



INAOE

**“Medición relativa de flujo sanguíneo en
vasos sanguíneos profundos in-vitro”**

Por

Ing. Cruz Elizabeth Pérez Corona

**Tesis sometida como requisito parcial para
obtener el grado de**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN LA
ESPECIALIDAD DE ÓPTICA**

en el

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

Supervisada por:

Dr. Julio César Ramírez San Juan

Dra. Hayde Peregrina Barreto

©INAOE 2015

Derechos Reservados

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



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Doctor Julio Cesar Ramírez San Juan y a la Doctora Hayde Peregrina Barreto por haberme permitido ser parte de su grupo de trabajo durante el desarrollo de esta tesis.

A los sinodales Dr. Francisco Renero, Dr. Roger Chiu, Dr. Jorge Castro, por su paciencia y tiempo que brindaron para mejorar esta tesis.

A todos los catedráticos y compañeros de la coordinación de óptica quienes compartieron muchos de sus conocimientos conmigo.

Agradezco al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE) por haberme dado la oportunidad de pertenecer al cuerpo estudiantil de la misma y por su apoyo para cumplir esta meta.

Finalmente, agradezco a CONACYT por la beca otorgada, la cual fue fundamental para que pudiera lograr este objetivo.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo mi cariño y mi amor a Dios y a las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, por siempre mi corazón y mi agradecimiento a mis padre **David Pérez Rangel** y **Elizabeth Corona Barbosa**.

A mi familia: mis abuelitos Francisco Pérez, Juana Rangel, Matilde Barboza y Lino Corona †. Mis tios y tias en especial a **Erika Corona Barboza**, que siempre me apoyaron y confiaron en mí.

A mis amigos, cuyo apoyo en esta etapa fue muy importante, me ayudaron en el ámbito académico e hicieron que mi estancia en la maestría fuera más alegre.

RESUMEN

El flujo sanguíneo es uno de los parámetros más importante de la función cardiovascular, los cambios relativos del flujo sanguíneo han sido utilizados para diagnósticos clínicos y fisiológicos asociados con problemas vasculares o enfermedades degenerativas, o bien para estudiar la respuesta de ciertos órganos a alguna intervención mecánica o farmacológica. Por esta razón, se han desarrollado diferentes técnicas para obtener mediciones del flujo y localización del vaso sanguíneo, tales como: espectrometría de conteo de fotones, técnica Doppler y Laser Speckle Imaging (LSI), las cuales han mostrado ser eficientes en vasos sanguíneos superficiales, sin embargo, cuando estas técnicas son utilizadas en vasos sanguíneos profundos, entonces presentan serias limitaciones, por lo que se han desarrollado técnicas que hacen uso de un agente externo para localizar el vaso, como por ejemplo: Physico Chemical Tissue Optical Clearing (PCTOC), Magnetomotive Laser Speckle Imaging (MM- LSI), Pulsed PhotoThermal Radiometry (PPTR) y PhotoThermal-LSI (PT-LSI). En esta tesis se utiliza la técnica de LSI para estudiar vasos sanguíneos profundos *in-vitro* y se comparan los resultados de medición de flujo sanguíneo con los algoritmos espacial y temporal. Para estimar el ancho del vaso se hace uso del método de la matriz de co-ocurrencia y del parámetro de homogeneidad. Como resultados se obtuvo que el algoritmo temporal es menos sensible al speckle estático comparado con algoritmo espacial y por lo tanto es el más indicado cuando de medir flujo sanguíneo en vasos profundos se trata. El descriptor de homogeneidad de la matriz de co-ocurrencia resultó un buen parámetro para estimar la posición y el ancho de vasos sanguíneo profundo.

ABSTRACT

The blood flow is one of the most important parameters of cardiovascular function. Relative measurements of blood flow changes can be useful to clinicians and physiologists to quantify vascular problems associated with degenerative diseases, or for studying responses to mechanical or pharmacological interventions. For this purpose, different techniques have been developed to provide this information and the localization of the blood vessel, for example: photon counting spectrometry, Doppler technique and Laser Speckle Imaging (LSI). Unfortunately, when the above mentioned techniques are used in deep blood vessels present serious limitations, therefore, techniques that used an external agent to localize the blood vessel have been developed: Physico Chemical Tissue Optical Clearing (PCTOC), Magnetomotive Laser Speckle Imaging (MM- LSI), Pulsed PhotoThermal Radiometry (PPTR) and PhotoThermal-LSI (PT-LSI). In this thesis the technique of LSI was applied in in-vitro deep blood vessels, and the behavior of the blood flow was observed in the spatial and temporal algorithm. In order to estimate the position and width of deep blood vessel we used the matrix method of co-occurrence and the parameter of homogeneity. As a result it was found that the temporal algorithm is less sensitive to the static speckle and therefore has a better performance than the spatial algorithm and descriptor homogeneity of the co-occurrence matrix is a good parameter to estimate the width of the deep blood vessel.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	4
2.1 Speckle o moteado.....	4
2.1.1 Definición.....	4
2.1.2 Tamaño del Speckle.....	5
2.1.3 Speckle estático y speckle dinámico.....	7
2.2 Laser Speckle Imaging (LSI).....	8
2.2.1 Contraste integrado.....	11
2.2.2 Promedio de la intensidad integrada en el tiempo.....	12
2.2.3 Varianza de la intensidad integrada en el tiempo.....	14
2.2.4 Intensidad integrada para scattering dinámico y estático.....	17
2.2.5 Análisis espacial.....	21
2.2.6 Análisis temporal.....	24
2.3 Matriz De Co-ocurrencia.....	26
2.3.1 Calculo de la matriz de co-ocurrencia.....	28
2.3.2 Descriptores de la textura.....	31
3. Arreglo experimental	35
3.1 Maniquí de piel.....	35
3.2 Arreglo experimental óptico.....	37

4. Resultados experimentales	39
4.1 Análisis espacial.....	39
4.2 Análisis temporal.....	42
4.3 Estimación de la posición y tamaño de vasos sanguíneos profundos.....	44

5. Conclusiones generales	49
--	----

Trabajo a futuro

Anexos

Bibliografía



INAOE

**“Medición relativa de flujo sanguíneo en
vasos sanguíneos profundos in-vitro”**

Por

Ing. Cruz Elizabeth Pérez Corona

**Tesis sometida como requisito parcial para
obtener el grado de**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN LA
ESPECIALIDAD DE ÓPTICA**

en el

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

Supervisada por:

Dr. Julio César Ramírez San Juan

Dra. Hayde Peregrina Barreto

©INAOE 2015

Derechos Reservados

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



RESUMEN

El flujo sanguíneo es uno de los parámetros más importante de la función cardiovascular, los cambios relativos del flujo sanguíneo han sido utilizados para diagnósticos clínicos y fisiológicos asociados con problemas vasculares o enfermedades degenerativas, o bien para estudiar la respuesta de ciertos órganos a alguna intervención mecánica o farmacológica. Por esta razón, se han desarrollado diferentes técnicas para obtener mediciones del flujo y localización del vaso sanguíneo, tales como: espectrometría de conteo de fotones, técnica Doppler y Laser Speckle Imaging (LSI), las cuales han mostrado ser eficientes en vasos sanguíneos superficiales, sin embargo, cuando estas técnicas son utilizadas en vasos sanguíneos profundos, entonces presentan serias limitaciones, por lo que se han desarrollado técnicas que hacen uso de un agente externo para localizar el vaso, como por ejemplo: Physico Chemical Tissue Optical Clearing (PCTOC), Magnetomotive Laser Speckle Imaging (MM- LSI), Pulsed PhotoThermal Radiometry (PPTR) y PhotoThermal-LSI (PT-LSI). En esta tesis se utiliza la técnica de LSI para estudiar vasos sanguíneos profundos *in-vitro* y se comparan los resultados de medición de flujo sanguíneo con los algoritmos espacial y temporal. Para estimar el ancho del vaso se hace uso del método de la matriz de co-ocurrencia y del parámetro de homogeneidad. Como resultados se obtuvo que el algoritmo temporal es menos sensible al speckle estático comparado con algoritmo espacial y por lo tanto es el más indicado cuando de medir flujo sanguíneo en vasos profundos se trata. El descriptor de homogeneidad de la matriz de co-ocurrencia resultó un buen parámetro para estimar la posición y el ancho de vasos sanguíneo profundo.

ABSTRACT

The blood flow is one of the most important parameters of cardiovascular function. Relative measurements of blood flow changes can be useful to clinicians and physiologists to quantify vascular problems associated with degenerative diseases, or for studying responses to mechanical or pharmacological interventions. For this purpose, different techniques have been developed to provide this information and the localization of the blood vessel, for example: photon counting spectrometry, Doppler technique and Laser Speckle Imaging (LSI). Unfortunately, when the above mentioned techniques are used in deep blood vessels present serious limitations, therefore, techniques that used an external agent to localize the blood vessel have been developed: Physico Chemical Tissue Optical Clearing (PCTOC), Magnetomotive Laser Speckle Imaging (MM- LSI), Pulsed PhotoThermal Radiometry (PPTR) and PhotoThermal-LSI (PT-LSI). In this thesis the technique of LSI was applied in in-vitro deep blood vessels, and the behavior of the blood flow was observed in the spatial and temporal algorithm. In order to estimate the position and width of deep blood vessel we used the matrix method of co-occurrence and the parameter of homogeneity. As a result it was found that the temporal algorithm is less sensitive to the static speckle and therefore has a better performance than the spatial algorithm and descriptor homogeneity of the co-occurrence matrix is a good parameter to estimate the width of the deep blood vessel.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	4
2.1 Speckle o moteado.....	4
2.1.1 Definición.....	4
2.1.2 Tamaño del Speckle.....	5
2.1.3 Speckle estático y speckle dinámico.....	7
2.2 Laser Speckle Imaging (LSI).....	8
2.2.1 Contraste integrado.....	11
2.2.2 Promedio de la intensidad integrada en el tiempo.....	12
2.2.3 Varianza de la intensidad integrada en el tiempo.....	14
2.2.4 Intensidad integrada para scattering dinámico y estático.....	17
2.2.5 Análisis espacial.....	21
2.2.6 Análisis temporal.....	24
2.3 Matriz De Co-ocurrencia.....	26
2.3.1 Calculo de la matriz de co-ocurrencia.....	28
2.3.2 Descriptores de la textura.....	31
3. Arreglo experimental	35
3.1 Maniquí de piel.....	35
3.2 Arreglo experimental óptico.....	37

4. Resultados experimentales	39
4.1 Análisis espacial.....	39
4.2 Análisis temporal.....	42
4.3 Estimación de la posición y tamaño de vasos sanguíneos profundos.....	44

5. Conclusiones generales	49
--	----

Trabajo a futuro

Anexos

Bibliografía

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, una de sus principales funciones es proteger los órganos internos del medio ambiente. Está compuesta por tres capas, epidermis, dermis y tejido subcutáneo. La epidermis es la capa externa la cual se encuentra en mayor contacto con el entorno, la dermis proporciona a la piel la propiedad de elasticidad y el tejido subcutáneo es el estrato más profundo de la piel, donde se encuentran las células grasas, nutrientes, las glándulas sebáceas y sudoríparas [1].

Como la mayoría de los materiales, la piel tiene propiedades ópticas particulares, las cuales se manifiestan al hacer incidir luz láser directamente sobre esta, la propagación de los fotones en el interior del tejido es caracterizada por las propiedades de reflexión, esparcimiento, absorción y transmisión. Estos acontecimientos dependerán de la intensidad y longitud de onda de la fuente de luz utilizada, así como de las propiedades y componentes de la piel.

Dentro de la piel se encuentran las arterias, las cuales son pequeños vasos encargados de llevar la sangre, la cual es un líquido rojizo, opaco y espeso; su color depende de la hemoglobina de los eritrocitos, quienes se encargan de administrar oxígeno a cada una de las células.

A la circulación de la sangre a través de un vaso sanguíneo se le denomina flujo sanguíneo, el cual es uno de los parámetros más importantes de la función cardiovascular. El flujo sanguíneo se define como el volumen de sangre que atraviesa la sección transversal de un vaso por unidad de tiempo.

A partir del flujo se puede conocer, y calcular la cantidad de sangre que está circulando en un organismo así como el tamaño de los vasos. Además se puede indicar el estado de funcionalidad de los vasos (rigidez, obstrucción, etc.), con lo cual también se puede determinar el estado del sistema circulatorio.

Para medir el flujo sanguíneo se han desarrollado varias técnicas basadas en el análisis de dispersión de luz dinámica, entre las que podemos mencionar: espectrometría de conteo de fotones, técnica Doppler y Laser Speckle Imaging (LSI) [2].

La espectrometría de conteo de fotones mide el flujo sanguíneo en vasos individuales. Se basa en la difracción de un láser con longitud de onda λ . Se obtiene una señal con un fotodetector que tiene una apertura más pequeña que las motas de speckle esparcidas, después se analizan las señales de intensidad con un espectrómetro digital de frecuencias y se convierten a una señal digital para analizarlas posteriormente [3].

La técnica Doppler es un análisis estadístico del patrón de speckle en un punto específico en la superficie del tejido. Proporcionando una alta resolución temporal de los cambios vasculares. Cuando se detecta la luz que se refleja o esparce del tejido de distintos puntos, se realiza un barrido para poder tener una imagen de velocidades por medio de estas variaciones de frecuencia [4].

A principios de los 80's, Briers et al [2] desarrollaron Laser Speckle Imaging (LSI) [2] como una técnica óptica de una sola exposición para medir flujo sanguíneo en retina. LSI se basa en la medición del contraste de luz dispersada dinámicamente, la cual, al ser integrada sobre un detector óptico (por ejemplo una CCD) es capaz de producir mapas de flujo sanguíneo. En la década de los 90's, LSI

tuvo un gran impulso, pues se comenzó a utilizar para obtener mapas de flujo sanguíneo del cerebro y piel, ya que el avance tecnológico permitía obtener y procesar las imágenes de manera más rápida [4], además de su bajo costo comparado con otros sistemas de medición de flujo sanguíneo como las técnicas Doppler.

LSI ha demostrado ser eficiente en la medición de flujo sanguíneo cuando de vasos superficiales se trata, sin embargo, muestra serias limitaciones al ser utilizado en vasos sanguíneos profundos. Para resolver este problema de la visualización de vasos sanguíneos profundos, se han desarrollado algunas otras técnicas tales como: PhysicoChemical Tissue Optical Clearing (PCTOC) [5], Magnetomotive Laser Speckle Imaging (MM- LSI) [6], Pulsed PhotoThermal Radiometry (PPTR) [7] y PhotoThermal-LSI (PT-LSI) [8], que requieren de algún agente externo, es decir son invasivas.

En este trabajo de tesis, para visualizar y medir el flujo sanguíneo en vasos profundos se propone utilizar los algoritmos temporal y espacial de la técnica de LSI sin hacer uso de un agente externo. Además proponemos el método de la matriz de co-ocurrencia para localizar la posición y ancho estimado del vaso.

Esta tesis está organizada de la siguiente manera: en el segundo capítulo se dará una explicación a la teoría básica de la técnica de LSI y el método de la matriz de co-ocurrencia. El tercer capítulo trata sobre la fabricación de los maniqués que simulan las propiedades de la piel humana y el arreglo experimental que se utilizaron en esta tesis. En el cuarto capítulo se presentan los resultados experimentales obtenidos al aplicar LSI y la matriz de co-ocurrencia para medir, visualizar y localizar los vasos sanguíneos profundos. Finalmente, el capítulo 5 muestra las conclusiones generales y los puntos a tratar en un trabajo a futuro.

CAPÍTULO 2.

