confirma lo que la FFT: un Pico dominante a 6.1 hercios junto con sus armónicos.

Conclusión de la secuencia

Lo más llamativo de esta secuencia son los 2 armónicos que presenta, además de la frecuencia fundamental de 6.1 Hz. Dichos armónicos ubicados en las frecuencias:

- 12.1 y 18.3 Hz.

En varias ocasiones aparecen unos cuantos más, de hecho aparecen hasta 4 de estos:

- 12.1, 18.3, 24.2 y 30.1 Hz

En la ROI vertical, dada su gran longitud, existe un gran promediado y esto parece reducir bastante dichos armónicos.

Con la ROI horizontal, sin embargo, es cuando mayor presencia tienen en el espectro.

Respecto al análisis de un píxel aislado, tiene alguna seria complicación. Existen ocasiones aisladas en las que la frecuencia de mayor amplitud es los 12 Hz, con lo que lleva a confusión. En estas ocasiones, un promediado puede ser la herramienta idónea para tener en caso de necesitar alguna alternativa. El promediado de Welch muestra claramente cual es el pico fundamental. Un breve ejemplo de dicho análisis equívoco:

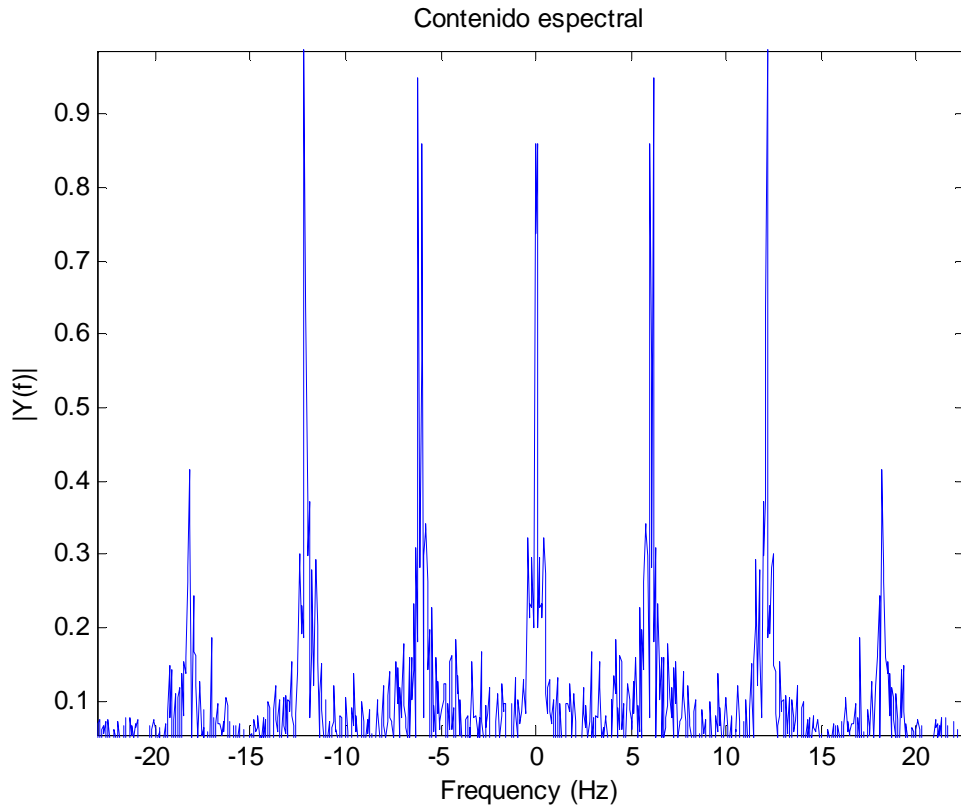


Figura 75. La FFT daría como principal un pico en los 12 Hz, cuando no es el fundamental en ningún caso. Esto ocurre porque la FFT solo hace la transformada de la intensidad en un solo píxel, sin promediar nada.

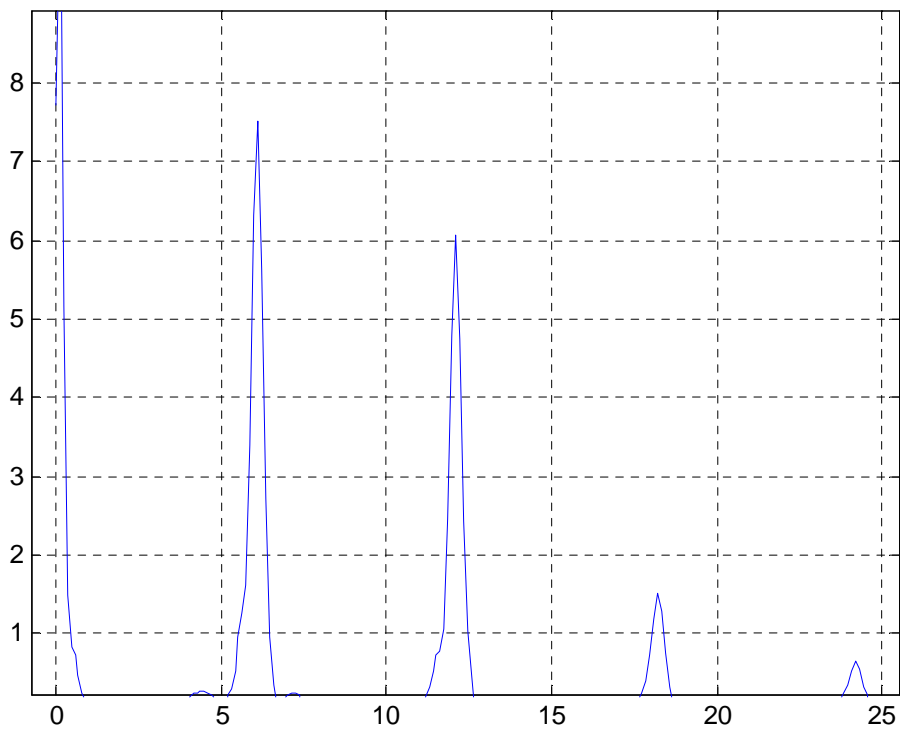


Figura 76. El método de Welch, sin embargo no se deja engañar: gracias a su promediado, no confirma como pico dominante el de los 12 Hz. Sigue dando como pico principal el de los 6 Hz.

