



**INAOE**

**Análisis multivariante de imágenes de speckle para visualización de vasos sanguíneos**

Por

**M.C. José Ángel Arias Cruz**

Tesis sometida como requisito parcial para obtener el grado de

**Doctor en ciencias en la especialidad en óptica**

en el

**INSTITUTO NACIONAL DE ASTROFÍSICA,  
OPTICA Y ELECTRÓNICA.**

Agosto 2019  
Tonantzintla, Puebla  
Supervisada por:

**Dr. Julio Cesar Ramírez San Juan  
Dr. Roger Chiu Zárate**

**© INAOE 2019**

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.





# *Dedicatoria*

*A mis padres Arturo y Gloria, que constantemente me apoyaron y siguen haciéndolo, ellos son mi permanente inspiración por lo cual, este trabajo les va dedicado, sin duda alguna valoro el esfuerzo que ellos han puesto en mi formación académica y humana.*

# *Agradecimientos*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado.*

*A mis asesores, el Dr. Julio Cesar Ramírez San Juan y Roger Chiu Zarate, por compartir su tiempo y conocimiento para realizar este trabajo.*

*A mis sinodal los doctores Francisco Javier Renero Carrillo, Rubén Ramos García, Hayde Peregrina Barreto, Gabriel Martínez Niconoff y Alina Santillán Guzmán por ayudar en la mejora de este trabajo y fungir como sinodales en mi examen doctoral.*

*A mi familia por toda su comprensión y paciencia.*

*A mis amigos y colegas que emprendimos este camino.*

## *Resumen*

Laser speckle contrast imaging (LSCI) es una técnica óptica económica y no invasiva que permite monitorear la dinámica de un sistema, independientemente de la naturaleza que lo origine. Dependiendo del algoritmo utilizado, puede tener una buena resolución temporal y/o espacial. La mayoría de los sistemas LSCI, incluidos los dispositivos comerciales, pueden realizar una evaluación del objeto (normalmente altamente esparcidor) bajo estudio solo a nivel superficial, debido a las propiedades esparcidoras del medio, lo cual ocasiona una pérdida en la visibilidad de objetos profundos (algunos cientos de micras), que pudieran estar presentes en el medio, lo cual es una limitación importante de esta técnica. De igual forma hay varios factores que impiden la utilización de LSCI como técnica cuantitativa. Entre estos factores, se destaca el efecto de los esparcidores estáticos que rodean los objetos a visualizar, por ejemplo, vasos sanguíneos dentro de tejido biológico. El objetivo de este trabajo es el estudio, análisis e implementación de algoritmos de procesamiento de imágenes de speckle que nos permitan mejorar la visualización de vasos sanguíneos profundos. En particular el análisis de las correspondientes imágenes de speckle con Componentes principales.

Para lograr esto, se fabricaron maniquís de piel con vasos sanguíneos, los cuales nos permiten diferentes parámetros de la piel, tales como la profundidad de los vasos, diámetro y velocidad de flujo sanguíneo entre otros. Los modelos aquí presentados son de gran importancia en aplicaciones biomédicas, permitiendo colocar al método LSI como una herramienta de análisis atractiva en las investigaciones de este campo.

## *Abstract*

Laser speckle contrast imaging (LSCI) is an economical and non-invasive optical technique that allows monitoring the dynamics of a system, regardless of the nature that originates it. Depending on the algorithm used, it may have a good temporal and/or spatial resolution. Most LSCI systems, including commercial devices, can perform an evaluation of the object (usually highly spreader) under study only at the surface level, due to the spreading properties of the medium, which causes a loss in the visibility of deep objects (a few hundred microns), which may be present in the medium, which is an important limitation of this technique. Similarly, there are several factors that prevent the use of LSCI as a quantitative technique. Among these factors, the effect of static spreaders surrounding the objects to be visualized, for example, blood vessels within biological tissue, is highlighted. The objective of this work is the study, analysis, and implementation of speckle image processing algorithms that allow us to improve the visualization of deep blood vessels. In particular, the analysis of the corresponding speckle images with main components.

To achieve this, skin mannequins with blood vessels were manufactured, which allow us different skin parameters, such as the depth of the vessels, diameter, and blood flow rate among others. The models presented here are of great importance in biomedical applications, allowing us to place the LSI method as an attractive analysis tool in the investigations of this field.

# Contenido

Dedicatoria .....	I
Resumen.....	III
Contenido.....	V
1 Introducción .....	1
1.1 Estado del Arte en LSCI .....	3
1.2 Planteamiento del problema .....	5
1.3 Justificación.....	5
1.4 Hipótesis .....	6
1.5 Objetivos .....	6
2 Conceptos básicos .....	8
2.1.1 Interacción luz materia.....	8
2.1.2 Tejido biológico .....	9
2.1.3 Fenómeno de speckle.....	10
2.1.5 Formación de speckle.....	11
2.2 Análisis estadístico de speckle .....	12
2.3 Contraste.....	14
2.4 Teoría básica de Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) .....	15
2.5 Interpretación de contraste en función de la dinámica .....	21
2.6 Análisis de contraste espacial. ....	22
2.7 Análisis de contraste temporal .....	23
2.8 Método de diferencias generalizadas.....	24
2.9 Método Fujii.....	25
2.10 Método MHI.....	25
2.11 Método Multivariante PCA.....	27
2.12 Simulación del fenómeno speckle .....	30
2.13 Aplicación de PCA+LSCI en speckle simulado .....	33
3 Metodología y arreglo experimental. ....	36
3.1 Maniquí de piel .....	36
3.2 Arreglo experimental de un sistema de LSCI .....	36
3.3 Adquisición de los patrones de speckle.....	37
4 Análisis de resultados para la visualización de vasos profundos .....	38

4.1 Aplicación de métodos de visualización .....	38
4.2 PCA+LSCI .....	39
4.3 Análisis de curtosis.....	46
5 Conclusiones.....	48
6 Trabajo a futuro.....	49



# 1 Introducción

Este trabajo muestra un enfoque para superar una de las limitaciones de un sistema Laser speckle contrast imaging (LSCI), el cual nos puede dar información valiosa sobre el flujo sanguíneo en tejido biológico, tal como piel, retina o cerebro. Esto nos permite conocer alguna patología en algún órgano en particular que pueda comprometer la salud de dicho órgano y de la persona, por lo tanto, es de vital importancia desarrollar y mejorar métodos que están dirigidos a resolver estos problemas, mejorando así la calidad de vida.

A medida que se han modificados nuestros hábitos de vida ha aumentado la esperanza de vida, y en consecuencia las causas de muerte en todo el mundo están cambiando. Datos recopilados en muertes a nivel mundial, muestran un gran porcentaje de muertes debidas a problemas cardiovasculares (Roser, 2019) mostrado en Fig. 1, por tal motivo la supervisión del buen estado del sistema cardiovascular es crucial para un buen diagnóstico.

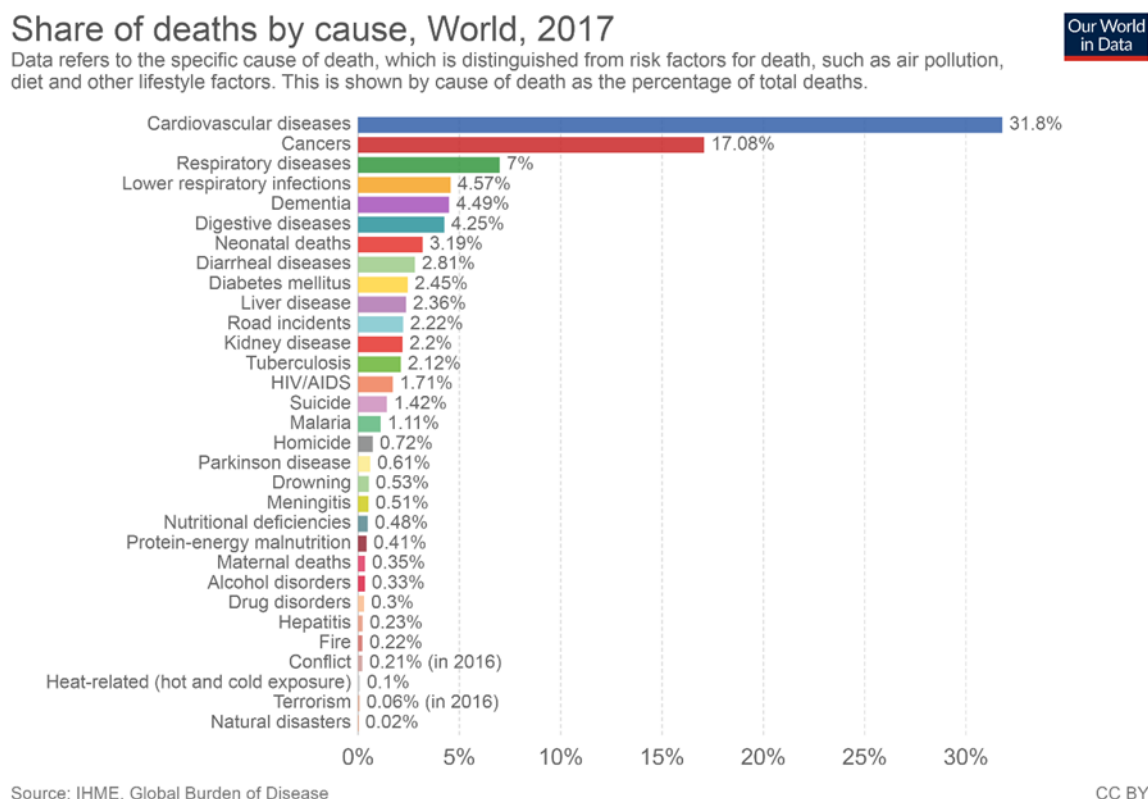


Fig. 1 Causa y porcentaje de muerte a nivel mundial (Roser, 2019).

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. Los vasos sanguíneos son los encargados de mantener la salud del tejido biológico, 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 dichos vasos y determinar el flujo sanguíneo presente en ellos, entre las cuales se encuentran algunas técnicas ópticas. Debido a que son no invasivas, se volvieron atractivas para su aplicación en la medicina, por ejemplo: Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) (B., 2007), 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) (Nossal, 1981) basada en el efecto Doppler.

LSCI, es capaz de detectar flujo sanguíneo superficial, pero muestra serias limitaciones cuando se utiliza en la detección de vasos sanguíneos profundos (en el orden de cientos de micras), esto debido a las propiedades altamente esparcidoras del tejido biológico, en particular la de la piel. LDF puede detectar flujo sanguíneo en vasos profundos (cientos de micras) cuando se combina con Tomografía Óptica Coherente (OCT por sus siglas en inglés) (Schmitt, 1999), pero requiere de un sistema de escaneo espacial que limita su resolución temporal y lo encarece.

En el presente trabajo se aborda el problema de vasos sanguíneos profundos mediante el uso de procesamiento de imágenes de speckle con técnicas multivariantes las cuales son aplicadas a las imágenes adquiridas por un sistema LSCI, dichas técnicas multivariantes que son utilizadas en un sin número de áreas de investigación, desarrollo y análisis, son aplicables a nuestro contexto, en este trabajo fueron utilizadas para discriminar la información proveniente de los vasos sanguíneos de aquella resultante del tejido circundante, con este será posible mejorar la visualización de dichos vasos.

Nuestra propuesta está enfocada en el uso de una técnica multivariante en combinación con LSCI, permitiendo agrupar más fácilmente la información presente de los vasos sanguíneos. La técnica en

particular que se utilizará es llamada Análisis de Componentes Principales (PCA). PCA es una técnica bien conocida y 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 (K. M. Ribeiro, 2014), la combinación de ambas técnicas da como resultado un método no invasivo para visualización de vasos sanguíneos profundos.

### ***1.1 Estado del Arte en LSCI***

Se realizó la revisión bibliográfica de las técnicas que se han implementado en conjunto con LSCI para superar varias de las limitaciones del método vistas previamente. Se abordará artículos de reciente publicación entre los años 2013-2019.

Para resolver la limitante de visualizar vasos sanguíneos profundos, diferentes grupos de investigación han explorado diversas alternativas, una de las cuales utilizan métodos físicos los cuales modifican las propiedades del tejido tales como: 1) PhysicoChemical Tissue Optical Clearing (PCTOC) (Son, 2003), 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) (Kim, 2009) 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) (Prahlt, 1997) 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; 4) PhotoThermal-LSI (PT-LSI) (Regan, 2014), 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.

Otra alternativa es el uso de los modelos de difusión para el transporte de luz en los tejidos se denominan como técnicas de óptica difusa. Gracias a que estos consideran muchos más eventos de interacción luz materia a diferencia de LSCI. Dentro de la óptica difusa destacan dos métodos que en la actualidad son muy estudiados 5) Diffuse Optical Tomography (DOT) (Yamada, 2016) y Diffuse Correlation Spectroscopy (DCS) (David A. Boas, 2016), Estos modelos se basan en la Diffusion Equation (DE) (Yodh, 1997) que describe la propagación de la luz en el tejido biológico, sin embargo, DE no es válido en regiones de bajo esparcimiento y/o de alta absorción y en las proximidades de fuentes de luz. En estos métodos es necesario el uso de los denominados algoritmos de reconstrucción

o de problema inverso, los cuales requieren una alta carga de cálculo computacional. Teniendo en cuenta las ventajas y desventajas ofrecida por la óptica difusa y LSCI se ha buscado la forma de combinar estas técnicas para complementarse y lograr superar sus limitaciones. Se tienen los casos en los que se busca combinar es métodos 6) LSCI con DOT Speckle contrast optical tomography (SCOT) (Hari M. Varma, 2014) y LSCI con DCS Speckle Contrast Optical Spectroscopy (SCOS) (Claudia P. Valdes, 2014).

SCOT y SCOS se basa en la medición de contraste de speckle y combina los modelos físicos utilizados en DOT y DCS con LSCI. Utilizando una fuente puntual (y no extendida como en LSCI) y adquiriendo simultáneamente mediciones de patrones de speckle donde la fuente recorre múltiples regiones de la muestra las cuales posteriormente son detectadas con una cámara CCD o CMOS, utilizando diferentes tiempos de exposición. mostrando la posibilidad de modelar la dependencia del contraste de speckle en función de la separación del detector y la fuente a diferentes tiempos de exposición con un modelo de difusión. La principal ventaja potencial de ellos tener información del tejido profundo con el campo amplio de LSCI.

Uno de los puntos de vista más populares y por supuesto económicos para superar dicha limitación es el uso de algoritmos de procesamiento para la extracción de información de los datos entregados por el sistema LSCI tales como: 7) El método Fujii, parametrización de diferencia temporal (DPT por sus siglas en ingles) y Diferencia generalizada (GD por sus siglas en inglés) los cuales son métodos de detección de actividad. En estos trabajos se presentan resultados experimentales para imágenes biospeckle (así denominado al patrón de speckle generado por actividad biológica) secuenciales de manzana fresca (Preeti D. Minz, 2014), del mismo modo en el monitoreo de flujo sanguíneo mostrando un comparativa entre LSCI y GD (Anne Humeau-Heurtier, 2015); 8) Motion History Images (MHI), el cual proviene del área de detección de movimiento, comúnmente usado para resaltar las regiones que presentan el mayor movimiento en una imagen, en el contexto de imágenes de LSCI enfatiza los cambios de perfusión micro vascular (Mohammad Zaheer Ansari, 2016); 9) Robust Laser Speckle Contrast Images Suitable for Blood Vessel Visualization, usan dos filtros combinados en detección de vasos sanguíneos, un primer filtro temporal que calcula el gradiente de contraste para todos los píxeles dentro de la imagen. Finalmente, el segundo filtro espaciotemporal analiza el comportamiento del flujo sanguíneo en función de las direcciones de contraste (J. R. Velázquez-González, 2017); 10) Exponentially smoothed Fujii (ESF), un método propuesto combina el promedio ponderado exponencialmente de los datos de series de tiempo con un cálculo de Fujii (P.M. Pieczywek, 2017); 11) Machine learning in multiexposure laser speckle contrast imaging, un que método se basa en redes neuronales artificiales para un procesamiento rápido

y preciso de los contrastes de LSCI con múltiples tiempos de exposición, Las redes se entrenan utilizando modelos LSCI y LDF, para el caso de perfusión sanguínea (Ingemar Fredriksson, 2019).

Como conclusión de esta sección en los anteriores enfoques permiten establecer un sin número de posibilidades para subsanar las limitaciones de un sistema LSCI, en particular este trabajo tomo el enfoque del uso de algoritmos multivariantes los cuales tiene la ventaja de que no incrementan el costo del sistema LSCI ni tampoco modifican la estructura del tejido. Permitiendo ordenar, agrupar, analizar e interpretar las señales registradas por sistema LSCI (las cuales inicialmente estarán como paquetes de imágenes o videos), para diferenciar las estructuras conformadas por esparcidos estáticos y dinámicos, permitiéndonos significativas mejoras en la visualización de vasos sanguíneos.