MARCO TEÓRICO

Este capítulo trata de las bases teóricas de la formación de un patrón de speckle, los antecedentes y principios de la técnica de LSI, los algoritmos espacial y temporal. Además del método de la matriz de co-ocurrencia y los descriptores propuestos por Haralick.

2.1 Speckle o moteado

A partir de la invención del láser en 1960, los científicos comenzaron a utilizar esta fuente de luz observando que la mayoría de los objetos iluminados por el láser aparecen cubiertos por un patrón irregular de puntos oscuros y brillantes que les confiere un aspecto granuloso denominado speckle o moteado, descubierto por primera vez por Ridger y Gordon como la interacción entre las ondas difundidas aleatoriamente por los diferentes puntos de las superficies rugosas (Fig. 2.1) [9].

2.1.1 Definición

Cuando luz coherente interactúa con un medio de dispersión aleatorio, en un plano de observación se capturan la luz que ha sido esparcida de varias posiciones del medio, resultando un patrón de interferencia constructiva y destructiva que varía con el acomodo de las partículas de esparcimiento con respecto al detector, dicho patrón se conoce como patrón de speckle (Fig. 2.1) [4].

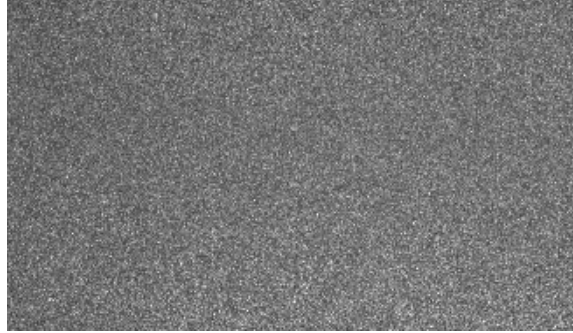


Fig.2.1 Patrón de Speckle

2.1.2 Tamaño del Speckle

El speckle se puede observar mediante dos métodos, speckle objetivo (Fig. 2.2a) y speckle subjetivo (Fig. 2.2b). El patrón de speckle formado por una geometría en espacio libre es llamado speckle objetivo. El tamaño del speckle d_{sp} , es un promedio estadístico de la distancia entre regiones adyacentes de la intensidad máxima y mínima, para este método de formación de speckle en primera aproximación es [9]:

$$d_{sp} = 1.22\lambda \frac{z}{D} \quad (2.1)$$

donde λ es la longitud de onda de la radiación formando un patrón de speckle, z es la distancia de la superficie rugosa al punto de observación y D es el diámetro de la parte iluminada de la superficie rugosa [9].

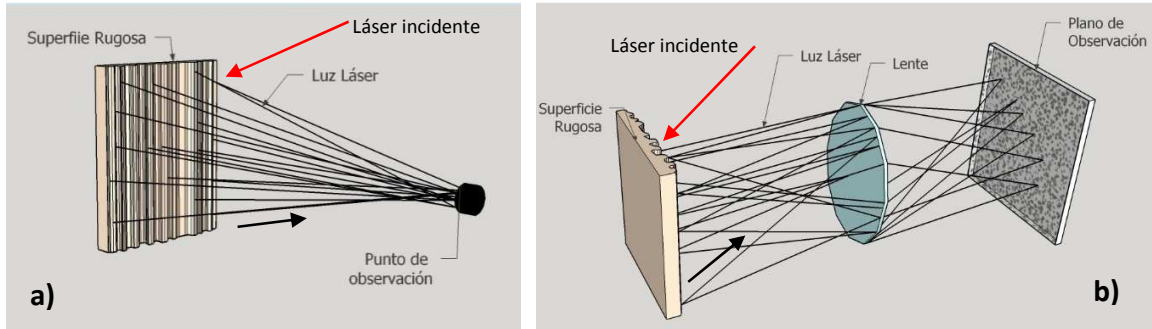


Fig. 2.2 a) Speckle objetivo, b) Speckle subjetivo

Si, el patrón de speckle es formado por coleccionar con una lente la luz esparcida y esta es enfocada en una pantalla, se forma un patrón de speckle subjetivo (Fig. 2.2b). El tamaño promedio del speckle está relacionado al $f/número\ de\ la\ lente$, también llamada razón de apertura F de la lente y la amplificación M a la que la lente está operando [9]:

$$d_{sp} = 1.22\lambda(1+M)F = 1.22\lambda(1+M)\frac{f}{D} \quad (2.2)$$

con f siendo la longitud focal de la lente y D el diámetro.

El patrón de speckle subjetivo puede ser tratado como la imagen de un patrón de speckle de diferente escala en el plano de la superficie esparcida. Para este speckle el tamaño promedio está dado por [9]:

$$d_{sp} = \frac{1.22\lambda(1+M)F}{M} = \frac{1.22\lambda(1+M)}{M} \frac{f}{D} \quad (2.3)$$

Entonces, para ambos esquemas de la formación de speckle puede ser visto que es posible un tamaño de speckle comparable con la longitud de onda de la radiación formando el patrón de speckle [9].

2.1.3 Speckle estático y speckle dinámico

Considerando el tejido vivo como una superficie rugosa, al iluminar esta superficie con luz láser se pueden observar dos tipos de speckle que se comportan de manera marcadamente diferente. Cuando la luz láser interactúa con el tejido una parte de esta se refleja creando un patrón donde sus formas no cambian aún después de desplazamientos considerables de un difusor y los granos de speckle se mueven como un todo, este patrón es conocido como patrón de speckle estático (Fig. 2.3a).

Los rayos que penetran la superficie del tejido y son reflejados por los glóbulos rojos, generan una fluctuación en la intensidad de los puntos oscuros y brillantes en el patrón de speckle debido a variaciones en la fase de la luz provocadas por el movimiento de las células sanguíneas, cambios en el índice de refracción, potencia rotatoria, etc. Este tipo de speckle es conocido como speckle dinámico (Fig. 2.3b). La luz viene de diferentes esparcimientos produciendo latidos de baja frecuencia en el detector, que aparecen como variaciones en intensidad local [10].

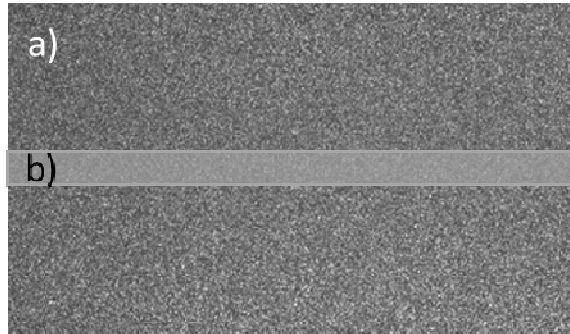


Fig. 2.3 a) Speckle estático, b) Speckle dinámico

2.2 Laser Speckle Imaging (LSI)

En 1980, el grupo de óptica de la universidad de Essen, Alemania, bajo el liderazgo de A. F. Fercher, emprendió la tarea de encontrar métodos no invasivos para diagnosticar problemas del ojo. Uno de los proyectos tenía como objetivo medir el flujo sanguíneo de la retina, una herramienta de diagnóstico en varios problemas oftálmicos. La técnica clásica en el momento fue inyectar un colorante fluorescente en la corriente sanguínea del paciente y esperar hasta que apareciera en el vaso sanguíneo de la retina. Varios problemas como el bloqueo de vasos sanguíneos podían ser identificados.

Se consideró que una técnica óptica no-invasiva tendría ventajas para el paciente (No inyectar un químico potencialmente dañino) y para el oftalmólogo (No necesita tiempo su examinación por el límite ofrecido por la ventada de la técnica de coloración) [11]. La primera propuesta fue usar doble tiempo de exposición en la fotografía de speckle. Sin embargo, se les ocurrió que podrían ser capaz de adoptar una técnica sencilla aprovechando el efecto observado varios años atrás, que el contraste del patrón de speckle es reducido por fluctuaciones del speckle. Si el contraste de speckle podría ser usado para codificar la velocidad, entonces un método de un solo tiempo de exposición podría funcionar. Los resultados iniciales fueron alentadores y la fotografía a un tiempo de exposición surgió [11].

El argumento básico es que si en un tiempo finito se fotografiará el láser, el patrón de speckle en un área donde el flujo está ocurriendo será difuminado a un grado que dependerá de la velocidad de flujo y del tiempo de exposición de la fotografía. El patrón de speckle en un área sin flujo permanecerá con un alto contraste. Entonces la distribución de velocidad será mapeada con variaciones en el contraste de speckle. Un análisis matemático preliminar, haciendo varios supuestos acerca de la envolvente estática, produjo algunos resultados prometedores [11].

En la práctica, las variaciones de contraste son difíciles de detectar por el ojo humano y algunos métodos para mejorar el mapeo de contraste son necesarios. Se encontró que con un proceso óptico de filtrado simple, usando un filtro pasa altas, se trabaja muy bien. El argumento es que donde el contraste de speckle es alto mucha de la luz será difractada y será colimada por la mitad de las lentes (rayos punteados, Fig. 2.4). Donde el contraste de speckle es bajo, la mayoría de la luz pasara directamente a través de la fotografía y será enfocada por la mitad de las lentes (rayos continuos, Fig. 2.4). Un alto en el plano focal de estas lentes bloquea la no difracción de la luz y después actúa como un filtro pasa altas solo la luz difractada alcanza el plano final de la imagen. Los altos contrastes de speckle, la mayoría de la luz de esa parte de la imagen original alcanza la imagen final: las variaciones de contraste son convertidas a variaciones de intensidad [11].

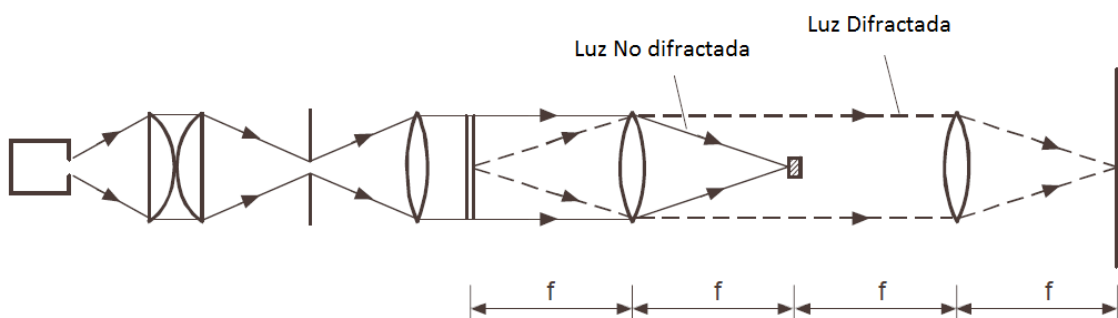


Fig. 2.4 Arreglo de filtrado espacial para convertir las variaciones de contraste de speckle a variaciones de intensidad [12].

La técnica fue utilizada en el objetivo original de monitorear el flujo sanguíneo en la retina. Un ejemplo, tomado en 1982 se muestra en la Fig. 2.5.

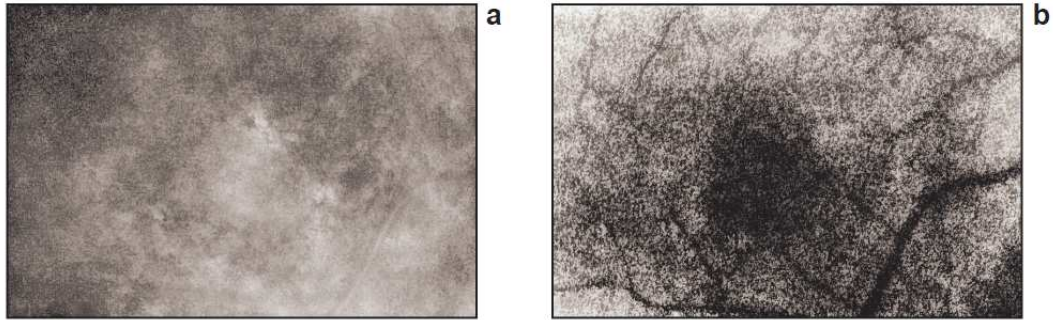


Fig. 2.5 Fotografía de speckle un solo tiempo de exposición a) Imagen en bruto de una parte de la retina y b) su versión procesada. Imagen tomada de [11].

En 1990, la técnica digital fue avanzando lo suficiente para justificar otra forma de la fotografía de speckle de un solo tiempo de exposición. Si la etapa de la fotografía puede ser eliminada, medir directamente el contraste y convertir a una imagen con un falso color, la principal desventaja de la técnica podría ser evitada. En la universidad de Kingston se inició un proyecto para investigar la posibilidad, y la técnica mostrara alguna esperanza. La nueva técnica se llamó LASCA (Laser Speckle Contrast Analysis) [11].

Los arreglos experimentales para LASCA son muy simples. La luz láser se diverge iluminado el objeto a estudiar para posteriormente sea capturado por una cámara CCD. La imagen es capturada por un detector (o su equivalente) y los datos se pasan a una computadora para procesarlos con un software. El operador usualmente tiene diversas opciones a su disposición, en este caso, se incluye el tiempo de exposición, el número de píxeles donde el contraste local fue analizado, la escala del mapa de contraste y elegir el color para codificar el contraste [11]. Algunos ejemplos de la técnica LASCA se muestran en la Figura 2.6.

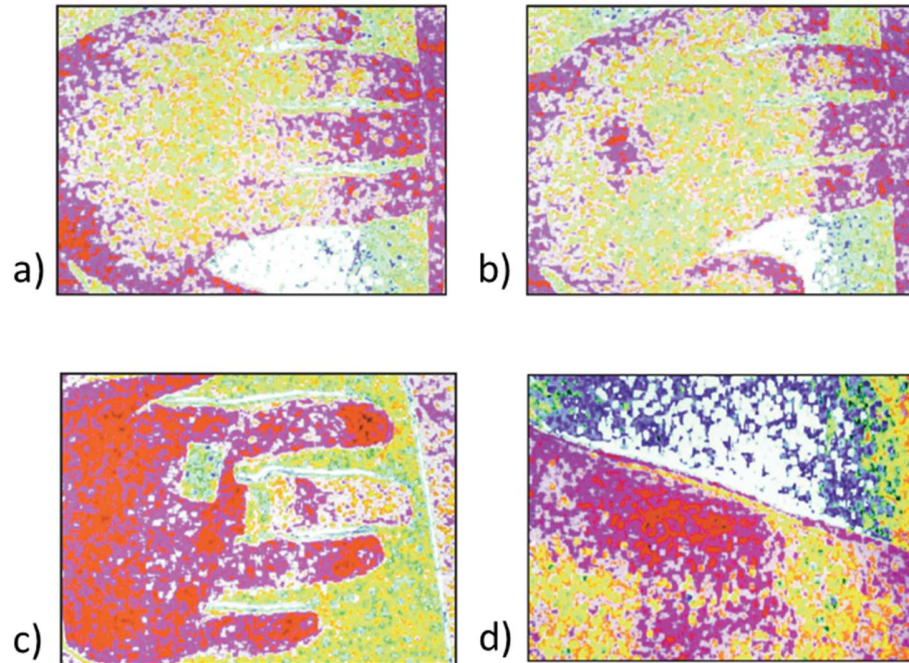


Fig. 2.6 a) Imagen LASC de la parte de atrás de la mano mostrando perfusión antes y b) después de un leve frotamiento en un área pequeña, c) Imagen LASC de la mano, mostrando la reducción de la perfusión causada por una cinta alrededor de la base del dedo, d) Imagen LASC de una parte del ante brazo, mostrando un incremento de perfusión alrededor de la superficie quemada por agua caliente. Imágenes tomadas de [11].