5.3.2 Influencia de la dimensión de la ROI

Según las secuencias estudiadas y las pruebas realizadas con múltiples ROIs, y las diferentes estrategias de cómputo usadas en el análisis ciliar, se han llegado a las siguientes conclusiones:

- Coger una ROI más grande en cualquier dimensión implica una variación de la frecuencia nominal de la batida ciliar, generalmente una reducción de la frecuencia.
- Cuando hay armónicos, el efecto de una ROI grande es el de rebajar las amplitudes de éstos, no el de su frecuencia fundamental. Por lo tanto, puede interesar dicha característica.
- Coger una ROI de un píxel sirve cuando el análisis frecuencial da unos resultados nítidos y claros, y no hace falta realizar ningún promediado. Si el periodograma tiene variaciones importantes se ha de acudir a algún tipo de promediado.

5.3.3 Módulo de validación de frames para secuencias más complejas

Existen secuencias de vídeo cuyo espectro no es tan nítido como en los casos anteriores. Aquí se muestra el ejemplo de la secuencia '*Batida_ciliar_normal.avi*', cuya célula rotaba y tuvo que ser corregida por ese motivo.

En la secuencia corregida, aún existen saltos lo suficientemente bruscos que introducen frecuencias que degradan el análisis en gran medida, con lo que el espectro tendrá múltiples picos. Para resolver el problema se promedió la intensidad de varios píxeles, junto con el promediado de Welch, obteniendo los resultados de la figura:

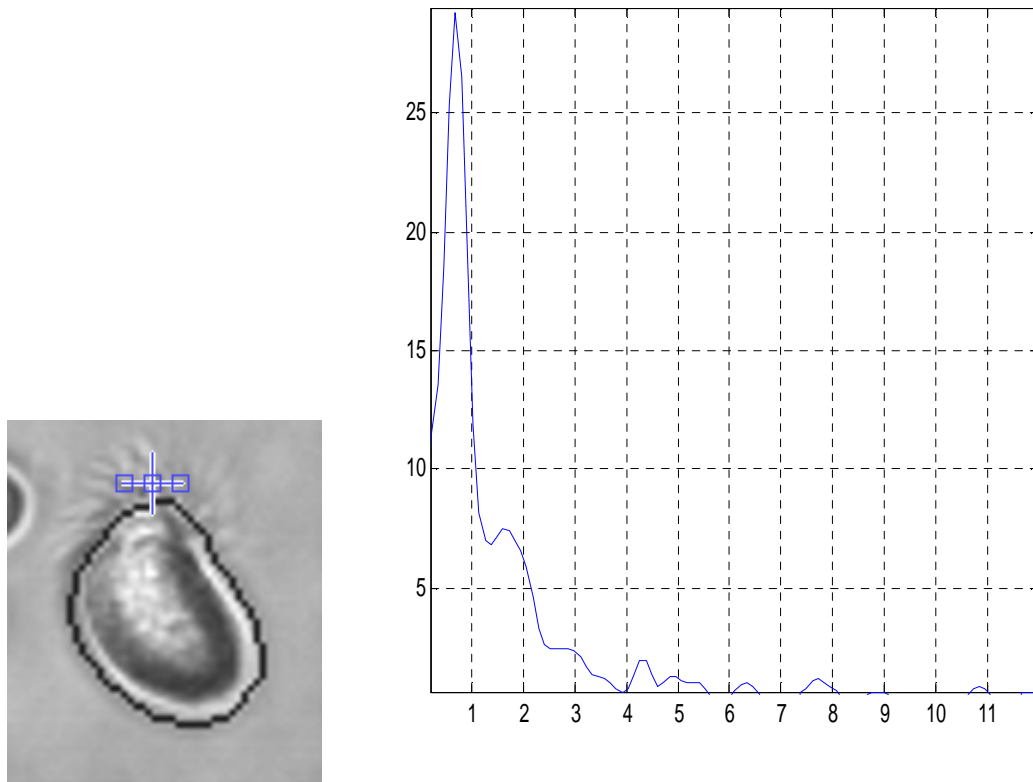


Figura 77. Aún habiendo usado el promediado de Welch, no resulta concluyente, ya que salen frecuencias dominantes demasiado bajas, cercanas al hercio.

El espectro resultante es muy difuso, ambiguo y poco fiable. Haciendo un análisis de la señal temporal, existen grandes fluctuaciones de amplitud que sobrepasan el rango de intensidades de los cilios:

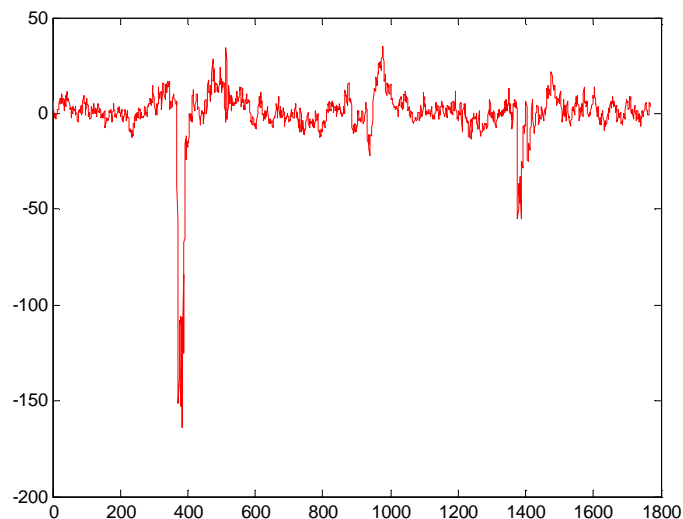


Figura 78. Existen grandes variaciones de las intensidades de los píxeles, cerca del frame 400. Tales variaciones tienen que ver en el espectro en frecuencia.

Lo que se pensó fue en usar una función que eliminase aquellos *frames* cuya intensidad se desviara bruscamente de la media. Esta función actuaría eliminando o validando la intensidad media por *frame*, siendo un filtro.

