



**I  
N  
A  
O  
E**

**Aplicación del método de componentes  
principales al análisis de imágenes de flujo  
sanguíneo**

Por

Lic. Jose Angel Arias Cruz

Tesis sometida como requisito parcial para  
obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN LA  
ESPECIALIDAD DE ÓPTICA

en el

Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y  
Electrónica. Agosto de 2015 Tonantzintla,  
Puebla

Supervisada por:

Dr. Julio César Ramírez San Juan

Dr. Roger Chiu Zárate

©INAOE 2015

Derechos Reservados

El autor otorga al INAOE el permiso de  
reproducir y distribuir copias de esta tesis en su  
totalidad o en partes mencionando la fuente.



## Resumen

El flujo sanguíneo está definido como la circulación continua de sangre en el sistema cardiovascular. Este proceso de circulación asegura la transportación de nutrientes, hormonas, desechos metabólicos, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> a través del cuerpo y permite mantener el metabolismo celular, regula el pH y la temperatura de todo el cuerpo. El sistema circulatorio, en el ser humano, es la estructura anatómica compuesta por el sistema linfático y el sistema cardiovascular, este último encargado del flujo sanguíneo, y está conformado por el corazón, la sangre y los vasos sanguíneos.

Los vasos sanguíneos son estructuras huecas y tubulares que conducen la sangre desde y hacia todo el cuerpo, se pueden clasificar en varios tipos; arterias, vénulas, venas y capilares.

En este trabajo se propone una técnica para la mejora en la visualización de vasos sanguíneos profundos para imágenes de speckle, donde debido a las propiedades altamente esparcidoras del medio ocasiona una pérdida en visibilidad, para ello proponemos un método que denominamos LSCI+PCA, en el que combina las ya bien estudiadas técnicas de LSCI para obtener imágenes de speckle y PCA para procesar dichas imágenes. Las muestras empleadas en este trabajo fueron maniqués de piel y muestras in-vivo. Los resultados obtenidos con LSCI+PCA se compararon con LSCI tradicional. En la que concluimos en una mejora considerable en la visualización de LSCI+PCA con respecto de LSCI, esto nos permite contar con una herramienta para el análisis de imágenes de speckle que presenta poca visibilidad en una red de vasos sanguíneos.

## Abstract

Blood flow is defined as the continuous circulation of blood in the cardiovascular system. This circulation process ensures transportation of nutrients, hormones, metabolic wastes,  $O_2$  and  $CO_2$  through the body and keeps the cellular metabolism, regulating the pH and temperature of the entire body. The circulatory system in humans, is the anatomical structure composed of the lymphatic system and the cardiovascular system, the latter in charge of blood flow, and consists of the heart, blood and blood vessels.

Blood vessels are hollow tubular structures that carry blood to and from the whole body, they can be classified into several types; arteries, venules, veins and capillaries.

In this work we propose a technique for improving the visualization of deep blood vessels from speckle images, where due to the highly scattering properties of the tissue causes a loss in visibility. The proposed method, called LSCI + PCA, combines the already well known LSCI and PCA. The samples used in this work were skin phantoms and in-vivo samples. The results obtained with LSCI + PCA were compared with the traditional LSCI. We found a considerable improvement in the visualization of deep blood vessels with LSCI + PCA compared with LSCI, this allows us to have a tool for analyzing images of speckle with poor visibility.

## Contenido

Capítulo 1: Introducción .....	1
Capítulo 2: conceptos básicos .....	3
2.1 Esparcimiento .....	3
2.2 Formación de speckle .....	4
2.3 Contraste .....	6
2.4 Teoría básica de Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI).....	6
2.5 Relación entre el tiempo de correlación y la velocidad de los esparcidos. ....	11
2.6 Algoritmo (espacial) para determinar el contraste .....	12
2.7 PCA aplicado al análisis de imágenes .....	13
Capítulo 3: Metodología y arreglo experimental. ....	15
3.1 Maniquí de piel.....	15
3.2 Arreglo experimental óptico.....	15
3.3 Análisis <i>in-vitro</i> e <i>in-vivo</i> .....	16
Capítulo 4: Análisis de resultados experimentales para la visualización de vasos profundos .....	18
4.1 Procesamiento de las imágenes de speckle con LSCI: Análisis Espacial.....	18
4.2 Resultados del análisis de contraste de las imágenes de speckle con LSCI .....	19
4.3 Resultados del análisis de contraste de las imágenes de speckle con LSCI+PCA. ....	20
Capítulo 5: Conclusiones .....	25
Trabajo a futuro .....	26
Anexo 1: Análisis de Componentes Principales PCA (o KLT) .....	27
Anexo 2: Código en matlab .....	29
Referencias .....	34



## Capítulo 1: Introducción

El flujo sanguíneo está definido como la circulación continua de sangre en el sistema cardiovascular. Este proceso de circulación asegura la transportación de nutrientes, hormonas, desechos metabólicos,  $O_2$  y  $CO_2$  a través del cuerpo y permite mantener el metabolismo celular, regula el pH y la temperatura de todo el cuerpo. El sistema circulatorio, en el ser humano, es la estructura anatómica compuesta por el sistema linfático y el sistema cardiovascular, este último encargado del flujo sanguíneo, y está conformado por el corazón, la sangre y los vasos sanguíneos.

Los vasos sanguíneos son estructuras huecas y tubulares que conducen la sangre desde y hacia todo el cuerpo, se pueden clasificar en varios tipos; arterias, vénulas, venas y capilares. Los vasos sanguíneos son los encargados de mantener la salud del tejido biológico [1], la vitalidad de estos es determinante, por todo lo anterior para un médico es relevante determinar su presencia y funcionalidad, por esta razón se han desarrollado diferentes técnicas para visualizar dicho vasos y determinar el flujo sanguíneo presente en ellos, entre las cuales se encuentran algunas técnicas ópticas, que debido a su carácter no invasivo se volvieron atractivas para su aplicación en la medicina, por ejemplo: Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) [2], basada en la medición de contraste de la imagen de speckle que se obtiene al iluminar coherentemente el tejido biológico; y Laser Doppler flowmetry (LDF) [3] basada en el efecto Doppler.

Las técnicas mencionadas anteriormente son capaces de medir flujo sanguíneo superficial, pero muestran serias limitaciones cuando de vasos sanguíneos profundos (algunos cientos de micras) se trata, esto debido a las propiedades altamente esparcidoras del tejido biológico. Para resolver esta limitante, diferentes grupos de investigación han explorado diversas alternativas, tales como: 1.- PhysicoChemical Tissue Optical Clearing (PCTOC) [4], la cual emplea un agente químico (a base de glicerina) para reducir el coeficiente de esparcimiento del tejido biológico; 2.- Magnetomotive Laser Speckle Imaging (MM-LSI) [5] utiliza nano partículas magnéticas, que se inyectan en el torrente sanguíneo, las cuales, bajo la acción de un campo magnético externo provocan una pérdida de contraste en la correspondiente imagen de speckle detectable con LSCI; 3.- Pulsed PhotoThermal Radiometry (PPTR) [6] utiliza un pulso laser a 585 nm (a esta longitud de onda la sangre presenta un pico de absorción) para calentar los vasos sanguíneos, el calor generado se propaga a la superficie y el correspondiente incremento de temperatura es monitoreado por una cámara térmica, de esta manera se visualiza el vaso sanguíneo; y finalmente PhotoThermal-LSI (PT-LSI) [7], en la cual también se calientan los vasos sanguíneos con el pulso de laser a 585 nm, pero en esta ocasión la energía cinética ganada por las células de la sangre provoca una caída en el contraste de la correspondiente imagen de speckle que puede ser medida con LSCI. El inconveniente de estas técnicas se

encuentra en que modifican las propiedades físicas intrínsecas del tejido o bien utilizan un agente externo que por sí mismo podrían alterar la morfología de los vasos sanguíneos o el flujo.

En este trabajo de tesis, proponemos el uso de LSCI en conjunto con una técnica de procesamiento estadístico llamada Análisis de Componentes Principales (PCA) para mejorar la visualización de vasos sanguíneos profundos. PCA se emplea para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos estadísticos, tomando como discriminante el parámetro de variabilidad de los datos, esta técnica ya ha sido utilizada en el procesamiento de imágenes ref., la combinación de ambas técnicas da como resultado un método no invasivo para visualización de vasos sanguíneos profundos.

Esta tesis está organizada de la siguiente manera:

En el Capítulo 2 se presentan los conceptos básicos de la óptica del tejido biológico, la formación de patrones de bio-speckle y el contraste de un patrón de speckle dinámico integrado en el tiempo, estos conceptos se relacionan con la medición de flujo sanguíneo.

En el Capítulo 3, se explica la elaboración de los maniquís de piel y el arreglo experimental utilizados en este trabajo.

En el Capítulo 4 se muestran y analizan los resultados experimentales para la visualización de vasos profundos.

En el Capítulo 5, se muestran las conclusiones generales de este trabajo.

## Capítulo 2: conceptos básicos

Como se mencionó en el capítulo 1, se han desarrollado diversas técnicas para la visualización de vasos sanguíneos, la mayoría de las técnicas mencionadas y en particular el método propuesto en este trabajo de tesis se basan en el análisis del patrón de speckle producido cuando el objeto bajo estudio es iluminado con luz coherente. El presente capítulo tiene como propósito introducir los conceptos básicos que serán utilizados a lo largo de la tesis, principalmente aquellos que ayuden a entender la generación de speckle desde un punto de vista general y particularmente el speckle generado en tejido biológico.

Speckle o moteado, es un fenómeno de interferencia, donde un gran número de ondas, coherentes pero desfasadas entre si aleatoriamente, interfieren y dan lugar a un patrón de manchas oscuras y brillantes como resultado de la interferencia destructiva y constructiva respectivamente. La mayoría de las superficies, sean de origen natural o sintético, presentan una alta rugosidad a escalas comparadas con una longitud de onda, cuando estas superficies son iluminadas por una onda coherente, la superficie esparce la luz, dando lugar a patrones de speckle, de esta forma se dice que el origen del speckle está basado en el esparcimiento de la luz, por lo tanto es necesario estudiarlo.

### 2.1 Esparcimiento

El fenómeno de esparcimiento de la luz es considerado como el cambio de dirección de la luz a consecuencia de la interacción entre la onda luminosa y un obstáculo o inhomogeneidad (partícula esparcidora). Esta interacción provoca una perturbación en las orbitas electrónicas de las moléculas que constituyen el objeto esparcidor, dicha perturbación es periódica y de la misma frecuencia que el campo incidente, dando lugar a la generación de un momento dipolar que se manifiesta como una fuente de radiación electromagnética, resultando de este modo la luz dispersada.

El fenómeno de esparcimiento se clasifica en tres categorías dependiendo del tamaño del objeto dispersor en relación con la longitud de onda de la luz incidente: el límite geométrico, el límite de Rayleigh y el régimen de Mie.