## ***1.2 Planteamiento del problema***

Desde la antigüedad, hace más de 3 mil años, los chinos eran capaces de realizar un diagnóstico del estado de algún órgano interno utilizando el análisis del pulso sanguíneo (íntimamente relacionado al flujo sanguíneo), en la medicina occidental moderna, uno de los descriptores más utilizados es la condición del flujo sanguíneo, existen un gran número de técnicas que extraen información relevante de su estado, sin embargo, las técnicas no invasivas y en particular técnicas ópticas, han ganado terreno en el área de diagnóstico y esto es debido a que la información que son capaces de extraer va acompañada de una imagen. Dentro de este tipo de técnicas LSCI, cumple con la mayoría de las características antes mencionadas; es no invasiva, nos da información a través de una imagen de campo completo del estado del vaso y del flujo sanguíneo, además de ser de un costo relativamente bajo.

La principal desventaja de LSCI es su incapacidad de medir u obtener una imagen cuando la profundidad del objeto a estudiar supera las 300  $\mu\text{m}$ . La imposibilidad de la técnica de separar por si sola la información referente al objeto bajo estudio de su medio circundante, limita ampliamente su aplicación para análisis de tejido no expuesto. En este trabajo se propone el uso de técnicas estadísticas de análisis multivariante y en particular de Análisis de Componentes Principales, para hacer un procesamiento de las imágenes obtenidas y de esta forma separar de manera eficiente la información proveniente del objeto bajo estudio de la información no deseada, lo que nos dará la posibilidad de superar la principal desventaja de LSCI, que es la profundidad de penetración.

## ***1.3 Justificación***

En la actualidad hay un sin número de investigaciones encaminadas a resolver este problema el cual abarca múltiples intereses en el área de la salud, economía y tecnología. Solo como ejemplo es posible ver la enorme cantidad de instrumentos, sistemas y enfoques en el mercado que ofrecen

medianamente resolver este problema de visualización de vasos sanguíneos. LSCI es un dispositivo no invasivo de relativo bajo costos, al ser combinado con algoritmos multivariantes los cuales no se incrementa aún más su costo, funcionan como una herramienta accesible, prácticamente para cualquier usuario que ya cuente con un sistema LSCI.

Dentro del aspecto teórico se cuenta con una aportación directa encontrando una relación de gran interés entre modelos matemáticos que establecen la interacción de esparcidos estáticos y dinámicos, los cuales con nuestro aporte pueden ser separados y analizados.

## ***1.4 Hipótesis***

Se puede mejorar la visualización de vasos sanguíneos profundos mediante el uso de algoritmos multivariantes en combinación con un sistema LSCI. Con el uso de estos algoritmos se puede separar más eficientemente el flujo sanguíneo del resto de tejido que lo cubre, permitiendo visualizar flujo que permanecía oculto al utilizar únicamente LSCI.

## ***1.5 Objetivos***

Objetivo general:

Visualizar vasos sanguíneos profundos en tejidos biológicos, mediante el uso combinado de LSCI y PCA.

Para alcanzar este objetivo nos planteamos los siguientes objetivos particulares:

- 1) Construir maniquís de piel con vasos sanguíneos, que simulen las propiedades ópticas (esparcimiento) de la piel y de la sangre
- 2) Usar algoritmos multivariantes que identifiquen el flujo sanguíneo presente en las imágenes obtenidas con el método LSCI. Mediante la implementación de un sistema LSCI se obtienen una serie de imágenes las cuales contienen información del tejido analizado, estas imágenes pueden reinterpretarse como un sistema multivariante y por lo tanto aplicarles un tratamiento mediante PCA, separando la información inicial (las imágenes), en grupos de acuerdo a su dinámica.
- 3) Corroborar nuestras propuestas mediante el uso de modelos matemáticos. Mediante los modelos establecidos por Parthasarathy (A. B. Parthasarathy, 2008) se establece un ajuste para comparar con los datos experimentales.
- 4) Cuantificar mediante la mejora obtenida con nuestra propuesta y LSCI convencional en la identificación de los vasos sanguíneos. Mediante el conocimiento previo de la ubicación de un vaso

sanguíneo, y el uso de la estimación de nuestros métodos a contrastar es posible establecer el error en función de la ubicación real y las estimaciones.

5) Elaborar un código que simule alguna de las propiedades más importante de los patrones de speckle. Basándose en investigaciones previas sobre la simulación de patrones de speckle, se buscará que dichos patrones sean los más fiel posible a los obtenidos experimentalmente.

## *2 Conceptos básicos*

### *2.1.1 Interacción luz materia*

En física el campo de la óptica se encarga del estudio de la luz, así como de sus propiedades; mientras que las interacciones de la luz con la materia se estudian en óptica física (Hecht, 2016). La interacción luz-materia es un fenómeno complejo, esto es debido a la complejidad de ambos actores, mientras que la materia presenta una organización atómica que hace imposible su determinación con precisión, la luz por otro lado es un fenómeno altamente complejo, su comportamiento puede ser entendido, mediante la teoría ondulatoria y/o corpuscular. No obstante, es posible acceder y comprender algunos parámetros o propiedades de la materia que nos ayudan en la descripción de las características intrínsecas de los materiales, estos parámetros son: la absorción y la dispersión.

En el proceso de absorción, la energía de la luz (fotón) es transferida a la materia (átomo). El proceso de esparcimiento, 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 esparcida.

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.

El límite geométrico es considerado cuando el tamaño de la partícula esparcidora 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.

El límite de Rayleigh (Rayleigh scattering) 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 Fig. 2 a).

El régimen de Mie (Mie scattering) es aplicable 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 Fig. 2 b).



Los efectos de esparcimiento mayoritariamente presente en vasos sanguíneos son Rayleigh y en menor medida Mie. Es posible ver como la dirección es luz incidente en medios esparcidores es redefinida por dicho fenómeno Fig. 2 c).

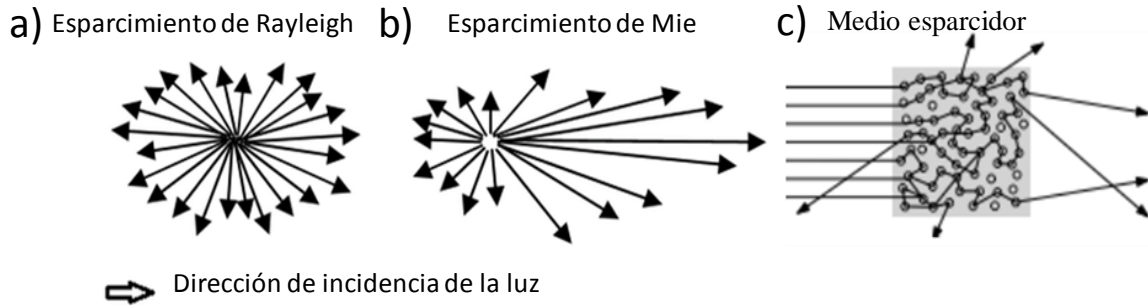


Fig. 2 luz incidente sobre partículas esparcidoras en a) régimen Rayleigh, b) Mie y c) Ensamble de varias partículas Rayleigh y Mie.

### 2.1.2 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.

Al interior de un tejido biológico se encuentra un sistema compuesto por pequeños vasos sanguíneos (de menos de 300  $\mu\text{m}$  de diámetro) que a menudo se le llama microcirculación, su función es el transporte y la entrega de nutrientes y gases a los tejidos del cuerpo. La microcirculación comprende las arteriolas, capilares, vénulas y vasos linfáticos terminales. Se caracteriza por una baja velocidad de la sangre y distancias cortas entre el vaso y los tejidos del cuerpo (Thiriet., 2007). La sangre que circula por esta red de vasos está compuesta en un 55% por el plasma que es una sustancia líquida que contiene una mezcla de agua, iones y proteínas con función defensiva y reguladora. El 45% restante corresponde a los elementos celulares de la sangre que incluye a los eritrocitos (o glóbulos rojos), los leucocitos (o glóbulos blancos) y las plaquetas.

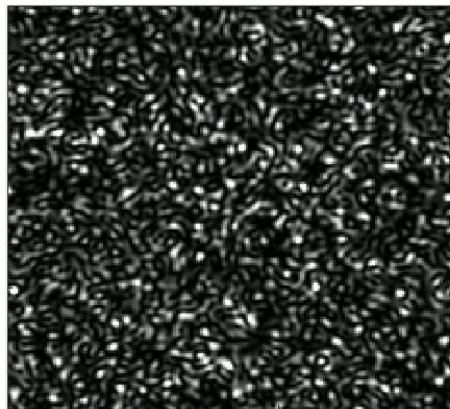
Ópticamente hablando, el tejido biológico se puede interpretar como una mezcla inhomogénea de partículas esparcidoras, las cuales no solo dispersan la energía, sino que también la absorben, dentro de las cuales cabe mencionar: células, núcleos y mitocondrias; con tamaños que van desde las 10  $\mu\text{m}$

a  $1\ \mu\text{m}$  (límite geométrico), vesículas, fibras de colágeno y agregados macro-celulares 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 compleja, la luz es esparcida y absorbida 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 encontrará presente el fenómeno de speckle, como una manifestación directa de interferencia espacial entre múltiples ondas que han sido esparcidas al interactuar con el tejido.

### *2.1.3 Fenómeno de speckle*

Se le denomina fenómeno de speckle al patrón que se genera cuando una superficie ópticamente rugosa es iluminada con luz coherente. La luz esparcida presenta una distribución de intensidad particular, la cual consiste en puntos brillantes y oscuros de formas variables y distribuidos en forma aleatoria (Fig. 3).



*Fig. 3 Patrón de speckle.*

Cuando la luz coherente interactúa con el tejido biológico se obtienen patrones de speckle con ciertas características, dependiendo del comportamiento de estos patrones en el tiempo se clasifican dos tipos de patrones; estático y dinámico. El estático, es generado por estructuras que prácticamente no cambian en el tiempo (i.e tejido adiposo), las interacciones de la luz con estas estructuras forman un patrón no cambiante. Por otro lado, el dinámico se origina cuando la luz interactúa con estructuras que cambian en el tiempo (i.e flujo sanguíneo), generando fluctuaciones en la intensidad del patrón de speckle debido a las variaciones en la fase de la luz. Debido a la estructura de los tejidos biológicos los patrones de speckle observados, contendrán una mezcla de patrones estáticos y dinámicos.

### 2.1.5 Formación de speckle

El tamaño medio del grano (o mota) 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, se puede estimar fácilmente en la mayoría de los casos. Los arreglos más comunes para generar el fenómeno speckle son denominados speckle objetivo y speckle subjetivo ver Fig. 4, los cuales son presentados a detalle.

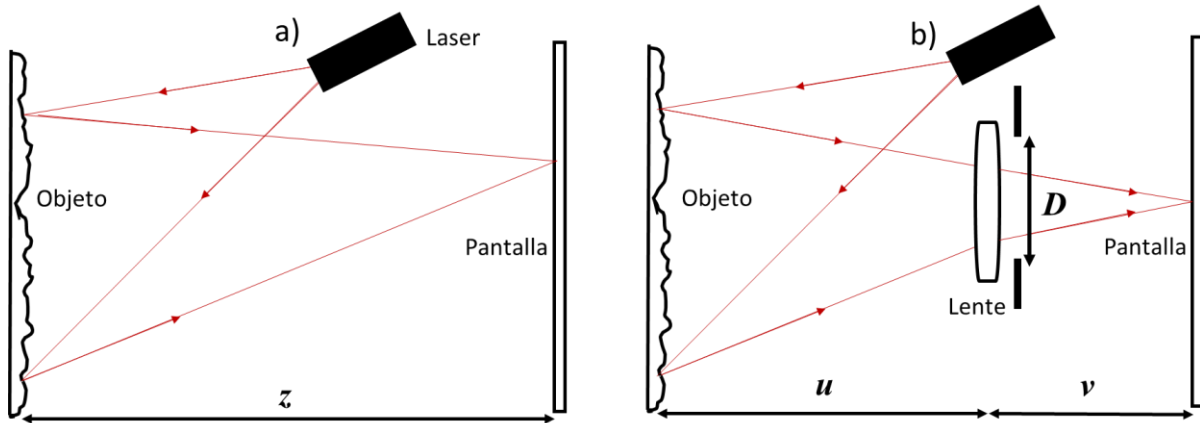


Fig. 4 Formación de speckle usando como fuente de luz coherente un láser: (a) campo lejano (speckle objetivo) y (b) speckle imagen (speckle subjetivo).

En la Fig. 4 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 (Dainty, 1984) propuso la expresión  $\lambda z/L$  para dimensionar el tamaño medio del grano 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 (J. C. Dainty, 1984), (Asakura, 1991).

En la Fig. 4 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 speckle. Si la posición del sistema formador se altera, el patrón cambiará gradualmente y eventualmente no estará relacionado con el patrón observado originalmente.

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 granos speckle en la imagen será de este orden.

## 2.2 Análisis estadístico de speckle

Para el análisis estadístico del patrón moteado (Goodman, 2007), se supone que la fuente de luz es monocromática y perfectamente polarizada. La forma analítica para una representación del campo eléctrico en un punto de observación  $(x, y, z)$  y tiempo  $(t)$  se define como:

$$u(x, y, z; t) = A(x, y, z)e^{i2\pi vt} \quad (2.2. 1)$$

Donde es  $v$  la frecuencia óptica y  $A(x, y, z)$  es la amplitud del campo eléctrico

$$A(x, y, z) = |A(x, y, z)|e^{i\theta(x,y,z)} \quad (2.2. 2)$$

donde el operador  $|\dots|$  simboliza el valor absoluto y  $\theta$  la fase. La representación analítica es una generalización en el espacio y tiempo.

La intensidad en un punto  $(x, y, z)$  es la suma de  $N$  diferentes elementos con distintas  $\theta$ . Al asumir la contribución de cada elemento da como resultado la suma en la ecuación (2.2. 3).

$$A(x, y, z) = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N |a_k| e^{i\theta_k} \quad (2.2. 3)$$

Al aplicar la fórmula de Euler, el resultado puede descomponerse en parte real e imaginaria.

$$Re(A(x, y, z)) = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N |a_k| \cos(\theta_k) \quad (2.2. 4)$$

$$Im(A(x, y, z)) = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N |a_k| \sen(\theta_k) \quad (2.2. 5)$$

Para calcular las propiedades estadísticas de primer orden de speckle, dos suposiciones principales son esenciales. Primero es que cada elemento es estadísticamente independiente entre sí en términos

de amplitud y fase. La importancia física de esta suposición. Denota la independencia de cada elemento esparcidor.

En segundo lugar, al suponer que las fases  $\theta_k$  se distribuyen uniformemente entre  $[-\pi, \pi]$ . El valor promedio de la parte real e imaginaria del campo viene dado por:

$$\langle \text{Re}(A(x, y, z)) \rangle = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N \langle a_k \rangle \langle \cos(\theta_k) \rangle \quad (2.2. 6)$$

$$\langle \text{Im}(A(x, y, z)) \rangle = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N \langle a_k \rangle \langle \text{sen}(\theta_k) \rangle \quad (2.2. 7)$$

La independencia se usa aquí para promediar la amplitud y la fase por separado, donde  $\langle \dots \rangle$  representan los valores promedio de  $\cos(\theta_k)$  y  $\text{sen}(\theta_k)$  con  $\theta_k \in [-\pi, \pi]$  esta dado por:

$$\langle \text{Cos}(\theta_k) \rangle = \int_{-\pi}^{\pi} \theta_k \cos(\theta_k) d\theta_k = 0 \quad (2.2. 8)$$

$$\langle \text{Sen}(\theta_k) \rangle = \int_{-\pi}^{\pi} \theta_k \text{sen}(\theta_k) d\theta_k = 0 \quad (2.2. 9)$$

Se observa que las partes reales e imaginarias del campo eléctrico tienen un promedio igual a cero:

$$\langle \text{Re}(A(x, y, z)) \rangle = 0$$

$$\langle \text{Im}(A(x, y, z)) \rangle = 0$$

El segundo momento centralizado estará dado por:

$$\langle [\text{Re}(A) - \langle \text{Re}(A) \rangle]^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \sum_{m=1}^N \langle |a_m| |a_k| \rangle \langle \text{Cos}(\theta_k) \text{Cos}(\theta_m) \rangle \quad (2.2. 10)$$

$$\langle [\text{Im}(A) - \langle \text{Im}(A) \rangle]^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \sum_{m=1}^N \langle |a_m| |a_k| \rangle \langle \text{Sen}(\theta_k) \text{Sen}(\theta_m) \rangle \quad (2.2. 11)$$

En esta situación, deben explorarse dos casos diferentes. Por un lado, cuando  $\theta_k$  es independiente de  $\theta_m$  es decir  $m \neq k$ , de forma que el promedio del producto es simplemente el producto de sus promedios. Por otro lado, cuando las variables son dependientes cuando  $m = k$ , el valor promedio viene dado por la función definida a continuación. Las mismas relaciones se aplican en el caso de la función seno.

$$\langle \cos(\theta_k)\cos(\theta_m) \rangle = \begin{cases} \langle \cos(\theta_k) \rangle \langle \cos(\theta_m) \rangle & \text{si } k \neq m \\ \int_{-\pi}^{\pi} \cos(\theta_k)^2 d\theta_k & \text{si } k = m \end{cases} = \begin{cases} 0 & \text{si } k \neq m \\ \frac{1}{2} & \text{si } k = m \end{cases} \quad (2.2. 12)$$

Por lo tanto, las variaciones de la parte real e imaginaria del campo eléctrico son:

$$\langle Re(A)^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{\langle |a_k|^2 \rangle}{2} \quad (2.2. 13)$$

$$\langle Im(A)^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{\langle |a_k|^2 \rangle}{2} \quad (2.2. 14)$$

Se concluye que la parte real e imaginaria del campo tiene media cero y varianzas iguales. Suponiendo una gran cantidad de elementos esparcidos  $N \rightarrow \infty$ , la función de densidad de probabilidad (PDF por sus siglas en inglés) es asintóticamente gaussiana. A continuación, se muestra la PDF para la parte real e imaginaria del campo.

$$P(Re(A)) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{Re(A)^2}{2\sigma^2}} \quad (2.2. 15)$$

$$P(Im(A)) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{Im(A)^2}{2\sigma^2}} \quad (2.2. 16)$$

Teniendo en cuenta el supuesto temprano de que las variables son independiente, el PDF conjunto es simplemente la multiplicación de las PDF individuales:

$$P(Re(A), Im(A)) = P(Re(A)) \cdot P(Im(A)) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{Re(A)^2 + Im(A)^2}{2\sigma^2}} \quad (2.2. 17)$$

## 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 más 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 (Jr., 2009)

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

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)***

Cuando la luz coherente interactúa en un tejido biológico (medio ópticamente rugoso), se pueden generar dos patrones de speckle diferentes; dinámico y estático. Estos patrones se presentan combinados dependiendo de la estructura y composición del medio. El speckle estático es generado al momento que luz coherente (un láser) interactúa con el tejido biológico que estructuralmente es estático, por ejemplo: huesos, cráneo o tejido adiposo, la luz es reflejada creando un patrón no cambiante. Por otro lado, el speckle dinámico se origina cuando luz penetra el tejido e interactúa con partículas en movimiento como lo son los glóbulos rojos, generando cambios en el patrón de speckle debido a las variaciones en la fase de la luz provocadas por el movimiento de las células de la sangre.