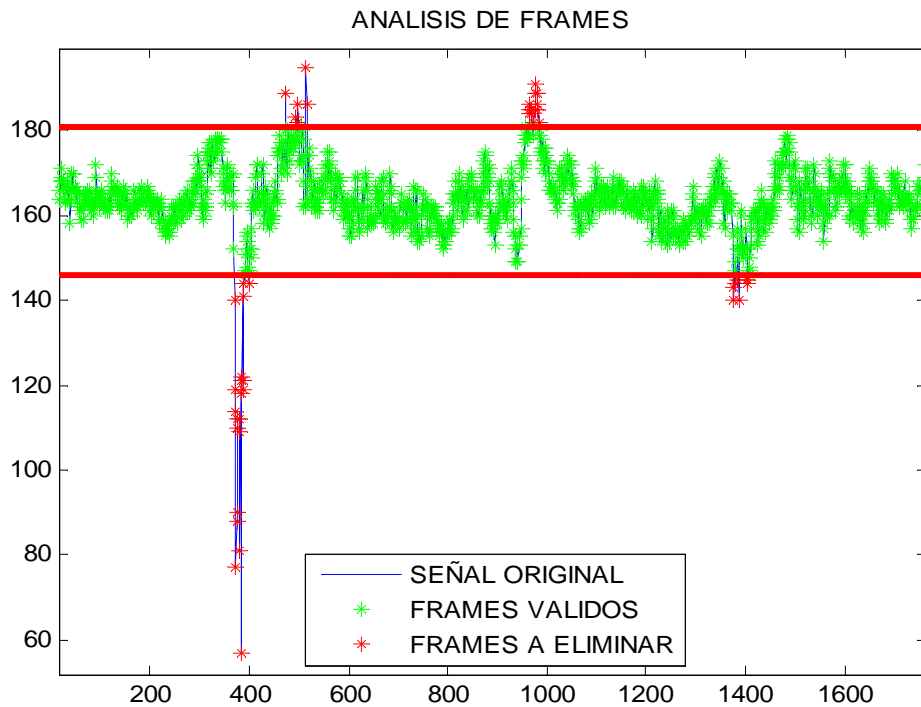


Figura 79. Este módulo permite eliminar los *frames* (en rojo) pues se desvían de la media. Tan solo se analizará la señal compuesta por *frames* válidos (en verde). En línea continua los umbrales superior e inferior, cuya intensidad media por *frame* no ha de sobrepasar para ser validada.

De todas formas, el análisis con esta secuencia no ha sido satisfactorio en su totalidad. A pesar de eliminar los *frames* que se salen de la media, el espectro sigue siendo poco nítido.

5.3.4 Análisis de la frecuencia fundamental de la batida ciliar mediante flujo óptico

El método de flujo óptico permite cuantificar el movimiento de todos los píxeles de una determinada ROI. Lo que hace es calcular flujo óptico de una determinada ROI, para después obtener el desplazamiento de cada uno de los píxeles de dicha ROI a lo largo de la secuencia de vídeo. Se obtendrá una serie temporal con el desplazamiento para cada píxel, normalmente la ROI contendrá solo cilios, que es lo que se quiere analizar. Posteriormente, se calcula la FFT de cada una de esas series, una por cada píxel, y se suman todas las FFTs.

La ventana seleccionada (o ROI) para el cálculo del flujo óptico ha de ser más grande que las que se usan en el estudio de la intensidad de los píxeles, ya que son algoritmos muy distintos. Este algoritmo funciona siguiendo los píxeles de una determinada secuencia de vídeo por lo que no tiene sentido coger ROIs tan sumamente pequeñas, como de 3 x 3 píxeles, ya que el movimiento de un píxel, normalmente, es mayor a esos tres píxeles, cosa que haría que el algoritmo de flujo óptico perdiera dicho píxel en la secuencia al poco tiempo.

normal.avi

Para aplicar flujo óptico en la secuencia '*normal.avi*', la ROI seleccionada tiene un tamaño 35 x 17 píxeles, marcada en azul en la imagen. El método de flujo óptico marca la frecuencia fundamental de la batida ciliar en torno a los 6 hercios. También marca los armónicos de dicha frecuencia fundamental, a 12.2 y 18.3 hercios.