#### Límite geométrico

Este límite es considerado cuando el tamaño de la partícula dispersora es mucho mayor que la longitud de onda de la luz incidente. La interacción luz-dispersor es descrita mediante el trazo de rayos que se reflejan y refractan en una interfaz.

#### Límite de Rayleigh

Este límite ocurre cuando el tamaño de la partícula esparcidora es pequeño en comparación con la longitud de onda. El esparcimiento de Rayleigh es llamado elástico porque tiene la misma longitud de onda que la onda incidente.

#### Régimen de Mie



La teoría de Mie describe la dispersión de la luz por objetos esféricos, que en principio es aplicable a cualquier relación entre tamaño de objeto y longitud de onda. Esta teoría es utilizada cuando no es válido el límite de Rayleigh o el límite geométrico, es decir, cuando el tamaño de la partícula dispersora es comparable con la longitud de onda. Aunque los dispersores no sean necesariamente esféricos, su comportamiento generalmente puede ser bien modelado por la teoría de Mie aplicada a esferas con un tamaño similar.

En el tejido biológico desde el punto de vista de la biología, el tejido, es una estructura constituida por un conjunto organizado de células diferenciadas, ordenadas regularmente, que realizan un trabajo fisiológico coordinado.

Ópticamente hablado, el tejido biológico es una mezcla inhomogénea de partículas esparcidoras del tipo de Rayleigh y de Mie, dentro de las cuales podemos mencionar: células, núcleos y mitocondrias con tamaños que van desde las 10  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$  (límite geométrico), vesículas, fibras de colágeno y agregados macrocelulares con tamaños alrededor de 0.1 $\mu\text{m}$  (límite de mie) y las membranas con tamaños de 0.01 $\mu\text{m}$  (límite de Rayleigh).

La interacción de la luz con el tejido biológico es un proceso complicado, la luz es esparcida por medio de las diferentes inhomogeneidades microscópicas, la mayor parte de la luz que es reflejada por el tejido es el resultado del esparcimiento de las diferentes capas y estructuras del tejido. En la interacción de luz coherente con algún tejido biológico siempre se encontrara presente el fenómeno de speckle, como una manifestación directa de interferencia espacial entre múltiples ondas que han sido esparcidas al interactuar con el tejido. Si bien el speckle es indeseable para la formación de imágenes ópticas de alta resolución, lleva información del tejido bajo análisis, proporcionando información estadística a nivel subcelular (orgánulos, membranas, vesículas, etc.) Sobre la estructura y dinámica presentes en el tejido.

## 2.2 Formación de speckle

El tamaño de las machas o motas en el patrón de speckle depende del sistema óptico utilizado, de la longitud de onda utilizada y de la distancia entre el sistema óptico y el área de iluminación, por lo tanto, el tamaño de estas, se puede estimar fácilmente en la mayoría de los casos. Para la observación de speckle se tienen dos tipos de arreglos.

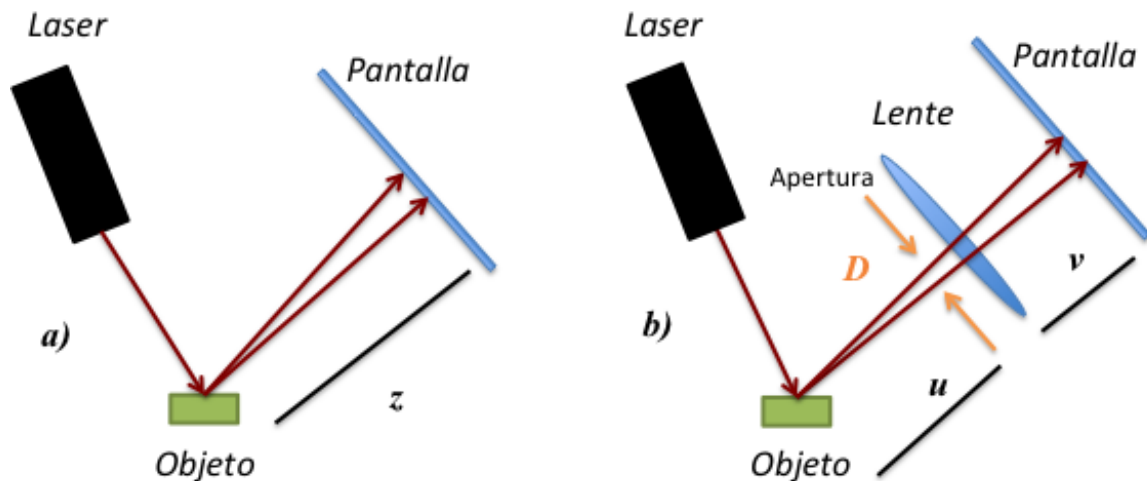


Fig.2.2. 1 Formación de speckle usando como fuente de luz coherente un láser: (a) campo lejano (speckle objetivo) y (b) speckle imagen (speckle subjetivo).

En la Fig.2.2. 1 a) se muestra el arreglo óptico para la formación de speckle conocido como speckle de campo lejano o speckle objetivo. La medida de estos speckle es función de la longitud de onda de la luz  $\lambda$ , el ancho del haz que ilumina la superficie bajo estudio y la distancia  $z$  de la superficie a la pantalla.

Dainty [8] propuso la expresión  $\lambda z/L$  para dimensionar el tamaño medio del speckle, donde  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz del láser,  $L$  es el ancho del área iluminada y  $z$  es la distancia entre el objeto y la ubicación del patrón de speckle [8], [9].

En la Fig.2.2. 1 b) se muestra el arreglo óptico para la formación de speckle conocido como speckle imagen o speckle subjetivo. Se llama así debido a que la estructura de los patrones depende del sistema de observación; por ejemplo, si la apertura de la lente cambia, también lo hace la medida de los speckles. Si la posición del sistema formador se altera, el patrón cambiara gradualmente y eventualmente no estará relacionado con el patrón observado originalmente.

Esto puede explicarse considerando que cada punto de la imagen es iluminado por un área finita del objeto. La medida de esta área está determinada por la resolución de la lente, limitada en difracción, la cual está dada por el diámetro del disco de Airy  $2.4 \lambda u/D$ , donde  $u$  es la distancia entre el objeto y la lente, y  $D$  es el diámetro de su apertura.

La luz de puntos vecinos de la imagen se dispersa desde áreas que tienen muchos puntos en común y la intensidad de tales puntos no difiere demasiado. Sin embargo, puntos en la imagen que son iluminados por áreas del objeto que estén separadas por un "disco de Airy" de diámetro, tienen intensidades no relacionadas. Esto corresponde a una distancia en la imagen de  $2.4 \lambda v/D$ , donde  $v$  es la distancia entre la lente y la imagen. Así, el tamaño de los speckles en la imagen será de este orden.

El análisis de los patrones de speckle es utilizado para obtener información relevante sobre los objetos, tales como la velocidad, vibración, desplazamiento, etc. Al ser analizados los patrones de speckle tomando como medida a la intensidad se han definido varias cantidades que sirven para su análisis [9] En nuestro caso la cantidad llamada contraste es de gran relevancia.

### 2.3 Contraste

El contraste en una imagen, está definido como la diferencia en brillantez que existe entre dos puntos diferentes de una misma imagen, en imágenes donde existen zonas brillantes y oscuras (patrones de interferencia) el contraste puede calcularse como

$$\frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (2.3. 1)$$

donde  $I_{max}$  e  $I_{min}$  representan la intensidad mas alta y la mas baja, y el denominador representa el doble de la intensidad promedio. De la misma forma en un patrón de speckle el contraste está definido como [10]

$$C = \frac{\sigma_I}{\langle I \rangle} \quad (2.3. 2)$$

donde  $\sigma_I$  representa la desviación estándar de la intensidad y  $\langle I \rangle$  el promedio de la misma.

### 2.4 Teoría básica de Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI)

La estadística espacial y temporal de un patrón de speckle provee información acerca del movimiento de las partículas de esparcadoras. El movimiento puede ser cuantificado midiendo y analizando las variaciones temporales o espaciales. En el dominio espacial, estas modificaciones se manifiestan como un difuminado de la imagen. LSCI cuantifica el grado de difuminado espacial al calcular una cantidad llamada *contraste local de speckle* ( $K$ ), el cual, está relacionado con el tiempo de correlación ( $\tau_{co}$ ) [11] de la luz esparcida y con la velocidad de las partículas en movimiento.

La influencia de la velocidad de las partículas en el contraste de speckle es descrito cuantitativamente usando la teoría dynamic light scattering (DLS) [12] en función de los tiempos de correlación ( $\tau_{co}$ ). El tiempo de correlación de speckle es el tiempo de decaimiento característico de la función de autocorrelación de speckle. La función de correlación de speckle es una función que describe la dinámica del sistema usando luz coherente esparcida. El tiempo de correlación es inversamente proporcional a la velocidad media de las partículas de esparcimiento  $\tau_{co} \propto 1/v$  (donde  $v$  es la velocidad media) [13]. De esta manera, LSCI mapea variaciones de contraste en un mapa de velocidades relativas del movimiento de las partículas esparcadoras (i.e flujo sanguíneo).

El grado de difuminado  $K$  se calcula sobre una región de la imagen de speckle, en términos de una imagen digital se utiliza una ventana de  $n \times n$  pixeles [14]:

$$K = \frac{\sigma_s}{\langle I \rangle} \quad (2.4.1)$$

Esta ecuación es similar a (2.3. 2) donde  $\sigma_s$  es la desviación estándar espacial de la intensidad y  $\langle I \rangle$  es la intensidad media sobre los pixeles de la ventana.

Las fluctuaciones de la intensidad del patrón de speckle son más rápidas, en las áreas donde se incrementa el flujo sanguíneo, y cuando es integrada sobre algún tiempo de exposición de la cámara, el patrón de speckle se difumina en aquellas áreas. Como resultado tenemos un patrón de speckle cuantificando en difuminado por la medida de contraste espacial. El contraste speckle tiene valores entre 0 y 1. Un contraste speckle de 1 indica que no hay difuminado en el patrón speckle y, por tanto, ningún movimiento, mientras que un contraste speckle de 0 significa que los aspersores se están moviendo muy rápido para promediar todos las motas, En la imagen de contraste se tiene suficiente información para poder comparar en que regiones tenemos mayor movimientos, obteniendo un mapa espacial del flujo sanguíneo relativo. Es decir solo podemos comparar sobre ese mapa que zona es más rápida que otra, y no tener un parámetro absoluto de flujo.