2.2.1 Contraste integrado

El contraste está definido como

$$K = \frac{\sigma_w}{\langle W \rangle} \quad (2.4)$$

Donde W es la variación de la intensidad integrada en el tiempo que permite cuantificar el contraste del patrón speckle formado en una imagen y σ_w es la desviación estándar de la intensidad integrada en el tiempo. Para un tiempo de

exposición (T) cada punto en la imagen de speckle es proporcional a la intensidad recibida por el detector óptico. La intensidad integrada en ese punto es [12]

$$W(t) = \int_{t-T}^t I(\xi) d\xi \quad (2.5)$$

Se considera que se utiliza un proceso estacionario y ergódico. Esto significa que el promedio de todo el conjunto es el mismo que el promedio en el tiempo y la estadística de W no depende en lo particular del tiempo de observación t . Para simplificar se expresa la Ec. 2.5 como

$$W = \int_{-T/2}^{T/2} I(\xi) d\xi \quad (2.6)$$

2.2.2 PROMEDIO DE LA INTENSIDAD INTEGRADA EN EL TIEMPO

El promedio de W está dado por [12]

$$\langle W \rangle = \int_{-T/2}^{T/2} \langle I(\xi) \rangle d\xi = T \langle I \rangle \quad (2.7)$$

Ahora se calcula el segundo momento de W que está dado por

$$\langle W^2 \rangle = 2 \langle W \rangle^2 \quad (2.8)$$

donde

$$\begin{aligned} \langle W \rangle^2 &= \left\langle \int_{-T/2}^{T/2} I(\xi) d\xi \right\rangle^2 \\ &= \left\langle \int_{-T/2}^{T/2} I(\xi) d\xi \int_{-T/2}^{T/2} I(\xi) d\xi \right\rangle \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&= \left\langle \int_{-T/2}^{T/2} I(\xi) d\xi \int_{-T/2}^{T/2} I(\eta) d\eta \right\rangle \\
&= \int_{-T/2}^{T/2} \int_{-T/2}^{T/2} \langle I(\xi) I(\eta) \rangle d\xi d\eta \\
&= \int_{-T/2}^{T/2} \int_{-T/2}^{T/2} \Gamma(\xi - \eta) d\xi d\eta \tag{2.9}
\end{aligned}$$

donde $\Gamma(\xi - \eta)$ es la función de autocorrelación de la intensidad y está definida como

$$\Gamma(\xi - \eta) = \langle I(\xi) I(\eta) \rangle = \langle E(\xi) E(\eta) E^*(\xi) E^*(\eta) \rangle \tag{2.10}$$

o su forma normalizada

$$g_2(\xi - \eta) = \frac{\langle I(\xi) I(\eta) \rangle}{\langle I^2 \rangle} \tag{2.11}$$

La relación entre la función de correlación de segundo orden de la Ec. 2.11 y la función de correlación de primer orden (Ec. 2.12) [13] está dado por la Ec. 2.13 conocida como la relación de Siegert [14]

$$g(\tau) = \frac{\langle E(t) E^*(t + \tau) \rangle}{\langle E^*(t) E(t) \rangle} \tag{2.12}$$

$$g_2(\tau) = 1 + \beta |g_1(\tau)|^2 \tag{2.13}$$

donde $\tau = \xi - \eta$ y β es un factor de normalización que representa un promedio del speckle debido a la falta de relación entre el tamaño del speckle, el tamaño del detector, polarización y efecto coherencia [15]. Entonces el segundo momento (Ec. 2.9) se reescribe como

$$\langle W^2 \rangle = \langle I \rangle^2 \int_{-T/2}^{T/2} \int_{-T/2}^{T/2} \left\{ 1 + \beta [g_1(\xi - \eta)]^2 \right\} d\xi d\eta \quad (2.14)$$

2.2.3 VARIANZA DE LA INTENSIDAD INTEGRADA EN EL TIEMPO

Ahora se calcula la varianza de σ_w^2 como [12]

$$\begin{aligned} \sigma_w^2 &= \langle W^2 \rangle - \langle W \rangle^2 \\ &= \langle I \rangle^2 \int_{-T/2}^{T/2} \int_{-T/2}^{T/2} \left\{ 1 + \beta [g_1(\xi - \eta)]^2 \right\} d\xi d\eta - T^2 \langle I \rangle^2 \\ &= \langle I \rangle^2 \left[\int_{-T/2}^{T/2} \int_{-T/2}^{T/2} d\xi d\eta + \int_{-T/2}^{T/2} \int_{-T/2}^{T/2} \beta [g_1(\xi - \eta)]^2 d\xi d\eta \right] - T^2 \langle I \rangle^2 \\ &= \langle I \rangle^2 T^2 + \langle I \rangle^2 \int_{-T/2}^{T/2} \int_{-T/2}^{T/2} \beta [g_1(\xi - \eta)]^2 d\xi d\eta - T^2 \langle I \rangle^2 \\ &= \langle I \rangle^2 \int_{-T/2}^{T/2} \int_{-T/2}^{T/2} \beta [g_1(\xi - \eta)]^2 d\xi d\eta \end{aligned} \quad (2.15)$$

donde $g_1(\xi - \eta)$ representa la función de autocorrelación de la intensidad instantánea.

Como el integrando es una función par de (ξ, η) , los límites de la integral se pueden redefinir (ec 2.16) y la doble integral se puede reducir a una sola integral.

$$\sigma_w^2 = \langle I \rangle^2 \int_0^T \int_0^T \beta [g_1(\xi - \eta)]^2 d\xi d\eta \quad (2.16)$$

Utilizando el método de reducción por Jacobiano y haciendo cambio de variable en los límites de integración la Ec. 2.16 se reescribe como

$$\sigma_w^2 = \langle I \rangle^2 \left[\frac{\beta}{T} \int_{-\infty}^{\infty} \Lambda\left(\frac{\tau}{T}\right) [g_1(\tau)]^2 d\tau \right] \quad (2.17)$$

donde $\tau(\xi, \eta)$ y

$$\Lambda(\tau) = \begin{cases} 1 - |\tau| & |\tau| \leq 1 \\ 0 & \text{otros casos} \end{cases}$$

Asumiendo que la velocidad del esparcimiento tiene una distribución Lorentziana [12]

$$g_1(\tau) = e^{-\tau/\tau_c} \quad (2.18)$$

Sustituyendo la Ec. (2.18) en la Ec. (2.17)

$$\sigma_w^2 = \langle I \rangle^2 \left[\frac{\beta}{T} \int_{-\infty}^{\infty} \Lambda\left(\frac{\tau}{T}\right) \left(e^{-2\tau/\tau_c} \right) d\tau \right]$$

Desarrollando la integral y sustituyendo el valor de $\Lambda(\tau)$ tenemos

$$\begin{aligned}
\sigma_w^2 &= \langle I \rangle^2 \left[\frac{2\beta}{T} \int_0^T \left(1 - \frac{\tau}{T}\right) \left(e^{-2\tau/\tau_c} \right) d\tau \right] \\
&= \frac{2\beta}{T} \langle I \rangle^2 \left[\int_0^T e^{-2\tau/\tau_c} d\tau - \int_0^T \frac{\tau}{T} \left(e^{-2\tau/\tau_c} \right) d\tau \right]
\end{aligned} \tag{2.19}$$

Resolviendo la integral (Ec. 2.19) y reduciendo términos se obtiene

$$\begin{aligned}
\sigma_w^2 &= \frac{2\beta}{T} \langle I \rangle^2 \left[\frac{\tau_c}{2} + \frac{\tau_c^2}{4T} \left(e^{-2\tau/\tau_c} - 1 \right) \right] \\
\sigma_w^2 &= \beta \langle I \rangle^2 \left[\frac{\tau_c}{T} + \frac{\tau_c^2}{2T^2} \left(e^{-2\tau/\tau_c} - 1 \right) \right]
\end{aligned} \tag{2.20}$$

Como el contraste está dado por [16]

$$K = \frac{\sigma_w}{\langle I \rangle}$$

Por lo tanto, se calcula la raíz cuadrada de la Ec. 2.20 obteniendo

$$\sigma_w = \beta^{1/2} \langle I \rangle \left[\frac{\tau_c}{T} + \frac{\tau_c^2}{2T^2} \left(e^{-2\tau/\tau_c} - 1 \right) \right]^{1/2} \tag{2.21}$$

Obteniendo así el contraste

$$K = \beta^{1/2} \left[\frac{\tau_c}{T} + \frac{\tau_c^2}{2T^2} \left(e^{-2\tau_c/T} - 1 \right) \right]^{1/2} \quad (2.22)$$

donde τ_c es el tiempo de correlación de la luz esparcida por la muestra.

La Ec. 2.22 es válida para los fotones reflejados de los glóbulos rojos que se encuentran en los vasos sanguíneos. Es decir, es válido para el esparcimiento dinámico.

2.2.4 INTENSIDAD INTEGRADA PARA ESPARCIMIENTO DINÁMICO Y ESTÁTICO

Tenemos un proceso no ergódico cuando la muestra a estudiar tiene componentes de esparcimiento dinámico y estático [17], por lo tanto, la relación de Siegert no se puede aplicar, esto es un problema cuando se quiere medir la función de correlación de la intensidad temporal $g_2(\tau)$ pero si solo se mide la función de correlación del campo temporal g_1 directamente ya no es problema [17].

El patrón de intensidad de speckle es la superposición de los fotones de la región estática en la muestra representada por $E_s(t)$ y la componente dinámica está representada por $E_f(t)$, por lo tanto, el total de los campos eléctrico es la suma,

$$E(t) = E_s(t) + E_f(t) \quad (2.23)$$

entonces la función de correlación es [12]

$$\begin{aligned}
g_1(\tau) &= \frac{\langle E(t)E^*(t+\tau) \rangle}{\langle E(t)E^*(t) \rangle} \\
&= \frac{(E_f(t) + E_s)(E_f^*(t+\tau) + E_s^*)}{(E_f(t) + E_s)(E_f^*(t) + E_s^*)} \\
&= \frac{\langle E_f(t)E_f^*(t+\tau) \rangle + \langle E_f(t)E_s^* \rangle + \langle E_sE_f^*(t+\tau) \rangle + \langle E_sE_s^* \rangle}{\langle E_f(t)E_f^*(t) \rangle + \langle E_f(t)E_s^* \rangle + \langle E_sE_f^*(t) \rangle + \langle E_sE_s^* \rangle} \\
g_1(\tau) &= \frac{\langle E_f(t)E_f^*(t+\tau) \rangle + I_s}{\langle I_f \rangle + \langle E_f(t)E_s^* \rangle + \langle E_sE_f^*(t) \rangle + I_s} \tag{2.24}
\end{aligned}$$

donde $I_f = \langle E_f(t)E_f^*(t) \rangle$ es el tiempo promedio de la intensidad de las oscilaciones de la luz dispersa dinámicamente e $I_s = \langle E_sE_s^* \rangle$, es la intensidad de la luz dispersa estáticamente; el segundo y tercer término del denominador de la Ec. 2.24 son cero porque la parte estática y la parte dinámica no están correlacionadas.

como $g_{1,f}(\tau) = \frac{E_f(t)E_f^*(t+\tau)}{E_f(t)E_f^*(t)}$ entonces

$$\begin{aligned}
g_1(\tau) &= \frac{\frac{E_f(t)E_f^*(t+\tau)}{E_f(t)E_f^*(t)} E_f(t)E_f^*(t) + I_s}{I_f + I_s} \\
g_1(\tau) &= \left[\frac{g_{1,f}(\tau)I_f + I_s}{I_f + I_s} \right]^2 \tag{2.25}
\end{aligned}$$

$$g_1(\tau) = \frac{1}{|I_f + I_s|^2} \left(|g_{1,f}(\tau) I_f|^2 + |g_{1,f}(\tau) I_f I_s| + |I_s|^2 \right)$$

$$g_1(\tau) = \left(\frac{|g_{1,f}(\tau) I_f|^2}{|I_f + I_s|^2} + \frac{|g_{1,f}(\tau) I_f I_s|}{|I_f + I_s|^2} + \frac{|I_s|^2}{|I_f + I_s|^2} \right)$$

Si $\rho = \frac{I_f}{I_f + I_s}$ y $(1-\rho) = \frac{I_s}{I_f + I_s}$

$$g_1(\tau) = \left(\rho^2 |g_{1,f}(\tau)|^2 + 2\rho(1-\rho) |g_{1,f}(\tau)| + (1-\rho)^2 \right) \quad (2.26)$$

Con el término obtenido anteriormente (Ec. 2.26) y asumiendo que la velocidad de esparcimiento tiene una distribución Lorentziana $g_{1,f}(\tau) = e^{-\tau/\tau_c}$ se obtiene el valor de σ_w^2 (Ec. 2.17)

$$\sigma_w^2 = \frac{2\beta \langle I \rangle^2}{T} \int_{-\infty}^{\infty} \Lambda\left(\frac{\tau}{T}\right) \left(\rho^2 e^{-2\tau/\tau_c} + 2\rho(1-\rho) e^{-\tau/\tau_c} + (1-\rho)^2 \right) d\tau \quad (2.27)$$

donde $\tau(\xi, \eta)$ y

$$\Lambda(\tau) = \begin{cases} 1-|\tau| & |\tau| \leq 1 \\ 0 & \text{otros casos} \end{cases}$$

Reescribimos la Ec. 2.27 como

$$\sigma_w^2 = \frac{2\beta\langle I \rangle^2}{T} \int_0^T \left(1 - \frac{\tau}{T}\right) \left(\rho^2 e^{-2\tau/\tau_c} + 2\rho(1-\rho)e^{-\tau/\tau_c} + (1-\rho)^2\right) d\tau$$

$$\sigma_w^2 = \frac{2\beta\langle I \rangle^2}{T} \int_0^T \left(1 - \frac{\tau}{T}\right) \rho^2 e^{-2\tau/\tau_c} d\tau + \int_0^T \left(1 - \frac{\tau}{T}\right) 2\rho(1-\rho)e^{-\tau/\tau_c} d\tau + \int_0^T \left(1 - \frac{\tau}{T}\right) (1-\rho)^2 d\tau$$

$$\sigma_w^2 = \frac{2\beta\langle I \rangle^2}{T} \left\{ \rho^2 \left[\int_0^T e^{-2\tau/\tau_c} d\tau - \int_0^T \frac{\tau}{T} e^{-2\tau/\tau_c} d\tau \right] \right\} + 2\rho(1-\rho) \left\{ \int_0^T e^{-\tau/\tau_c} d\tau - \int_0^T \frac{\tau}{T} e^{-\tau/\tau_c} d\tau \right\} \\ + (1-\rho)^2 \left[\int_0^T d\tau - \int_0^T \frac{\tau}{T} d\tau \right]$$

Haciendo cambio de variable y resolviendo las integrales de la ecuación anterior se reduce

$$\sigma_w^2 = \frac{2\beta\langle I \rangle^2}{T} \left\{ \rho^2 \left[-\frac{\tau_c}{2} (e^{-2T/\tau_c} - 1) + \frac{\tau_c}{2} e^{-2T/\tau_c} + \frac{\tau_c^2}{4T} (e^{-2T/\tau_c} - 1) \right] + \right. \\ \left. + 2\rho(1-\rho) \left[-\tau_c (e^{-T/\tau_c} - 1) + \tau_c e^{-T/\tau_c} + \frac{\tau_c^2}{T} (e^{-T/\tau_c} - 1) \right] + (1-\rho)^2 \left[T - \frac{T}{2} \right] \right\} \\ = \frac{2\beta\langle I \rangle^2}{T} \left\{ \rho^2 \left[\frac{\tau_c}{2} + \frac{\tau_c^2}{4T} (e^{-2T/\tau_c} - 1) \right] + 2\rho(1-\rho) \left[\tau_c + \frac{\tau_c^2}{T} (e^{-T/\tau_c} - 1) \right] + (1-\rho)^2 \left[\frac{T}{2} \right] \right\} \\ \sigma_w^2 = \beta\langle I \rangle^2 \left\{ \rho^2 \left[\frac{\tau_c}{2} + \frac{\tau_c^2}{2T^2} (e^{-2T/\tau_c} - 1) \right] + 4\rho(1-\rho) \left[\tau_c + \frac{\tau_c^2}{T^2} (e^{-T/\tau_c} - 1) \right] + (1-\rho)^2 \right\}$$

Como $x = \frac{T}{\tau_c} \therefore \frac{1}{x} = \frac{\tau_c}{T}$ donde τ_c es el tiempo de correlación sobre la muestra.

$$\sigma_w^2 = \beta \langle I \rangle^2 \left[\left\{ \rho^2 \left[\frac{1}{x} + \frac{(e^{-2T/\tau_c} - 1)}{2x^2} \right] + 4\rho(1-\rho) \left[\frac{1}{x} + \frac{(e^{-T/\tau_c} - 1)}{x^2} \right] + (1-\rho)^2 \right\} \right]$$

Obteniendo la raíz cuadrada

$$\sigma = \beta^{0.5} \langle I \rangle \left[\left\{ \rho^2 \left[\frac{1}{x} + \frac{(e^{-2T/\tau_c} - 1)}{2x^2} \right] + 4\rho(1-\rho) \left[\frac{1}{x} + \frac{(e^{-T/\tau_c} - 1)}{x^2} \right] + (1-\rho)^2 \right\} \right]^{0.5} \quad (2.28)$$

Por lo tanto el contraste está dado por

$$K = \frac{\sigma_w}{\langle I \rangle}$$

$$K = \beta^{0.5} \left[\left\{ \rho^2 \left[\frac{1}{x} + \frac{(e^{-2x} - 1)}{2x^2} \right] + 4\rho(1-\rho) \left[\frac{1}{x} + \frac{(e^{-x} - 1)}{x^2} \right] + (1-\rho)^2 \right\} \right]^{0.5} \quad (2.29)$$

Un modelo de speckle practico que cuenta con la presencia de luz esparcida por una región estática está dada por la ecuación (2.29).