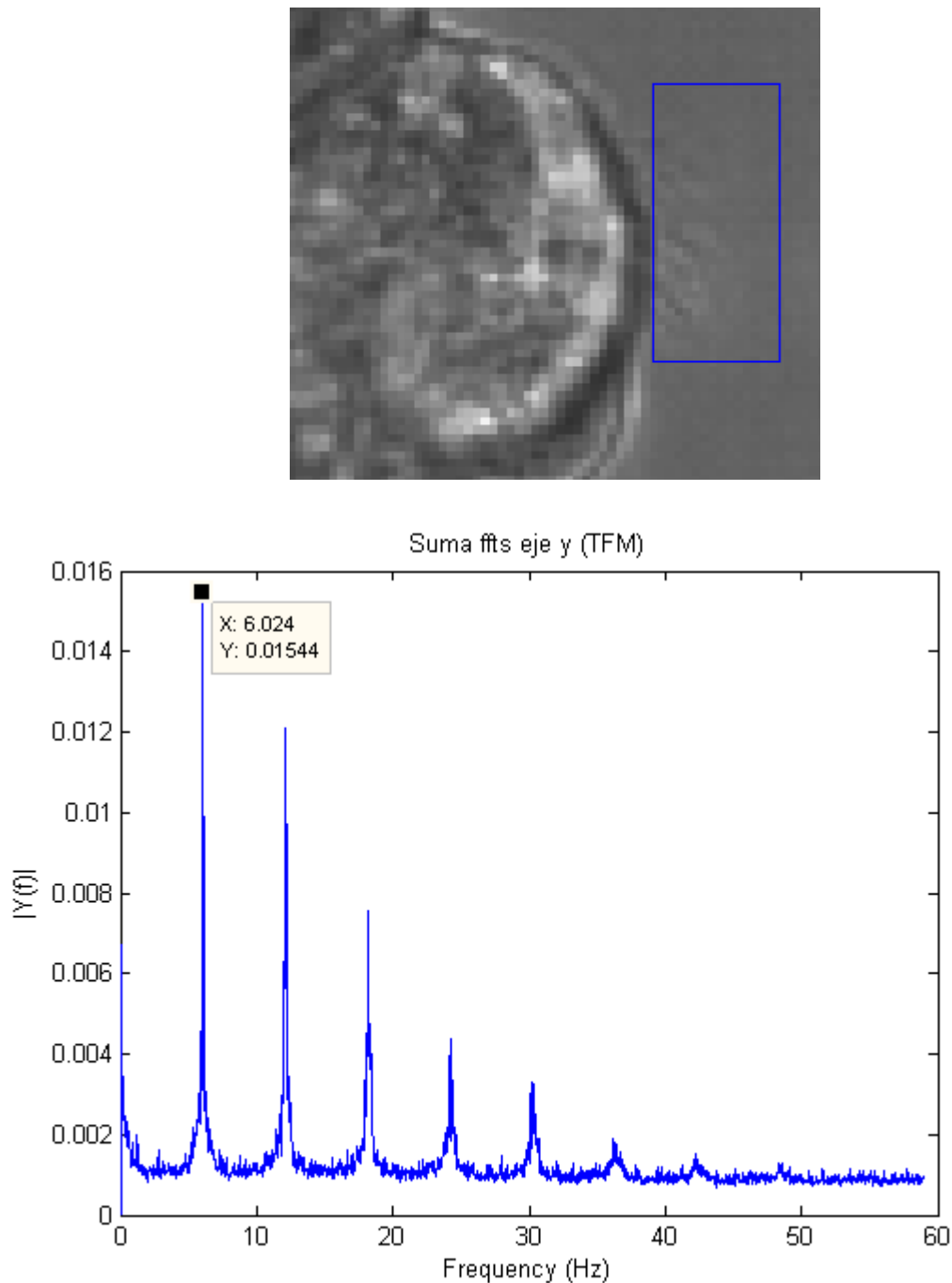


Figura 80. Espectro sacado a partir de flujo óptico de la ROI marcada arriba en azul. Se observa un pico dominante a 6 hercios más 5 armónicos, cuya amplitud decrece.

celula1000n.avi

El método de flujo óptico, en la secuencia '*celula1000n.avi*' marca como frecuencia fundamental de batida ciliar 7.9 hercios, seguido de un pico de menor nivel, cercano a los 15 hercios.

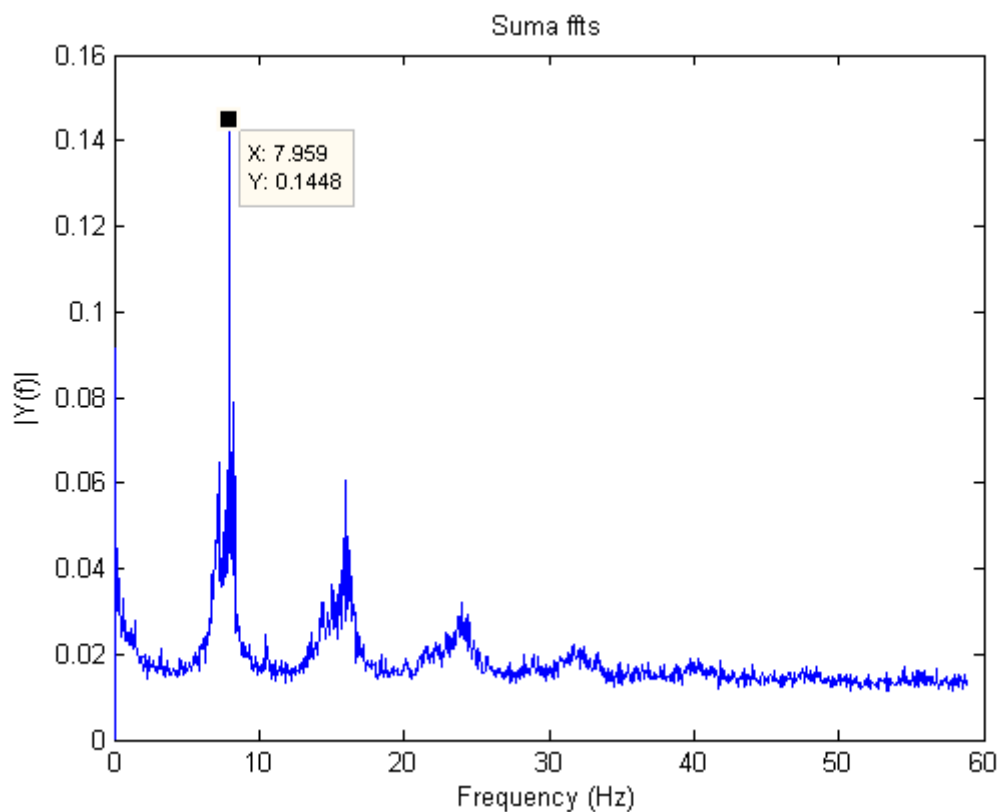
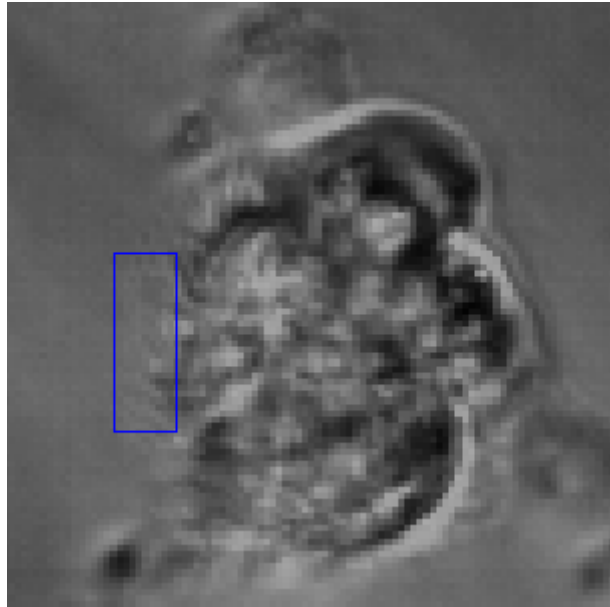


Figura 81. Espectro sacado a partir de flujo óptico de la ROI marcada arriba en azul. Se muestra un pico dominante en torno a los 8 hercios, seguido de otro de menor nivel en torno a los 15 hercios.