Para hallar una expresión analítica para el contraste  $K$  se emplea la teoría de funciones de correlación, la cual fue estudiada en el capítulo 1. Las fluctuaciones temporales de speckle son cuantificadas mediante las funciones de autocorrelación del campo eléctrico y de la intensidad [11]. Las funciones de autocorrelación del campo eléctrico y de la intensidad están relacionadas mediante la relación de Siegert [15]:

$$g_2(t) = 1 + \beta [g_1(\tau)]^2 = \frac{\langle I(t) * I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (2.4.2)$$

donde  $\beta \leq 1$  depende del tamaño relativo entre la mota de speckle y el área del pixel,

$$g_1(\tau) = \frac{|\langle E(t)E(t + \tau)^* \rangle|}{\langle E(t)E(t)^* \rangle} \quad (2.4.3)$$

es la función de correlación normalizada del campo eléctrico  $E(t)$  esparcido por la muestra a estudiar y  $\tau$  es el tiempo de retardo.

Para que la relación de Siegert pueda ser aplicada, se requiere que el campo eléctrico esparcido  $E(t)$  sea completamente dinámico, es decir, que no tenga una componente estática, de ser este el caso, la relación de Siegert no puede ser aplicada. Para superar este problema, se modeló el campo esparcido como:

$$E(t) = E_f(t) + E_s(t) \quad (2.4.4)$$

donde  $E_f(t)$  es el campo eléctrico esparcido (fluctuante),  $E_s(t)$  es el campo eléctrico estático [8].

Sustituyendo (2.4. 4) dentro de (2.4. 3) se tiene que

$$\begin{aligned}
 g_1(\tau) &= \frac{\langle [E_f(t) + E_s(t)][E_f^*(t + \tau) + E_s^*(t + \tau)] \rangle}{\langle [E_f(t) + E_s(t)][E_f^*(t) + E_s^*(t)] \rangle} = \\
 &= \frac{\langle E_s(t)E_s(t + \tau)^* \rangle + \langle E_f(t)E_f(t + \tau)^* \rangle}{I_s(t) + \langle I_f \rangle + \langle E_s(t)E_f(t)^* \rangle + \langle E_f(t)E_s(t)^* \rangle} + \\
 &+ \frac{\langle E_s(t)E_f(t + \tau)^* \rangle + \langle E_f(t)E_s(t + \tau)^* \rangle}{I_s(t) + \langle I_f \rangle + \langle E_s(t)E_f(t)^* \rangle + \langle E_f(t)E_s(t)^* \rangle} = \\
 &= \frac{I_s(t) + \langle I_f \rangle |g_{1,f}(\tau)|}{I_s(t) + \langle I_f \rangle} \tag{2.4. 5}
 \end{aligned}$$

El símbolo  $\langle \dots \rangle$  denota un promedio temporal.  $E_s(t)$  no fluctúa en el tiempo, por lo tanto la intensidad  $I_s(t) = E_s(t)E_s(t + \tau)^*$  es constante.  $E_f(t)$  fluctúa en el tiempo tal que  $\langle I_f \rangle = \langle E_f(t)E_f(t)^* \rangle$  es la intensidad fluctuante promediada en el tiempo y  $g_{1,f}(\tau)$  es la función de correlación temporal del campo  $E_f(t)$  (esta decae desde 1 hasta 0). Los términos en el numerador sobre la tercera línea (2.4. 5) se promedian a cero porque las fases de los campos no están correlacionadas. Igualmente, el tercer y cuarto término sobre el denominador de la segunda y tercera línea se promedia a cero.

Sustituyendo (2.4. 5) dentro de (2.4. 2) se tiene que

$$\begin{aligned}
 g_2(t) &= 1 + \beta \left| \frac{I_s(t) + \langle I_f \rangle |g_{1,f}(\tau)|}{I_s(t) + \langle I_f \rangle} \right|^2 = \\
 &= 1 + \beta \frac{(I_s(t) + \langle I_f \rangle |g_{1,f}(\tau)|)^2}{(I_s(t) + \langle I_f \rangle)^2} = \\
 &= 1 + \beta \frac{I_s(t)^2 + 2I_s\langle I_f \rangle |g_{1,f}(\tau)| + \langle I_f \rangle^2 |g_{1,f}(\tau)|^2}{(I_s(t) + \langle I_f \rangle)^2} \\
 &= 1 + \beta [\rho^2 |g_{1,f}(\tau)|^2 + 2\rho(1 - \rho) |g_{1,f}(\tau)| + (1 - \rho)^2] \tag{2.4. 6}
 \end{aligned}$$

donde  $\rho^2 = \frac{I_f^2}{(I_f + I_s)^2}$  y  $\beta$  está definida como en (2.4. 2).

(2.4. 6) es la relación de Siegert para campo eléctrico con componentes estática y dinámica [16].

Ahora, de la nueva relación de Siegert encontrada, se buscará la relación entre la varianza de speckle y el tiempo de correlación.

Para un tiempo de exposición dado, cada pixel reporta una señal que es proporcional al número total de fotones recibidos. Así, la intensidad integrada sobre el pixel  $i$ -ésimo está dada por:

$$I = \frac{1}{T} \int_0^T I_i(t') dt' \quad (2.4.7)$$

donde  $T$  es el tiempo de exposición.

Por otro lado,

$$\langle I^2 \rangle_T \equiv \frac{1}{T^2} \iint_0^T \langle I_i(t') I_i(t'') \rangle dt' dt'' \quad (2.4.8)$$

donde los corchetes triangulares significan promedio sobre el ensamblé. Sustituyendo la expresión para  $g_2(\tau)$  dada por (2.4.6) la sustituimos en (2.4.8) obtenemos:

$$\begin{aligned} \langle I^2 \rangle_T &= \langle I \rangle^2 \frac{1}{T^2} \iint_0^T (1 + \beta[\rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2 + 2\rho(1 - \rho)|g_{1,f}(t' - t'')| + \\ &\quad + (1 - \rho)^2]) dt' dt'' = \\ &= \langle I \rangle^2 \frac{1}{T^2} \iint_0^T dt' dt'' + \\ &+ \langle I \rangle^2 \frac{1}{T^2} \iint_0^T [\beta\rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2 + 2\beta\rho(1 - \rho)|g_{1,f}(t' - t'')| + \beta(1 - \rho)^2] dt' dt'' \\ &= \frac{\langle I \rangle^2 T^2}{T^2} + \\ &+ \langle I \rangle^2 \frac{1}{T^2} \iint_0^T [\beta\rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2 + 2\beta\rho(1 - \rho)|g_{1,f}(t' - t'')| \\ &\quad + \beta(1 - \rho)^2] dt' dt'' \quad (2.4.9) \end{aligned}$$

Restando  $\langle I \rangle^2$  y multiplicando por  $1/\langle I \rangle^2$  ambos miembros de la (2.4.9) se obtiene la varianza normalizada:

$$\begin{aligned} K^2 &= \frac{\langle I^2 \rangle_T - \langle I \rangle^2}{\langle I \rangle^2} = \\ &= \frac{1}{T^2} \iint_0^T [\beta\rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2 + 2\beta\rho(1 - \rho)|g_{1,f}(t' - t'')| \\ &\quad + \beta(1 - \rho)^2] dt' dt'' \quad (2.4.10) \end{aligned}$$

Para evaluar la integral de (2.4.10), ambas variables de integración deben ser modificadas.

Sea  $\tau = t' - t''$  y  $\alpha = t''$ , entonces de (2.4.10) es transformada (excepto los límites de integración) usando la fórmula de cambio de variables

$$\begin{aligned}
& \frac{1}{T^2} \iint_0^T [\beta \rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2] dt' dt'' + \frac{1}{T^2} \iint_0^T [2\beta \rho(1 - \rho) |g_{1,f}(t' - t'')|] dt' dt'' + \\
& \quad + \frac{1}{T^2} \iint_0^T [\beta(1 - \rho)^2] dt' dt'' = \\
& = \frac{1}{T^2} \iint [\beta \rho^2 |g_{1,f}(\tau)|^2] |J|^{-1} d\alpha d\tau + \frac{1}{T^2} \iint [2\beta \rho(1 - \rho) |g_{1,f}(\tau)|] |J|^{-1} d\alpha d\tau + \\
& \quad + \frac{1}{T^2} \iint_0^T [\beta(1 - \rho)^2] dt' dt''
\end{aligned}$$

donde  $|J|$  es el valor absoluto del jacobiano para el cambio de variables dado por:

$$J = \begin{vmatrix} \frac{\partial \tau}{\partial t'} & \frac{\partial \tau}{\partial t''} \\ \frac{\partial \alpha}{\partial t'} & \frac{\partial \alpha}{\partial t''} \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} 1 & -1 \\ 1 & 0 \end{vmatrix} = 1$$

Como  $\tau = t' - t''$  y además  $0 \leq t' \leq T$ ,  $0 \leq t'' \leq T$  entonces  $-T \leq \tau \leq T$ .

Como  $\alpha = t'$  y  $0 \leq t' \leq T$  entonces  $0 \leq \alpha \leq T - |\tau|$ .

Entonces

$$\begin{aligned}
K^2 &= \frac{1}{T^2} \int_{-T}^T \int_0^{T-|\tau|} [\beta \rho^2 |g_{1,f}(\tau)|^2] d\alpha d\tau \\
& \quad + \frac{1}{T^2} \int_{-T}^T \int_0^{T-|\tau|} [2\beta \rho(1 - \rho) |g_{1,f}(\tau)|] d\alpha d\tau \\
& \quad + \beta(1 - \rho)^2 = \\
& = \frac{\int_{-T}^T (T - |\tau|) [\beta \rho^2 |g_{1,f}(\tau)|^2] d\tau}{T^2} + \frac{\int_{-T}^T (T - |\tau|) [2\beta \rho(1 - \rho) |g_{1,f}(\tau)|] d\tau}{T^2} + \\
& \quad + \beta(1 - \rho)^2
\end{aligned}$$

$\tau$  solamente tiene sentido físico si  $\tau \geq 0$ , por lo tanto  $|\tau| = \tau$ , entonces:

$$\begin{aligned}
K^2 &= 2\beta \rho^2 \int_0^T \frac{\left(1 - \frac{\tau}{T}\right) (g_{1,f}(\tau))^2 d\tau}{T} \\
& \quad + 4\beta \rho(1 - \rho) \int_0^T \frac{\left(1 - \frac{\tau}{T}\right) g_{1,f}(\tau) d\tau}{T} + \beta(1 - \rho)^2 \quad (2.4. 11)
\end{aligned}$$

Suponiendo que las velocidades de los difusores tienen una distribución Lorentziana, la cual está dada como

$$g_{1,f}(\tau) = e^{-\tau/\tau_{co}} \quad (2.4.12)$$

Y reconociendo que la raíz cuadrada de la varianza es el contraste de speckle,

(2.4.11) se simplifica a

$$K(T, \tau_{co}) = \left\{ \beta \rho^2 \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta \rho (1 - \rho) \frac{e^{-x} - 1 + x}{x^2} + (1 - \rho)^2 \right\}^{1/2} \quad (2.4.13)$$

donde  $x = \frac{T}{\tau_{co}}$ ,  $\rho = \frac{I_f}{I_f + I_s}$  es la fracción de la luz total que es esparcida dinámicamente y  $\tau_{co}$  es el tiempo de correlación de los speckles.