2.2.5 ANALISIS ESPACIAL

En 2008 Parthasarathy et al. Propusieron un riguroso y practico modelo de speckle que cuenta con la presencia de luz esparcida de un medio estático, por lo que el contraste está definido por la Ec. (2.29) [15].

Las imágenes de speckle son capturadas por una cámara CCD. En orden para medir estos contraste de speckle se utiliza una ventana de $w \times w$ pixeles, normalmente $w = 5$ ó 7 . El contraste para la estadística espacial del tiempo de integración, la imagen de speckle es calculada usando la siguiente ecuación

$$K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} = \frac{\sqrt{\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2}}{\langle I \rangle} \quad (2.30)$$

El valor del contraste K es depositado en una nueva imagen, la ventana se mueve hacia adelante un pixel y se calcula nuevamente el contraste, estos pasos se repiten sobre toda la imagen hasta cubrir la imagen totalmente después se tiene una nueva imagen de contraste (Fig. 2.7).

Finalmente, el valor del contraste es convertido a Speckle Flow Index (SFI) que está definido como [18]

$$SFI = \frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{TK^2} \propto \text{velocidad relativa del flujo sanguíneo} \quad (2.31)$$

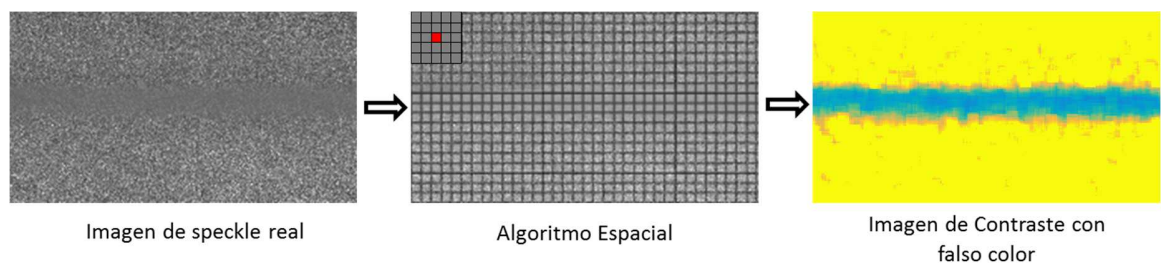


Fig. 2.7 Estadística espacial speckle de un speckle integrado en el tiempo

El siguiente algoritmo (Fig. 2.8), presentado detalladamente en el Anexo 1, muestra el procedimiento que este desarrolla para obtener el contraste y el SFI, para el análisis espacial. Primeramente se especifica el tiempo de exposición (T), el número de imágenes muestra que se tomarán (N), el tamaño de la ventana (w) con la cual se escaneara la imagen muestra, posteriormente se crea un ciclo for el cual permitirá analizar la número de imágenes seleccionadas, al entrar al ciclo se lee la primera imagen a ser analizada con la ventana seleccionada y se obtiene la desviación estándar del conjunto de elementos tomada por la ventana, esta ventana se ira desplazando a través de todo la imagen muestra. Al finalizar este proceso se obtiene el contraste de la primera imagen mediante la Ec. 2.30, obteniendo el contraste para el número N de imágenes, se suma el contraste de las N imágenes y se divide entre el número de imágenes, obteniendo así una imagen de contraste promedio.

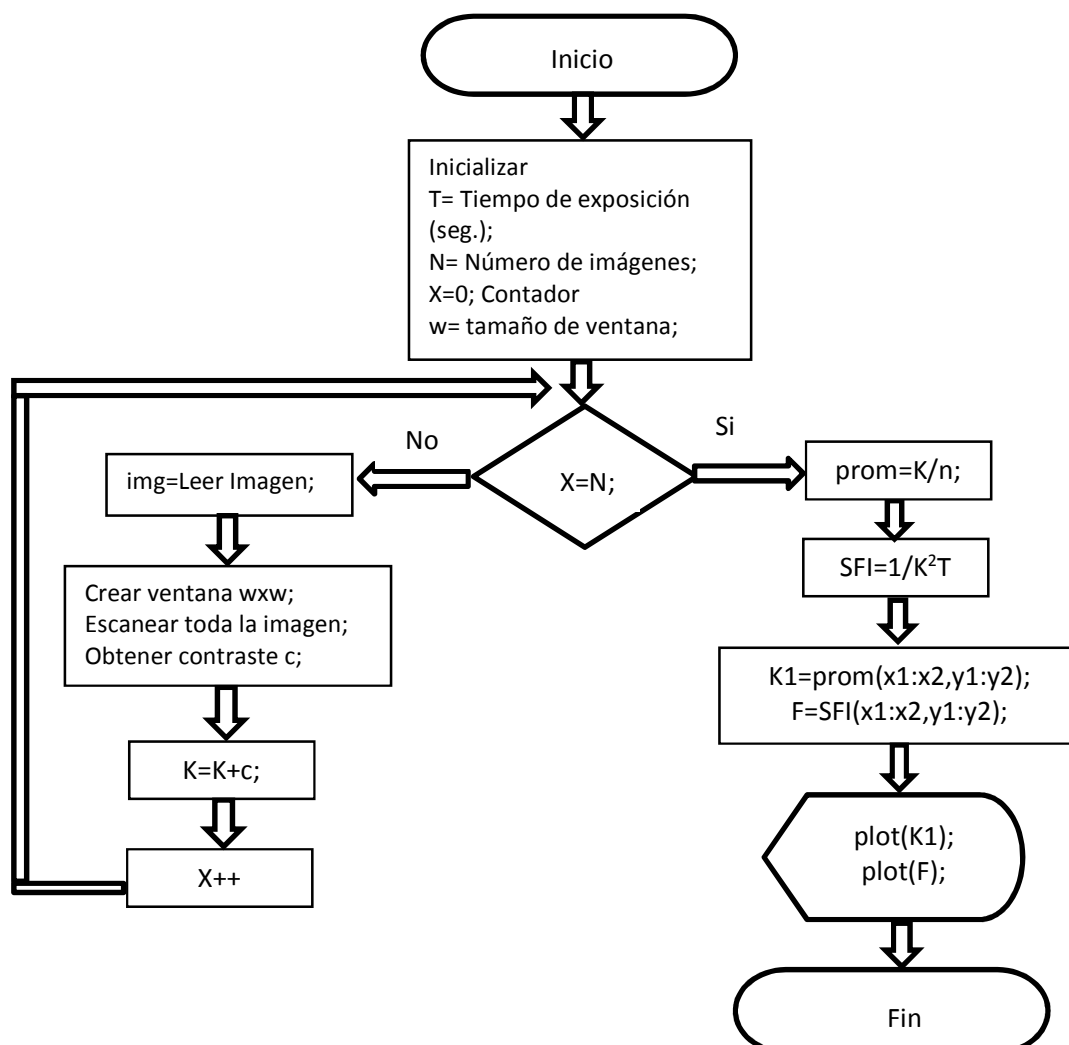


Fig. 2.8 Diagrama de flujo análisis espacial

2.2.6 ANALISIS TEMPORAL

En 2003 Cheng [19] presento un análisis modificado para laser speckle imaging (mLSI) que está basado en la estadística temporal de un speckle integrado en el tiempo para obtener el mapa de velocidad directamente. En este método cada pixel en la imagen de speckle puede ser visto como el área de un solo punto. Después la señal procesada consta en calcular la estadística temporal de la intensidad de cada pixel en la imagen usando la ecuación

$$\frac{1}{K^2} = \frac{1}{N_t} = \frac{\langle I \rangle^2}{\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2} \quad (2.32)$$

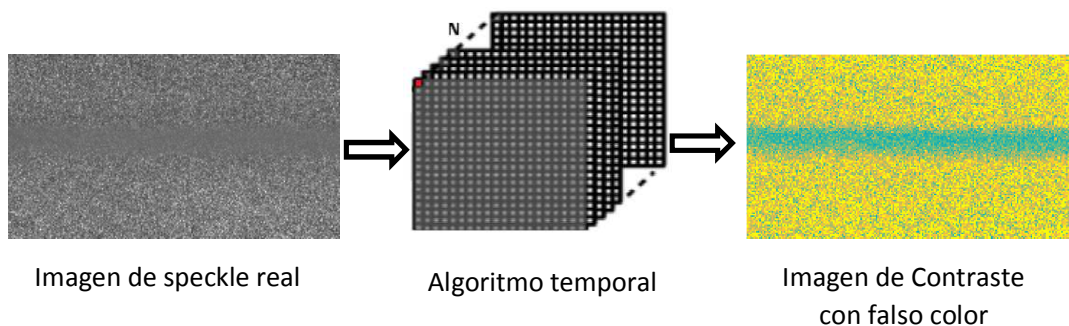


Fig. 2.9 Estadística temporal speckle de un sol tiempo de exposición

El algoritmo temporal es desarrollado en Matlab (anexo 2), el siguiente diagrama de flujo (Fig. 2.10) muestra el proceso que desarrolla el algoritmo temporal, el cual se inicializa declarando el tiempo de exposición (T) de la cámara, el número de imágenes (N) a utilizar. Siguiendo el proceso paso a paso, se lee la imagen a analizarse tomando el valor del primer pixel el cual se agrega a una variable (term1), se lee el mismo pixel de la segundo imagen y se le suma al pixel anterior, haciendo esto para todas la imágenes y pixeles, al terminar con todo el

análisis, se obtiene el contraste mediante la Ec. (2.32), utilizando este contraste se obtiene el SFI (Ec. 2.33).

$$SFI \equiv \frac{1}{TN_i} \quad (2.33)$$

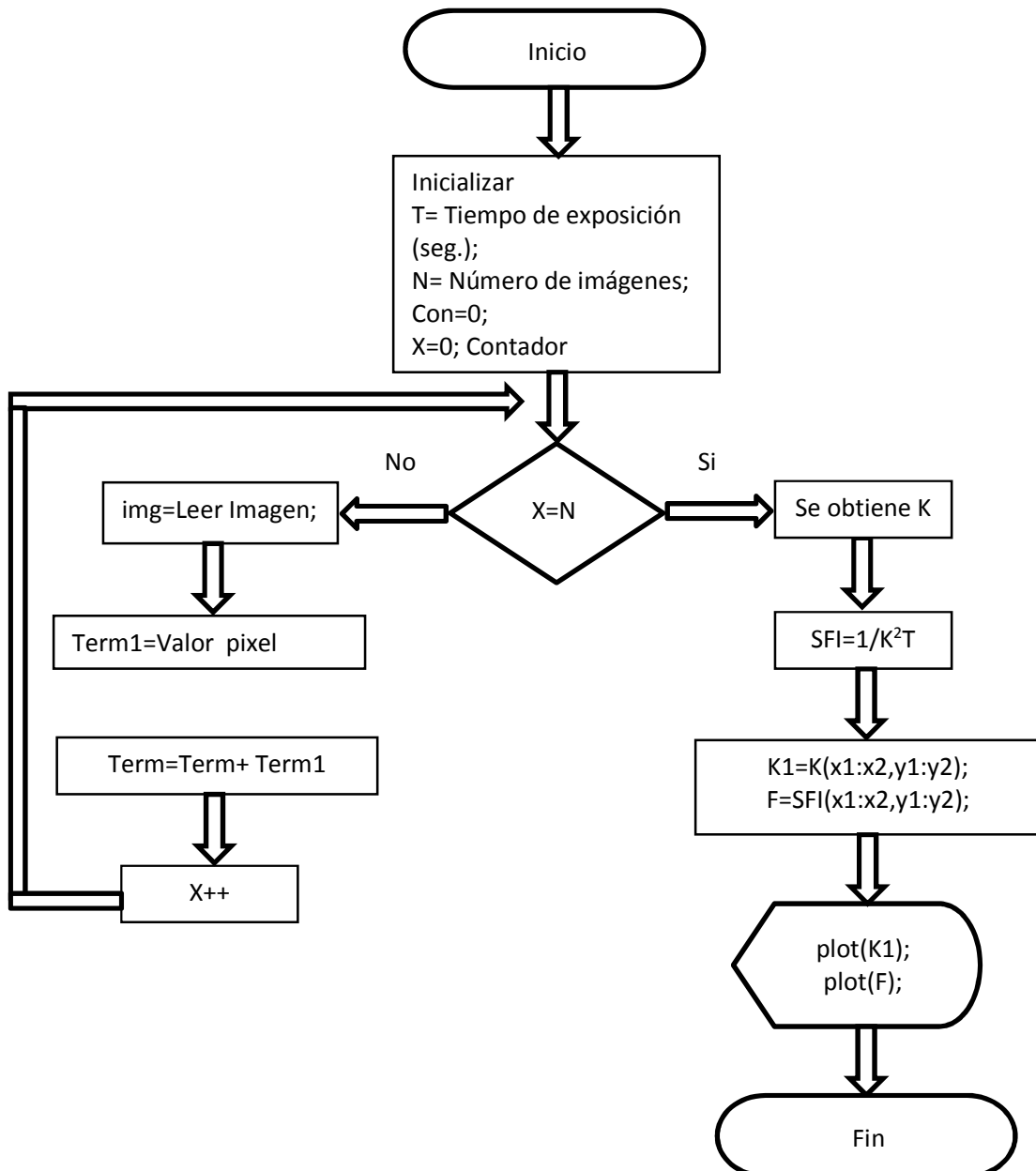


Fig. 2.10 Diagrama de flujo análisis temporal

2.3 Matriz de Co-ocurrencia

La textura en imágenes digitales describe la estructura de una superficie, teniendo propiedades como el contraste, granulosidad, etc. (Fig. 2.11). Existen varios métodos para medir la textura de una imagen, uno de ellos es la matriz de co-ocurrencia, la cual está basada en la relación que existe entre el nivel de gris de un pixel y el nivel de gris de sus pixeles vecinos dada una dirección y una distancia específica. En base a esta relación y utilizando la estadística es posible establecer si existe cierto patrón de textura en una imagen o región.