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 de speckle ( $K$ ), el cual, está relacionado con el tiempo de correlación ( $\tau_{co}$ ) (Berne, 1976) de la luz esparcida y con la velocidad de las partículas en movimiento.

La influencia de la velocidad de las partículas sobre el contraste de speckle es descrito cuantitativamente usando la teoría dynamic light scattering (DLS) (Nolte, 2012) en función del tiempo 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) (JD, 2007). De esta manera, LSCI transforma variaciones de contraste en un mapa de velocidades relativas del movimiento de las partículas esparcadoras (i.e flujo sanguíneo).

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 se tiene un patrón de speckle cuantificando en términos de la pérdida de contraste. El contraste de speckle tiene valores entre 0 y 1. Un contraste de speckle de 1 indica que no hay difuminado en el patrón de speckle y, por tanto, ningún movimiento, mientras que un contraste de speckle de 0 significa que los esparcidos se están moviendo muy rápido para promediar el speckle, En la imagen de contraste se tiene suficiente información para poder comparar en que regiones se localiza mayor movimiento, 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. Las fluctuaciones temporales de speckle son cuantificadas mediante las funciones de autocorrelación del campo eléctrico y de la intensidad (Berne, 1976). Las funciones de autocorrelación del campo eléctrico y de la intensidad están relacionadas mediante la relación de Siegert (R. Bandyopadhyay, 2005):

$$g_2(t) = 1 + \beta[g_1(\tau)]^2 = \frac{\langle I(t) * I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (2.4.1)$$

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

$$g_1(\tau) = \frac{|\langle E(t)E(t + \tau)^* \rangle|}{\langle E(t)E(t)^* \rangle} \quad (2.4.2)$$

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  $E(t)$  sea expresado como:

$$E(t) = E_f(t) + E_s(t) \quad (2.4.3)$$

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

Al sustituir la ecuación (2.4.3) dentro de la ecuación (2.4.2) se tiene que

$$\begin{aligned} g_1(\tau) &= \frac{\langle [E_f(t) + E_s(t)][E_f^*(t + \tau) + E_s^*(t + \tau)] \rangle}{\langle [E_f(t) + E_s(t)][E_f^*(t) + E_s^*(t)] \rangle} = \\ &= \frac{\langle E_s(t)E_s(t + \tau)^* \rangle + \langle E_f(t)E_f(t + \tau)^* \rangle}{I_s(t) + \langle I_f \rangle + \langle E_s(t)E_f(t)^* \rangle + \langle E_f(t)E_s(t)^* \rangle} + \end{aligned}$$



$$\begin{aligned}
& + \frac{\langle E_s(t)E_f(t+\tau)^* \rangle + \langle E_f(t)E_s(t+\tau)^* \rangle}{I_s(t) + \langle I_f \rangle + \langle E_s(t)E_f(t)^* \rangle + \langle E_f(t)E_s(t)^* \rangle} = \\
& = \frac{I_s(t) + \langle I_f \rangle |g_{1,f}(\tau)|}{I_s(t) + \langle I_f \rangle} \tag{2.4. 4}
\end{aligned}$$

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  $\langle E_s(t)E_f(t)^* \rangle$  y  $\langle E_f(t)E_s(t)^* \rangle$  se promedian a cero porque los campos no están correlacionados. Igualmente, el tercer y cuarto término sobre el denominador de la segunda y tercera línea se promedia a cero.

Sustituyendo la ecuación (2.4. 4) dentro de (2.4. 1) se tiene que

$$\begin{aligned}
g_2(t) &= 1 + \beta \left| \frac{I_s(t) + \langle I_f \rangle |g_{1,f}(\tau)|}{I_s(t) + \langle I_f \rangle} \right|^2 = \\
&= 1 + \beta \frac{(I_s(t) + \langle I_f \rangle |g_{1,f}(\tau)|)^2}{(I_s(t) + \langle I_f \rangle)^2} = \\
&= 1 + \beta \frac{I_s(t)^2 + 2I_s\langle I_f \rangle |g_{1,f}(\tau)| + \langle I_f \rangle^2 |g_{1,f}(\tau)|^2}{(I_s(t) + \langle I_f \rangle)^2} \\
&= 1 + \beta [\rho^2 |g_{1,f}(\tau)|^2 + 2\rho(1-\rho) |g_{1,f}(\tau)| + (1-\rho)^2] \tag{2.4. 5}
\end{aligned}$$

donde  $\rho^2 = \frac{I_f^2}{(I_f + I_s)^2}$  y  $\beta$  está definida de acuerdo a la ecuación (2.4. 1).

Observando que la ecuación (2.4. 5) es la relación de Siegert para campo eléctrico con componentes estática y dinámica (A. B. Parthasarathy, 2008).

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  $i$ -ésimo pixel está dada por:

$$I = \frac{1}{T} \int_0^T I_i(t') dt' \tag{2.4. 6}$$

donde  $T$  es el tiempo de exposición.

Por otro lado,

$$\langle I^2 \rangle_T \equiv \frac{1}{T^2} \iint_0^T \langle I_i(t') I_i(t'') \rangle dt' dt'' \quad (2.4.7)$$

donde los corchetes triangulares significan promedio sobre el ensamblé. Sustituyendo la expresión para  $g_2(\tau)$  dada por la ecuación (2.4.5) al sustituir en la ecuación (2.4.7) se obtiene:

$$\begin{aligned} \langle I^2 \rangle_T &= \langle I \rangle^2 \frac{1}{T^2} \iint_0^T (1 + \beta[\rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2 + 2\rho(1 - \rho) |g_{1,f}(t' - t'')| + \\ &\quad + (1 - \rho)^2]) dt' dt'' = \\ &= \langle I \rangle^2 \frac{1}{T^2} \iint_0^T dt' dt'' + \\ &+ \langle I \rangle^2 \frac{1}{T^2} \iint_0^T [\beta\rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2 + 2\beta\rho(1 - \rho) |g_{1,f}(t' - t'')| + \beta(1 - \rho)^2] dt' dt'' \\ &= \frac{\langle I \rangle^2 T^2}{T^2} + \\ &+ \langle I \rangle^2 \frac{1}{T^2} \iint_0^T [\beta\rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2 + 2\beta\rho(1 - \rho) |g_{1,f}(t' - t'')| \\ &\quad + \beta(1 - \rho)^2] dt' dt'' \end{aligned} \quad (2.4.8)$$

Restando  $\langle I \rangle^2$  y multiplicando por  $1/\langle I \rangle^2$  ambos miembros de la ecuación (2.4.8) se obtiene la varianza normalizada:

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

Para evaluar la integral de la ecuación (2.4.9), ambas variables de integración deben ser modificadas.

Sea  $\tau = t' - t''$  y  $\alpha = t''$ , entonces de (2.4.9) es transformada (excepto los límites de integración) usando la fórmula de cambio de variables

$$\begin{aligned}
& \frac{1}{T^2} \iint_0^T [\beta \rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2] dt' dt'' + \frac{1}{T^2} \iint_0^T [2\beta \rho(1 - \rho) |g_{1,f}(t' - t'')|] dt' dt'' + \\
& \quad + \frac{1}{T^2} \iint_0^T [\beta(1 - \rho)^2] dt' dt'' = \\
& \frac{1}{T^2} \iint_0^T [\beta \rho^2 |g_{1,f}(\tau)|^2] |J|^{-1} d\alpha d\tau + \frac{1}{T^2} \iint_0^T [2\beta \rho(1 - \rho) |g_{1,f}(\tau)|] |J|^{-1} d\alpha d\tau + \\
& \quad \frac{1}{T^2} \iint_0^T [\beta(1 - \rho)^2] dt' dt'' \tag{2.4.10}
\end{aligned}$$

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

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

$$\begin{aligned}
& \frac{\int_{-T}^T (T - |\tau|) [\beta \rho^2 |g_{1,f}(\tau)|^2] d\tau}{T^2} + \frac{\int_{-T}^T (T - |\tau|) [2\beta \rho(1 - \rho) |g_{1,f}(\tau)|] d\tau}{T^2} + \dots \\
& + \beta(1 - \rho)^2 \tag{2.4.11}
\end{aligned}$$

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

$$K^2 = 2\beta \rho^2 \int_0^T \frac{\left(1 - \frac{\tau}{T}\right) (g_{1,f}(\tau))^2 d\tau}{T} + 4\beta \rho(1 - \rho) \int_0^T \frac{\left(1 - \frac{\tau}{T}\right) g_{1,f}(\tau) d\tau}{T} + \beta(1 - \rho)^2 \tag{2.4.12}$$

Suponiendo que las velocidades de los difusores tienen una distribución Lorentziana (A. B. Parthasarathy, 2008), la cual está dada como

$$g_{1,f}(\tau) = e^{-\tau/\tau_{co}} \quad (2.4.13)$$

Y reconociendo que la raíz cuadrada de la varianza es el contraste de speckle, (2.4.12) se simplifica quedando como

$$K(T, \tau_{co}) = \left\{ \beta \rho^2 \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta \rho(1 - \rho) \frac{e^{-x} - 1 + x}{x^2} + (1 - \rho)^2 \right\}^{1/2} \quad (2.4.14)$$

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 speckle.

Donde  $I_s$  y  $I_f$  es la intensidad de la luz que es esparcida por la parte estática y dinámica dentro de la muestra.

Se planteó la necesidad de obtener una expresión analítica del contraste de speckle para poder cuantificar el difuminado en el patrón de speckle. Para esto, se asumió que la función de autocorrelación temporal del campo (2.4.13) tiene la forma

$$g_{1,f}(\tau) = e^{-t/\tau_{co}} \quad (2.4.15)$$

Esto da un contraste de speckle

$$K(T, \tau_{co}) = \left\{ \beta \rho^2 \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta \rho(1 - \rho) \frac{e^{-x} - 1 + x}{x^2} + (1 - \rho)^2 \right\}^{1/2} \quad (2.4.16)$$

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

$$\tau_{co} \propto \frac{1}{v} \quad (2.4.17)$$

En el caso de mediciones de láser Doppler, teóricamente es posible relacionar los tiempos de correlación  $\tau_{co}$  con la velocidad de las células rojas presente en 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 (R. Bandyopadhyay, 2005), (2.4.13) 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 la ecuación (2.4.13) debe ser cuadrado para representar la velocidad sanguínea. En el régimen de esparcimiento dinámico individual, la ecuación (2.4.13) es correcta, sí, 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 (Boas D.A., 2010). 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.

$$SFI \propto \frac{1}{TK^2} \quad (2.4.18)$$

En la práctica para calcular el valor de  $K$  en una imagen de speckle, se difundió dos enfoques denominados  $K$  espacial y  $K$  temporal, los cuales poseen sus ventajas y desventajas (M. Draijer, 2009).

## 2.5 Interpretación de contraste en función de la dinámica

Para determinar el comportamiento dinámico del contraste será necesario manejar el contraste al cuadrado, esta cantidad es práctica de operar para nuestro análisis.

$$K^2(x) = \beta\rho^2 \frac{\exp(-2x) - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta\rho(1 - \rho) \frac{\exp(-x) - 1 + x}{x^2} + \beta(1 - \rho)^2 \quad (2.5.1)$$

Se usa  $K^2$  por simplicidad matemática en análisis posteriores. Cuando  $x \gg 1$  el  $K^2$  alcanza un valor asintótico ( $K_s^2$ ) está dado por:

$$K^2(x)|_{x \gg 1} \equiv K_s^2 = \beta(1 - \rho)^2 \quad (2.5.2)$$

Es decir, el valor  $K_s^2$  es independiente del tiempo y se puede asociar a la luz esparcida por estructuras estáticas, como el tejido que rodea los vasos sanguíneos. Dado que los dos primeros términos de la ecuación (2.5.1) dependen de la relación entre el tiempo de exposición y el tiempo de correlación, pueden asociarse con la luz esparcida por estructuras dinámicas, como la sangre que circula por los vasos sanguíneos. Entonces, en general, la luz esparcida contiene componentes estáticos y dinámicos.

$$K_D^2 \equiv \beta\rho^2 \frac{\exp(-2x) - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta\rho(1 - \rho) \frac{\exp(-x) - 1 + x}{x^2} \quad (2.5.3)$$

Es posible que uno prevalezca sobre el otro como en los vasos sanguíneos. Por lo tanto, el objetivo

de este trabajo es utilizar PCA en combinación con LSCI para separar  $K_S^2$  de  $K_D^2$  y, por lo tanto, mejorar la visualización de los vasos sanguíneos profundos.

## ***2.6 Análisis de contraste espacial.***

El  $K$  espacial definido por Briers y Webster (Webster, 1996), consiste en calcular el  $K$  de forma espacial ( $K(sp)$ ) sobre una ventana que se desliza sobre la imagen de speckle. Calculándose de manera local en el espacio mediante una ventana de  $5 \times 5$  ó  $7 \times 7$ , esto permite que, a partir de una sola imagen se pueda calcular  $K(sp)$ , sin embargo, existe un compromiso entre el tamaño de ventana y la resolución de la imagen de  $K(sp)$  a medida que la ventana crece de tamaño la resolución disminuye y al utilizar ventanas muy pequeñas las muestras para la estadística al calcular  $K(sp)$  son poco fiables (M. Draijer, 2009).

El tamaño del grano speckle (moteado de color blanco Fig. 5 b) en relación con el tamaño del píxel está determinado totalmente por la apertura del sistema de imagen utilizado (por ejemplo, un detector CCD). Si ocurre que los granos speckle son más pequeños que los pixeles, ocurrirán algunos promedios y la técnica será menos eficaz. Si los pixeles son más grandes (como se ilustra en la Fig. 5 a)), solamente unos cuantos speckle serán muestreados por la ventana deslizante y las estadísticas serán poco confiables (JD, 2007).

Generalmente se elige un cuadrado con lados que tengan un número impar de pixeles para que el contraste calculado en la ventana deslizante sea simétrico y pueda ser asignado al píxel central (Draijer, 2009).

En la Fig. 5 b) se muestra un esquema de la forma en que es calculado el contraste de speckle. El contraste en el píxel (gris oscuro) se determina mediante el cálculo de la ecuación (2.3.2), en el área de píxeles de color gris pálido de  $w \times w$  por el valor medio de los píxeles en esta área (Sean J. Kirkpatrick, 2008).