(2.4.13) da cuenta de la luz que es esparcida por la presencia de material biológico estático y dinámico dentro de la muestra.

## 2.5 Relación entre el tiempo de correlación y la velocidad de los esparcidos.

Se planteó la necesidad de obtener una expresión analítica del contraste de speckle (2.4.1) para poder cuantificar el difuminado en el patrón de speckle. Para esto, se asumió que la función de autocorrelación temporal del campo (2.4.12) tiene la forma

$$g_{1,f}(\tau) = e^{-\tau/\tau_{co}} \quad (2.4.14)$$

Esto da un contraste de speckle

$$K(T, \tau_{co}) = \left\{ \beta \rho^2 \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta \rho (1 - \rho) \frac{e^{-x} - 1 + x}{x^2} + (1 - \rho)^2 \right\}^{1/2} \quad (2.4.15)$$

donde el tiempo de correlación de los speckles  $\tau_{co}$  se supone que es inversamente proporcional a una medida de la velocidad de las partículas de esparcimiento

$$\tau_{co} \propto \frac{1}{v} \quad (2.4.16)$$

En el caso de mediciones de láser Doppler, teóricamente es posible relacionar los tiempos de correlación de los speckles  $\tau_{co}$  con la velocidad de las células rojas de la sangre, pero esto es difícil de hacer en la práctica ya que el número de partículas en movimiento con las que la luz interactúa y sus orientaciones son desconocidos. Sin embargo, las medidas espaciales y temporales relativas de la velocidad se pueden obtener fácilmente a partir de las relaciones de los tiempos de correlación. Según Bandyopadhyay [15], (2.4.12) está relacionada solamente para velocidades dentro del



régimen de alto esparcimiento, donde cada uno de los fotones ha experimentado múltiples eventos de esparcimiento desde las partículas en movimiento. En el régimen de esparcimiento dinámico individual, cuando los fotones se esparcen no más de una vez a partir de las partículas en movimiento, entonces el argumento del exponente en (2.4. 12) debe ser cuadrado para representar la velocidad sanguínea. En el régimen de esparcimiento dinámico individual (2.4. 12) es correcta si el movimiento de las partículas está sometido a un movimiento Browniano. Además, la relación entre  $\tau_{co}$  y la velocidad de las partículas de esparcimiento depende de la distribución de velocidad de las partículas de esparcimiento de la muestra mediante la luz detectada. Las publicaciones que tratan el contraste de speckle, tienden a utilizar los términos “velocidad” y “flujo” de manera intercambiable, cuando la velocidad es una longitud por unidad de tiempo, mientras que el flujo es un volumen por unidad de tiempo [17]. Finalmente se tiene un descriptor que es de gran importancia debido a que relaciona al contraste con una medida de flujo llamado Speckle Flow Index (SFI) y se define como.

$$SFI = \frac{1}{\tau_{co}} = \frac{1}{TK^2} \quad (2.4. 17)$$

## 2.6 Algoritmo (espacial) para determinar el contraste

Un mapa resuelto espacialmente de contraste local de speckle puede ser calculado a partir de una imagen de speckle mediante el cálculo de la relación de contraste  $K(T, \tau_{co})$  en cada punto en la imagen mediante una ventana deslizante de  $n \times n$ . En este punto, se debe tener cuidado en el muestreo espacial del patrón de speckle. Específicamente, el tamaño del speckle en relación con el tamaño de píxel que se tiene debe ser considerado (referencia), así como el número de píxeles que se utilizan en la ventana deslizante.

El tamaño del speckle en relación con el tamaño del píxel está determinado totalmente por la apertura del sistema de imagen utilizado (por ejemplo un detector CCD). Si los speckles son más pequeños que los píxeles, ocurrirán algunos promedios y la técnica será menos eficaz. Si los speckles son más grandes que los píxeles (como se ilustra en la Fig.2.6. 1a)), solamente unos cuantos speckles serán muestreados por la ventana deslizante y las estadísticas serán poco confiables [13].

La elección del número de píxeles sobre los cuales se va a calcular el contraste de speckle es muy importante: muy pocos píxeles y las estadísticas se verán comprometidas, demasiados píxeles y la resolución espacial será degradada. En la práctica, se emplea un cuadrado de  $7 \times 7$  o  $5 \times 5$  píxeles. Generalmente se elige un cuadrado con lados que tengan un número impar de píxeles para que el contraste calculado en la ventana deslizante sea simétrica y pueda ser asignado al píxel central [18].

En la Fig.2.6. 1b) se muestra un esquema de la forma en que es calculado el contraste de speckle. El contraste en el píxel  $(i, j)$  (gris oscuro) se determina mediante el cálculo

de la relación de la desviación estándar de los píxeles, en el área de píxeles de color gris pálido de  $n \times n$  por el valor medio de los píxeles en esta área [14].

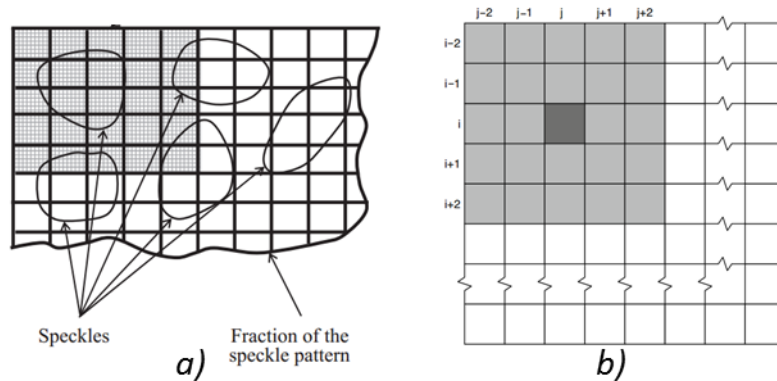


Fig.2.6. 1 a) tamaño de speckle mal promediados en una ventana b) Esquema del cálculo del contraste de speckle mediante una ventana deslizante

## 2.7 PCA aplicado al análisis de imágenes

PCA tiene sus fundamentos matemáticos en la teoría de espacios vectoriales y a tenido un gran número de aplicaciones en distintas áreas del conocimiento, en particular en el procesamiento de señales, al descomponer una señal como la combinación de señales elementales, generalmente más simples. Es posible representar una señal en término de sus componentes elementales, Existen infinitas maneras de descomponer una señal como combinación lineal de componentes elementales sean ortogonales o no. PCA forma una base ortogonal, contando con propiedades muy útiles ver Anexo 1.

En particular nos enfocaremos a la técnica PCA aplicada al procesamiento de imágenes, un resumen del método se muestra en la Fig.2.7. 1.

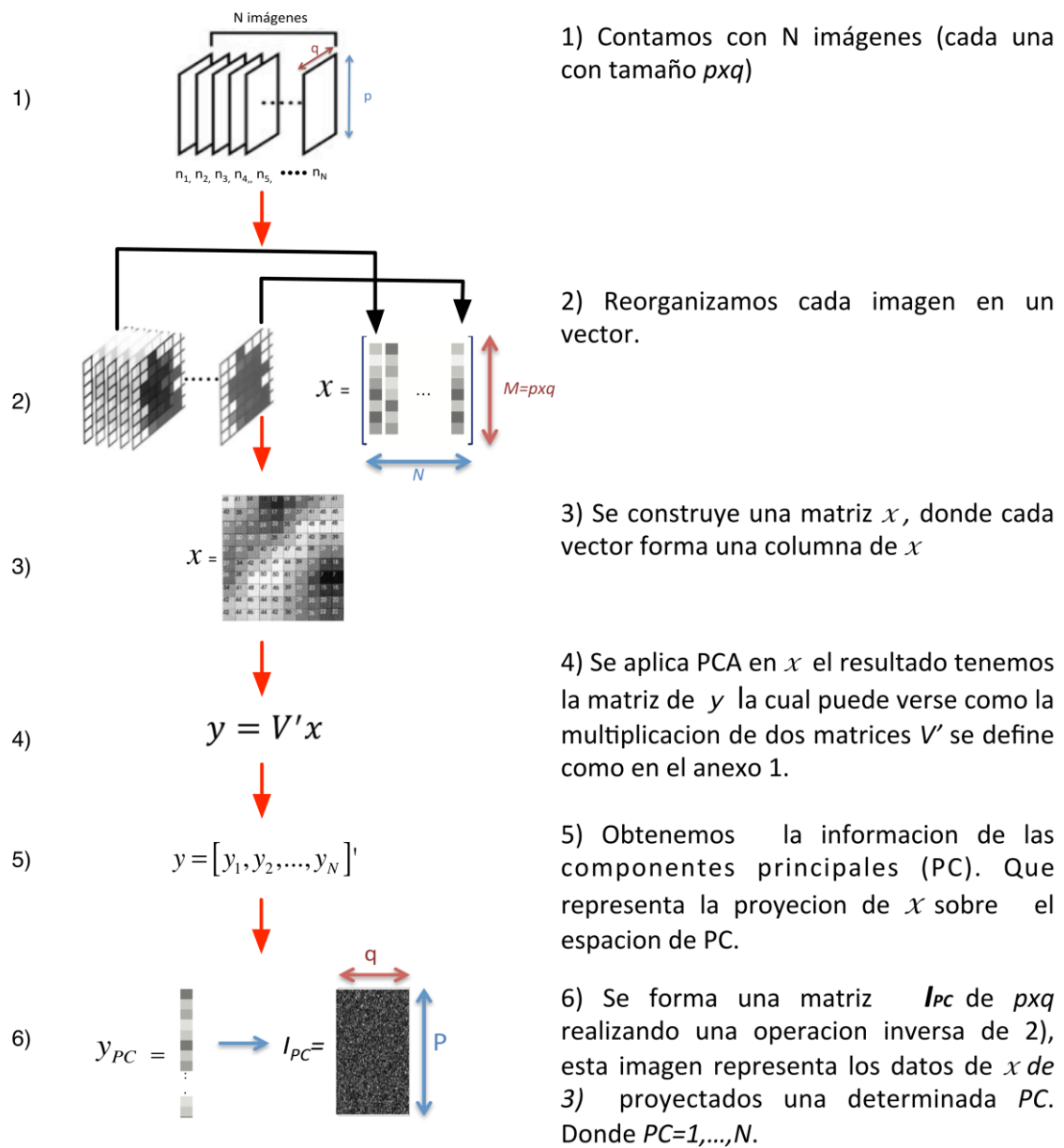
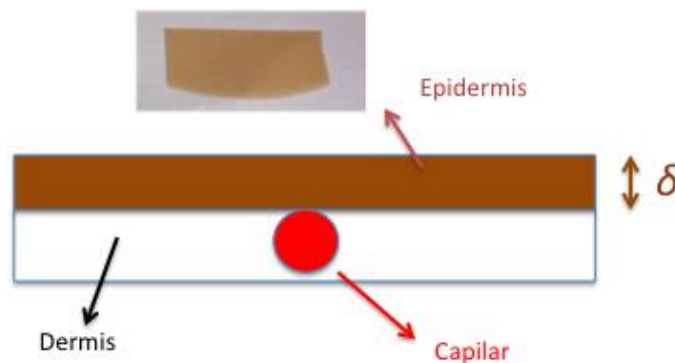


Fig.2.7. 1 Método PCA aplicado al análisis de imágenes

## Capítulo 3: Metodología y arreglo experimental.

### 3.1 Maniquí de piel

El maniquí de piel consiste de dos partes: la dermis y epidermis como se muestra en la *Fig. 3.1. 1* Para la dermis se usa una resina transparente con la concentración adecuada de  $\text{TiO}_2$  (Dióxido de Titanio, 1.45 mg/mL) [19] que simula las propiedades de esparcimiento de la dermis humana ( $1 \text{ mm}^{-1}$ ).