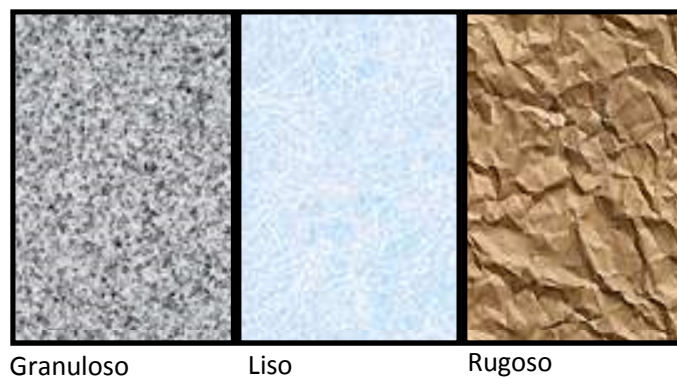


Fig. 2.11 Diferentes texturas

La matriz de co-ocurrencia describe la frecuencia de un nivel de gris que aparece en una relación espacial específica con otro valor de gris, dentro del área de una ventana de análisis determinada [20], es decir, es una tabla que indica cómo están relacionadas las distintas combinaciones de los valores de brillo de los pixeles (niveles de grises) que ocurren en la imagen.

Para obtener la matriz de co-ocurrencia es requerido realizar los siguientes pasos [21]:

1. Tamaño de la ventana

2. Componente espacial
3. Matriz de simetría
4. Matriz de probabilidad
5. Cálculo de imágenes de textura

El tamaño de la ventana debe tener un número impar de píxeles a fin de tener un pixel central y comúnmente es cuadrada (Fig. 2.12a). Cada elemento de la ventana debe colocarse en un pixel que este ocupado en la imagen original, es decir, la ventana debe estar completamente contenida dentro de la imagen y no en un borde. El resultado del cálculo de la ventana es un solo número que representa la ventana completa, el cual es colocado en el píxel central de la ventana, posteriormente la ventana se mueve un píxel (Fig. 2.12b) y se repite el mismo calculo, se hace este procedimiento hasta que la imagen se haya barrido completamente construyendo una nueva imagen con valores de textura (Fig. 2.12c) [20].

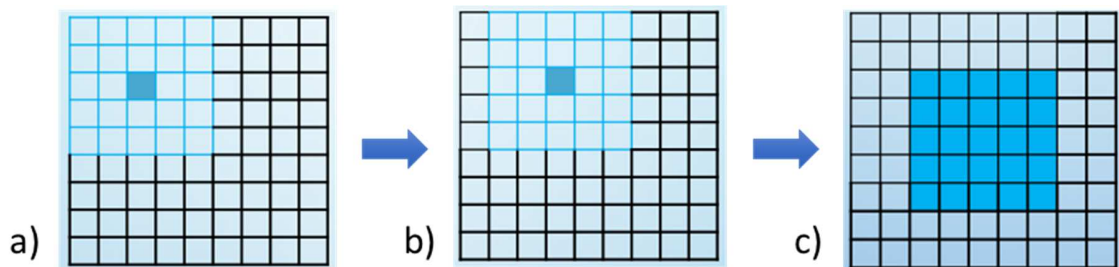


Fig. 2.12 a) Análisis de una imagen con una ventana de 5x5 y b) desplazamiento de la venta sobre la imagen y C) la matriz de co-ocurrencia resultante al escanear toda la imagen.

La relación espacial entre el píxel de referencia y su vecino puede ser en cualquiera de las 8 direcciones mostradas en la Fig. 2.13, pero solo se toman cuatro porque la Norte es opuesta a la Sur, por lo tanto, se utiliza una matriz de simetría.

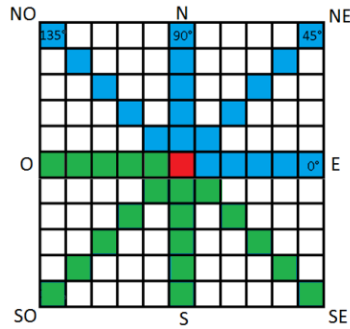


Fig. 2.13 Relación entre el píxel de referencia (rojo) y sus vecinos

La matriz de simetría se calcula sumándole a la matriz de co-ocurrencia su transpuesta. Esta matriz significa que los mismos valores ocurren en las celdas opuestas a la diagonal. Después de obtener la matriz simétrica, esta debe expresarse como matriz de probabilidad.

2.3.1 CALCULO DE LA MATRIZ DE CO-OCURRENCIA

La matriz de co-ocurrencia es un resumen de la forma en que los valores de los píxeles ocurren al lado de otro valor en una pequeña ventana. Se puede expresar como una tabla que indica cómo están relacionadas distintas combinaciones de los niveles de grises de una imagen, por lo tanto, si tenemos una imagen de W niveles de grises la matriz de co-ocurrencia será de una dimensión de $W \times W$. Supongamos una imagen (Fig. 2.14) de 5 niveles de grises (0, 1, 2, 3, 4), la matriz de co-ocurrencia será de 5×5 .

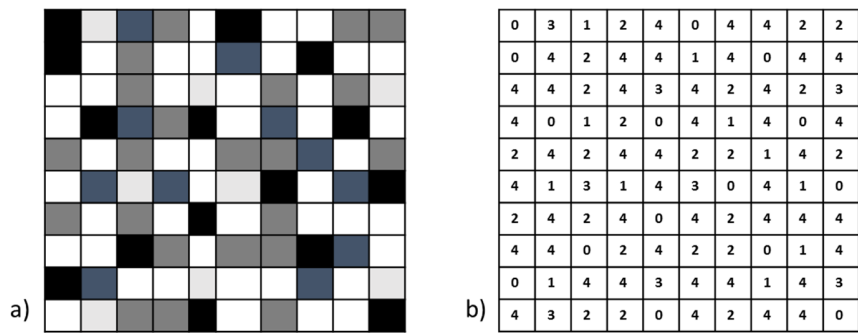


Fig. 2.14 a) Imagen en escala de grises y b) valor de cada nivel de gris

La matriz de co-ocurrencia toma la relación espacial entre dos píxeles, el píxel de referencia (x) y su píxel vecino (y), por lo tanto, si deseamos hacer un análisis del píxel de referencia con el píxel a la derecha de este la notación se expresaría como (1,0) indicando la dirección de 0°, a 45° se toma como (1,1), 90° (0,1) y 135° (-1,1). Para cada dirección se crea una matriz de co-ocurrencia. Con las posibles combinaciones de los niveles de gris (Fig. 2.15) existentes en toda la imagen

Pixel Vecino Pixel de Referencia	0	1	2	3	4
0	[0,0]	[0,1]	[0,2]	[0,3]	[0,4]
1	[1,0]	[1,1]	[1,2]	[1,3]	[1,4]
2	[2,0]	[2,1]	[2,2]	[2,3]	[2,4]
3	[3,0]	[3,1]	[3,2]	[3,3]	[3,4]
4	[4,0]	[4,1]	[4,2]	[4,3]	[4,4]

Fig. 2.15 Tabla de posibles combinaciones para generar la matriz de co-ocurrencia

Para la imagen (Fig. 2.14) se obtuvieron las siguientes matrices en las diferentes direcciones.

0°	45°	90°	135°																
0	2	1	1	7	0	1	1	3	5	1	0	4	3	4	0	1	2	0	7
1	0	2	1	7	2	1	2	0	5	2	0	2	0	5	0	2	3	0	5
3	1	4	1	10	3	4	3	2	6	1	3	2	1	12	4	2	2	2	5
1	2	1	1	2	0	1	2	0	2	0	1	2	0	4	1	1	1	0	4
7	5	12	5	11	5	4	8	1	16	8	7	9	3	11	6	4	8	3	11

Fig. 2.16 Matrices de combinaciones para las diferentes direcciones

De las matrices de co-ocurrencia (Fig. 2.16) se calcula la matriz simétrica, para cada una.

0°	45°								
0	3	4	2	14	0	3	4	3	10
3	0	3	3	12	3	2	6	1	9
4	3	8	2	22	4	6	6	4	14
2	3	2	2	7	3	1	4	0	3
14	12	22	7	22	10	9	14	3	32

90°	135°								
2	2	5	3	12	0	1	6	1	13
2	0	5	1	12	1	4	5	1	9
5	5	4	3	21	6	5	4	3	13
3	1	3	0	7	1	1	3	0	7
12	12	21	7	22	13	9	13	7	22

Fig. 2.17 Matrices simétricas para cada dirección

De la distribución de los pixeles (Fig. 2.14) se puede observar que existen 81 posibles eventos hacia la derecha de que una combinación suceda, pero como es una matriz simétrica se consideran también la relación de pixeles a la izquierda también, por lo que el total de eventos serian 162, a partir de esto se calcula la matriz de probabilidad (Fig. 2.18).

0°					45°				
0	0.0185	0.0247	0.0123	0.0864	0	0.0185	0.0247	0.0185	0.0617
0.0185	0	0.0185	0.0185	0.0741	0.0185	0.0123	0.0370	0.0062	0.0556
0.0247	0.0185	0.0494	0.0123	0.1358	0.0247	0.0370	0.0370	0.0247	0.0864
0.0123	0.0185	0.0123	0.0123	0.0432	0.0185	0.0062	0.0247	0	0.0185
0.0864	0.0741	0.1358	0.0432	0.1358	0.0617	0.0556	0.0864	0.0185	0.1975
90°					135°				
0.0123	0.0123	0.0309	0.0185	0.0741	0	0.0062	0.0370	0.0062	0.0802
0.0123	0	0.0309	0.0062	0.0741	0.0062	0.0247	0.0309	0.0062	0.0556
0.0309	0.0309	0.0247	0.0185	0.1296	0.0370	0.0309	0.0247	0.0185	0.0802
0.0185	0.0062	0.0185	0	0.0432	0.0062	0.0062	0.0185	0	0.0432
0.0741	0.0741	0.1296	0.0432	0.1358	0.0802	0.0556	0.0802	0.0432	0.1358

Fig. 2.18 Matrices de probabilidad

Finalmente se suman las matrices de probabilidad (Fig. 2.18) y se obtiene un perfil del descriptor de homogeneidad.

2.3.2 DESCRIPTORES DE LA TEXTURA

De la matriz de co-ocurrencia se pueden derivar diferentes medidas de textura propuestas por Haralick [22], las cuales nos proporcionan información de la imagen a escala de grises que se está analizado. Los Descriptores que propone Haralick son:

Homogeneidad. Se concentra en la diagonal de la matriz de co-ocurrencia, esto ocurre cuando la imagen es localmente homogénea de acuerdo al tamaño de la ventana, la cual se obtiene mediante la ecuación 2.34.

$$Homogeneidad = \sum_{i,j=0}^{N-1} \frac{P_{i,j}}{1+(i-j)^2} \quad (2.34)$$

Siendo $P_{i,j}$ la probabilidad de co-ocurrencia de los valores de gris i y j , para una distancia dada. Tomando en cuenta esta ecuación se llega a la conclusión de que cuanto menor es el contraste, más alto es la homogeneidad debido a la ponderación inversa a través de $(i-j)^2$.

Contraste. Es lo opuesto a la homogeneidad, es decir es una medida de la variación local de una imagen. Tiene un valor alto cuando la región dentro de la escala de la ventana tiene un alto contraste. Tiene valores altos que están concentrados lejos de la diagonal de la matriz de co-ocurrencia.

$$\text{Contraste} = \sum_{i,j=0}^{N-1} P_{i,j} (i-j)^2 \quad (2.35)$$

Disimilaridad. Es similar al contraste, un alto contraste indica un valor alto de disimilaridad, la diferencia está en que su peso incrementa linealmente.

$$\text{Disimilaridad} = \sum_{i,j=0}^{N-1} P_{i,j} |i-j| \quad (2.36)$$

Media. Esta media corresponde a la frecuencia de que un píxel vecino esté en una combinación con un píxel de referencia.

$$\text{Media} = \sum_{i,j=0}^{N-1} iP_{i,j} \quad (2.37)$$

Desviación estándar. Es una medida de dispersión de los niveles de grises en la ventana, es decir, cuanto se apartan los datos de su media. Para obtener este parámetro se calcula la varianza para i (Ec. 2.38) y j (Ec. 2.39), los cuales darán el mismo resultado pues se trabaja con una matriz simétrica.

$$\sigma_i^2 = \sum_{i,j=0}^{N-1} P_{i,j} (i - \mu_i)^2 \quad (2.38)$$

$$\sigma_j^2 = \sum_{i,j=0}^{N-1} P_{i,j} (i - \mu_j)^2 \quad (2.39)$$

Finalmente para el cálculo de la desviación estándar se utiliza la ecuación 2.40

$$\sigma_i = \sqrt{\sigma_i^2} \quad \sigma_j = \sqrt{\sigma_j^2} \quad (2.40)$$

Entropía. Es alta cuando los elementos de la matriz de co-ocurrencia tienen relativamente valores iguales y baja cuando los elementos son cercanos a 0 o 1. Es la encargada de medir la aleatoriedad de los píxeles de la matriz de co-ocurrencia, ya que se utiliza en medidas aleatorias de los elementos de la matriz de co-ocurrencia.

$$Entropía = \sum_{i,j=0}^{N-1} -P_{i,j} \ln(P_{i,j}) \quad (2.41)$$

Entre más pequeños son los valores de $P_{i,j}$, la ocurrencia de esa combinación de píxeles es menos común, por lo tanto en una imagen homogénea se tendrá baja entropía.

Energía. Tiene valores altos cuando la matriz de co-ocurrencia tiene pocas entradas de gran magnitud y baja cuando todas las entradas son similares. Es decir, cuanto más suave la textura la energía tendrá mayor valor y está dada por:

$$Energía = \sum_{i,j=0}^{N-1} P_{i,j}^2 . \quad (2.42)$$

En este capítulo se expusieron los conceptos básicos necesarios para el desarrollo de este trabajo, así como también se explicaron las técnicas de LSI y la matriz de co-ocurrencia para el análisis de las imágenes de speckle. En el siguiente capítulo hablaremos del arreglo experimental empleado para obtener dichas imágenes de speckle y de la elaboración de los maniquís de piel.

CAPÍTULO 3

ARREGLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se explicará la fabricación de los maniqués que simulan las propiedades de esparcimiento de la piel y el arreglo experimental utilizado.

3.1 MANIQUÍ DE PIEL

El maniquí de piel consiste de dos partes: la dermis (Fig. 3.1a) y la epidermis (Fig. 3.1b). En el caso de la dermis utilizamos una resina transparente con la concentración adecuada de TiO_2 (Dióxido de Titanio, 1.45 mg/mL) [23] para simular las propiedades de esparcimiento de la dermis humana (2 mm^{-1}).

Antes de que la resina solidifique, se incrustó un capilar de vidrio con un diámetro interno de $550 \mu\text{m}$ lo más cerca de la superficie. En el capilar se hace circular una mezcla de intralipido al 1% en agua como sustituto de la sangre, este es inyectado por una jeringa y una bomba de infusión (PUMP-NE500) que nos permite controlar la velocidad de inyección (V) del líquido, antes de inyectar el fluido al capilar, es importante asegurarnos que este no tenga burbujas de aire. La bomba es colocada en un área separada de la muestra, ya que al momento de estar en funcionamiento puede generar algunas perturbaciones y cambiar los resultados.