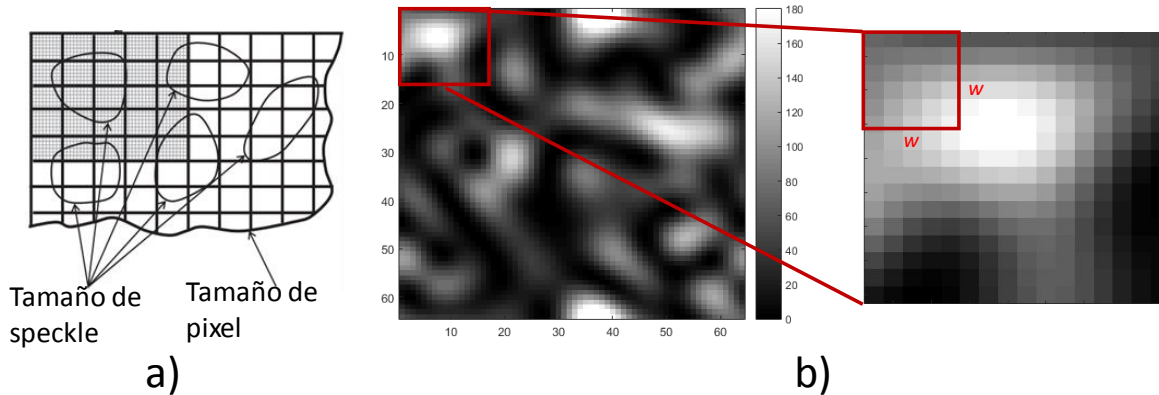


Fig. 5 a) tamaño de grano speckle y pixel b) Esquema del cálculo del contraste de speckle mediante una ventana deslizante

## 2.7 Análisis de contraste temporal

El algoritmo temporal del  $K$  es propuesto por Cheng (H. Cheng, 2003), en el cual se hace la estadística sobre el tiempo, se aplica sobre un conjunto de imágenes tomadas en diferentes tiempos en el cual es recomendable tener el conjunto dentro de un buen muestreo temporal en función de la actividad registrada en el paquete de imágenes, usualmente se toma como parámetro el tiempo de correlación o sus múltiplos para obtener este buen muestreo temporal como mínimo 15 imágenes para tener una buena estadística, Se aplica el cálculo de  $K$  sobre los valores de intensidad de cada pixel a través del tiempo con la ecuación (2.3.2), como ejemplo se muestra el conjunto de pixeles que se tomarían a calcular, este procedimiento se realizara para cada pixel y se tiene como resultado una imagen de  $K$  temporal  $K(tem)$ .

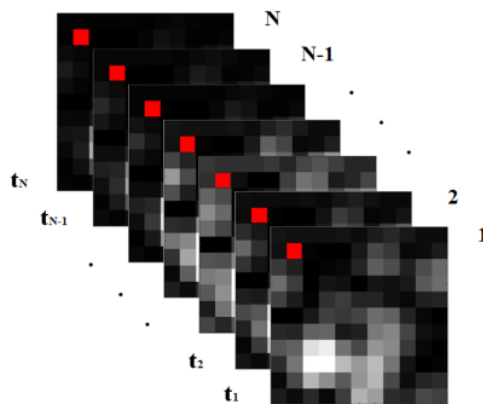


Fig. 6 Calculo de  $K$  temporal

Las ventajas del  $K(tem)$  contra el espacial, es una mejor resolución espacial debido a que la estadística es sobre el tiempo y no sobre el espacio, pero debido a esto su desventaja es una menor resolución temporal.

Dependiendo de la aplicación a casos concretos, se debe de usar uno u otro de acuerdo a las ventajas que uno ofrece para unas imágenes de speckle en concreto (M. Draijer, 2009).

## ***2.8 Método de diferencias generalizadas***

Diferencias generalizadas (GD por sus siglas en inglés) es uno de los denominados métodos gráficos (Humeau-Heurtier A., 2015), en lo cual su objetivo es resaltar la información dinámica debida a la actividad biológica de la muestra.

El método consiste en cuantificar la actividad de speckle o moteado basándose en la acumulación de todas las posibles diferencias (en valor absoluto) de intensidades para cada píxel en una imagen completa, entre cuadros (imágenes) consecutivos y no consecutivos. Incluyendo operaciones puntuales, es decir, una operación en la cual el valor de la irradiación (nivel de gris) de cada uno de los píxeles de la imagen es reemplazado con un nuevo valor que proviene del cálculo que involucra operaciones con los valores de cada uno de los mismos píxeles de varias (o al menos dos) imágenes de una secuencia.

Debido a que en una misma imagen pueden presentarse diferentes niveles de actividad de speckle o moteado (algunas regiones pueden presentar cambios rápidos, otros cambios lentos y algunas regiones no presentan cambios), el método de las DG también incluye cálculos de diferencias entre imágenes no consecutivas. Para esto, se asigna a cada píxel de la imagen procesada el valor DG dado por la ecuación (2.8. 1):

$$DG = \sum_j \sum_k |I_j - I_k| \quad (2.8. 1)$$

Donde  $j$  y  $k$  representa la posición de la imagen en la secuencia, dando como resultado el acumulado de todas las posibles diferencias presentes en la secuencia, lo cual permite distinguir las zonas presentes en la muestra de acuerdo a la actividad ver Fig. 7.



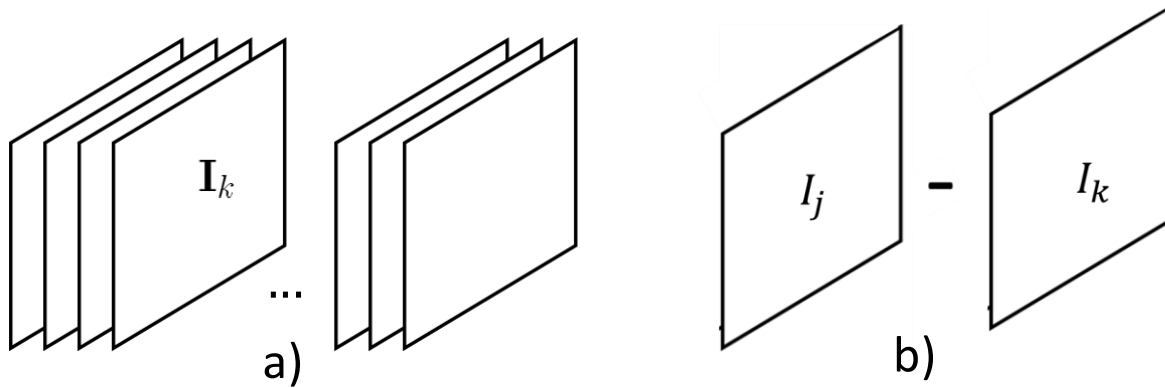


Fig. 7 a) conjunto de imágenes adquiridas en una secuencia, b) Diferencia entre cualesquiera de las imágenes

## 2.9 Método Fujii

El método (Preeti D. Minz, Intensity based algorithms for biospeckle analysis, 2014) suma la diferencia absoluta de intensidades. de las imágenes consecutivas, que se ponderan por la suma de sus intensidades. Está representado por la ecuación (2.9. 1) que se da a continuación.

$$Fujii = \sum_k \left| \frac{I_{k+1} - I_k}{I_{k+1} + I_k} \right| \quad (2.9. 1)$$

Donde  $k$  representa la posición de la imagen en la secuencia como se observa en Fig. 7 en el caso de *DG* con la clara excepción que en *Fujii* no se toman todas las posibles diferencias del conjunto de imágenes además de que al ponderar con la suma de imágenes consecutivas *Fujii* es menos sensible a los cambios de intensidad, como mala iluminancias al adquirir el conjunto.

## 2.10 Método MHI

La imagen del historial de movimiento (*MHI* por sus siglas en inglés) es una imagen estática que permite detectar la ubicación y la ruta del movimiento a de una secuencia de imágenes (Mohammad Zaheer Ansari, 2016). En *MHI*, la información del movimiento temporal se contrae en una sola imagen donde el nivel es una función del movimiento. Por lo tanto, el nivel de píxel en *MHI* es una función del historial de movimiento en esa ubicación, donde los valores más brillantes corresponden a un movimiento más reciente. Con *MHI*, las partes móviles de una secuencia de video se pueden grabar con una sola imagen, desde donde se puede predecir el flujo de movimiento, así como las partes móviles de la acción de la secuencia.

Para calcular *MHI* se presentará en los próximos pasos, y se utilizó una colección de imágenes de un brazo al levantarse para ilustrarlo. En el caso de la Fig. 8, el movimiento del brazo va de abajo hacia

arriba. El primer paso del procedimiento MHI es la resta de dos imágenes consecutivas en escala de grises.

$$S_l = I_{l+1} - I_l \quad (2.10. 1)$$

Donde  $S_l$  representa la imagen dada por la diferencia de imágenes consecutivas, al contar con  $N$  imágenes se tiene  $N-1$  imágenes de diferencias.

Cada  $S_l$  debe de transformarse en binario mediante la siguiente definición

$$T_l(i, j) = \begin{cases} 1 & \text{si } |S_l(i, j)| > Z \\ 0 & \text{si } |S_l(i, j)| \leq Z \end{cases} \quad (2.10. 2)$$

Donde  $Z$  representa el umbral seleccionado para dicha transformación

Finalmente se calcula  $MHI$  definida a continuación

$$MHI = \frac{1}{P} \sum_{k=1}^{N-1} T_k k \quad (2.10. 3)$$

Donde  $P = \frac{(N-1)N}{2}$  representa el peso en función de que tan reciente es el evento.

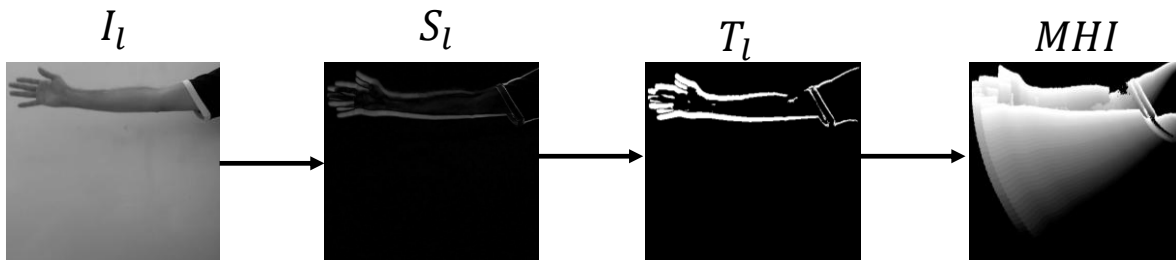


Fig. 8 Esquema ilustrativo del método MHI

Algunas características importantes de la representación de  $MHI$  son:

- Representa la secuencia de movimiento de una manera compacta. En este caso, la secuencia se condensa en una imagen en escala de grises, donde se conserva la información de movimiento dominante.
- $MHI$  se puede crear e implementar en condiciones de baja iluminación donde la estructura no se puede detectar fácilmente de otra manera.
- La representación  $MHI$  no es tan sensible a ruidos de silueta, agujeros, sombras y partes faltantes.

- La *MHI* de escala de grises es sensible a la dirección del movimiento porque puede demostrar la dirección del flujo del movimiento.
- Mantiene un historial de cambios temporales en cada ubicación de píxel, que luego decae con el tiempo.
- El *MHI* expresa el flujo de movimiento o la secuencia mediante el uso de la intensidad de cada píxel de manera temporal.

## ***2.11 Método Multivariante PCA***

El Análisis Multivariante es un conjunto de métodos estadísticos y matemáticos, destinados a describir e interpretar los datos que provienen de la observación de varias variables estadísticas, estudiadas conjuntamente (Anderson, 1958).

Se presenta el uso de algunos modelos y métodos del análisis multivariante, en el contexto de extracción de información de imagen de speckle. esta técnica es utilizada en la extracción e interpretación en función de la actividad (separación de parte dinámica y estática), presente en un conjunto de imágenes de speckle.

El análisis multivariante (AM) es la parte de la estadística y del análisis de datos que estudia, analiza, representa e interpreta los datos que resultan de observar más de una variable estadística sobre una muestra de individuos. Las variables observables son homogéneas y correlacionadas, sin que alguna predomine sobre las demás. La información estadística en AM es de carácter multidimensional, por lo tanto, la geometría, el cálculo matricial y las distribuciones multivariantes juegan un papel fundamental.

La información multivariante es una matriz de datos, pero a menudo, en AM la información de entrada consiste en matrices de distancias o similitudes (Boj, 2010), que miden el grado de discrepancia entre los individuos. Es de vital importancia tener en mente cuáles serán las variables e individuos (o muestras).

Algunos métodos de AM consisten en obtener e interpretar combinaciones lineales adecuadas de las variables observables. Una variable compuesta es una combinación lineal de las variables observables.

Ciertas variables compuestas reciben diferentes nombres según la técnica multivariante: componentes principales (PCA) (Aluja, 1999), variables canónicas, funciones discriminantes, etc. Uno de los

objetivos del Análisis Multivariante es encontrar variables compuestas adecuadas que expliquen aspectos relevantes de los datos.

Para el uso particular de PCA en nuestro contexto se parte al interpretar un conjunto de imágenes como un sistema multivariante.

El procedimiento para obtener los componentes principales (PC) comienza con la organización de los datos en una matriz  $\Gamma$  de dimensión  $M \times N$ , donde  $M$  representa el número de observaciones (valores de gris de cada pixel) y  $N$  representa el número de variables (imágenes tomadas por la cámara).

$$\Gamma = \begin{bmatrix} \gamma_{11} & \gamma_{12} & \cdots & \gamma_{1N} \\ \gamma_{21} & \gamma_{22} & \cdots & \gamma_{2N} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \gamma_{M1} & \gamma_{M2} & \cdots & \gamma_{MN} \end{bmatrix} \quad (2.11. 1)$$

El segundo paso consiste en extraer la media de cada conjunto  $N$ . Este paso evita la dispersión estadística del conjunto de datos, este proceso llamado centralización está representado por

$$\Phi_i = \mathbf{y}_i - \mu(\mathbf{y}_i) \quad (2.11. 2)$$

donde  $\Phi_i$  es el vector de la columna de datos centralizado alrededor de la media,  $\mathbf{y}_i$  representa la  $i$ -ésima observación, y  $\mu(\mathbf{y}_i)$  es la media del vector de la columna de observaciones, y pueden calcularse mediante

$$\mu(\mathbf{y}_i) = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M \mathbf{y}_i(j) \quad (2.11. 3)$$

El tercer paso comprende el cálculo de la matriz de covarianza por medio de la siguiente ecuación

$$\mathbf{C} = \Phi \cdot \Phi^T \quad (2.11. 4)$$

donde  $\mathbf{C}$  representa la matriz de covarianza,  $\Phi$  y  $\Phi^T$  la matriz de datos con media cero y su transposición respectivamente. La matriz de covarianza resultante es real y simétrica. Esto nos permite la factorización de la matriz  $\mathbf{C}$  de la siguiente manera

$$\mathbf{C} = \Lambda \lambda \Lambda^T \quad (2.11. 5)$$

donde  $\Lambda$  es una matriz  $N \times N$  de vectores propios ortonormales y  $\lambda$  es la matriz diagonal de valores propios. El paso final implica el cálculo de las puntuaciones de componentes principales no correlacionadas por

$$PC = \Lambda^T \cdot \Phi \quad (2.11. 6)$$

Como para cualquier otra transformación, es posible calcular la transformación inversa de la *PC* en los datos originales usando la ecuación

$$\Gamma = (\Lambda \cdot PC) + \mu(\Upsilon) \quad (2.11. 7)$$

Los datos originales se pueden recuperar, solo si se utiliza el conjunto general de vectores propios en la transformación inversa. Por otro lado, si se usan algunos vectores propios en la transformación inversa, aún es posible construir un nuevo conjunto de datos (aproximación) donde algunas características indeseables pueden ser discriminadas o eliminadas de los datos originales.

Siguiendo el procedimiento descrito, el primer paso consiste en convertir cada imagen en un vector de columna. Esto se puede hacer tomando cada columna de la imagen y organizando una debajo de la otra. Cada imagen (ahora un vector de columna) está dispuesta una al lado de la otra para formar la matriz  $\Gamma$  como se muestra en la Fig. 9. En nuestro caso, cada imagen recopilada tiene un tamaño de 640 x 480 píxeles, entonces la dimensión del vector de columna es de 1 x 307200 píxeles. Finalmente, la dimensión de la matriz  $\Gamma$  es de 30 x 307200 píxeles / elementos.

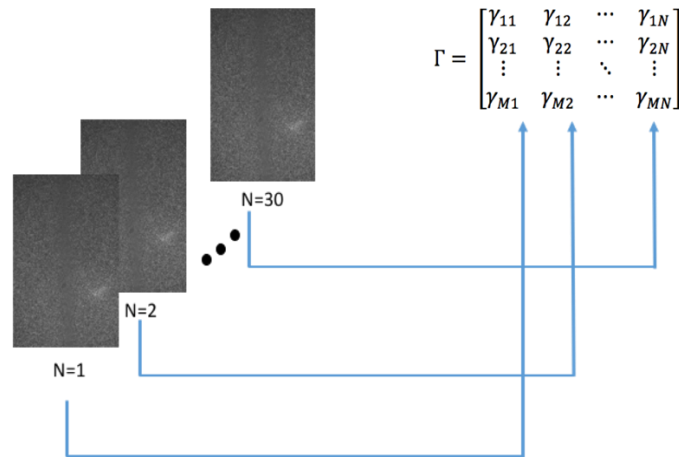


Fig. 9 Organización de imágenes en una matriz  $\Gamma$ . Unos conjuntos de 30 imágenes se arreglan en matriz  $\Gamma$ , dado por  $\Gamma$ ,  $N$  corresponde al número de imagen ( $N = 30$ ) y  $M$  corresponde al número de píxeles en cada imagen ( $M = 640 \times 480$ ).