*Fig. 3.1. 1* Maniquí de piel con epidermis de  $\delta \mu\text{m}$

Antes de que la resina solidifique, se incrustó un capilar de vidrio con un diámetro interno de  $550 \mu\text{m}$  cercano a la superficie. En el capilar se hace circular una mezcla de intralipido al 1% en agua como suplente de la sangre, este es inyectado por una jeringa y una bomba de infusión (PUMP-NE500) que nos permite controlar la velocidad de inyección del líquido que circula por el capilar. El maniquí de epidermis se fabricó con una mezcla de PDMS (Polidimetilsiloxano),  $\text{TiO}_2$  (2 mg/mL) y café (10 mg/mL) para simular el coeficiente de absorción. Este último maniquí se fabricó con diferentes espesores ( $\delta = 0,190, 510$  y  $1000 \mu\text{m}$ ), que al colocar sobre la dermis ver *Fig. 3.1. 1*, simulan diferentes profundidades del vaso sanguíneo.

### 3.2 Arreglo experimental óptico

El arreglo experimental *Fig. 3.2. 1* es constituido por un láser He-Ne (632.8nm), que incide sobre un difusor que ilumina la superficie del maniquí de piel de manera homogénea, una cámara CCD (Retiga 2000R) equipada con una lente zoom (NATIVAR 700) es enfocada sobre la superficie del maniquí. Sobre la lente se coloca un polarizador lineal cruzado con la polarización del He-Ne para evitar la reflexión especular proveniente de la superficie de la muestra, esta reflexión se evita porque no aporta información de los vasos profundos. Antes de capturar las imágenes se verifica que el capilar se encuentre en foco, para esto se utiliza luz blanca y la apertura de la lente totalmente abierta de tal forma que nos permita visualizar de manera precisa el capilar a través de la cámara, porque al medir la intensidad, si la imagen no se encuentra en foco el contraste es alterado. Finalmente la cámara es conectada a una computadora para capturar las imágenes de speckle. Se utilizaron diferentes tiempos de exposición ( $T$ ) entre  $66 \mu\text{s}$  y  $40000 \mu\text{s}$ .

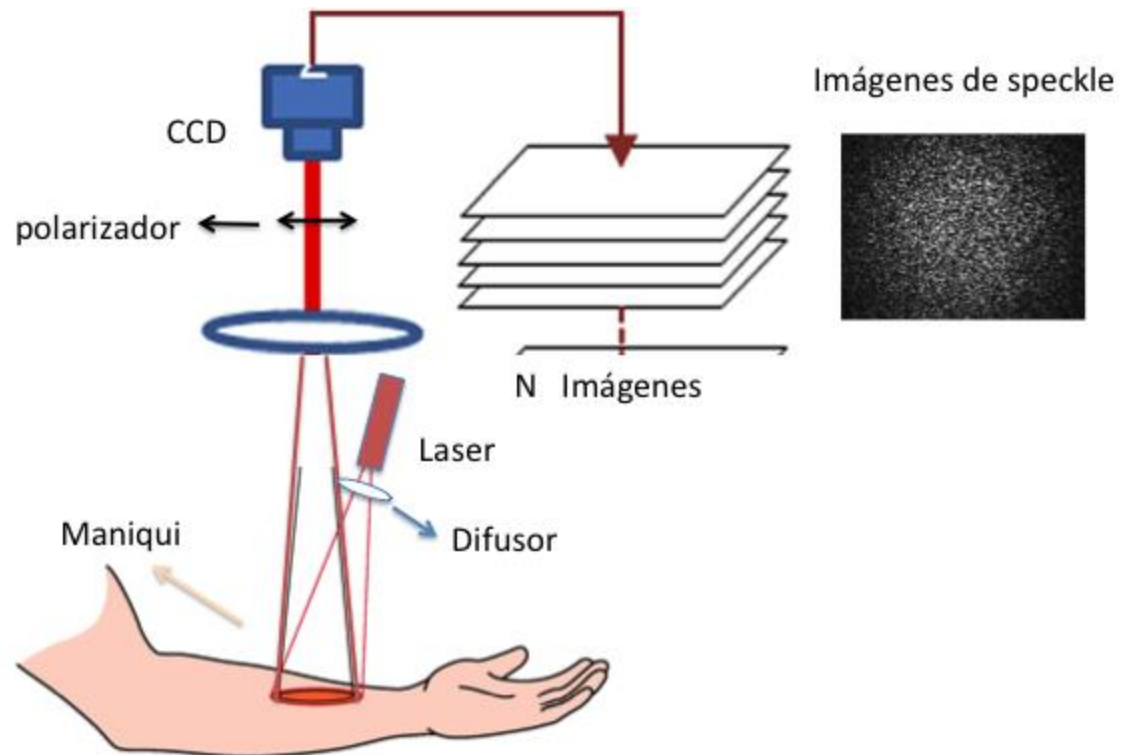


Fig. 3.2. 1 Esquema experimental.

### 3.3 Análisis *in-vitro* e *in-vivo*

Adicionalmente se presentan datos analizados *in-vitro* e *in-vivo* (estos datos fueron obtenidos en el Beckman Laser Institute & Medical Clinic University of California Irvine), en el caso *in vitro* se utilizó un sistema de micro-canales con forma de gusano ver Fig. 3.3. 1 con un  $\delta=400 \mu\text{m}$ , circulando sangre porcina con velocidad de flujo de  $4 \text{ mm} / \text{s}$  y  $T= 14 \text{ ms}$  Fig. 3.3. 1. La fuente de iluminación fue un láser de He-Ne con longitud de onda de  $633 \text{ nm}$ .



Fig. 3.3. 1 micro-canal en forma de gusano

En el caso *in-vivo*. Se utilizó un modelo dorsal de ratón como nuestro sustrato de ensayo. Se realizó una preparación quirúrgica en la que se suspende la piel entre unas pinzas con marcos de titanio Fig. 3.3. 2.



Fig. 3.3. 2 Ventana sobre el dorso de un roedor que muestra la red de capilares en el experimento in-vivo.

La red microvascular es fácilmente visible desde el lado de la subdermis; en la epidermis la red microvascular no es visible Fig. 3.3. 3 . La configuración para iluminar la parte de la epidermis es denominada epi-iluminación. Como fuente luz se utilizó un diodo laser de 808 nm (Ondax, Monrovia, California, USA), las imágenes fueron tomadas a 100fps y  $T= 9\text{ms}$ . El sistema de adquisición de imágenes se muestra en la Fig. 3.3. 3.

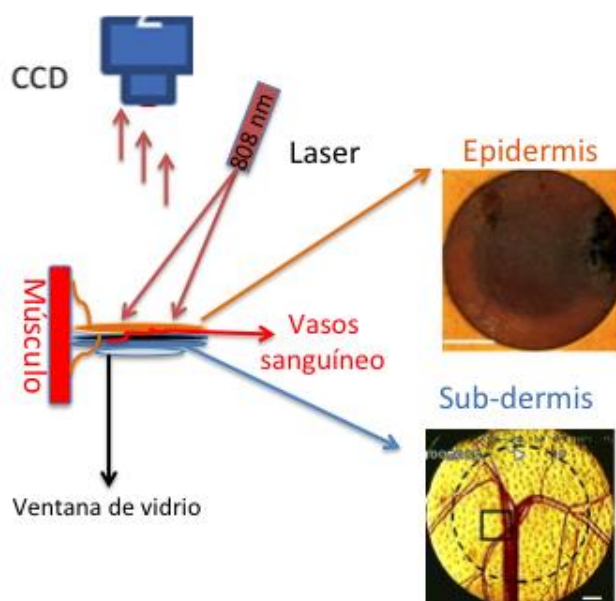


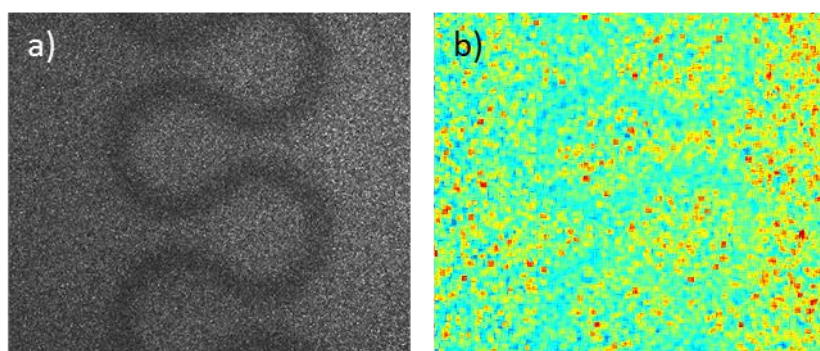
Fig. 3.3. 3 sistema de epi-iluminación, observando la parte de la epidermis y sub-dermis.

## Capítulo 4: Análisis de resultados experimentales para la visualización de vasos profundos

En este capítulo se describe y se muestran los resultados de nuestra propuesta de análisis de imágenes de speckle para la visualización de vasos sanguíneos profundos, la cual consiste en una combinación de LSCI y PCA (LSCI+PCA). Los resultados obtenidos se comparan con LSCI.

### 4.1 Procesamiento de las imágenes de speckle con LSCI: Análisis Espacial

Las *Fig. 4.1. 1a* muestran una imagen típicas de speckle obtenida directamente de la CCD, para una epidermis con grosor  $\delta=400 \mu\text{m}$ , la imagen *Fig. 4.1. 1 b)* es la imagen correspondiente de contraste utilizando el algoritmo espacial descrito en la sección 2.6 para una ventana deslizante de  $5 \times 5$  píxeles, una velocidad de flujo de  $V= 4 \text{ mm/sec}$  y un tiempo de exposición  $T=14 \text{ ms}$ . Para minimizar el ruido generado por la ventana deslizante al obtener los valores de contraste sobre el micro-canal, se promediaron 29 imágenes de contraste. De estas imágenes podemos notar que para *Fig. 4.1. 1 a)*, el vaso sanguíneo se observa a simple vista, es decir, es posible identificar los bordes del vaso, no así para su imagen en contraste *Fig. 4.1. 1 b)*, donde los bordes se han perdido.