El maniquí de epidermis se fabricó con una mezcla de PDMS (Polidimetilsiloxano) que tiene un índice de refracción de 1.43 cercano al de la piel que es de 1.4, TiO_2 (2 mg/mL) que simula las propiedades de esparcimiento (3.0 mm^{-1}) y café liofilizado (10 mg/mL) [23] para simular el coeficiente de absorción (0.2 mm^{-1}). Este último maniquí se fabricó con diferentes espesores ($\delta = 300$ y $1000 \mu\text{m}$),

que al ser colocada sobre la dermis, simulan diferentes profundidades del capilar de vidrio o vaso sanguíneo (Fig. 3.1 c).

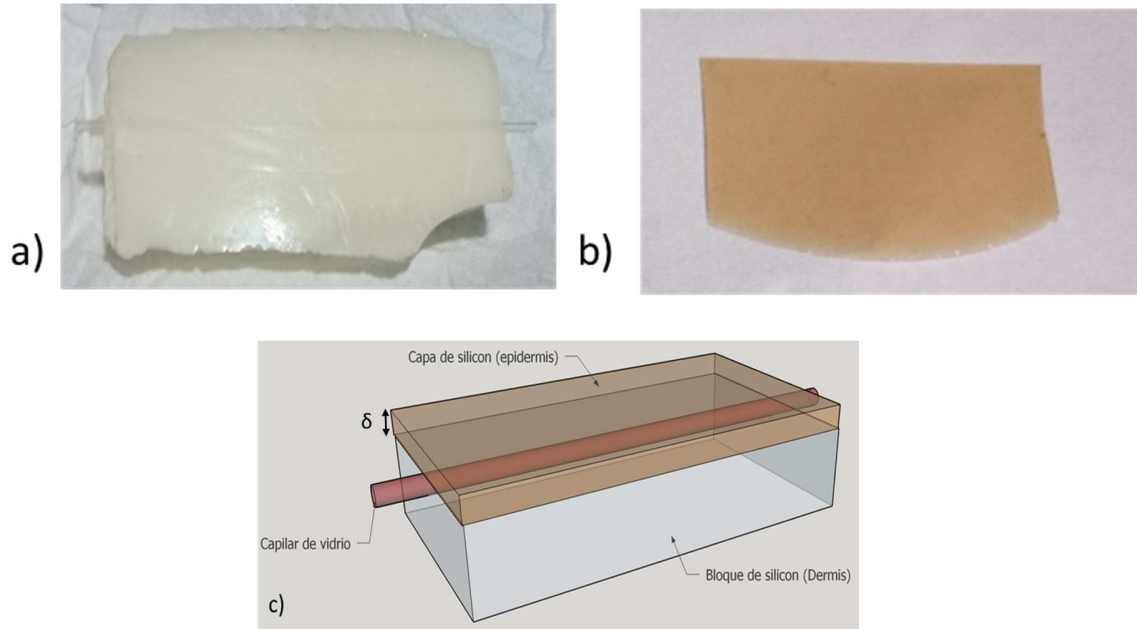


Fig. 3.1 a) Maniquí de dermis, b) maniquí de epidermis, c) maniquí de piel que simula un vaso sanguíneo a una profundidad δ (μm).

Antes de hacer uso de los maniqués en el arreglo experimental, es importante evitar tocarlos directamente con la mano para evitar la grasa de los dedos, así como también debemos protegerlos del polvo (Fig. 3.2), de otra manera la grasa y el polvo se reducen en ruido en las imágenes de speckle.

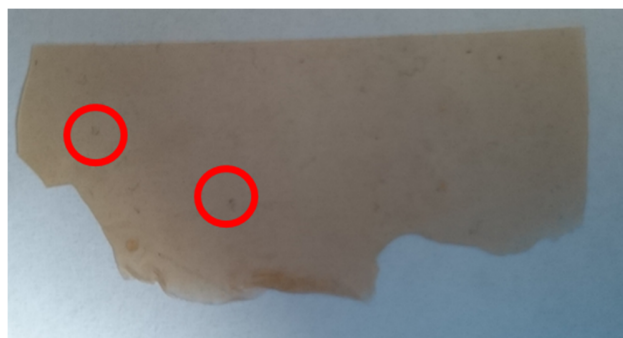


Fig. 3.2 Maniquí contaminado

3.2 Arreglo experimental óptico

El arreglo experimental (Fig. 3.3a) consiste de un láser He-Ne (632.8nm) que incide sobre un difusor estático que a su vez ilumina la superficie del maniquí de piel de manera homogénea.

Una cámara CCD (Retiga 2000R) equipada con una lente zoom (NATIVAR 700) es enfocada sobre la superficie del maniquí. Sobre la lente se coloca un polarizador lineal cruzado con la polarización del He-Ne para evitar la reflexión especular proveniente de la superficie de la muestra, esta reflexión se evita porque no aporta información de los vasos profundos. Antes de capturar las imágenes hay que verificar que el capilar se encuentre en foco, para esto se utiliza luz blanca y la apertura de la lente totalmente abierta de tal forma que nos permita visualizar de manera más precisa el capilar a través de la cámara, esto porque lo que se mide en el análisis es el contraste y si la imagen no se encuentra en foco el contraste cambia.

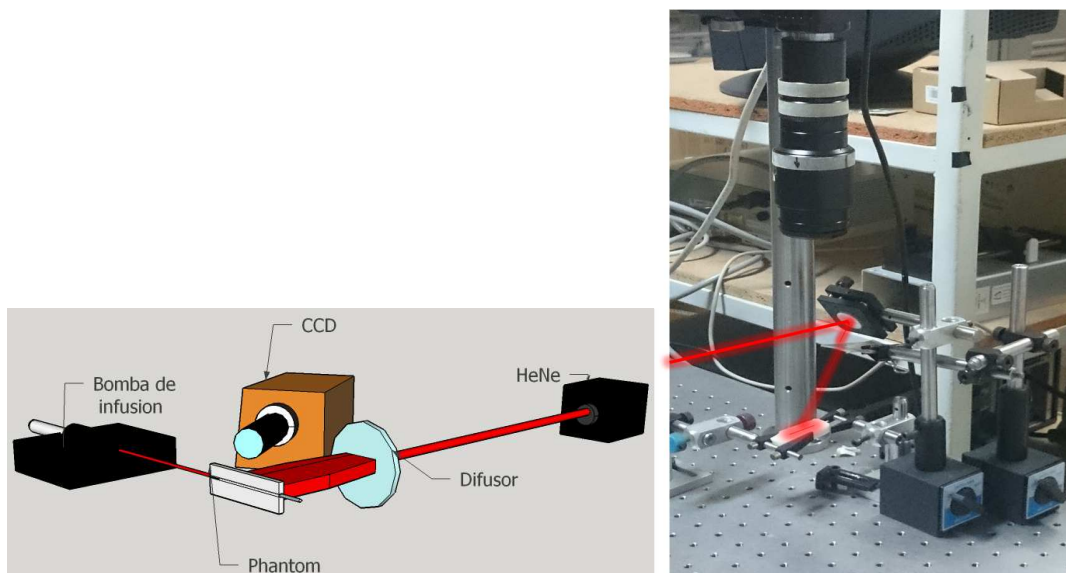


Fig. 3.3 a) Esquema experimental de un sistema de LSI empleado en los experimentos reportados en este trabajo y b) fotografía del sistema real empleado en el laboratorio.

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 44ms . Cada vez que se cambia T o δ es importante compensar la potencia del láser de tal manera que las imágenes capturadas por la CCD no sean sub o sobre-expuestas, esto se lograba utilizando la función “auto-exposure” de la CCD.

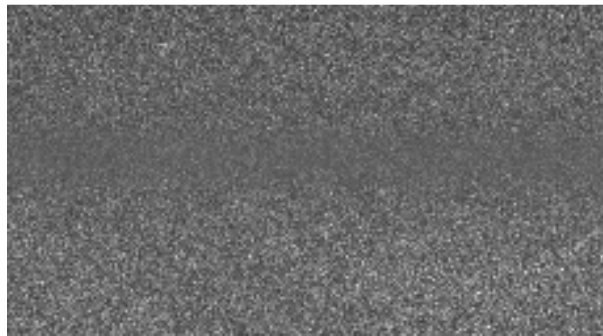


Fig. 3.4 imagen típica de speckle capturada por el sistema de LSI, correspondiente a $T=10\text{ms}$, $V=20\text{mm/s}$, $\delta=300\mu\text{m}$.

En este capítulo se describió el procedimiento utilizado para la fabricación de los maniquís de piel y el arreglo experimental utilizado para la adquisición de las imágenes de speckle. En el siguiente capítulo se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis de contraste de estas imágenes y de la matriz de co-correncia.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Este capítulo está dividido en dos partes, en la primera describimos la metodología empleada para analizar las imágenes de speckle de vasos sanguíneos profundos, este análisis se llevó a cabo tanto con el algoritmo espacial como con el algoritmo temporal (ver secc. 2.2.5 y 2.2.6), ambos resultados se comparan para determinar cuál de los dos es más viable al analizar vasos sanguíneos profundos. En la segunda parte aplicamos el método de la matriz de co-ocurrencia para determinar la posición y diámetro de un vaso sanguíneo profundo a partir de las imágenes de speckle.

4.1 Análisis Espacial

Las figuras 4.1a y 4.1b muestran imágenes típicas de speckle obtenida directamente de la CCD, para una epidermis con grosor $\delta=0$ y $\delta=1000 \mu\text{m}$ respectivamente, las imágenes 4.1c y 4.1d son las imágenes correspondientes de contraste utilizando el algoritmo espacial descrito en la sección 2.2.5 para una ventana deslizante de 5×5 píxeles, una velocidad de flujo de $V=20 \text{ mm/s}$ y un tiempo de exposición $T=10 \text{ ms}$. De estas imágenes (Fig. 4.1) podemos notar que para $\delta=0$, el vaso sanguíneo se observa a simple vista, es decir, es posible identificar los bordes del vaso, no así para $\delta=1000 \mu\text{m}$, donde los bordes se han perdido aun en la imagen de contraste.

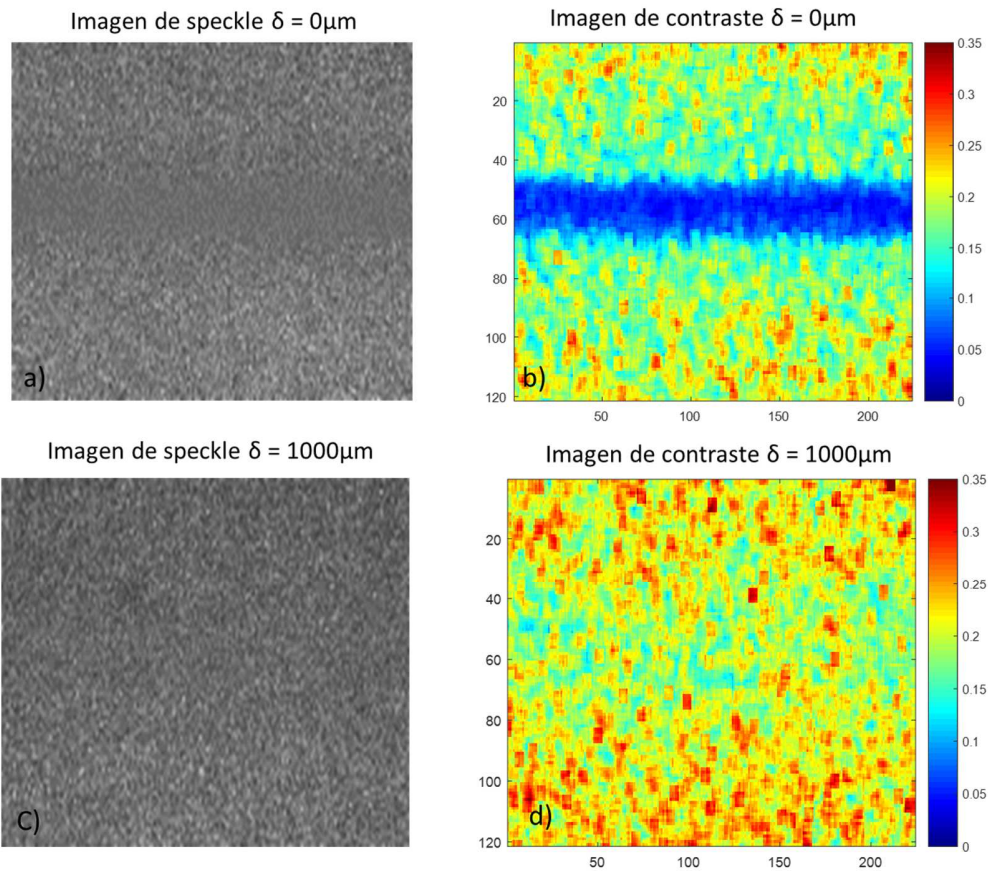
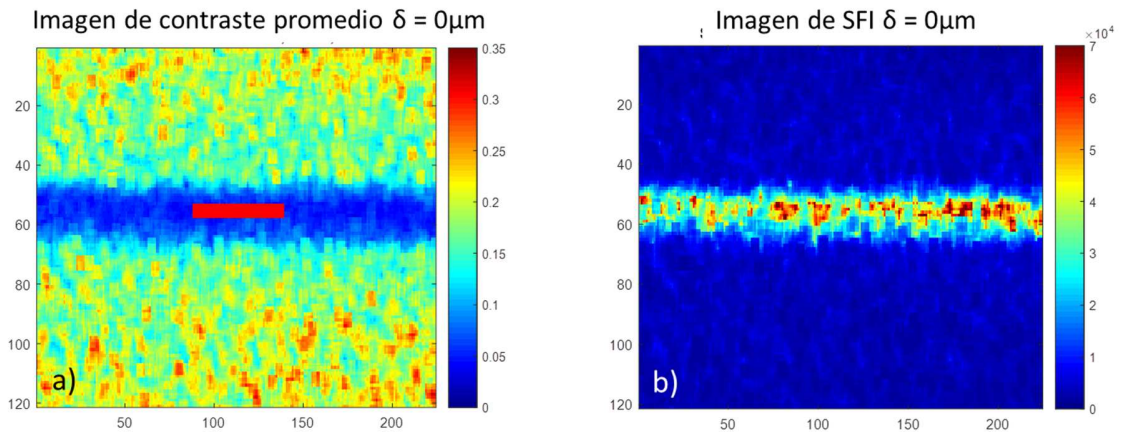


Fig. 4.1 a) Imagen de speckle típica y c) imagen de contraste para $\delta = 0 \mu\text{m}$, b) Imagen de speckle típica y d) imagen de contraste para $\delta = 1000 \mu\text{m}$.

Para minimizar el ruido generado por la ventana deslizante y obtener los valores de contraste sobre el vaso sanguíneo para una δ , T y V determinados, se promediaron 25 imágenes de contraste, sobre la imagen resultante promedio se definió una región de interés (RI) de 50×10 píxeles sobre la región central del vaso (rectángulo rojo, Fig. 4.2a), se calculó el valor promedio del contraste sobre la RI y el valor resultante es el contraste asignado para esos valores de δ , T y V , los valores de contraste espacial reportados en las gráficas subsecuentes corresponden a este valor promedio. En la Fig. 4.2b se observa la imagen de SFI (ver Ec. 2.31) correspondiente a la imagen de contraste en 4.2a.