5.3.5 Análisis del patrón temporal de la señal mediante análisis de los píxeles

A modo de establecer una conclusión clara sobre aquellas secuencias que daban un resultado más nítido, se pensó en estudiar la señal temporal para tener otra referencia alternativa que refuerce lo planteado anteriormente.

Para ello, se hicieron dos estudios más sobre dichas secuencias:

-Se observó la secuencia, *frame a frame*, para establecer visualmente cuántos *frames* pasaban desde que los cilios pasaban desde un sitio a otro.

-Se sacó la señal temporal, para ver si el periodo fundamental de la misma se podía ver a simple vista y cuantificar, siendo un valor acorde con la frecuencia de batida.

Definiendo las siguientes características:

- Duración secuencia T
- Número de imágenes N
- Imágenes por segundo fps
- Duración por frame Ts

Si el periodo de la señal (expresado en el número frames) se llama *Numeroframes*, la fórmula de la batida ciliar (FBC), a partir de las características del vídeo anteriores es:

$$FBC = \frac{1}{\text{Numeroframes} \cdot T_s} = \frac{N}{\text{Numeroframes} \cdot T} = \frac{fps}{\text{Numeroframes}}$$

Ahora solo falta saber en cada una de las secuencias los valores de cada uno de los parámetros.

'normal.avi'

- T = 19 segundos
- N = 2360
- fps = N/T = 124.21
- Ts = T/N = 8.05 ms
- FBC diagnosticada por flujo óptico y análisis de píxeles : 6.1 Hz

Observando la señal temporal, el periodo, que está tomado como la diferencia entre máximos de señal, oscila entre valores de 19 a 23 *frames*, esto usando la formula de la FBC da un rango entre 5.4 y 6.5 hercios, rango en el que está el resultado anterior, con lo que lo corrobora perfectamente.

'celula1000n.avi'

- T = 14 segundos
- N = 1770
- fps = N/T = 126.43
- Ts = T/N = 7.91 ms
- FBC diagnosticada por flujo óptico y análisis de píxeles : 8.2 Hz

En esta ocasión, el periodo oscila entre 13 y 18 *frames*, en lo que aplicando la fórmula de la FBC da un rango entre 7 y 9.7 hercios, volviendo a estar los 8.2 hercios dentro del rango calculado.

6. Discusión

6.1 Segmentación por contornos activos

El método de los contornos activos es el método empleado para la segmentación. Sus características para la adaptación de las curvas a los contornos y su relativo fácil manejo lo hicieron el candidato idóneo. Se hizo especialmente necesaria una herramienta de esta complejidad por el tipo de secuencias que se manejan.

Las secuencias biomédicas, con contornos y formas no regulares, como pueden ser células o huesos, no tienen un área clara y cuantificable mediante una fórmula. Además, las secuencias que se están tratando no tienen una iluminación uniforme, con lo que la detección de bordes y los filtrados no son capaces de determinar exactamente el contorno de cada *frame* sin ninguna ambigüedad.

Si esto hubiera sido así, simplemente con un filtrado y una detección de bordes hubiera sido suficiente, pero va a ser necesario inicializar una curva ‘inteligente’ que sea capaz de elegir ese contorno entre otros, ya que va a existir más de un contorno.

De todas formas, a pesar de usar los contornos activos, se siguen teniendo problemas particulares por las secuencias estudiadas, con lo que se requiere de la optimización. La iluminación de las secuencias tiene grandes variaciones no compensables con el filtrado, existen cambios de forma de los objetos a segmentar u obtención de contornos en los que no se pueden establecer referencias para saber el movimiento que han sufrido de un *frame* al siguiente.

6.1.1 Frames corregidos con correlación cruzada

La ***correlación cruzada*** es un buen estimador de la similitud entre imágenes y gran herramienta para la optimización de la segmentación. Existen secuencias de vídeo, donde la correlación cruzada entre *frames* disminuye sensiblemente, bien debido a un rápido movimiento entre ellos o a los grandes cambios de iluminación que existen en algunas secuencias. Estos movimientos bruscos dificultan la segmentación, siendo necesario variar alguno de los parámetros de guiado de la curva, como en este caso, se aumentó el número de iteraciones necesarias para adaptarse al contorno del *frame*.

Este movimiento, en el caso particular de ‘*Batida_ciliar_normal.avi*’, es un giro de más grados de lo normal, donde la correlación era menor a 0.98. En tales casos, con los valores por defecto no le daba tiempo a adaptarse tan rápidamente, consecuentemente había alguna anomalía como la mostrada en la siguiente figura. Si la correlación superaba esa cifra era que en esos *frames*, con los parámetros por defecto, la curva se guiaba sin problemas.

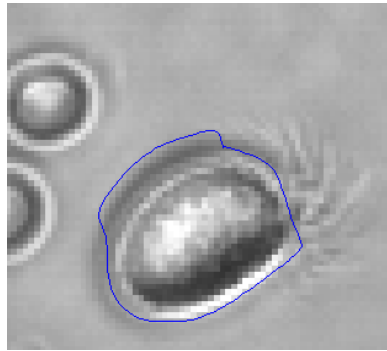


Figura 82. Problemas durante la detección de contorno con *framek* en '*Batida_ciliar_normal.avi*' con los valores por defecto. Duplicando el número de iteraciones fue suficiente para resolver el problema.

6.1.2 Problemas con contornos circulares

Un contorno circular no interesa en la segmentación porque si éste gira no se sabe cuantificar ni el giro ni la dirección, ya que es una referencia ambigua. Aunque la fase de segmentación logre ceñirse al contorno lo más perfectamente posible, el hecho de tener un contorno circular imposibilita el funcionamiento de la fase de corregistro, pues no se puede compensar un movimiento que no se sabe como es exactamente. El corregistro, para compensar el movimiento entre un *frame* y el anterior, ha de tener una referencia que en ambos *frames* esté bien clara y no sea ambigua, cosa que con un contorno circular no es posible.

Existen varias soluciones pensadas al problema:

- Realizar la segmentación a mayor resolución (mayor coste computacional)
- Marcar algún punto del contorno de forma distinta a los otros puntos, como referencia (como detectarlo)

6.1.3 Problemas con contornos cuya forma varía

Existen secuencias donde el contorno de la célula a segmentar varía de forma considerable, haciendo que la curva se haya de adaptar a tales cambios. Esta problemática ocasiona problemas en el corregistro, ya que las referencias se pierden al variar la forma del contorno. Para ello, el algoritmo de corregistro seleccionará aquellos *frames* donde la forma del contorno no varíe tanto y así no perder referencias, pudiendo compensar los movimientos de un *frame* a otro.