*Fig. 4.1. 1 a) imagen de speckle en intensidad b) imagen de contraste correspondiente a la imagen en a).*

En un capilar recto se realizó el análisis como en el caso anterior, en el cual sobre la imagen resultante promedio se definió una región de interés (RI) de  $10 \times 100$  píxeles sobre la región central del vaso (rectángulo negro *Fig. 4.1. 2*), se calculó el valor promedio del contraste sobre la RI y el valor resultante es el contraste asignado para esos valores de  $\delta$ ,  $T$  y  $V$ , los valores de contraste espacial reportados en las gráficas subsecuentes corresponden a este valor promedio.

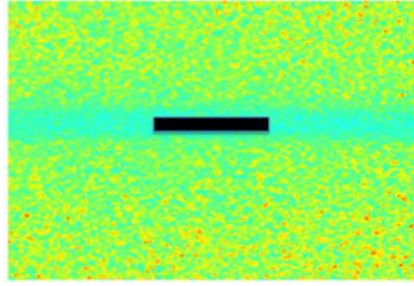


Fig. 4.1. 2 RI sobre la imagen de contraste promedio

#### 4.2 Resultados del análisis de contraste de las imágenes de speckle con LSCI

La metodología explicada en la sección anterior para medir el contraste, se aplicó para el análisis de imágenes de speckle adquiridas con el arreglo experimental mencionado en el Capítulo 3 ver Fig. 3.2. 1. Los tiempos de exposición van de los  $T= 0.06$  hasta  $T= 40$  ms para cuatro diferentes valores del grosor de la epidermis ( $\delta=0, 190, 510$  y  $1000$   $\mu\text{m}$ ). En la Figura 4.3a los símbolos representan el contraste experimental para los diferentes valores de  $\delta$ , y las líneas continuas corresponden al análisis de regresión de los datos experimentales con la (2.4. 15)

$$K(T, \tau_{co}) = \left\{ \beta \rho^2 \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta \rho(1 - \rho) \frac{e^{-x} - 1 + x}{x^2} + \beta(1 - \rho)^2 \right\}^{1/2} \quad (2.4. 15)$$

Cuando  $T \gg \tau_c$ , es decir, cuando  $x \gg 1$ , la (2.4. 15) se reduce a:

$$K_S = K(T, \tau_{co})|_{x \gg 1} = \beta^{1/2}(1 - \rho) \quad (4.2. 1)$$

Dado que  $(1-\rho)$  es la fracción de “luz estática” integrada por la CCD,  $K_S$  representa la contribución del speckle estático al contraste total ( $K$ ).



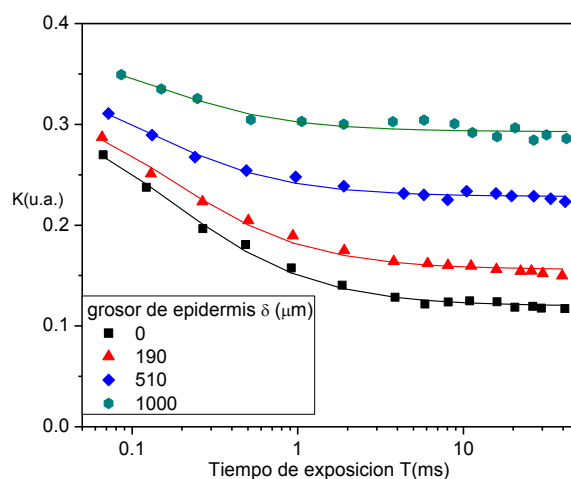


Fig. 4.2. 1  $K$  como función de  $T$  para diferentes valores de  $\rho$ . Los símbolos representan datos experimentales y las líneas continuas son los análisis de regresión a la (2.4. 15). En todos los casos la velocidad  $V=5\text{mm/sec}$ .

De la Fig. 4.2. 1, podemos observar que para un valor de  $\delta$  específico, a medida que el tiempo de exposición crece, el contraste espacial decae, este comportamiento es esperado, ya que a mayor tiempo de exposición mayor es el número de patrones de speckle que se superponen incoherentemente sobre la CCD, lo cual se traduce en un mayor difuminado y por lo tanto en una pérdida de contraste. Para valores suficientemente grandes de  $T$  ( $> 5$  ms) el contraste espacial prácticamente alcanza un valor asintótico. Sin embargo, si nos fijamos en un tiempo  $T$  determinado, podemos observar que aun cuando la velocidad es constante, el valor del contraste cambia al cambiar el espesor de la epidermis ( $\delta$ ), lo cual es inaceptable, dado que la velocidad estimada según la teoría de LSI está dada por  $V \propto 1/(TK^2)$  (ver (2.4. 17)), es decir los datos de la Figura 4.3a, siguieren que el contraste espacial predice diferentes velocidades en el vaso sanguíneo solo por estar a diferentes profundidades, cuando en realidad la velocidad es constante en todas las tres curvas. Regresaremos a este punto en la siguiente sección cuando comparar estos resultados de esta sección (LSCI) con LSCI+PCA.

#### 4.3 Resultados del análisis de contraste de las imágenes de speckle con LSCI+PCA

La figura 4.4 se muestra un arreglo rectangular con las 29 imágenes de contraste correspondientes a las 29 componentes principales ( $PC_n$ , donde  $n \in [1,29]$ ) que se obtienen del algoritmo de PCA (LSCI+PCA), la imagen etiquetada con LSCI es la imagen de contraste promedio de las 29 imágenes de speckle procesada solo con LSCI y se incluye con fines de comparación.

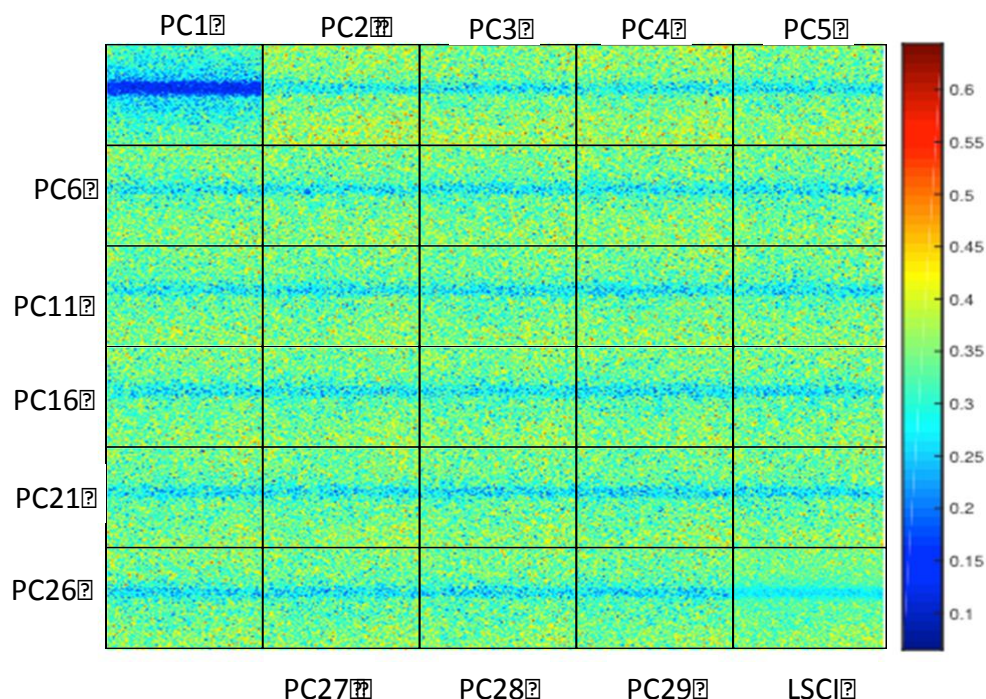


Fig. 4.3. 1 Imágenes de contraste correspondientes a las 29 componentes principales generadas por PCA (LSCI+PCA), LSCI es la imagen de contraste promedio de las 29 imágenes de speckle procesadas solo con LSCI.

De la Fig. 4.3. 1 podemos notar que es la primera componente de PCA (PC1) la que define mejor la forma del vaso, en comparación con las otras componentes de PCA y con la misma imagen de LSCI, notamos también que PC1 en general produce una imagen con valores de contraste menores a todas las demás, tanto dentro como fuera del vaso. Por esta razón los resultados que se muestran a continuación corresponden a PC1.

Si obtenemos el valor promedio del contraste dentro de una RI sobre el vaso como en la Fig. 4.1. 2 y lo graficamos como función de  $T$  para PC1, obtenemos los resultados mostrados en la Fig. 4.3. 2 En esta figura, podemos notar que para un valor dado de  $\rho$ , el contraste sobre el vaso para su correspondiente PC1 ( $K_{PC1}$ ) es prácticamente constante para un rango muy grande de valores de  $T$ , sin embargo  $K_{PC1}$  si es sensible a  $\rho$ , a mayor grosor de la epidermis, mayor es el contraste de PC1 ( $K_{PC1}$ ).

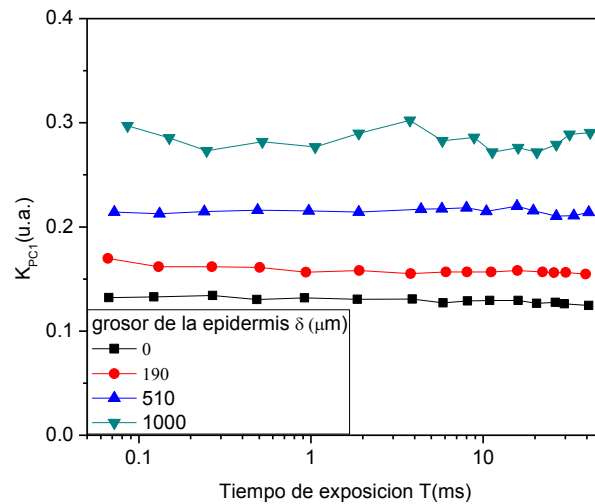


Fig. 4.3. 2 Contraste espacial promedio dentro de la RI ubicada sobre el vaso sanguíneo para PC1 como función del tiempo de exposición, mientras  $K_{PC1}$  es prácticamente constante para diferentes valores de  $T$ , es sensible a diferentes valores de  $\rho$ .

En la Fig. 4.3. 3 , graficamos  $K_s$  de (4.2. 1) obtenida a partir del análisis de regresión de la sección anterior y el valor promedio ( $K_{PC1-prom}$ ) de  $K_{pc1}$  para los diferentes valores de  $\rho$ , es importante resaltar que ambos conjuntos de datos coinciden, es decir, la componente estática del contraste de una imagen de speckle, coincide con el contraste de PC1, lo cual sugiere que PC1 extrae la componente estática del patrón de speckle.