4.2 a) Imagen de contraste promedio con RI señalada y b) imagen de SFI

En la Figura 4.3a se muestran los resultados experimentales de contraste espacial como función del tiempo de exposición T para una velocidad de 5 mm/s, y diferentes grosores (δ) de la epidermis. Para un valor de δ específico, podemos observar que a medida que el tiempo de exposición crece, el contraste espacial decae, este comportamiento es esperado, ya que a mayor tiempo de exposición mayor es el número de patrones de speckle que se superponen incoherentemente sobre la CCD, lo cual se traduce en un mayor difuminado y por lo tanto en una pérdida de contraste. Para valores suficientemente grandes de T (> 5 ms) el contraste espacial prácticamente alcanza un valor asintótico. Sin embargo, si nos fijamos en un tiempo T determinado, podemos observar que aun cuando la velocidad es constante, el valor del contraste cambia al cambiar el espesor de la epidermis (δ), lo cual es inaceptable, dado que la velocidad está dado por $V \propto 1/(TK^2)$ (ver Ec. 2.31), es decir los datos de la Figura 4.3a, sugieren que el contraste espacial predice diferentes velocidades en el vaso sanguíneo solo por estar a diferentes profundidades, cuando en realidad la velocidad es constante en las tres curvas.

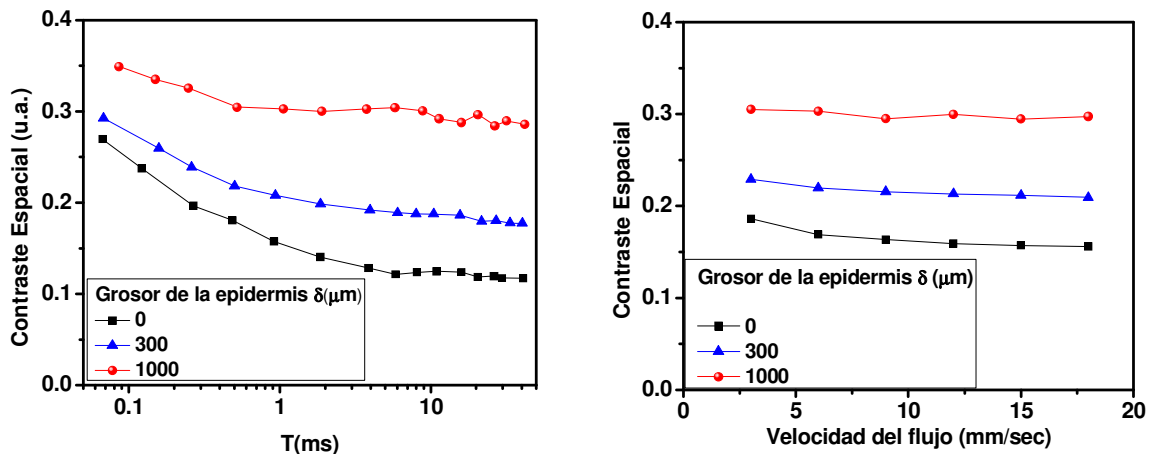


Fig. 4.3 a) Grafica de Contraste espacial vs T con V constante, b) grafica de contraste espacial vs V con T constante, para las diferentes δ de la epidermis.

En la Figura 4.3b, se muestra el contraste espacial como función de la velocidad del fluido en el vaso para los tres diferentes valores de δ . Una vez más, si sobre esta grafica tomamos un valor específico para V , el contraste espacial predicho y por lo tanto la velocidad estimada por el algoritmo espacial, dependen del grosor de la epidermis δ , cuando en realidad es la misma velocidad en los tres casos, una vez más, este resultado es inaceptable. En la sección siguiente analizamos este mismo conjunto de datos pero ahora utilizamos el algoritmo temporal.

4.2 Análisis Temporal

El conjunto de imágenes de speckle analizadas con el algoritmo espacial, se utilizó para su análisis con el algoritmo temporal, el cual se explica en la sección 2.2.6.

De la imagen de contraste obtenida mediante el algoritmo temporal se selecciona la misma RI utilizada para el algoritmo espacial, obteniendo nuevamente

el promedio del contraste temporal dentro de la RI para un valor determinado de T , V y δ .

En la Fig. 4.4a se muestran los resultados experimentales del contraste temporal como función del tiempo de exposición para los diferentes valores de δ . Una vez más, para un valor de δ constante, a medida que el tiempo de integración (T) aumenta, el contraste decae, sin embargo los valores de contraste temporal son menores que en el caso espacial, pero sobre todo, podemos notar que las diferencias entre las tres curvas son mínimas a pesar de la capa de epidermis, en otras palabras, el contraste temporal es independiente del grosor de la epidermis al menos dentro del rango de valores reportados en este trabajo. En la Fig. 4.4b se muestra el contraste temporal como función de la velocidad del fluido para los diferentes grosores de la epidermis. En este caso se puede observar claramente que el contraste temporal, y por lo tanto la velocidad estimada, es el mismo para las diferentes profundidades del vaso, que es el comportamiento esperado puesto que la velocidad estimada no tiene por qué cambiar si se aumenta su profundidad del vaso.

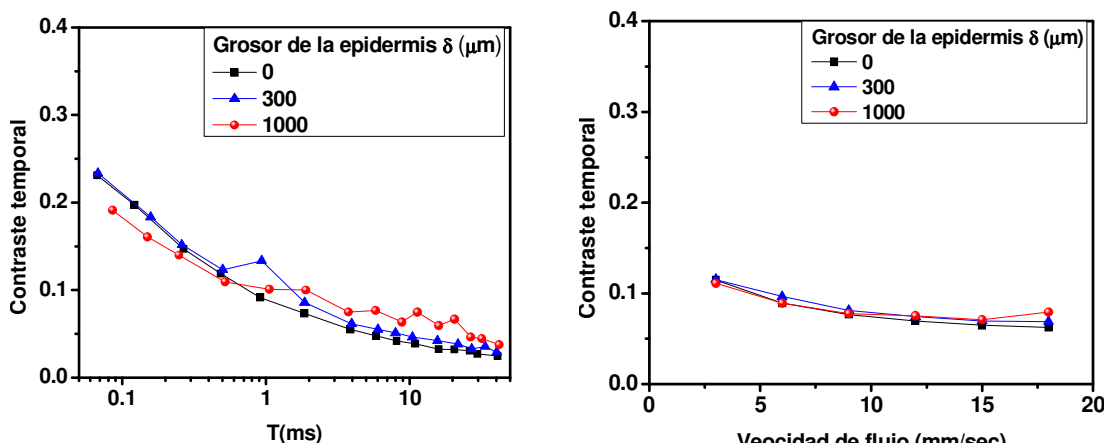


Fig. 4.4 a) Graficas de contraste temporal vs T con V constante y b) grafica del contraste temporal vs V con T constante, en las diferentes δ .

A partir de los resultados mostrados en las Figuras 4.3 y 4.4 podemos afirmar que el algoritmo temporal es menos sensible al speckle estático generado por la capa de epidermis en comparación con el algoritmo espacial.

4.3 Estimación de la posición y tamaño de vasos sanguíneos profundos

Después de obtener las 25 imágenes de speckle con $T = 10\text{ms}$ y $V = 20\text{mm/s}$ para los diferentes δ , estas se promediaron para obtener una imagen promedio (Fig. 4.5a) para cada valor δ de la epidermis. Esta imagen promedio se procesa con el algoritmo de la matriz de co-ocurrencia (ver sección 2.3.1) y cuyo código, en Matlab, se muestra en el Anexo 3.

El código de la matriz de co-ocurrencia (MO), inicialmente carga la imagen promedio de speckle para $\delta=0\ \mu\text{m}$, sobre la cual se define una RI de $5 \times m$, donde m es el número de columnas de la imagen promedio (4.5b), sobre esta RI se hace pasar una ventana deslizante de 5×5 para calcular una primera sección de la MO, posteriormente se mueve la RI a las siguientes 5 columnas y se vuelve a pasar la ventana obteniendo otra sección de la MO, este procedimiento se realiza hasta que analiza toda la imagen y se tiene una MO completa, de esta matriz de co-ocurrencia se obtiene un perfil de homogeneidad como función de la distancia (ver sección 2.3.2), a este perfil (Fig. 4.5c) se le calcula la curtosis (k_θ), este valor se toma como referencia para cuando se analicen las imágenes de speckle con los diferentes δ sobre el vaso sanguíneo.

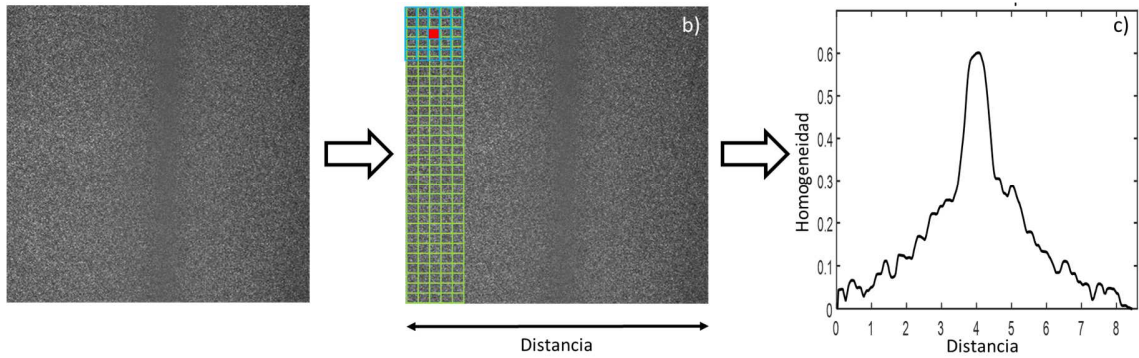


Fig. 4.5 a) imagen de speckle promedio, b) algoritmo de la matriz de co-ocurrencia, c) perfil de homogeneidad

El proceso anterior se repite para las imágenes de speckle promedio correspondientes a los diferentes δ , de donde definimos el parámetro a como el máximo del perfil de homogeneidad, k es la curtosis y σ es la desviación estándar del perfil de homogeneidad.

Para cada valor de δ se define el parámetro dif :

$$dif = a - (c * \sigma) \quad (4.1)$$

donde $c = k / k_0$. La intersección del perfil de homogeneidad determinan el ancho estimado del vaso sanguíneo $d_2 - d_1$ (Fig. 4.6).

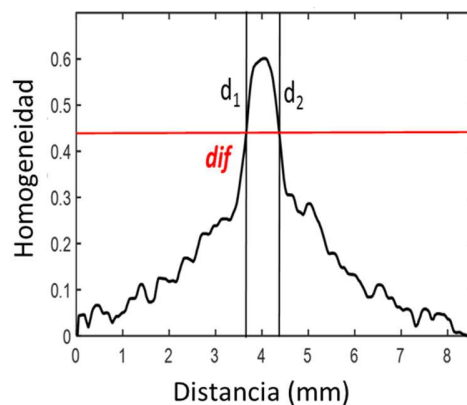


Fig. 4.6 Perfil de homogeneidad, donde se ubican dif , d_1 y d_2

En la imagen de speckle correspondiente al vaso sanguíneo superficial ($\delta = 0 \mu\text{m}$, Fig. 4.7a) se observa un difuminado vertical, esto indica la presencia de flujo y por lo tanto la ubicación del vaso, si se compara con el perfil de homogeneidad (Fig. 4.7b) se puede apreciar que en la ubicación del vaso se encuentra un pico.

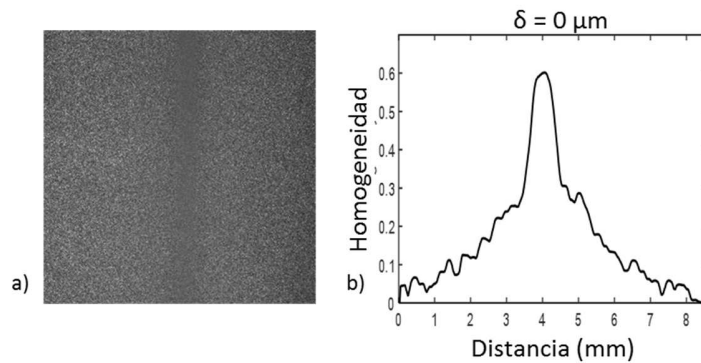


Fig. 4.7 a) Imagen de speckle del vaso in-vitro con un $\delta = 0 \mu\text{m}$ con su b) perfil de homogeneidad correspondiente en función de la distancia.

Como mencionamos anteriormente, el perfil de homogeneidad se obtiene para los diferentes valores de δ y en ellos se puede observar que conforme aumenta la profundidad del vaso el perfil de homogeneidad se va ensanchando (Fig. 4.8).

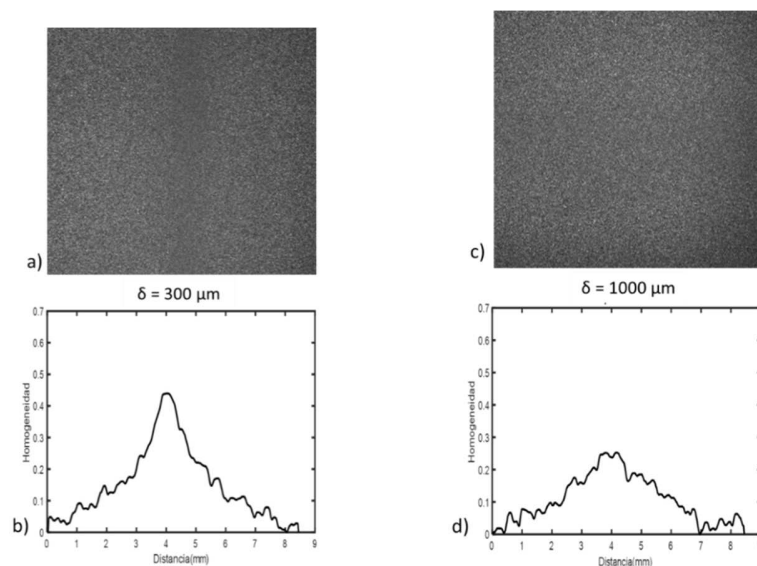


Fig. 4.8 a) Imagen promedio de speckle y su b) perfil de homogeneidad para $\delta = 300 \mu\text{m}$, c) Imagen promedio de speckle y el d) perfiles de homogeneidad para $\delta = 1000 \mu\text{m}$.

En base a los perfiles de homogeneidad se puede estimar el ancho del vaso tal como se muestra en la Fig. 4.9, donde el área encerrada por la línea blanca nos indica la ubicación y ancho estimado del vaso.

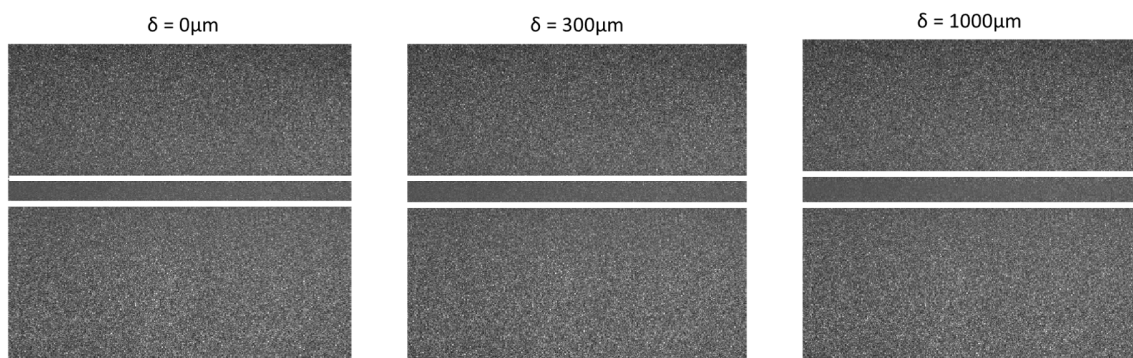


Fig. 33 Imágenes de speckle promedio con el ancho y ubicación del vaso.