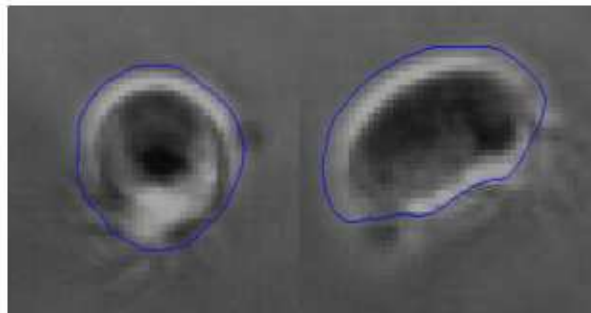


Figura 83. Un ejemplo de variación de forma entre frames sucesivos

6.2 Corregrastración mediante la transformada Fourier-Mellin

De los más de 15 métodos estudiados, había dos características que tenían en común: la lentitud y la no compensación del movimiento. Tan sólo la correlación cruzada y la entropía conjunta lograban acercarse al objetivo de compensar el movimiento, pero con un coste computacional enorme o incluso inviable (no conseguían corregrastrar más del 15 % de *frames* de las secuencias).

Es lógico si se piensa que para corregrastrar se ha de coger una imagen y se han de comprobar todos los posibles giros y desplazamientos y seleccionar el mejor de ellos, eso para cada una de las imágenes.

El método de *Fourier-Mellin* es el algoritmo que logra realizar el corregrastro de las secuencias de forma satisfactoria. Además, no solo es viable sino que es mucho más rápido que los dos métodos anteriores, obteniendo tiempos de cómputo sensiblemente inferiores.

El corregrastro de este algoritmo es una compensación del movimiento entre *frames* en la mayoría de casos, existiendo aún pequeñas deficiencias en tal compensación. Esto se traduce en saltos en ciertos *frames* de las secuencias que degradan el análisis frecuencial.

Posiblemente, los problemas en la iluminación de las secuencias originales (traducidos en leves variaciones del contorno segmentado) ocasionan esas deficiencias en la compensación del movimiento de esta fase. La parte de la adquisición de las secuencias será algo a mejorar para poder resolver dichos los problemas que se plantean en esta fase.

Otro de los problemas que se puede observar en dicho corregrastro es la presencia del contorno de la célula en la secuencia corregrastrada. Si existiese la posibilidad de obtener los mismos resultados pero sin el contorno, sería algo que podría ayudar en un procesado posterior.

6.3 Análisis de la batida ciliar

6.3.1 Flujo óptico

El análisis por flujo óptico es capaz de calcular el movimiento de cada uno de los píxeles entre un *frame* y el siguiente, dentro de una cierta ROI. Tal descripción de movimiento permite más que una simple descripción frecuencial del batido ciliar, pudiendo dar incluso el movimiento de los píxeles de un mismo cilio, y consiguiendo con ello una caracterización completa del movimiento del cilio.

Pero el objetivo de la caracterización aún no es posible, debido al enmascaramiento entre unos cilios y otros. La reducida resolución de los vídeos analizados hace imposible el seguimiento de un cilio, ya que si se analiza el movimiento de cada uno de sus píxeles, llega un momento en que otro cilio aparece ocultando al anterior, con lo que se hace inviable.

Por tanto, flujo óptico es una herramienta ideal para la caracterización del movimiento ciliar, pero una vez resueltas las dificultades de la resolución y de la calidad de las secuencias adquiridas.

6.3.2 Análisis de la batida ciliar: Intensidad de los píxeles

Es el método de descripción frecuencial más sencillo de los empleados, aunque no por ello debe ser menospreciado, ya que es rápido y preciso en los resultados que aporta. Usa el algoritmo FFT como descriptor frecuencial básico pero tiene varias optimizaciones, como el

método de Welch para estimar el periodograma de la señal temporal, o un módulo que valide *frames*, para asegurar en todo momento que la ROI seleccionada tenga unas amplitudes dentro de los márgenes correctos.

6.3.3 Comparativa entre flujo óptico y el estudio intensidad de los píxeles

Ambos algoritmos, a pesar de ser completamente diferentes, aportan los mismos resultados en todas las secuencias estudiadas. Si se tiene que decidir cual de ellos funciona mejor, cada uno da un tipo distinto de información y no se pueden comparar en este sentido.

Por un lado, el procedimiento de análisis de píxeles es capaz de calcular la variación temporal de los píxeles dentro de la ROI seleccionada. Por otro lado, el flujo óptico es capaz de calcular hacia donde y cuanto se desplaza cada uno de los píxeles de la ROI. Por ello, ambos procedimientos pueden ser usados en un futuro dentro de alguna herramienta que los combine y sea capaz de estimar los parámetros del batido ciliar.

El procedimiento de análisis de píxeles no puede extraer el patrón de movimiento de la batida ciliar, cosa que sí puede hacer flujo óptico, ya que esta herramienta es capaz de calcular el movimiento de cada uno de los píxeles, mientras que el análisis de los píxeles sólo cuantifica la variación de intensidad de los mismos durante la secuencia.

6.3.4 Influencia del tiempo de obturación en la adquisición

Se pueden conseguir mejoras en la adquisición de las secuencias variando el tiempo de obturación. Uno de los problemas que existen en la mayoría de secuencias analizadas, es que los cilios destacan sobre el fondo en el que están haciendo difícil el análisis en frecuencia. Además, los saltos de iluminación que existen hacen que a veces el propio fondo oculte a los cilios, pudiendo confundir ambos y estar midiendo la variación del fondo, no la de los cilios.

Las secuencias que tenían estos problemas en la iluminación habían sido adquiridas con un tiempo de obturación de 1/120 segundos. Tras un análisis de los posibles parámetros, se modificó a 1 /10000 segundos, la cual era mucho menor.