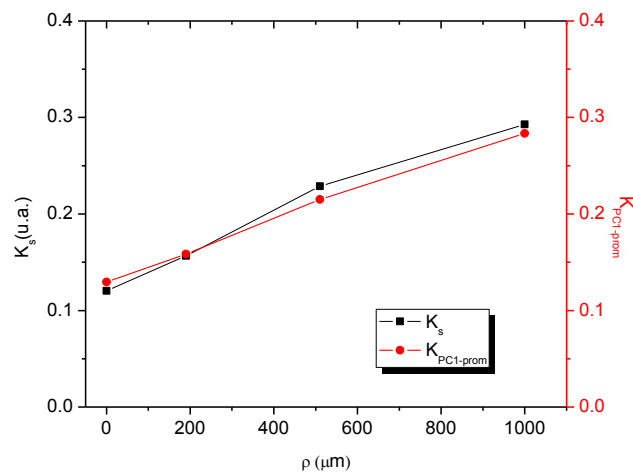


Fig. 4.3. 3  $K_s$  y  $K_{PC1-prom}$  coinciden para los diferentes valores de  $\rho$ , lo cual sugiere que PC1 extrae la componente estática del patrón de speckle.

A partir, de este último resultado, si restamos el contraste promedio de PC1 ( $K_{PC1-prom}$ ) a los resultados de la Fig. 4.2. 1 , deberíamos de obtener la componente dinámica de  $K$ , estos resultados se observan en la Fig. 4.3. 3. A partir de esta figura, podemos notar que la componente dinámica ( $K - K_{PC1-prom}$ ) de  $K$  es similar para los diferentes valores de  $\rho$ ,

particularmente a tiempos de exposición mayores de 1 ms, recordemos que en aplicaciones in-vivo de LSCI normalmente se utilizan tiempo de exposición entre 1 y 20 ms.

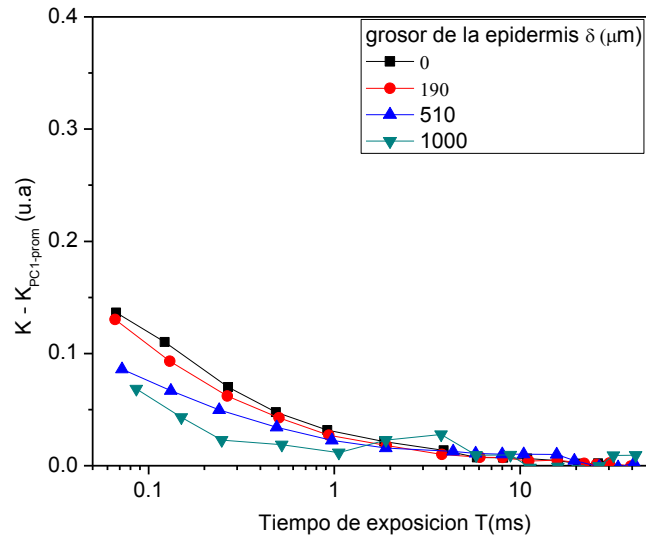


Fig. 4.3. 4 Componente dinámica de  $K$  como función de  $T$  para los diferentes valores de  $\rho$ , a diferencia de los datos en la Figura 4.2.1, la componente dinámica es menos sensible a  $\rho$ , particularmente a  $T \geq 1$  ms.

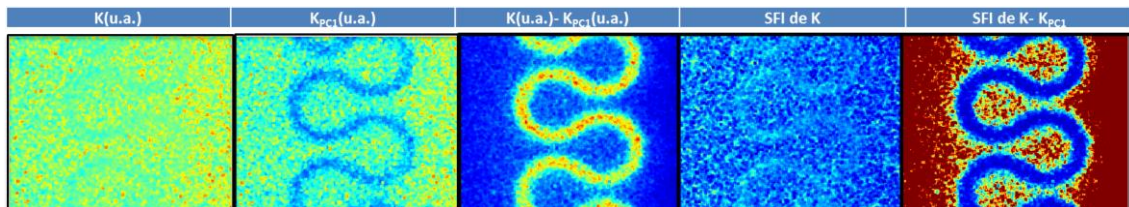
$\rho(\mu\text{m})$	$K(\text{u.a.})$	$K_{PC1}(\text{u.a.})$	$K(\text{u.a.}) - K_{PC1}(\text{u.a.})$	SFI de $K$	SFI de $K - K_{PC1}$
0					
190					
510					
1000					

Fig. 4.3. 5 comparación entre el método LSCI y LSCI+PCA.

En la Fig. 4.3. 5 se muestra la comparación entre los métodos LSCI y LSCI+PCA, para dos descriptores  $K$  y SFI junto con las diferencias. En el que cabe mencionar las columnas

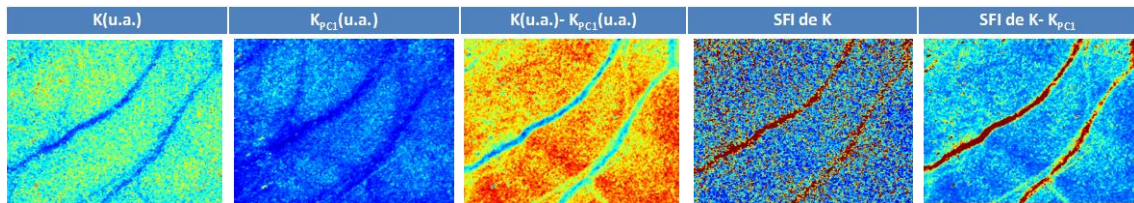
de  $K(u.a.)$  y  $K_{PC1}(u.a.)$  se encuentran en la misma escala, no es el caso de las demás columnas debido a que sus magnitudes son muy distintas, en los descriptores se muestra claramente cómo se tiene una mejora en la visualización del vaso para el caso de las diferencias.

Para el caso in-vitro contamos con el micro-canal en forma de gusano *Fig. 3.3. 1*, utilizando los mismos descriptores, que en el caso de la *Fig. 4.3. 5*. Se tiene como resultado la *Fig. 4.3. 6* .



*Fig. 4.3. 7 se muestra la comparación entre los métodos LSCI y LSCI+PCA para el micro canal en forma de gusano.*

En el caso in-vivo se tiene se presenta en la *Fig. 4.3. 8*. Utilizando los mismos descriptores, que en el caso de la *Fig. 4.3. 5*. Donde se puede estacar una mejora considerable para el caso de SFI de  $K-K_{PC1}$ .



*Fig. 4.3. 9 comparación entre los métodos LSCI y LSCI+PCA para en caso in-vivo, donde para el caso LSCI se tomo solo una imagen*

## Capítulo 5: Conclusiones

El Contraste es sensible a la profundidad del vaso ( $\delta$ ), lo cual para nuestro propósito de visualización es una limitante, debido a que para valores de  $\delta > 500 \mu m$  está es muy pobre como se observó en los resultados experimentales. Para PC1 se observa que la zona del vaso es resaltada, una primera hipótesis es que la PC1 pose información relevante para poder discriminar la zona del vaso y la del fondo.

El contraste de PC1 sobre RI muestra un comportamiento prácticamente constante como función del tiempo para un valor determinado de  $\delta$ . Se mostró que PC1 y  $K_s$  (componente estática del contraste) son muy similares, esto nos lleva a plantear la hipótesis de que PC1 corresponde a  $K_s$ .

Proponemos extraer  $K_{pc1-prom}$  de  $K$ , la imagen resultante presenta una mejor visualización comparada con  $K$ .

La imagen de SFI de  $(K_{pc1-prom} - K)$  muestran una mejora en la visualización, para la zona donde se presenta flujo, se puede concluir que la resta sirve como un filtro de la parte estática. Finalmente la mejora en visualización se mostró tanto *in-vitro* como *in-vivo*.

## Trabajo a futuro

Proponemos analizar LSCI+PCA para las componentes principales de orden superior o conjunto de ellas en términos de su eficacia para mejorar la visualización de vasos sanguíneos profundos.

Probar la eficiencia para el número de imágenes que se toman en LSCI+PCA.

Estudiar la eficacia de LSCI+PCA como función del tiempo de exposición.

## Anexo 1: Análisis de Componentes Principales PCA (o KLT)

### *Análisis de Componentes Principales PCA (o KLT)*

El Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis - PCA) es una herramienta matemática muy conocida, con aplicaciones en diversas áreas de la ciencia. Esta técnica de análisis estadístico de datos multidimensionales, fue introducida originalmente por Pearson en 1901 en un contexto biológico [20], y desarrollada posteriormente por Hotelling en trabajos de psicometría [21]. La técnica PCA es también conocida como la transformación de Karhunen-Loève (Karhunen-Loève Transformation-KLT) debido a que fue desarrollada de manera independiente por Karhunen [22] y generalizada posteriormente por Loève [23]

La KLT o PCA juega un rol fundamental en las técnicas modernas de procesamiento de señales, con aplicaciones a la compresión de datos [24], al reconocimiento de patrones en imágenes [25], a la fusión de imágenes satelitales [26], etc. También es utilizada en algoritmos de redes neuronales [27].

A continuación se introduce una definición formal de la KLT [28]:

Análisis de Componentes Principales (PCA): Dado un vector aleatorio  $x = [x_1, x_2, \dots, x_N]'$ , se define la PCA como la transformación lineal de  $x$ .

$$y = V'x$$

Donde  $y = [y_1, y_2, \dots, y_N]'$  es el vector transformado, y la matriz  $V = [V_1, V_2, \dots, V_N]'$  se forma colocando en las columnas los  $N$  autovectores normalizados de la matriz de covarianzas  $C_{xx} = E[(x - \bar{x})(x - \bar{x})']$ , ordenados por orden decreciente de sus autovalores  $\lambda_1 \geq \lambda_2, \dots, \geq \lambda_N$ .

Existe una serie de propiedades muy importantes de la KLT que se resumen a continuación, cuyas demostraciones pueden encontrarse en la literatura [28] pero que, dada su importancia, se incluyen algunas a continuación:

Propiedad I: Las variables aleatorias transformadas  $y_1, y_2, \dots, y_N$  son no-correlacionadas, es decir, poseen covarianzas nulas

$$C_{yy} = E[(y - \bar{y})(y - \bar{y})'] = 0$$

Propiedad II: Las variables  $y_1, y_2, \dots, y_N$  corresponden a proyecciones de las variables originales en las direcciones de máxima (o mínima) varianza. Es decir, de todas las posibles proyecciones  $y = V'x$ , la varianza de  $y$  resulta máxima (o mínima) si se elige la dirección dada por los autovectores de la matriz de covarianzas, por ejemplo al tomar  $V_i$ , con  $i = 1, \dots, N$ , las varianzas de las variables  $y_1, y_2, \dots, y_N$  están dadas por los autovalores  $i$  asociados a los autovectores  $V_i$ .