Al obtener la información en el espacio *PC* ahora se proyectar la información sobre dos subespacios (A y B) definidos por el Criterio Guttan-Kaiser (Kaiser, 1961). Este criterio se basa en el peso de cada PC. El grupo A consta de todas las PC cuyos valores propios satisfacen,  $\lambda_j \geq \bar{\lambda}$  donde  $\bar{\lambda}$  es el valor medio de todos los valores propios (ecuación (2.11. 8)). El grupo B consiste en todas las PC cuyos valores propios satisfacen que  $\lambda_j < \bar{\lambda}$ . Por definición, la suma de todos los valores propios es 1, como se observar los  $N$  valores propios pesados en la ecuación (2.11. 8) .

$$\bar{\lambda} = \frac{\sum_{j=1}^N \lambda_j}{N} \quad (2.11. 8)$$

## 2.12 Simulación del fenómeno speckle

El fenómeno speckle es un patrón de interferencia aleatorio y está presente en todos los sistemas ópticos donde se utiliza luz coherente. Este fenómeno se ha empleado para estudiar las propiedades de superficies rugosas, volúmenes esparcidores, propagación de luz coherente o la dinámica de algún sistema, por ejemplo, vibración mecánica o flujo sanguíneo (Pedro G. Vaz, 2016). Por esta razón, la simulación computacional del patrón dinámico de speckle puede ser una herramienta poderosa para comprender las propiedades ópticas del fenómeno de moteado dinámico (H. Fujii, 1976) y poder relacionarlas con el comportamiento de las muestras en estudio, como es el caso de la actividad biológica, o para investigar la posibilidad de nuevas aplicaciones del fenómeno speckle (Zheng, 1994). Uno de los métodos de simulación más empleados para generar patrones de speckle es a través de la transformación de Fourier de matrices de fase aleatoria (Goodman, 2007), cuyos valores se distribuyen uniformemente en el intervalo  $[0, 2\pi]$ , el campo aleatorio se propaga en el espacio a través de una pupila y posteriormente es observado en un plano de salida Fig. 10, este método solo puede simular patrones de moteado independientes (la correlación entre cualquiera de ellos es cero), limitando drásticamente su aplicabilidad.

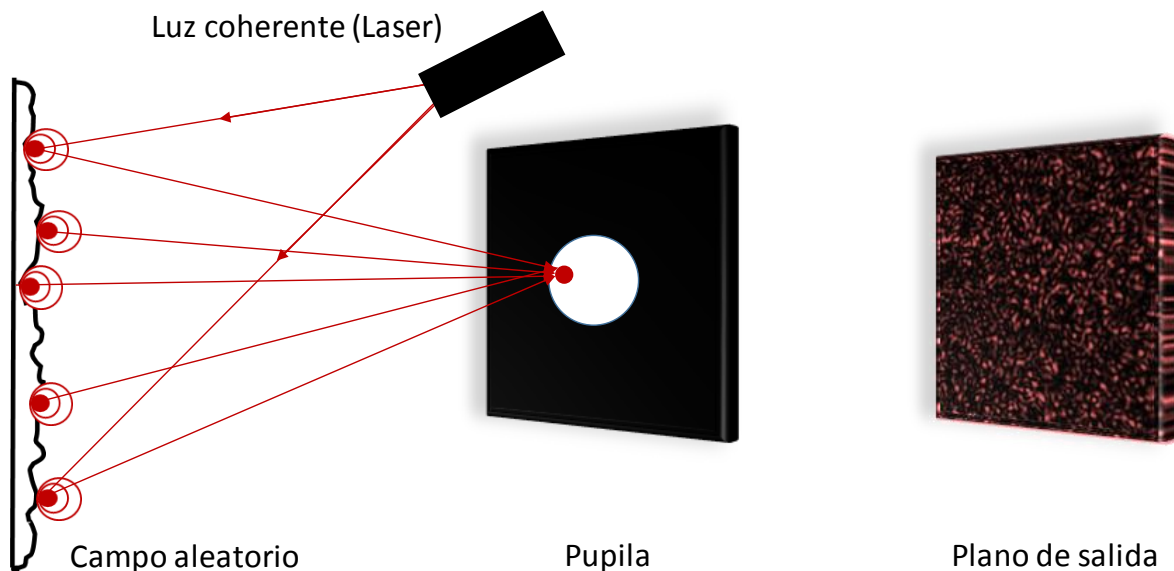


Fig. 10 métodos de simulación más empleados para generar patrones de speckle

Dado que muchas aplicaciones en el fenómeno de moteado se basan en sus propiedades de correlación que dependerán de las propiedades características de la muestra) (Ramírez-Miquet, 2017.), es deseable simular patrones de moteado con correlación temporal que se ajusta a estas particularidades. Duncan y Kirkpatrick introdujeron el método de Copula para generar una secuencia de patrones moteados, entre los cuales el coeficiente de correlación podría predefinirse temporalmente (Rabal, 2013). Con este método, es posible investigar las propiedades speckle de un espécimen con variaciones temporales, generando una serie de patrones de speckle correlacionados (D. D. Duncan, 2008). Sin embargo, en este método, la generación de patrones de speckle correlacionados depende de una función de cópula y una transformación directa de Fourier, que mezcla espacialmente la contribución de los valores de entrada, es decir, los patrones de moteado generados no tienen relación de mapeo de ubicación con las matrices de fase de entrada. Por lo tanto, este método solo puede generar patrones moteados con coeficientes de correlación temporal específicos en su conjunto que no varían espacialmente.

Para superar esta limitación, se ha propuesto una solución en la que es posible predefinir la correlación temporal y espacial de un conjunto de patrones de moteado simulados, es posible relacionando dos matrices de fase aleatoria por medio de una ecuación en la que la contribución de cada matriz puede determinarse por el coeficiente de correlación, lo que permite predefinir cualquier contribución de dichas matrices al coeficiente de correlación calculado (Song, 2016). Un inconveniente de este enfoque es que solo se puede generar patrones de moteado entre estas dos matrices de fase aleatoria, lo que limita el uso práctico a una variedad de fenómenos, en los que su evolución depende de su estado anterior y, por lo tanto, está relacionado con lo que sucede dentro de la muestra (Bianco, 2017).

En este trabajo, se formula un método simple para la generación de un conjunto de patrones dinámicos de speckle.

Generamos una matriz de fase aleatoria inicial ( $\theta_1$ ) de dimensiones  $m \times m$ , los valores de esta matriz estarán dados por una función aleatoria distribuida uniformemente entre  $[0, 2\pi]$ . La segunda matriz ( $\theta_2$ ) se define como la suma de  $\theta_1$  más la contribución de otra matriz de fase aleatoria  $\Delta\theta_1$  ponderada por un factor de peso ( $p$ ), es decir:

$$\theta_2 = \theta_1 + p * \Delta\theta_1 \quad (2.12. 1)$$

de manera similar,  $\theta_2$  viene dado por:

$$\theta_3 = \theta_2 + p * \Delta\theta_2 \quad (2.12. 2)$$

Al seguir este procedimiento, se obtiene la  $k_{\text{ésimo}}$  matriz aleatoria:

$$\theta_{k+1} = \theta_k + p * \Delta\theta_k \quad (2.12. 3)$$

De esta manera, podemos generar un número  $N$  de matrices de fase aleatorias, debe tenerse en cuenta que el valor de  $p$  permanece constante en cada iteración y toma un valor en el intervalo (0,1). Para valores de  $p$  cercanos a cero, los cambios entre las matrices son bastante pequeños y, por lo tanto, podrían estar altamente correlacionados y para  $p$  cercanos a 1 los cambios podrían ser lo suficientemente grandes como para inducir una correlación pobre entre ellos. En la siguiente sección se consigue una relación entre el parámetro  $p$  y el tiempo de correlación.

Una vez generado  $N$  matrices aleatorias ( $\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_N$ ), el campo eléctrico correspondiente para la matriz aleatoria  $\theta_k$  viene dado por (amplitud unitaria):

$$M_k = e^{-i\theta_k} \quad (2.12. 4)$$

La distribución de intensidad correspondiente (patrón de speckle) en el plano de salida viene dada por [Goodman]:

$$I_k = |F^{-1}[H(x,y)F(M_k)]|^2 \quad (2.12. 5)$$

Donde  $F$  es la transformada de Fourier,  $F^{-1}$  es la transformada inversa de Fourier y  $H$  es la pupila del sistema óptico. De esta manera se cuenta con un conjunto de  $N$  patrones de moteado parcialmente correlacionados.

A partir del valor de correlación entre el primero ( $k = 1$ ) y el  $k_{\text{ésimo}}$  patrones simulados de speckle en función de  $k$  (símbolos) para un valor  $p$  específico, se tiene el  $\tau_{co}$  como el ancho de la curva de correlación (es decir, correlación  $e^{-1} = 0.3679$ ) para este valor  $p$ , como se muestra en Fig. 11.

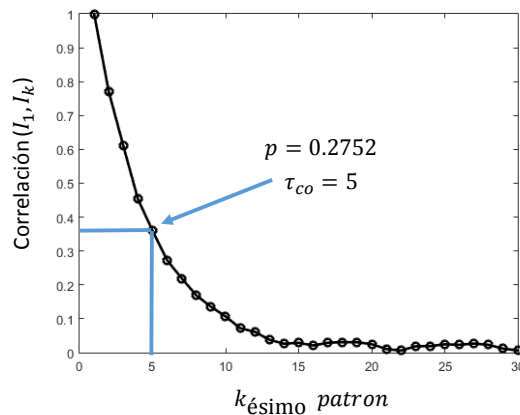


Fig. 11 Función de correlación entre los patrones  $I_1$  y  $I_k$ .



Una vez que se logra la simulación para un valor específico de  $p$ , el proceso se repite para diferentes valores de  $p$ , recuerde que  $p \in (0,1)$ . La Fig. 12 muestra el gráfico en escala log-log correspondiente en la cual se generaron conjuntos de patrones con los posibles valores de  $p$  tomando 100 valores de forma que se producen 100 curvas de correlación para estos y calcular su respectivo  $\tau_{co}$ , se observar en la Fig. 12 una relación lineal, lo que sugiere una relación potencial entre  $\tau_{co}$  y  $p$ , realizando el ajuste correspondiente se consigue la expresión:

$$\tau_{co} = ap^b \quad (2.12. 6)$$

Con esta relación entre  $p$  y  $\tau_{co}$ , cabe resaltar que la ecuación (2.12. 6) se mide el  $\tau_{co}$  a partir del número de patrón para cual correlación decae  $e^{-1}$  lo que permite procesar los patrones de forma practica y definir las propiedades de los patrones de forma rápida, mediante esta propuesta es posible definir tiempos de correlación específicos para generar una serie de patrones de speckle con esas características.

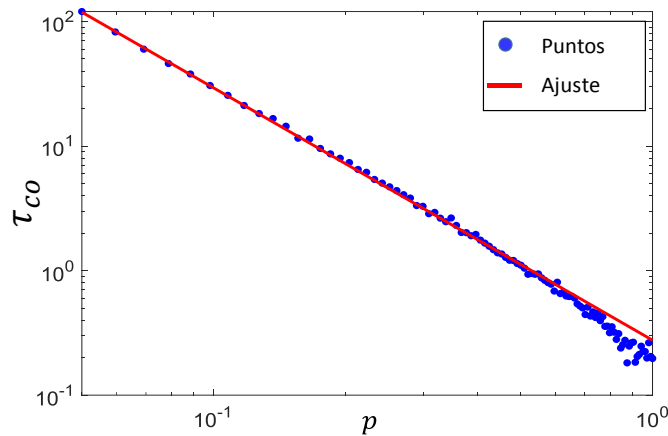


Fig. 12 ajuste lineal en escala log-log para los parámetros  $p$  y  $\tau_{co}$ .

### 2.13 Aplicación de PCA+LSCI en speckle simulado

Se puso a prueba PCA+LSCI, con la simulación de patrones de speckle de la sección 2.12, se generaron 30 patrones de speckle, las simulaciones se generaron usando matrices de fase aleatorias  $\theta_k$  definida es la ecuación (2.12. 3) distribuidas uniformemente en el rango  $[0,2\pi]$ , después se generan las matrices de campos de acuerdo a la ecuación (2.12. 4), finalmente se propagan los campos usando la ecuación (2.12. 5), para definir una zona dinámica y estática en las distribuciones de intensidad  $I_k$ , se define una región dinámica como en la Fig. 13 a) de forma que sobre esta región se tiene un valor de  $p = 0.2752$  (ver Ec.(2.12. 6)), el cual corresponde a un  $\tau_{co} = 5$  recordando que esta medida es a partir del número de patrón en el que la correlación toma el valor  $e^{-1}$ , de forma tal que la región

estática tendrá un valor de  $p = 0$  el cual corresponde a que no habrá cambios de fase por lo tanto esta región permanecerá prácticamente inalterada en el tiempo.

El tamaño de las matrices es de  $256 \times 256$  pixel diámetro de pupila 64 pixel, se definió una región dinámica la cual abarca 86 filas que es aproximadamente la tercera parte del tamaño de la matriz y la región estática la cual cubre a la región dinámica para coincidir lo más posible al caso experimental ver Fig. 13, de forma que en cada patrón simulado se cuenta con información dinámica y estática presente.

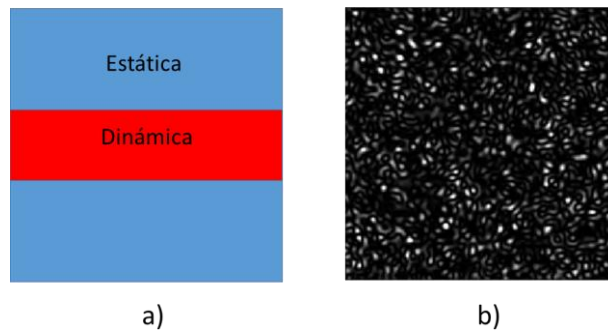


Fig. 13 a) Zona dinámica y estática, b) uno patrón simulado  $I_k$

Al contar con los patrones definidos se aplica el método PCA+LSCI, sobre este conjunto de datos basándonos en la Fig. 21 donde se definieron los grupos A, B y C. se elabora de forma similar para los patrones simulados.

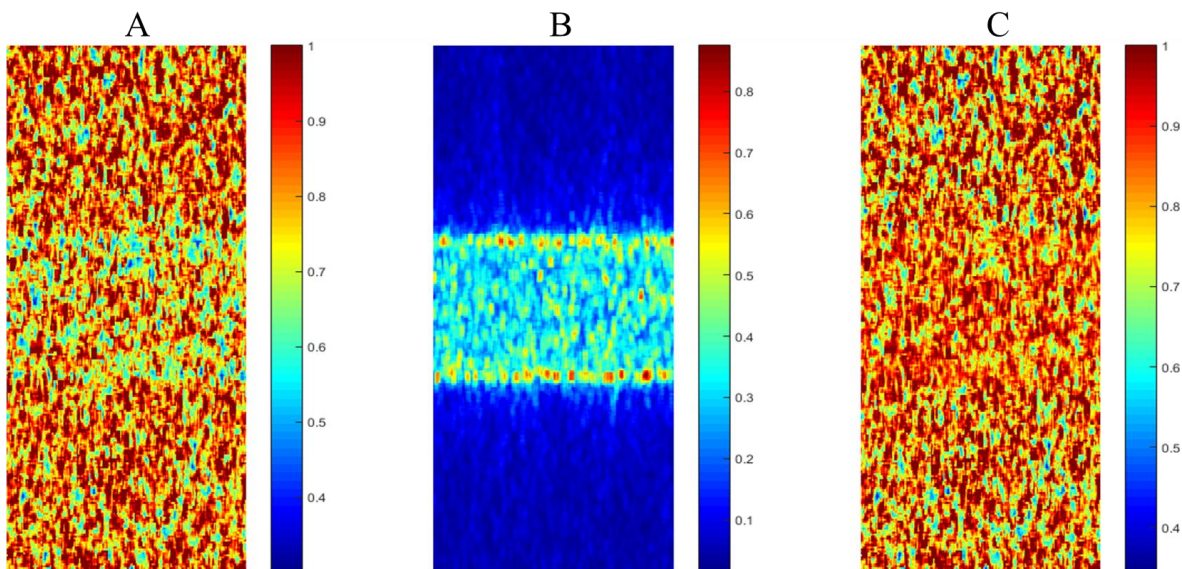
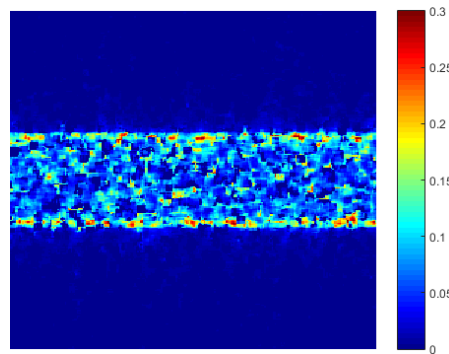


Fig. 14 Imágenes de contraste para los grupos A, B y C, para patrones de speckle simulados

En el caso de C es realmente difícil distinguir zona dinámica y estática, en A se presenta una diferencia mínima entre estas zonas, en cambio se observa claramente como B rescata la parte dinámica del patrón de forma bastante eficiente, una de las diferencias cruciales con su homólogo experimental es que en el simulado al tener un control total sobre variables las cuales experimentalmente no se pueden controlar, como es el caso del ruido característico del sistema (Chenge Wang, 2019).