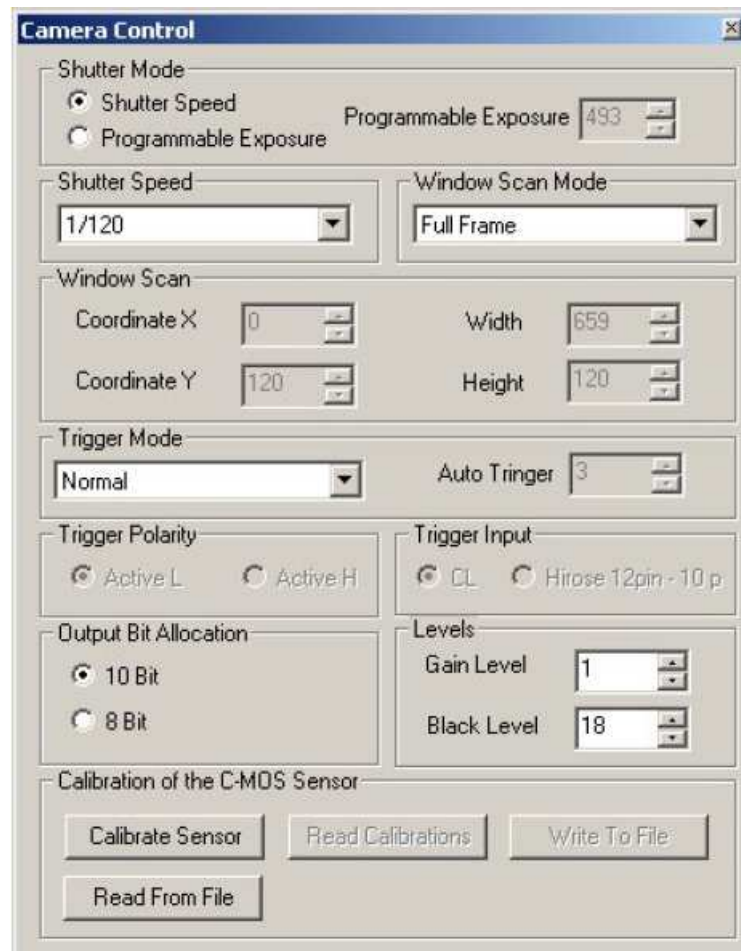


Figura 84. Ejemplo de la interfaz de control de algunos parámetros de la cámara CCD [28].

Disminuir el tiempo de obturación durante la fase de adquisición consigue una secuencia con iluminación más uniforme entre *frames*, consiguiendo eliminar los grandes saltos de iluminación que existen en las secuencias. Por otra parte, en las secuencias obtenidas los cilios tienen una clara mayor presencia que hace el análisis más factible.

7. Conclusiones

El principal objetivo de este proyecto, era caracterizar el patrón de movimiento de los cilios del epitelio respiratorio. Lo que realmente se pretendía con la caracterización del movimiento ciliar era tener en todo momento el movimiento de un cilio aislado para, posteriormente, establecer algún tipo de modelado sobre dicho movimiento que permitiera tener información de parámetros tales como la amplitud, forma o frecuencia del batido ciliar.

Para ello, y a lo largo de este Proyecto Fin de Carrera, se ha:

- Definido los principales parámetros que caracterizan la Discinesia Ciliar Primaria a partir de un análisis semi-automático de imágenes de secuencias de video con movimiento ciliar.
- Desarrollado un algoritmo que permite segmentar automáticamente la célula mediante el uso de contornos activos (mapas de flujo del vector gradiente o ***Gradient Vector Flow [GVF]***), permitiendo localizar de forma automática la célula bajo estudio, lo que facilitará una posterior corrección de la misma.
- Elaborado un algoritmo que permite una ***corrección*** de la célula dada una correcta segmentación de la misma. Esta herramienta era necesaria para fijar la célula, ya que ésta se mueve a lo largo de la secuencia de video. Se han estudiado varios algoritmos de corrección (entropía conjunta, correlación cruzada y la transformada Fourier-Mellin), seleccionando este último método como el que mejores resultados proporciona.
- Estudiado y caracterizado el movimiento ciliar, así como la frecuencia de dicho movimiento. Para ello se parte de una región de interés situada en los cilios y se analiza mediante flujo óptico (algoritmos de ***Lucas & Kanade*** y ***Proesman***). También se ha estudiado el movimiento ciliar mediante un análisis frecuencial de la variación de intensidad en los píxeles de la región de interés a través de los *frames*, proporcionando un peor resultado y una menor versatilidad frente al algoritmo de flujo óptico.
- Agrupado todos los algoritmos desarrollados para el análisis del batido ciliar de las secuencias de video en una interfaz de fácil manejo para el usuario, de forma que pueda obtener el análisis de forma semi-automática.

Hasta ahora se tiene un procedimiento para analizar la frecuencia de batido ciliar de células ciliadas que tienen una leve vibración o desplazamiento, el cual aporta frecuencias dentro del rango válido según la terminología médica (esto es de 6 a 10 hercios). Además se ha contrastado el análisis de las secuencias en las que se han obtenido frecuencias razonables con varios métodos, estando estrechamente correlacionados los resultados obtenidos.

7.1 Líneas futuras

La principal línea de trabajo futuro está en la mejora de la adquisición de las secuencias de vídeo. Las secuencias analizadas hasta ahora tienen una resolución muy reducida, ocasionando problemas para el seguimiento en el movimiento de un cilio aislado, por el ocultamiento existente entre cilios.

Los continuos cambios de iluminación que se producen en las secuencias son otro objetivo a tratar de mejorar. A pesar de variar la velocidad de obturación con que se obtenían las secuencias, no se consigue eliminar las variaciones de iluminación. Por otra parte, la propia sombra de las células sobre el líquido que forma el fondo, y su gran variación crea problemas en el procesado de las imágenes.

Una de las opciones que parece ser la nueva rienda a tomar, es un estudio en tres dimensiones de las células ciliadas. Las secuencias analizadas en el presente proyecto están tomadas desde un único punto, dando una visión única de los cilios. En un futuro, es muy posible que se haga una adquisición desde varios puntos para proyectar el batido ciliar en cada una de las dos dimensiones y realizar una mejora de la caracterización del batido ciliar.