Propiedad III: Dado un vector cualquiera  $x_0$ , la aproximación de orden  $p$  dada por el desarrollo en la base ortonormal definida por los  $p$  autovectores de  $C_{xx}$  más relevantes, está dada por.

$$\hat{x}_0 = \bar{x} + \sum_{i=1}^p c_i V_i$$

Con  $c_i = (x_0 - \bar{x})' V_i$  es una representación óptima en el sentido que minimiza el error cuadrático medio.

## Anexo 2: Código en matlab

### Código en matlab

```

clear,clc,close all

%Este programa principal en donde dividimos por partes los procesos a
%realizar
%colocamos la direccion, nombre y extecion del archivo de imagenes de
%Speckle Dinamic
name= 'T10_105ms_8mms_L900um_HeNe_34FPS.tif';
%-----
-

%Se manda a llamar la funcion aC_image que se encarga de guardar la
%informacion de nuestro parametros de interes.
[mImage nImage FileTif] = aC_image(name);

%Se crea una matriz de ceros con las dimensiones de nuestro interes ey
%especificando que sea de 8 bits.
FinalImage=zeros(nImage,mImage,'uint8');

%-----
-

%Se espesifica el numero de imagenes a analizar.
iniCoun = 1;
finalCoun = 30;

%-----
-

% Definir la zona de la imagenes que nos interese.
x_inicial=1;
x_final=mImage;
y_inicial=1;
y_final=nImage;

%-----
-

% llamamos a la funcion Array_PCA que se encarda de ralizar PCA
[fImage,matriz_datos,original] =
Array_PCA(iniCoun,finalCoun,FileTif,x_inicial,...
        x_final,y_inicial,y_final);

```

```
%-----  
-  
%%  
% Monitoreo del contraste de zonas de interes en nuestro caso son  
cuatro.  
% Zona 1  
lado1_xin=308;  
lado1_xfi=328;  
lado1_yin=50;  
lado1_yfi=59;  
%-----  
-  
% Zona 2  
lado2_xin=68;  
lado2_xfi=88;  
lado2_yin=53;  
lado2_yfi=62;  
%-----  
-  
% Zona 3  
lado3_xin=265;  
lado3_xfi=285;  
lado3_yin=198;  
lado3_yfi=207;  
%-----  
-  
% Zona 4  
lado4_xin=60;  
lado4_xfi=80;  
lado4_yin=269;  
lado4_yfi=278;  
%-----  
-----  
% indice que determina el total de imagenes de nuestro interes  
ims = finalCoun-iniCoun;  
%-----  
-
```

```

% Aplicacion del algoritmo espacial Algo_spa a las PC para obtener el
% contraste de las PC y las zonas de interes.

[contraste,contrasteI,contrasteI2,contrasteI3,contrasteI4,Matriz_contr
] = ...

    Algo_spa(original,lado1_xin,lado1_xfi...
        ,lado1_yin,lado1_yfi,lado2_xin,lado2_xfi,lado2_yin,lado2_yfi...
        ,lado3_xin,lado3_xfi,lado3_yin,lado3_yfi,lado4_xin,lado4_xfi,lado4_yin
        ,...lado4_yfi,ims);

%-----

Funciones

%-----

function [mImage nImage FileTif] = aC_image(FileTif)
%aC_image: adquiere la imagen y su unformacion
% Donde la entradas son el nombre del archivo y su ruta
% Devolviendo la informacion de la imagen
FileTif=FileTif;
InfoImage=iminfo(FileTif);%read the image info
mImage=InfoImage(1).Width;
nImage=InfoImage(1).Height;
end

%-----

function [fImage,initPCAImage,original] =
Array_PCA(iniCoun,finalCoun,FileTif,x_inicial,x_final,y_inicial,y_fina
l)
%Array_PCA:obtiene un arreglo con la informacion regerias para el PCA
% Dando la imagen inicial y la final, y el nombre del archivo.
initPCAImage = [];
imCount = 1;
iniCount = iniCoun;
finalCount = finalCoun;
ims = finalCount-iniCount;
for i=iniCount:finalCount
    FinalImage=imread(FileTif,'Index',i);
    newImage=FinalImage(y_inicial:y_final,x_inicial:x_final
[ nImage mImage]=size(newImage);
    original(:, :, imCount)=newImage;

```

```

        initPCAImage(:,imCount)= reshape(newImage,nImage*mImage,1);
imCount=imCount+1;
end
meanImage = mean(initPCAImage',1);
shiftedImages = initPCAImage-repmat(meanImage',1,ims+1);

[eVector,score,eValues] = princomp(initPCAImage);
imCount = 1;
for i =1:finalCount-iniCount
finalData = (eVector(:,i) '*shiftedImages')+meanImage;
fImage(:, :, imCount) = reshape(finalData,nImage,mImage);
imCount = imCount + 1;
end
end
%-----
function
[contraste,contrasteI,contrasteI2,contrasteI3,contrasteI4,Matriz_contr
] = Algo_spa(fImage,lado1_xin,lado1_xfi...
, lado1_yin,lado1_yfi,lado2_xin,lado2_xfi,lado2_yin,lado2_yfi...
,lado3_xin,lado3_xfi,lado3_yin,lado3_yfi,lado4_xin,lado4_xfi,lado4_yin
,lado4_yfi,ims)
%Algo_spa: Extrae el contraste de las PC y los promedios de la zonas
de %interes
w=5; %tamano de ventana v X v
for s = 1:ims
m=spkcnt(fImage(:, :, s),w);
for i=1:3
m(1, :)=[];
m(:, 1)=[];
tam=size(m);
m(tam(1), :)=[];
m(:, tam(2))=[];
end
c1 = m > 1;
c2 = not(c1);

```

```
cf = m.*c2 + c1;
c1=cf < 0.01;
c2=not(c1);
contraste=cf.*c2+0.01*c1;
SFI=1./(T*(contraste.^2));
Matriz_contr(:, :, s)=contraste;
Matriz_contr_original(:, :, s)=contraste;
contrasteI(1, s)=
mean(mean(contraste(lado1_yin:lado1_yfi, lado1_xin:lado1_xfi)));
contrasteI2(1, s) =
mean(mean(contraste(lado2_yin:lado2_yfi, lado2_xin:lado2_xfi)));
contrasteI3(1, s) =
mean(mean(contraste(lado3_yin:lado3_yfi, lado3_xin:lado3_xfi)));
contrasteI4(1, s) =
mean(mean(contraste(lado4_yin:lado4_yfi, lado4_xin:lado4_xfi)));
end
end
```

## Referencias

- [1] g. R. E. T. Enrico pellegini, Blood vessel segmentation and width estimation in ultra-wide field scanning laser ophthalmoscopy, Vol.5, Biomedical Optics Express, 2014.
- [2] J. DAVIDBRIERS, «Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow,» *Optica Applicata*, vol. XXXVII, No. 1–2, 2007.
- [3] R. B. a. R. Nossal, Model for laser doppler measurements of blood flow in tissue, *Appl. Opt.*, 1981.
- [4] J. L. B. J. T. Son, Contrast Enhancement of Laser Speckle Contrast Image in Deep Vasculature by Reduction of Tissue Scattering, vol. 17, *Journal of the Optical Society of Korea*, 2013, pp. 86-90.
- [5] J. O. B. C. J. Kim, Magnetomotive laser speckle imaging,» *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, 2009.
- [6] S. Prahl, Determination of optical properties of turbid media using pulsed photothermal radiometry, vol. Vol. 37, *Phy. Med. Biol.*, 1991, pp. 1203-1217.
- [7] J. C. R. a. B. c. Caitlin Regan, Photothermal laser speckle imaging, Vol. 39, *Optics Letters*, 2014.
- [8] J. C. Dainty, *Laser Speckle and Related Topics*, Springer-Verlag, 1984.
- [9] Y. A. a. T. Asakura, Bio-speckle phenomena and their applications to the evaluation of blood flow, *Optical Laser Technologies*, 1991.
- [10] H. J. R. a. R. A. B. Jr., «Dynamic Laser Speckle and Applications,» pp. 181-220, 2009.
- [11] B. j. Berne, «dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics,» pp. 11-16.
- [12] D. D. Nolte, «Optical Interferometry for Biology and Medicine,» pp. 96-98, 2012.
- [13] B. JD, Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow, vol. *Opt Appl XXXVII*, 2007, p. 139–152..
- [14] \*. D. D. a. E. M. W.-G. Sean J. Kirkpatrick, «Detrimental effects of speckle-pixel size matching,» *OPTICS LETTERS*, Vol. 33, No. 24, 15 December 2008.
- [15] A. G. R. Bandyopadhyay, Speckle-visibility spectroscopy: A tool to study time-varying dynamics, *Rev. Sci. Instrum*, 2005, p. 093110 .
- [16] W. J. T. A. G. X. Z. a. A. K. D. A. B. Parthasarathy, Robust flow measurement with multi-exposure speckle imaging, vol. 16, *Opt. Express*, 2008, p. 1975–1989.

- [17] B. D. A. a, Laser speckle contrast imaging in biomedical., vol. Opt. 15, optics J. Biomed., 2010, p. 011109.
- [18] M. Draijer, Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion, vol. Vol.24, Lasers Med. Sci, 2009, p. 639–651.
- [19] R. B. S. C. K. K. Au., «Multi-layer silicone phantoms for the evaluation of quantitative optical techniques in skin imaging».
- [20] P. K, «On lines and planes of closest fit to systems of points in space,» *Philosophical Magazine*, pp. 559-572, 1901.
- [21] H. H, «Analysis of a complex of statistical variables into principal,» *Journal of Educational Psychology*, pp. 417-441, 1933.
- [22] K. K, «Uber lineare methoden in der Wahrscheilichkeitsrechnung,» *Mathematica-Physica*, pp. 3-79, 1947.
- [23] L. M., «Probability Theory,» 1963.
- [24] V. M. D. V. R. A. D. I. Donoho D. L., «Data Compression and Harmonic Analysis,» *IEEE Trans. on Inform. Theory*, pp. 2435-2476 , 1998.
- [25] P. A. Moghaddam B., «Probabilistic Visual Learning for Object Representation,» *IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, pp. 696-710 , 1997.
- [26] S. J. S. C. A. J. A. Chavez P. S., «Comparison of three diſerent methods to merge multiresolution and multispectral data: Landsat TM and SPOT panchromatic,» *Eng. Remote Sens.*, pp. 259-303, 1991.
- [27] A. S. I., «Neural theory of association and concept formation,» *Biological Cybernetics*, pp. 175-185, 1977.
- [28] A. S. I. Cichocki A., «Adaptive Blind Signal and Image Processing: Learning Algorithms and Applications,» *J. Wiley & Sons*, 2002.