Finalmente se presenta C-A, para corroborar que de forma similar con buenos resultados en la visualización de la parte dinámica ver Fig. 15 .



*Fig. 15 C-A para patrones de speckle simulados.*

### 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. 16 Para la dermis se usa una resina transparente con la concentración adecuada de  $\text{TiO}_2$  (Dióxido de Titanio, 1.45 mg/mL) (Au.) que simula las propiedades de esparcimiento de la dermis humana ( $1 \text{ mm}^{-1}$ ).

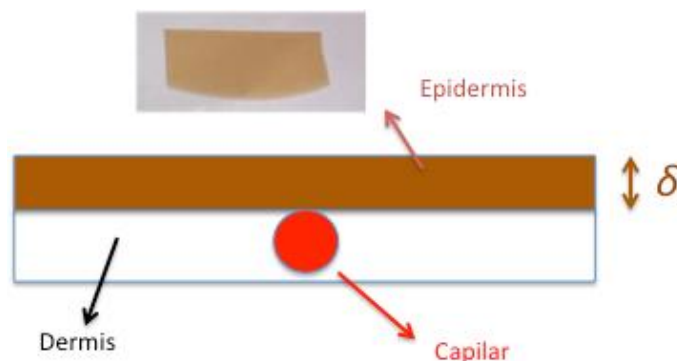


Fig. 16 Maniquí de piel utilizado en este trabajo, el cual consta de Dermis, vaso sanguíneo y epidermis de espesor  $\delta \mu\text{m}$

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 que simula el esparcimiento ( $300 \text{ mg/mL}$ ) de la sangre, este es inyectado por una jeringa y una bomba de infusión (PUMP-NE500) que nos permite controlar la velocidad del líquido que circula por el capilar. El maniquí de epidermis se fabricó con una mezcla de PDMS (Polidimetilsiloxano),  $\text{TiO}_2$  ( $2 \text{ mg/mL}$ ) y café liofilizado ( $10 \text{ mg/mL}$ ) para simular el coeficiente de absorción. Este último maniquí se fabricó con diferentes espesores ( $\delta = 0, 190, 510, 311 \text{ y } 1000 \mu\text{m}$ ), que al colocar sobre la dermis ver Fig. 16, simulan diferentes profundidades del vaso sanguíneo.

#### 3.2 Arreglo experimental de un sistema de LSCI

El arreglo experimental del sistema de LSCI se muestra en la Fig. 17, el cual es constituido por un láser He-Ne ( $632.8\text{nm}$ ), 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), la luz 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 la superficie 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, 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  $40000\mu\text{s}$ .

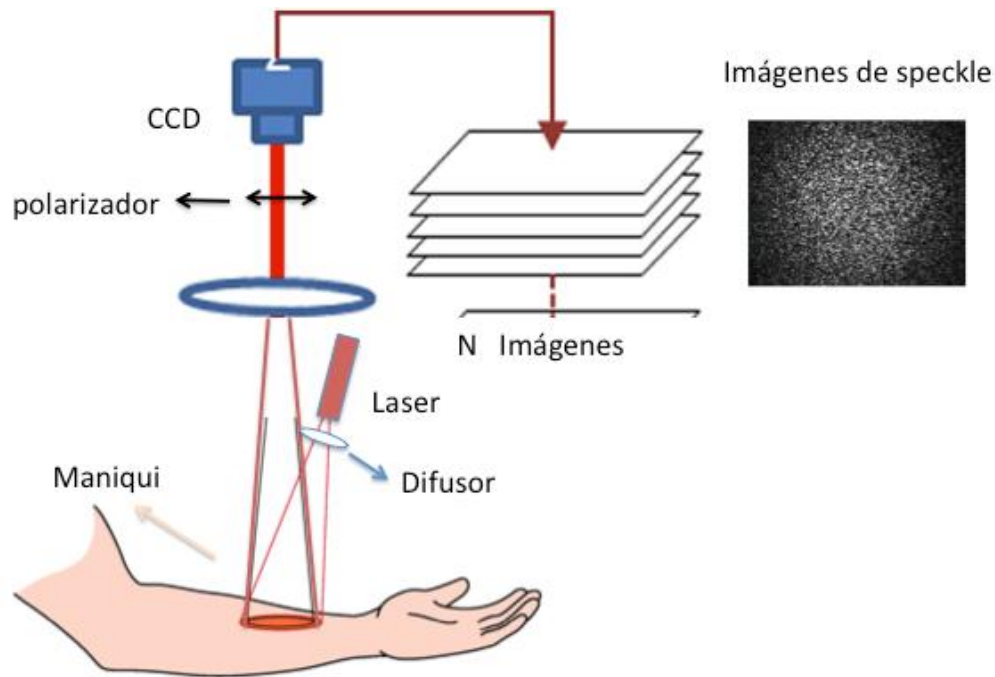


Fig. 17 Esquema experimental de un sistema de LSCI

### 3.3 Adquisición de los patrones de speckle

Teniendo en cuenta lo expuesto en las dos secciones anteriores de este capítulo, se adquirieron 30 imágenes para los 4 valores de  $\delta$  y los 14 valores de  $T$ , las muestras se tomaron de forma continua para que las condiciones ambientales fueran las más parecidas posibles, los cambios en  $T$  se realizaron mediante el software de la cámara, pero en el caso de los maniqués de piel, fue necesario colocarlos manualmente uno sobre otro, según se requiriera.

El tamaño de la imagen obtenida por el sistema fue de  $640 \times 480$  pixels, con respecto al tamaño de la mota en los patrones se buscó que esta fuera al menos dos veces el tamaño del pixel de acuerdo a los criterios expuestos en la sección 2.6, de esta forma se obtuvo una base de datos la cual fue guardada de forma digital para su posterior análisis.

## 4 Análisis de resultados para la visualización de vasos profundos

### 4.1 Aplicación de métodos de visualización

Las técnicas expuestas en los métodos de visualización (capítulo 2) serán puestas a prueba con imágenes de speckle para los diferentes espesores de la epidermis ( $\delta$ ), como un primer examen en su aplicación. En la Fig. 18, las filas establecen los diferentes  $\delta$ , las columnas el método de análisis para la visualización del capilar. A medida que  $\delta$  aumenta, se pierde la visualización del capilar en cada uno de los métodos, cada uno de ellos no es capaz de distinguir el capilar cuando  $\delta=1000 \mu\text{m}$ , la primera columna muestra la imagen de speckle obtenida por el arreglo experimental, comúnmente llamada *Raw speckle*, la segunda columna es el método de contraste espacial  $K(sp)$ , la tercera contraste temporal  $K(tem)$ , la cuarta el método *MHI*, la quinta el método *DG*, la sexta el método *Fujii*.

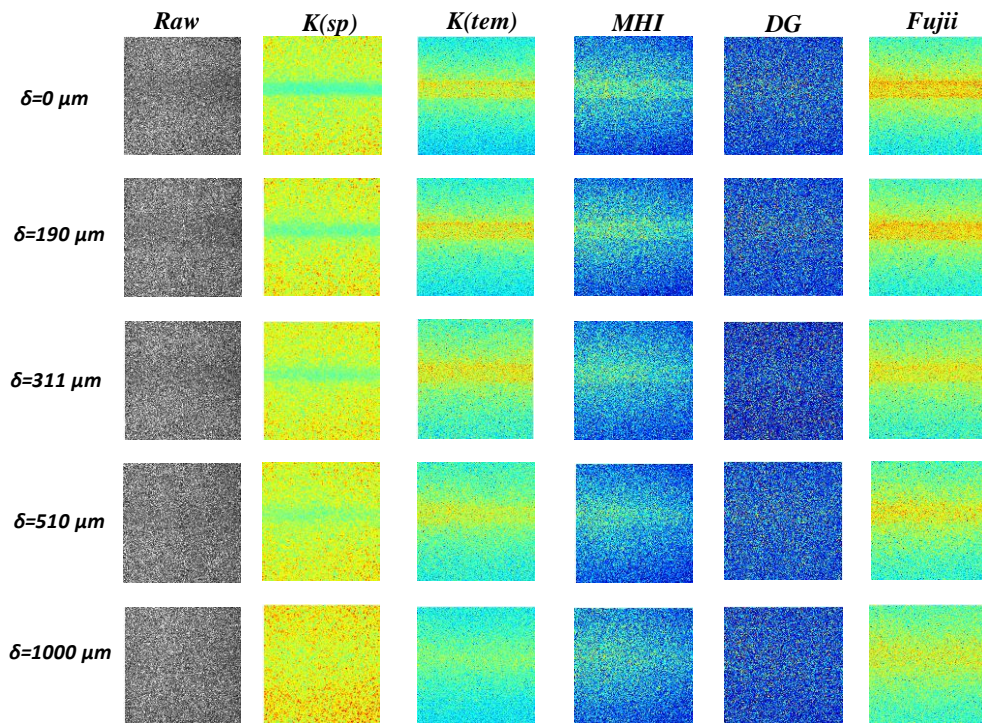


Fig. 18 Métodos de visualización de vasos sanguíneos para diferentes valores de  $\delta$



Cada uno de estos métodos son utilizados en diferentes campos de aplicación, cada uno de los cuales tiene su propia interpretación, en todos los casos es necesario de un análisis a profundidad sobre la dinámica de la muestra que se está analizando, en nuestro caso particular lo que se busca es la mejora de la visualización de vasos sanguíneos.

Mediante el uso de los métodos expuestos se observa claramente que a medida que aumentan los valores de  $\delta$ , es más difícil visualizar el capilar, en cada uno de los métodos tenemos presencia notable de ruido provocado por el tejido que rodea al vaso sanguíneo, entre más gruesa es la epidermis, más ruido está presente y por lo tanto es más difícil visualizar el vaso. A partir de estos resultados, proponemos un método al que llamamos PCA+LSCI el cual es una combinación del método LSCI tradicional y la técnica multivariante PCA, la idea es filtrar las componentes estática y dinámica presente en las imágenes de raw speckle, para posteriormente recuperar la información de nuestro interés la cual es la del capilar, a continuación, mostraremos los detalles de este método propuesto.

## ***4.2 PCA+LSCI***

Conforme a la teoría de PCA aplicada al conjunto de imágenes de speckle (Jose Angel Arias-Cruz, 2019) definida anteriormente se procedió a obtener los subespacios A y B los cuales son definidos conforme al criterio de Guttan-Kaiser (Ec.(2.II. 8)) además de definir el grupo C el cual es el método LSCI estándar para usarlo como referencia, para tres espesores diferentes  $\delta$  y para tres diferentes tiempos de exposición ( $T$ ), ver Fig. 19. Podemos observar que la mayoría de las veces solo la primera PC pertenece al grupo A. Solo en el 4% de los experimentos reportados aquí, el grupo A contiene las dos primeras PC. Para valores de  $\delta$  y  $T$  dados, el primer valor propio tiene un valor mucho más alto que el resto de ellos. Este hecho es más evidente para largos tiempos de exposición y capas superiores. Significa que para largos tiempos de exposición (es decir, 10.929 ms) y / o capa superior gruesa (es decir, 1000  $\mu\text{m}$ ), el conjunto de imágenes es bastante similar y, por lo tanto, la variación de las imágenes sin procesar se concentra en la primera PC y el proceso de filtrado es poco eficiente. Por otro lado, para tiempos de exposición cortos y / o capas superiores delgadas, la variación se distribuye de manera más homogénea entre todas las PC y, por lo tanto, el proceso de filtrado es más eficiente

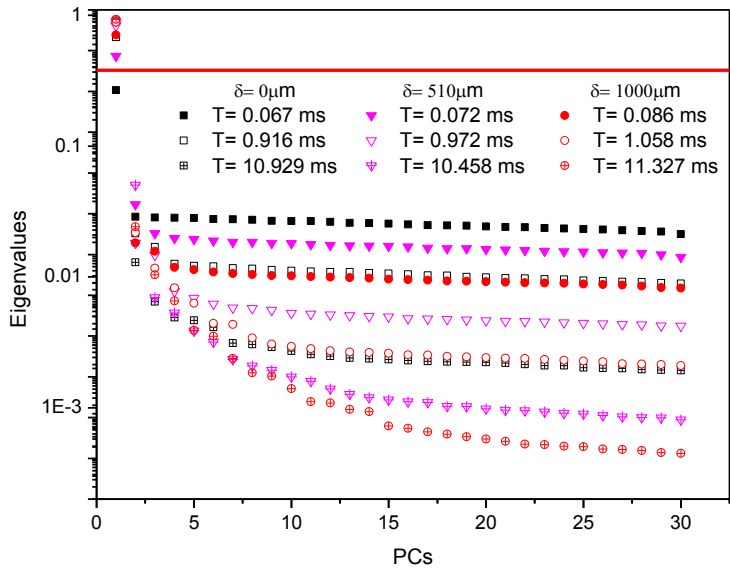


Fig. 19 Eigenvalores VS al número de PC, la línea horizontal roja gruesa establece la separación mediante el Criterio de Guttman-Kaiser para muestras con  $\delta = 0, 510, 1000 \mu\text{m}$  en tres tiempos de exposición diferentes.

Este hecho es más evidente en la Fig. 20, donde se muestra la suma de los valores propios en el grupo A como función del tiempo de exposición para diferentes espesores de la epidermis. Para tiempos de exposición prolongados, la suma de valores propios se aproxima a 1 y, por lo tanto, la mayor parte de la información se concentra en el grupo A, como se mencionó anteriormente, el proceso de filtrado no es eficiente en este caso. Esto significa que el método de filtrado debería ser más eficiente para tiempos de exposición cortos, es decir, menores a un milisegundo. Se encuentra una tendencia similar, pero menos dramática, a medida que la  $\delta$  se vuelve más gruesa.



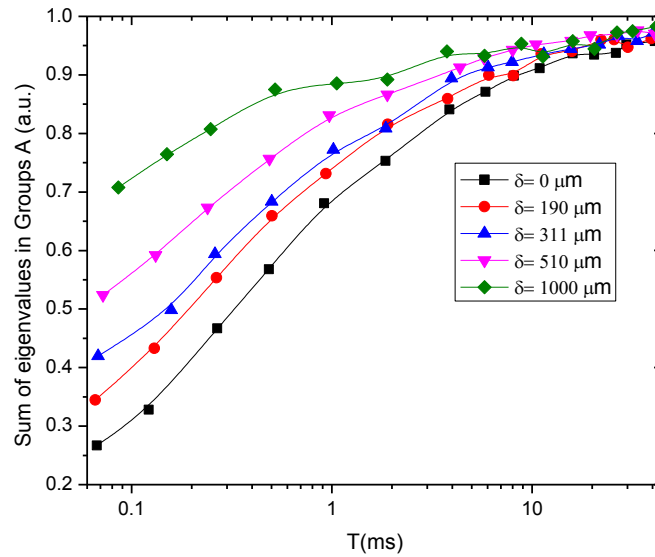


Fig. 20 Suma de los valores propios superiores a  $\bar{\lambda}$  (grupo A) para todos los tiempos de exposición y el grosor de  $\delta$  empleados en este estudio

Una vez que se generaron los grupos A, B y C, se recuperaron sus imágenes de speckle correspondientes ( Fig. 21 ) usando la ecuación (2.11. 7). Las imágenes de contraste se obtuvieron de cada grupo utilizando una ventana deslizante de 5x5 píxeles. Se puede observar que los valores de contraste para el grupo A son significativamente más altos en el área fuera del capilar (región estática), mientras que en el grupo B los valores más altos se encuentran en la zona del capilar (región dinámica). Esto significa que la estructura estática se resalta en el grupo A y la dinámica en el grupo B. El grupo C nos permite comparar la técnica PCA+LSCI versus LSCI estándar. Se observó el mismo comportamiento mostrado en la Fig. 21 para tiempos de exposición cortos (<1 ms) y para los diferentes valores de  $\delta$  empleadas en este trabajo.