Una futura mejora de la adquisición de las secuencias, hará factible el análisis de células con diversos tipos de desplazamientos y rotaciones, siendo posible ya no solo analizar la frecuencia de batida ciliar automáticamente, sino además, caracterizar el movimiento ciliar en las tres dimensiones del espacio.

7.2 Publicaciones derivadas de este Proyecto Fin de Carrera

‘Optical Flow Method in Phase-Contrast Microscopy Images for the Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia Through Measurement of Ciliary Beat Frequency’

Autores: Eduardo Parrilla, José M. Sánchez, Miguel Armengot, Manuel Mata, Xavier Milara, Julio Cortijo, Daniel Monleón, Jaime Riera y David Moratal

Enviado el 30 de octubre de 2009 al

IEEE Transactions on Medical Imaging, Special Issue on Multivariate Microscopy Image Analysis (Manuscript ID: TMI-2009-0612)

8. Referencias

- [1] Armengot M, Carda C, Escribano E, Samper G, Archivos de bronconeumología, Volumen 41, número 01, enero 2005. “Estudio del transporte mucociliar y de la estructura ciliar nasales en pacientes con síndrome de Kartagener”
http://www.doyma.es/bronco/ctl_servlet?_f=40&ident=13070275
- [2] Armengot M, Mata M, Milara X, Cortijo J. Facultad de Medicina, Universitat de València, Servicio de otorrinolaringología de la fundación para la investigación del Hospital general univesitario de Valencia, Artículo de revision: “Discinesia ciliar primaria. Ciliopatías”.
- [3] Kohidai L. “Flagellum - beating pattern of flagellum and cilia” (2008)
- [4] Richard K. Albert, Stephen G. Spiro, James R. Rett, Elsevier Health Sciences, Mayo 2001, “Translation of Albert: Comprehensive Respiratory Medicine”
- [5] Atlas de histología vegetal y animal: La célula, Citoesqueleto: cilios y flagelos.
<http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/ampliaciones/7-cilio-flagelo.php>
- [6] Jorissen, Mark, Willems, Tom and Van der Schueren, Bernadette, Acta Oto-Laryngologica, Volume 120, Number 2, 30 August 2000 , pp. 291-295(5) 2000, Informa Healthcare, “Ciliary Function Analysis for the Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia: Advantages of Ciliogenesis in Culture”.
- [7] Armengot M, Morcillo E, Cortijo J. Facultad de Medicina, Universitat de València, Servicio de otorrinolaringología de la fundación para la investigación del Hospital general univesitario de Valencia. “Desarrollo y características del equipo de medición del movimiento ciliar”
- [8] Image Processing Toolbox 6 User’s Guide R2007b (2007) [www.mathworks.com]
- [9] Modelos, control y sistema de visión, “Detección de discontinuidades”, Omar Sánchez, Escuela Politécnica Superior de la Rábida. <http://omarsanchez.net/detectdisc.aspx>
- [10] Abril L, Grupo de robótica y manufactura avanzada, Centro de Investigación y estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Saltillo, Procesamiento de imágenes: “Filtrado en el dominio de la frecuencia” (2009)
- [11] Proyecto Final de Carrera.: Herramienta de cuantificación automática de marcadores de viabilidad miocárdica en secuencias de resonancia magnética cardiaca. Autor: Diego Ramón García Sánchez. Directores: Dr. D. José Millet Roig, David Moratal Pérez, ETSIT UPV 2003.
- [12] Gonzalez, R, Woods, R, Eddins S. *Digital image processing using Matlab*. 3a ed. Estados Unidos: Pearson Prentice-Hall, 2004.
- [13] Proyecto Final de Carrera.: Herramienta de reconstrucción 2D y 3D de arterias basada en secuencias de imágenes de ultrasonido intravascular para la ayuda en el diagnóstico. Autor: Roberto Sanz Requena. Directores: Diego R. García Sanchez, David Moratal Pérez, ETSIT UPV 2005.

- [14] Díaz N. Departamento de Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial, Universidad de Granada, Modelos de inteligencia artificial, “Aplicaciones y ejemplos en segmentación de imágenes”.
- [15] Kass M, Witkin A, Terzopoulos D. “Snakes: Active Contour Models.” International Journal of Computer Vision. 1987; 1:321-331.
- [16] Image Analysis and Communications Lab, Johns Hopkins University, “Active Contours, Deformable Models, and Gradient Vector Flow”.
<http://iacl.ece.jhu.edu/projects/gvf/>
- [17] Bolón V, Fernández A, García M, Lado L. “Visión artificial 2007-2008”.
- [18] Biafore F. Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín, “Aspectos básicos del registro y fusión de imágenes”
- [19] Pascau J. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Laboratorio de imagen médica, “Técnicas avanzadas de procesamiento de imágenes médicas”.
- [20] Pascau J. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Laboratorio de imagen médica, “SPM: Herramientas de procesamiento I”.
- [21] Universidad de Michigan, Department of Computer Science and Engineering, “Mutual information for image registration”.
- [22] Riaan van den Dool, Universidad de Stellenbosch, Department of Electrical and Electronic Engineering, Electronics Systems Laboratory, Mayo 2004, “Image Processing tools”.
<http://www.scribd.com/doc/9480198/Tools-FourierMellin-Transform>
- [23] Bourke P. “DFT and FFT”, 1993:
<http://local.wasp.uwa.edu.au/~pbourke/miscellaneous/dft/>
- [24] Jurkovic I. The University of Texas Health Science Center, Research Imaging Center, “Fourier-Mellin Transform in radiation therapy”
- [25] Escolano F. DCCIA, Universidad de Alicante, Ampliación de IA, ‘Tema 5: Movimiento y tracking (flujo óptico)’
<http://www.dccia.ua.es/dccia/inf/asignaturas/VA/Tema5/Microsoft%20PowerPoint%20-%20Tema45aAIA%202002.PDF>
- [26] Amitabha Mukerjee, Proesmans Optical Flow: Implementation and optimization, Project Report CS 676, Indian Institute of Technology Kanpur (2007)
- [27] Rincón J, Facultad de Ingeniería Eléctrica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, “Introducción al Procesamiento Digital de Señales”
<http://lc.fie.umich.mx/~jrincon/curdspi.pdf>
- [28] ‘Digital Monochrome Quad Speed CMOS Progressive Scan Camera CV-A33CL Operation Manual’