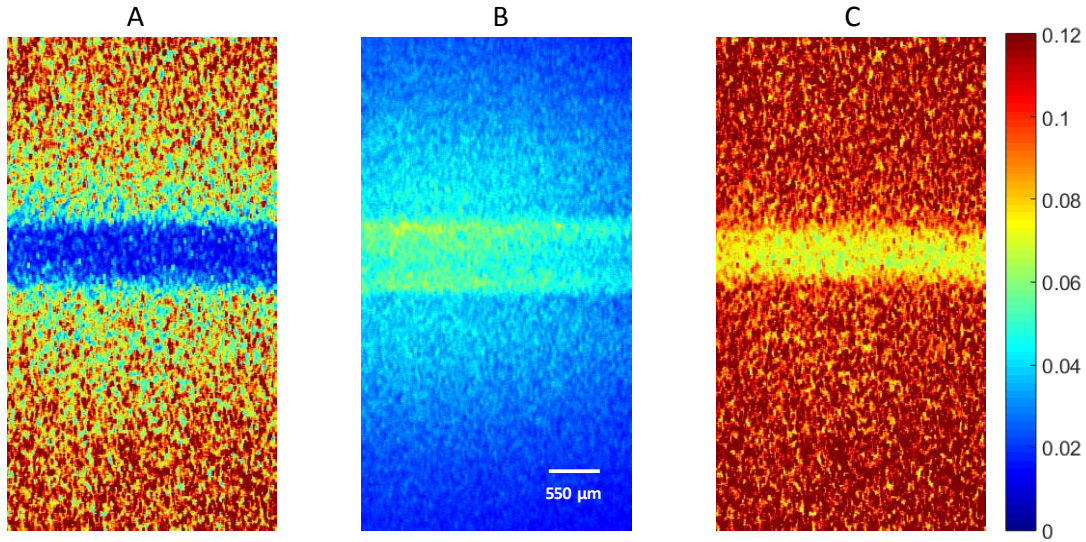


Fig. 21 Imágenes de  $k^2$  para los grupos A, B y C. La región estática se resalta en el grupo A y las regiones dinámicas se resaltan en el grupo B. El grupo C incluye los grupos A y B y, por lo tanto, corresponden al procesamiento LSCI estándar.

Para estudiar el contraste en función del tiempo de exposición y los diferentes valores de  $\delta$ , seleccionamos una región de interés (ROI) de 10x100 píxeles centrada en la región dinámica que se muestra en la Fig. 22. Los valores de contraste en esta región fueron promediados y se obtuvo un valor único representativo. Este procedimiento se repitió para los grupos A, B y C.

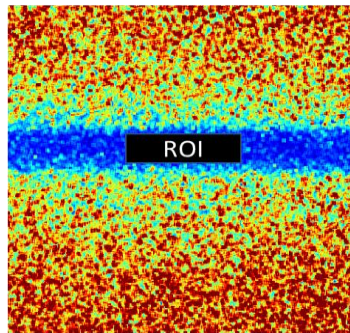


Fig. 22 La región de interés (ROI) se centró en el capilar, donde los valores de  $K^2$  se promediaron en esta región para obtener un valor representativo.

La Fig. 23 (a) muestra la curva experimental de  $K^2$  (símbolos) en función del tiempo de exposición, obtenido del ROI del grupo C, para diferentes  $\delta$ . Para un valor  $\delta$  dado,  $K^2$  es máximo para un tiempo de exposición corto ( $T$ ) y decae para  $T$  más grande, alcanzando un valor constante ( $K_s^2$ ) para tiempos de exposición más largos, según lo predicho por la ecuación (2.5.2) El desplazamiento observado aumenta con el grosor de  $\delta$  debido al esparcimiento estático. Las líneas continuas corresponden a ajustes teóricos a la ecuación (2.6.1). Es notable la concordancia entre la teoría y el experimento.

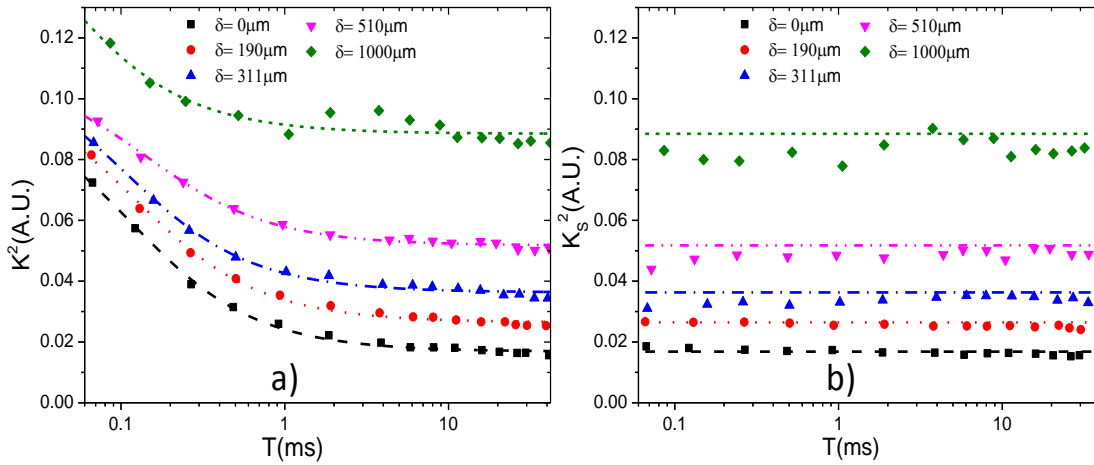


Fig. 23 Valores Experimentales de  $K^2$  (símbolos) como función de  $T$  para diferentes  $\delta$  y su ajuste teórico (líneas discontinuas). a). valores del grupo C y ajuste a la ecuación (2.5. 1), b) valores del grupo A y ajuste a la ecuación (2.5. 2).

La Fig. 23 (b) muestra un análisis similar para el grupo A. Curiosamente, para un valor  $\delta$  dado,  $K^2$  permanece constante para todos los tiempos de exposición, es decir, la contribución de la región estática del ROI para el contraste global es independiente de  $T$  y aumenta con el grosor de la capa, como se esperaba de la Ec. (2.5. 1). Además, el comportamiento asintótico de  $K^2$  parece ser una continuación de los valores de la Fig. 23 (a) y se unen ambas partes a) y b) las cuales coinciden casi perfectamente. Por lo tanto, nuestro análisis sugiere que las primeras PC contienen el componente estático de  $K^2$  y, lo que es más importante, podemos separar el componente estático del dinámico.

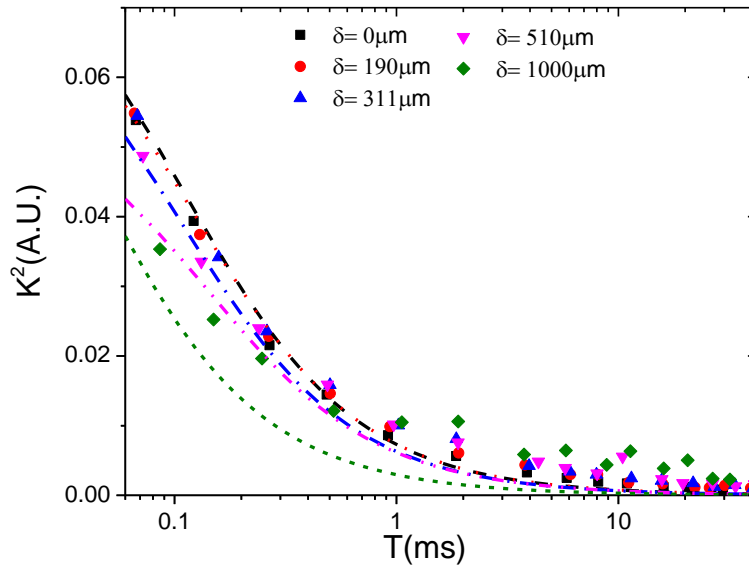


Fig. 24 Grupo C-A (símbolos) y ajuste teórico de la ecuación (2.5. 3). (líneas discontinuas)

La componente dinámica del contraste ( $K_D^2$ ) se obtiene restando el contraste del grupo A del grupo C. La Fig. 24 muestra  $K_D^2$  como función de  $T$  para diferentes  $\delta$ . Los símbolos corresponden a los resultados experimentales y la línea discontinua corresponde a los ajustes de la ecuación (2.5.3). Curiosamente, los valores de contraste obtenidos son casi independientes del grosor de las capas de epidermis para todos los tiempos de exposición empleados en este estudio. Este resultado es fundamental para calcular el índice de flujo de perfusión, el cual es proporcional a la velocidad del flujo sanguíneo (Boas D.A., 2010):  $SFI \propto 1/K_D^2$  de una manera más precisa ya que la influencia del speckle estático se ha filtrado.

A continuación, mostramos de forma esquemática el filtrado, en el cual permite recuperar mayoritariamente la influencia del speckle dinámico Fig. 25.

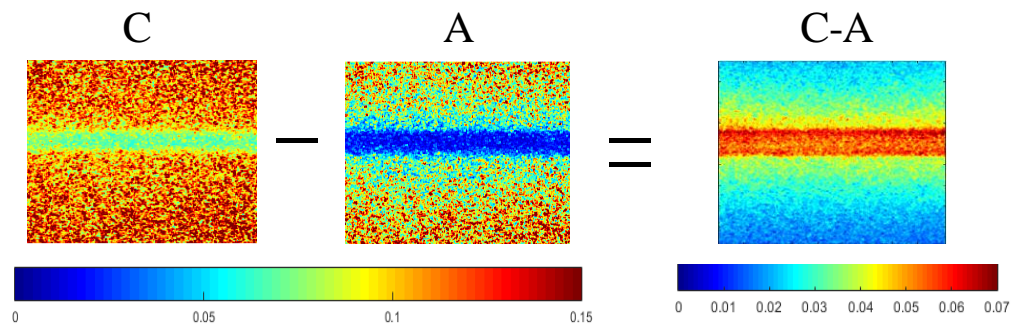


Fig. 25 diagrama para filtrar la componente dinámica a partir de las imágenes C y A

Cabe resaltar que es más eficiente recuperar la parte dinámica (capilar) de la diferencia, C-A que, solo de B, esto es debido a que en B se acentúan fuertemente los efectos del ruido del sistema como puede ser el ruido de disparo, corriente oscura y fluctuaciones debida a la fuente de iluminación (Chenge Wang, 2019).

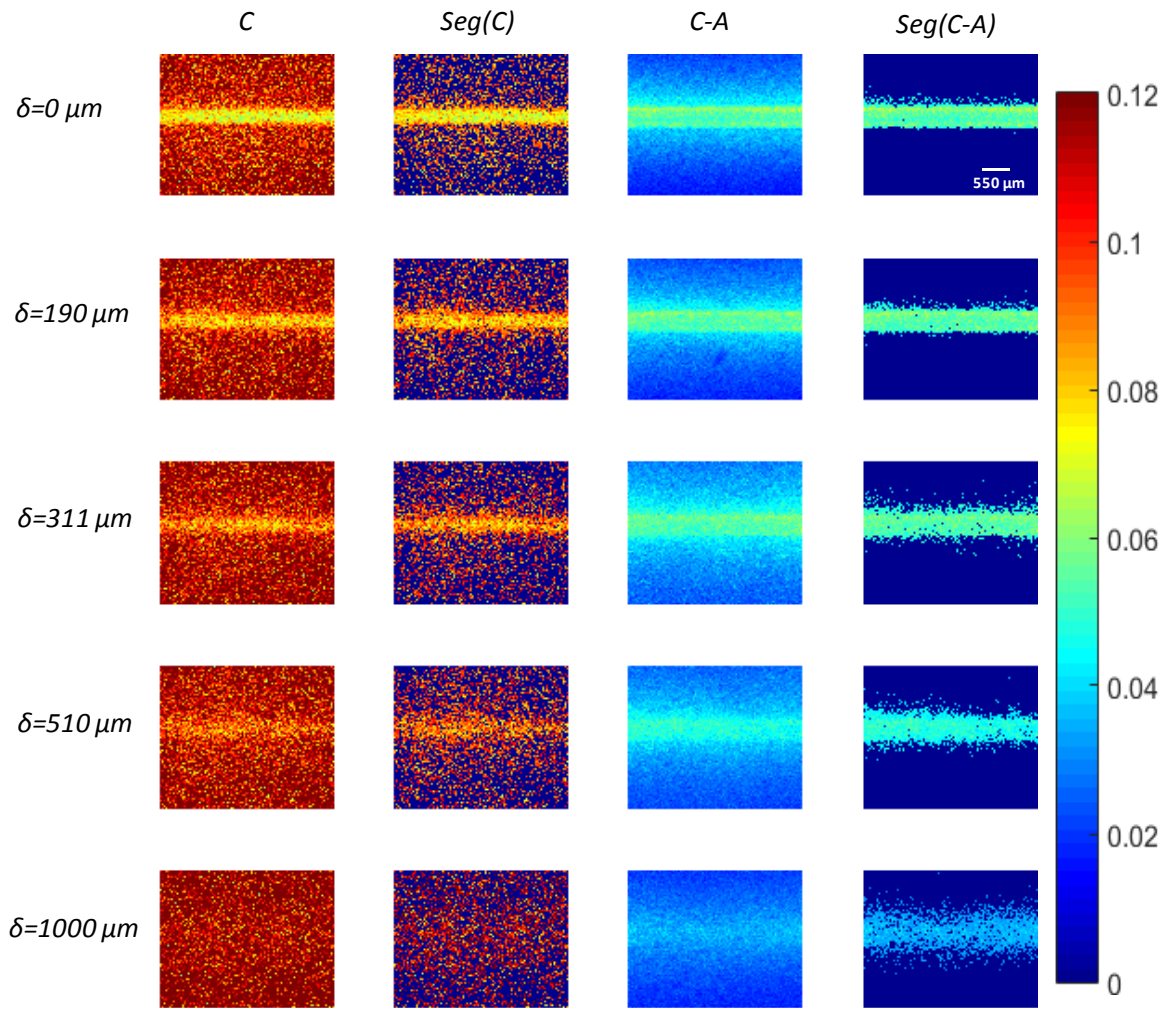


Fig. 26 Comparación entre el LSCI tradicional (C) y nuestra propuesta C-A con su segmentación correspondiente por medios K (2da y 4ta columnas).

La Fig. 26 muestra una comparación entre el LSCI estándar (grupo C) y el contraste dinámico basado en PCA (grupo C-A). De izquierda a derecha, la primera columna muestra imágenes de  $K^2$  para el LSCI estándar (grupo C) para diferentes valores de  $\delta$ . A medida que aumenta el grosor  $\delta$  de la capa de epidermis, se hace cada vez más difícil identificar el vaso sanguíneo, siendo casi imposible distinguirlo a  $\delta = 1000 \mu\text{m}$ . En la segunda columna, utilizamos la técnica de segmentación conocida como K-mean, comúnmente utilizada en el procesamiento de imágenes digitales (R. C. Gonzalez, 2009) para segmentar las imágenes del grupo C (etiquetadas como Seg (C)). Básicamente, en la

técnica de segmentación, los píxeles de una imagen se agrupan de acuerdo con sus valores. Incluso en este caso, es difícil distinguir el perfil de los vasos sanguíneos a  $\delta = 1000 \mu\text{m}$ . La tercera columna corresponde al contraste dinámico obtenido de la diferencia entre las imágenes LSCI tradicionales (Grupo C) y las imágenes recuperadas con la primera PC (Grupo A), etiquetadas como imágenes C-A. Su segmentación correspondiente (Seg (C-A)) se muestra en la última columna. Se obtiene una mejora obvia en la visualización del perfil de los vasos sanguíneos, particularmente para  $\delta = 1000 \mu\text{m}$  donde las otras alternativas fallan.

### ***4.3 Análisis de curtosis***

Aunque la segmentación ayuda a visualizar los vasos sanguíneos profundos, la región vecina correspondiente a la transición entre regiones estáticas y dinámicas no está bien definida. Para resolver este problema, aplicamos el análisis de curtosis a las imágenes segmentadas. La curtosis se ha utilizado con éxito como parámetro para estimar los límites de los vasos sanguíneos en las imágenes LSCI (JD, 2007), (K. E. Barrett). El análisis de curtosis se utiliza como un paso posterior al procesamiento para definir mejor la región dinámica (vasos sanguíneos) en las imágenes C y C-A (Fig. 26 ). La Fig. 27 muestra la ubicación automática de los vasos sanguíneos obtenida del análisis de curtosis para  $\delta = 0, 510$  y  $1000 \mu\text{m}$ . Para más detalles sobre el análisis de curtosis ver (H. Peregrina-Barreto, 2017). Cuando el análisis se aplica a Seg (C) y  $\delta = 0$ , la ubicación automática del vaso sanguíneo (marcadores de colores redondos °) se aproxima a su posición real (líneas negras verticales paralelas), como se muestra en la Fig. 27 (a). Sin embargo, a medida que aumenta la profundidad ( $\delta > 510 \mu\text{m}$ ), la ubicación se aleja de la referencia porque aumenta el ruido alrededor del vaso, lo que hace que el perfil del vaso tenga una distribución normal y, por lo tanto, una curtosis más baja. Por lo tanto, para una ubicación precisa de los vasos sanguíneos, es necesario que el perfil tenga una curtosis alta y que el algoritmo LSCI estándar (imagen Seg (C)) a gran profundidad no proporcione dicha condición. Fig. 26 (b) muestra los perfiles obtenidos de las imágenes Seg (C-A) a las mismas profundidades que la gráfica anterior. Estos perfiles mantienen un alto nivel de curtosis incluso cuando la profundidad aumenta y la ubicación automática del vaso sanguíneo está más cerca de la ubicación real. Este hecho demuestra la efectividad de PCA como herramienta para separar regiones estáticas y dinámicas de imágenes LSCI.

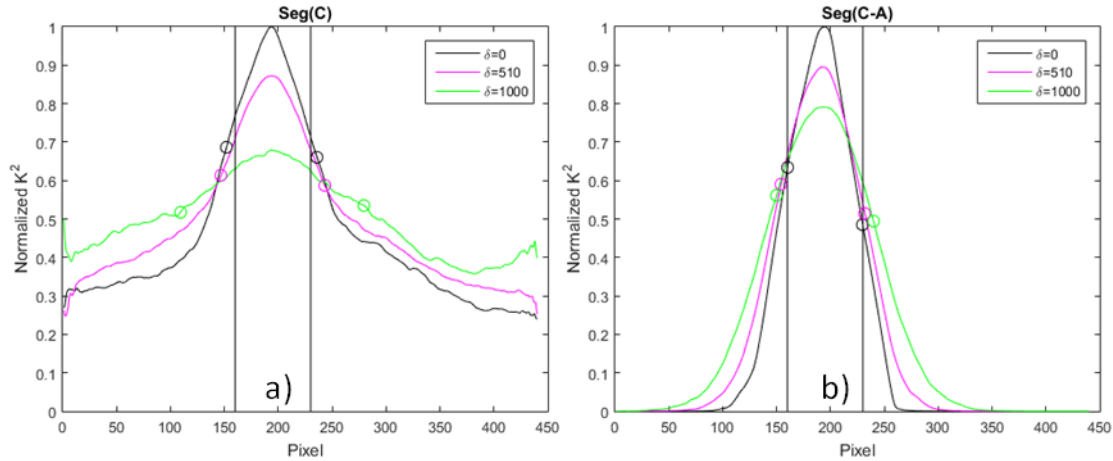


Fig. 27 a) Ubicación del capilar (líneas verticales) de los perfiles para C, b) de manera similar para C-A

Estos resultados se resumen en la Tabla 1 y muestran que incluso segmentando la imagen C, el error estimado para la ubicación del recipiente más profundo es de alrededor del 140%. Por otro lado, cuando combinamos PCA y LSCI, la ubicación del capilar mejora y el ancho estimado es más preciso, el error es un orden de magnitud menor en comparación con el algoritmo LSCI estándar.

Tabla 1 Ancho real y estimado del capilar para diferentes valores  $\delta$

$\delta$ ( $\mu\text{m}$ )	Ancho real (pixel)	Seg(C) (pixel)	Error (%)	Seg(C-A) (pixel)	Error (%)
0	70	84	20	70	0
510	70	94	37	78	11
1000	70	170	143	90	28



## *5 Conclusiones*

La técnica de laser speckle imaging basada en el análisis de contraste (LSCI), es una técnica simple y robusta que encuentra aplicaciones en áreas donde se requiere un mapeo directo de la dinámica sanguínea (i.e flujo sanguíneo en el cerebro), y presenta una alta resolución espacial y temporal (dependiendo del modo de medición). Sin embargo, estas cualidades se ven opacadas cuando el grosor de las estructuras que generan la información estática (huesos, cráneo, epidermis) aumenta. En otras palabras, la técnica deja de ser eficiente cuando el speckle estático predomina sobre el speckle dinámico. La naturaleza de la técnica hace imposible bajo las condiciones antes expuestas la separación eficiente de la parte dinámica de la estática de manera directa. En esta tesis se abordó esa problemática y se propuso una metodología basada en la combinación de análisis estadístico multivariado con LSCI, la técnica estadística utilizada fue la de análisis de componentes principales (PCA), dado que es altamente compatible con el análisis de imágenes, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el PCA aplicado al LSCI permite separar la componente estática de la dinámica en imágenes de speckle sin procesar, este método permite alcanzar una visualización de vasos sanguíneos de hasta 1000 $\mu$ m de profundidad. Otra aportación importante de este trabajo es la inclusión del criterio de Guttman-Kaiser, el cual permite establecer un parámetro de umbral para separar o discernir de entre el vector de componentes principales obtenidos, las componentes principales que contienen la información estática y dinámica. Adicionalmente se utilizó el análisis de la curtosis para establecer de manera cuantitativa la efectividad de la propuesta, los resultados encontrados demostraron que la identificación del vaso sanguíneo fue más eficiente y precisa, es decir la curtosis encontrada fue del tipo leptocúrtica, lo que implicó que, la metodología propuesta si fue capaz de separar eficientemente la parte estática de la dinámica aun en las regiones límites como lo son las paredes del vaso sanguíneo, donde es más alta la mezcla de información estática y dinámica. Una observación que es importante hacer es que el método propuesto funciona bien cuando la varianza entre los datos o imágenes es suficiente para ser distribuida a lo largo de todos los componentes principales, esto es cuando la dinámica de la muestra es relativamente baja o para tiempos de exposición cortos, si esta condición no se cumple, el proceso de separación o filtrado de la información falla debido a que el primer componente principal atrae toda la información comparado con el resto de los componente.



## ***6 Trabajo a futuro***

En el trabajo de investigación se abren nuevas puertas para sobre pasar los límites de un sistema LSCI estándar, el cual por sus atractivos como su bajo costo y fácil aplicación se establecido como un método de análisis de actividad en diferentes campos de investigación, particularmente en el caso del flujo sanguíneo se tiene muchas preguntas sobre la fiabilidad del sistema.

Por lo cual mediante nuestra aportación es posible indagar a profundidad sobre, cuales son los factores que delimitan la extracción de información del sistema, así como que algoritmos de procesamiento de imágenes son más adecuados para un determinado caso particular.

Un siguiente paso en nuestra investigación es crear un algoritmo, en el que se pueda reconocer de forma automática cual es el procesamiento de datos más eficiente, para extraer una determinada información. Más aún que muestre una interpretación en base a los criterios en los cuales un especialista esté interesado.

## *Como resultado de este trabajo de investigación se presentaron los siguientes productos:*

### **Artículos de revistas internacionales:**

1. **Visualization of in vitro deep blood vessels using principal component analysis based laser speckle imaging.** Arias-Cruz, Jose Angel, Chiu, Roger, Peregrina-Barreto, Hayde, Ramos-Garcia, Ruben, Spezzia-Mazzocco, Teresita, & Ramirez-San-Juan, Julio C., (2019). Biomedical Optics Express.

### **Resumen in extenso presentados en congresos:**

1. **Visualization of deep blood vessels in speckle imaging using homogeneity measurement of the co-occurrence matrix.** Jose Angel Arias-Cruz, Cruz Elizabeth Perez-Corona, Hayde Peregrina-Barreto, Ruben Ramos-Garcia, and Julio Cesar Ramirez-San-Juan, (2015). Proc. SPIE 9660, SPECKLE 2015: VI International Conference on Speckle Metrology.
2. **Dynamic speckle simulation to study microorganism simple.** Jose Angel Arias-Cruz, David I. Loaiza-Toscueto, Teresita Spezzia-Mazzocco, Ruben Ramos-Garcia, Hayde Peregrina-Barreto and Julio C. Ramirez-San-Juan, (2020). BIOIMAGING the 13th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies.

### **Reuniones académicas:**

1. **Use of co-occurrence matrix in the visualization of blood vessels deep in the technical Laser Speckle imaging.** Jose Angel Arias-Cruz, H. Peregrina-Barreto, C. E. Pérez-Corona, R. Ramos-García and J.C. Ramírez- San-Juan, (2015). Light in Science, Light in Life (LiSci) Querétaro, México.
2. **Visualization of in vitro deep blood vessels using principal component analysis based laser speckle imaging.** Arias-Cruz, Jose Angel, Chiu, Roger, Peregrina-Barreto, Hayde, Ramos-Garcia, Ruben, Spezzia-Mazzocco, Teresita, & Ramirez-San-Juan, Julio C., (2017). Mexican Optics and Photonics Meeting. Puebla, México.
3. **Visualization of in vitro deep blood vessels using principal component analysis based laser speckle imaging.** Arias-Cruz, Jose Angel, Chiu, Roger, Peregrina-Barreto, Hayde, Ramos-Garcia, Ruben, Spezzia-Mazzocco, Teresita, & Ramirez-San-Juan, Julio C., (2019). Congreso de Tópicos Avanzados de Óptica y Electrónica. Puebla, México.
4. **Visualization of in vitro deep blood vessels using principal component analysis based laser speckle imaging.** Arias-Cruz, Jose Angel, Chiu, Roger, Peregrina-Barreto, Hayde, Ramos-Garcia, Ruben, Spezzia-Mazzocco, Teresita, & Ramirez-San-Juan, Julio C., (2019). MobiCom

2019 The 25th Annual International Conference on Mobile Computing and Networking Oct  
21-25, Los Cabos, México.

# Referencias

- A. B. Parthasarathy, W. J. (2008). *Robust flow measurement with multi-exposure speckle imaging* (Vol. 16). Opt. Express.
- Aluja, T. M. (1999). *Aprender de los datos: el análisis de componentes principales, una aproximación desde el data mining*. Barcelona: EUB.
- Anderson, T. W. (1958). *An Introduction to Multivariate Analysis*. N. York: Wiley.
- Anne Humeau-Heurtier, G. M. (2015). Microvascular blood flow monitoring with laser speckle contrast imaging using the generalized differences algorithm. *Microvascular Research*, 98, 54-61.
- Asakura, Y. A. (1991). Bio-speckle phenomena and their applications to the evaluation of blood flow. In *Optical Laser Technologies*.
- Au., R. B. (n.d.). Multi-layer silicone phantoms for the evaluation of quantitative optical techniques in skin imaging.
- B., D. (2007). Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow. *Optica Applicata*, XXXVII(1–2).
- Berne, B. j. (n.d.). dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics. 11-16.
- Bianco, V. M. (2017). Food quality inspection by speckle decorrelation properties of bacteria colonies. *Optical Metrology*.
- Boas D.A., D. A. (2010). *Laser speckle contrast imaging in biomedical*. (Vol. Opt. 15). optics J. Biomed.
- Boj, E. D. (2010). *Distance-based local linear regression for functional predictors*. Computational Statistics and Data Analysis.
- Chenge Wang, Z. C. (2019). Robust quantitative single-exposure laser speckle imaging with true flow speckle contrast in the temporal and spatial domains. *Biomedical Optics Express*, 10(8).
- Claudia P. Valdes, H. M. (2014). Speckle contrast optical spectroscopy, a non-invasive, diffuse optical method for measuring microvascular blood flow in tissue. *Biomed. Opt. Express*, 5, 2769-2784.
- D. D. Duncan, a. S. (2008). The copula: a tool for simulating speckle dynamics. *J. Opt. Soc. Am.*(25), 231-237.
- Dainty, J. C. (1984). *Laser Speckle and Related Topics*. Berlin: Springer-Verlag.
- David A. Boas, S. S. (2016). Establishing the diffuse correlation spectroscopy signal relationship with blood flow. *Neurophotonics*.
- Draijer, M. (2009). *Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion* (Vol. Vol.24). Lasers Med. Sci.
- Goodman, J. W. (2007). Random Phasor Sums. In *Speckle Phenomena in Optics: Theory and Applications* (pp. 7-11). Roberts and Company Publishers.
- H. Cheng, Q. L. (2003). Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution. *J. Biomed. Opt.*, 8(3), 559–564.

- H. Fujii, J. U. (1976). Computer simulation study of image speckle patterns with relation to object surface profile. *Journal of the Optical Society of America*, 66, 1222-1236.
- H. Peregrina-Barreto, E. P.-C.-M.-G.-S.-J. (2017). Use of kurtosis for locating deep blood vessels in raw speckle imaging using a homogeneity representation. *J. Biomed. Opt.*, 22, 066004.
- Hari M. Varma, C. P. (2014). Speckle contrast optical tomography: A new method for deep tissue three-dimensional tomography of blood flow. *Biomed. Opt. Express*, 5, 1275-1289.
- Hecht, E. (2016). *Optics*. Pearson.
- Humeau-Heurtier A., M. G. (2015). Microvascular blood flow monitoring with laser speckle contrast imaging using the generalized differences algorithm. *Microvascular Research*, 54-61.
- Ingemar Fredriksson, M. H. (2019). Machine learning in multiexposure laser speckle contrast imaging can replace conventional laser Doppler flowmetry. *Journal of Biomedical Optics*.
- J. C. Dainty. (1984). *Laser Speckle and Related Topics*. Springer .
- J. R. Velázquez-González, H. P.-B.-M.-S.-J. (2017). Robust laser speckle contrast images suitable for blood vessel visualization. *IEEE International Autumn Meeting on Power, Electronics and Computing (ROPEC)*, 1-6.
- JD, B. (2007). *Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow* (Vol. Opt Appl XXXVII).
- Jose Angel Arias-Cruz, R. C.-B.-G.-M.-S.-J. (2019). "Visualization of in vitro deep blood vessels using principal component analysis based laser speckle imaging. *Biomed. Opt. Express* , 10, 2020-2031.
- Jr., H. J. (2009). *Dynamic Laser Speckle and Applications*. (C. P. Group, Ed.) 181-220.
- K. E. Barrett, S. M. (n.d.). Blood as a circulatory fluid.
- K. M. Ribeiro, R. A. (2014). Principal component analysis in the spectral analysis of the dynamic laser speckle patterns. *J.Europ. Opt. Soc. Rap. Public*, 9.
- Kaiser, H. F. (1961). a Note on Guttman'S Lower Bound for the Number of Common Factors. *Br. J. Stat. Psychol.*
- Kim, J. O. (2009). Magnetomotive laser speckle imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 15.
- M. Draijer, E. H. (2009). Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion. *Lasers Med. Sci.*, 24(4), 639–651.
- Mohammad Zaheer Ansari, A. H.-H. (2016). Visualization of perfusion changes with laser speckle contrast imaging using the method of motion history image. *Microvascular Research*, 107, 106-109.
- Mohammad Zaheer Ansari, A. H.-H. (2016). Visualization of perfusion changes with laser speckle contrast imaging using the method of motion history image. *Microvascular Research*, 107, 106-109.
- Nolte, D. D. (2012). *Optical Interferometry for Biology and Medicine*. (S. S. Media, Ed.) 96-98.
- Nossal, R. B. (1981). Model for laser doppler measurements of blood flow in tissu. *Appl. Opt.*
- P.M. Pieczywek, J. C. (2017). Exponentially smoothed Fujii index for online imaging of biospeckle spatial activity. *Computers and Electronics in Agriculture*, 142, 70-78.

- Pedro G. Vaz, A. H.-H. (2016). Laser Speckle Imaging to Monitor Microvascular Blood Flow: A Review. *IEEE REVIEWS IN BIOMEDICAL ENGINEERING*, 9.
- Prahl, S. (1997). Determination of optical properties of turbid media using pulsed photothermal radiometry. *Phy. Med. Biol.*, 37, 1203-1217.
- Preeti D. Minz, A. N. (2014). Intensity based algorithms for biospeckle analysis. *Optik*, 125(14), 3633-3636.
- Preeti D. Minz, A. N. (2014). Intensity based algorithms for biospeckle analysis. *Optik*, 125, 3633-3636.
- R. Bandyopadhyay, A. G. (2005). *Speckle-visibility spectroscopy: A tool to study time-varying dynamics*. Rev. Sci. Instrum.
- R. C. Gonzalez, R. E. (2009). In *J. Biomed. Opt.* (pp. 325-350). PEARSON.
- Rabal, H. A. (2013). Numerical model for dynamic speckle: an approach using the movement of the scatterers. *Pure Appl. Opt.*
- Ramírez-Miquet, E. C. (2017.). Digital imaging information technology for biospeckle activity assessment relative to bacteria and parasite. *Lasers in Medical Science*.
- Regan, J. C. (2014). Photothermal laser speckle imaging. *Optics Letters*, 39.
- Roser, H. R. (2019). *OurWorldInData.org*. (Causes of Death) Retrieved from <https://ourworldindata.org/causes-of-death>
- Schmitt, J. M. (1999). Optical coherence tomography (OCT): a review. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*.
- Sean J. Kirkpatrick, D. D.-G. (2008, December 15). Detrimental effects of speckle-pixel size matching. *OPTICS LETTERS*, 33(24).
- Son, J. L. (2003). Contrast Enhancement of Laser Speckle Contrast Image in Deep Vasculature by Reduction of Tissue Scattering. *Journal of the Optical Society of Korea*, 17, 86-90.
- Song, L. Z. (2016). Simulation of speckle patterns with pre-defined correlation distributions. *Biomedical optics express*.
- Thiriet., M. (2007). Cardiovascular physiology. . In *In Biol. Mech. Blood Flows Part II* (pp. 35-80). CRM Series in Mathematical Physics.
- Webster, J. D. (1996). Laser speckle contrast analysis (LASCA): A non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow. *J. Biomed. Opt.*, 1(2), 174-179.
- Yamada, Y. H. (2016). "Overview of diffuse optical tomography and its clinical applications. *Journal of Biomedical Optics*.
- Yodh, D. B. (1997). Spatially varying dynamical properties of turbid media probed with diffusing temporal light correlation. *J. Opt. Soc. Am.*
- Zheng, B. P. (1994). Feature information extraction from dynamic biospeckle. *Applied optics*.