Se realizó una tabla (Tabla 1) comparando mostrando los valores estimados para las diferentes profundidades del vaso sanguíneo. Tomando como referencia que el diámetro del vaso es de 550 μm .

δ (μm)	Valor estimado del ancho del vaso (μm)	Error (%)
0	550	-
300	571	3.8
1000	698	27

Tabla 1. Anchos estimados del vaso

En la Tabla 1 se puede observar que para 300 μm , el ancho es muy cercano a las 550 μm que es el diámetro del vaso utilizado, y para las 1000 μm el ancho se aparta alrededor de un 27% del valor actual.

Con los datos obtenidos con la matriz co-ocurrencia y el parámetro de homogeneidad es posible estimar la posición y el ancho del vaso sanguíneo en profundidades de hasta 1000 μm .

En el siguiente capítulo se mencionan las conclusiones generales de este trabajo.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES GENERALES

- Se estudió la teoría básica correspondiente al método de LSI y a la matriz de co-ocurrencia para tener una base en el desarrollo de esta tesis.
- Se fabricó un maniquí que simula las propiedades de esparcimiento de la epidermis y de la dermis de piel humana, de esta última se elaboraron diferentes grosores ($\delta = 300$ y $1000 \mu\text{m}$) que al colocarlas sobre el maniquí de dermis, simulaban diferentes profundidades de vasos sanguíneos. Para los vasos sanguíneos se utilizó un capilar cilíndrico recto en el cual se hacía circular un fluido (intralípido) que simulaba las propiedades de esparcimiento de la sangre.
- Se construyó el sistema óptico de un sistema LSI, donde se realizaron pruebas in-vitro con los maniqués fabricados y se capturaron imágenes de speckle para posteriormente ser analizadas con los algoritmos espacial y temporal.
- Se desarrollaron, en MATLAB, los algoritmos espacial, temporal y de la matriz de co-ocurrencia para procesar las imágenes de speckle.
- Se compararon los resultados de los algoritmos espacial y temporal, se encontró que este último es menos sensible al speckle estático generado por la epidermis en comparación con el algoritmo espacial, por lo cual proponemos el uso del algoritmo temporal cuando se vasos sanguíneos profundos se trata.
- De las imágenes de contraste obtenidas con LSI, se pudo apreciar que conforme aumenta la profundidad del vaso la visibilidad de este se reduce hasta llegar a un punto de no poder distinguirlo.

- Por otra parte, con el análisis de la matriz de co-ocurrencia es posible estimar el ancho y la ubicación del vaso para profundidades de hasta 1000 μm , que con solo LSI no es posible.

TRABAJO A FUTURO

- Se pretende utilizar la misma técnica de Laser Speckle Imaging (LSI) para medir el flujo sanguíneo en vasos con geometrías aleatorias.
- Proponemos el uso de otros descriptores de la matriz de co-ocurrencia, además del de homogeneidad utilizado en este trabajo, para el análisis de imágenes de speckle con el objetivo de determinar la posición de vasos sanguíneos profundos in-vitro con diferentes geometrías e in-vivo.
- Aplicar el método de la matriz de co-ocurrencia para analizar los resultados obtenidos mediante el análisis de componentes principales (PCA) a imágenes de speckle de vasos sanguíneos profundos.

ANEXOS

ANEXO 1. Algoritmo espacial

Los programas fueron desarrollados en MatlabR2015, estos realizan el análisis espacial de las imágenes de speckle, se conforma de tres programas, el principal el cual se le denominó LSISPA, en este se varían los valores del tiempo de exposición T, el número de imágenes y la región de análisis. Los otros dos programas calculan el contraste de la imagen.

#Programa spkcnt#

Calcula el contraste en toda la imagen

```
function SC = spkcnt(I,w);  
  
% Calcula el contraste para una ventana de wxw  
  
SC=zeros(size(I)); % crea una matriz del tamaño de la imagen  
  
SC=colfilt(I,[w w], 'sliding', @speckle_contrast); %Algoritmo espacial  
SC = double(SC); %Se cambia tipo doble
```

#Programa speckle_contrast#

Calcula el contraste en una subregión dada.

```
function sc=speckle_contrast(v)  
x=double(v); %Se convierte en tipo doble  
sc=std(x)./mean(x); % Realiza la operación correspondiente para el cálculo del contraste
```

#Programa LSISPA#

```
%ALGORITMO ESPACIAL  
clear all; % limpia todo antes de empezar  
close all; % cierra todas las ventanas  
con=0;  
w=5; %tamaño de ventana a X a  
T=0.009664; %Tiempo de exposición seg  
V=2:2:20;  
  
for ij= 1:1:30; %Pide una imagen del conjunto de imágenes del archivo
```



```

I=double(imread('T9_664ms_2mms_HeNe_L000um_34FPS.tif',ij)); %Genera la imagen como
matriz

% % Calculo de la imagen de contraste de speckle promedio
% %especificar el tamaño de la ventana (nombre,numimagen,tam ventana)
m=spkcnt(I,w); %imagen de contraste.
%
% %%se remueven las columnas y renglones que contienen ruido
%
for i=1:3
m(1,:)=[];
m(:,1)=[];
tam=size(m);
m(tam(1),:)=[];
m(:,tam(2))=[];
end
%
c1 = m > 1; % las siguientes tres líneas asigna el valor de a los valores que son mayores a uno
c2 = not(c1);
cf = m.*c2 + c1;
%
c1=cf < 0.01;
c2=not(c1);
contraste=cf.*c2+0.01*c1;
%
con=con+contraste;
end

prom=con./30; %Obtiene la imagen promedio
%
chanel1=prom(54:56,100:150); %Selecciona la ventana que obtendrá el valor a graficar del
contraste
p1=mean(mean(chanel1)); %Obtiene el promedio de la región seleccionada
%
SFI= 1./(T*(prom.^2));%Genera imagen SFI

canal1=SFI(54:56,100:150); % Selecciona la ventana que obtendrá el valor a graficar del SFI
pp1=mean(mean(canal1)); %Obtiene el promedio de la región seleccionada
%
%Despliega la imagen de intensidad
figure
imagesc(I)
colormap(gray)
colorbar
title('Intensidad T10ms, L0um, V2mms')

%Despliega la imagen de contraste
figure
imagesc(prom, [0 0.35])
colorbar
title('Contraste Promedio T10ms, L0um, V2mms')

%Despliega la imagen de SFI
figure
imagesc(SFI, [0 7000])

```

```
colorbar
title('SFI promedio T10ms, L0um, V2mms')
```

Anexo 2. Algoritmo Temporal

```
clear all
close all
T=0.009664; %Tiempo en seg.
numfiles = 30; % Número de archivos
img=0;
contador=0;
term1 = 0; % Variable para la media del cuadrado de cada pixel
term2 = 0; % Variable para la media del cuadrado de cada pixel
kt=0;
%
for ij = 1:1:numfiles; % Pide una imagen del conjunto de imágenes
    contador=contador+1;%
    img=double(imread('T10_400ms_2mms_HeNe_L200um_34FPS.tif',ij)); %Genera la imagen como
    matriz

        term1 = term1 + img.^2; % Agrega el cuadrado de cada pixel a TERM1
        term2 = term2 + img; % Agrega el valor de cada pixel a TERM2
        img=0;
    end;
term1 = term1/contador; % Calcula la media para TERM1
term2 = term2/contador; % Calcula la media de TERM2
term2 = term2.^2; % Calcula el cuadrado de la media para llegar a TERM2
N = (term1 - term2)./term2;
Kt=sqrt(N);% Calcular inverso de la velocidad de las partículas de scattering de acuerdo a la
ecuación del algoritmo temporal

    c1 = Kt > 1; % las siguientes tres líneas asigna el valor de uno a los valores que son mayores
a uno

    c2 = not(c1);
    cf = Kt.*c2 + c1;

    c1 = cf < 0.01;
    c2 = not(c1);
    cff = cf.*c2+0.01*c1; %valor del contraste, sin ruido
    K1 = cff;

chanel1=prom(54:56,100:150); %Selecciona la ventana que obtendrá el valor a graficar del
contraste
p1=mean(mean(chanel1)); %Obtiene el promedio de la región seleccionada
%
SFI= 1./(T*(prom.^2));%Genera imagen SFI

canal1=SFI(54:56,100:150); % Selecciona la ventana que obtendrá el valor a graficar del SFI
```

```

pp1=mean(mean(canal1)); %Obtiene el promedio de la región seleccionada
%

%Despliega la imagen de contraste
figure
imagesc(prom, [0 0.35])
colorbar
title('Contraste Promedio T10ms, L0um, V2mms')

%Despliega la imagen de SFI
figure
imagesc(SFI, [0 7000])
colorbar
title('SFI promedio T10ms, L0um, V2mms')

```

Anexo 3. Matriz de Co-ocurrencia

Este programa consta de dos partes, la primera calcula la matriz de co-ocurrencia de la imagen y la segunda señala la región del vaso en la imagen de speckle.

#Programa MocCo#

```

function [i j]=McoOcur(I, H, W)

H W]=size(I);%Obtiene el tamaño de la imagen promedio de intensidad

m=0;%min(min(I));
M=255;%max(max(I));
NL=M-m;
I2=I;

linea=5; ;%Número de líneas a tomar
h=mod(H,linea);
vals=zeros(h,5); %Genera la region ROI
H=H-h;
z=1;

for i=1:1:H
I=I(i:i+linea-1,:);
vals(z,5)=(std2(I)/mean2(I))*100;%coeficiente de variacion en porcentaje
%Las siguientes la líneas obtienes el calculo de la matriz de co-ocurrencia para las diferentes
direcciones
%0°
co1=graycomatrix(I, 'GrayLimits', [m M],'NumLevels',NL, 'offset', [0,1], 'Symmetric', true);
%45°
co2=graycomatrix(I, 'GrayLimits', [m M],'NumLevels',NL, 'offset', [-1,1], 'Symmetric', true);
%90°
co3=graycomatrix(I, 'GrayLimits', [m M],'NumLevels',NL, 'offset', [-1,0], 'Symmetric', true);
%135°
co4=graycomatrix(I, 'GrayLimits', [m M],'NumLevels',NL, 'offset', [-1,-1], 'Symmetric', true);

```

```

co=co1+co2+co3+co4;

stats=graycoprops(co, {'Homogeneity'}); %Se obtiene el parametro de homogeneidad

vals(z,1:2)=[i, i+linea];
vals(z,3:4)=[stats.Contrast stats.Homogeneity]; %Asigna los valores obtenidos en cada columna
z=z+1;
l=l+1;
end

%normalizacion
vals(:,5)=vals(:,5)./max(vals(:,5));

%erosion esta parte suaviza la imagen
se = ones(1,5);
out = imerode(vals(:,5)', se);

h=fspecial('average',[1,3]);
out=imfilter(out,h);
out(1)=max(out);
out(end)=max(out);

out=max(out)-out; %Invierte la imagen

[a b]=max(out); %regresa el valor y ubicación del máximo del perfil de homogeneidad
k=kurtosis(out) %Calcula el valor de la curtosis del perfil de homogeneidad
c=k/4.4246;
dif=a-(c*std(out)) %Valor para encerrar la región del vaso
[a i]=min(abs(dif-out(1:b)));
[a j]=min(abs(dif-out(b+1:end)));
j=j+b;

[i j] %Posicion del vaso

end

```

#Programa RegionVaso#

Define la zona del vaso sanguíneo utilizando la medida homogeneidad en base a la matriz de co-ocurrencia

```

clear all;
clc;

inc=5;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%-0um
J0=imread('0um.tif'); %Rcibe la imagen promedio de intensidad
[H W]=size(J0); %Tamaño de la imagen
[m M]=McoOcur(J0, H, W); %Calcua la matriz de co-ocurrencia, el perfil de homogeneidad y la
ubicación del vaso

disp('0um');
[m M] %Ubicación del vaso

```

```
J0(m,:)=250; ;%Genera la línea superior del ancho del vaso  
J0(M,:)=250; ;%Genera la línea inferior del ancho del vaso
```

BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. Valdivia, *Revista Peruana de Dermatología*, vol. 12, 2002.
- [2] J. D. B. a. S. Webster, «Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow,» *Journal Biomedical Opt.*, vol. 1, pp. 174-179, 1996.
- [3] V. Tushin, *Tissue Optics: Light scattering methods and instruments for medical diagnosis*, USA: SPIE, 2000.
- [4] A. K. D. David A. Boas, «Laser Speckle contrast imaging in biomedical optics,» *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, nº 1, 2010.
- [5] J. L. y. B. J. Taeyoon Son, «Contrast enhancement of laser speckle contrast image in deep vasculature by reduction of tissue scattering,» *Journal of the Optical Society of Korea*, vol. 17, nº 1, pp. 86-90, 2013.
- [6] J. O. y. B. C. Jeehyun Kim, «Magnetomotive laser speckle imaging,» *Journal of biomedical optics*, vol. 15, nº 1, pp. 011110-1-011110-5, 2010.
- [7] B. C. J. R. Z. J. K. y. J. S. N. Wim Verkruyse, «Thermal depth profiling of vascular lesions: automated regularization of reconstruction algorithms,» *Phys. Med. Biol.*, vol. 53, nº 5, pp. 1463-1474, 2008.
- [8] J. C. R. S. J. y. B. C. Caitlin Regan, «Photothermal laser speckle imaging,» *Optics letter*, vol. 39, nº 17, pp. 5006-5009, 2014.
- [9] N. A. Fomin, *Speckle Photography for Fluid Mechanics Measurements*, Alemania: Springer, 1998.
- [10] R. A. B. J. Hector J. Rabal, *Dynamic Laser Speckle and Applications*, USA: CRC Press, 2009.
- [11] J. D. Briers, «Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow,» *Optical Applicata*, vol. 37, nº 1-2, pp. 139-152, 2007.
- [12] J. W. Goodman, *Statistical Optics*.
- [13] M. C. T. B. A. SAleh, *Fundamental of photonics*, John Wiley & Sons, 1991.
- [14] J. C. R. S. Juan, «Simple correlation factor for Laser Speckle Imaging of flow dynamics,» *Optics Letters*, vol. 39, nº 3, pp. 678-681, 2014.
- [15] W. J. T. A. G. X. Z. y. A. K. D. A. B. Parthasarathy, «Robust flow measurement with multi-exposure speckle imaging,» *Opt. Express*, vol. 16, nº 3, pp. 1975-1989, 2008.

- [16] A. G. S. S. P. D. y. D. D. R. Bandyopadhyay, «Speckle-visibility spectroscopy: A tool to study time-varying dynamics.,» *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 76, p. 093110, 2005.
- [17] D. A. Boas, *Diffuse Photon Probes of structural and Dynamical Properties of Turbid Media: Theory and Biomedical Applications.*, Philadelphia, Pa.: Ph. D. dissertation (Department of physics and Astronomy, University of pennsylvania), 1996.
- [18] R. R.-G. I. G.-I. G. M.-N. y. B. C. J. C. Ramirez-San-Juan, «Impact of velocity distribution assumption on simplified laser speckle imaging equation,» *Opt. Express*, vol. 16, nº 5, pp. 3197-3203, 2008.
- [19] Q. L. S. Z. S. C. J. C. a. H. G. H. Cheng, «Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution.,» *Journal Biomedical Optics*, nº 8, pp. 559-564, 2003.
- [20] M. Presuatti, «La matriz de co.occurrencia en la clasificación multiespectral: Tutorial para la enseñanza de medidas texturales en cursos de grado universitario,» de *4a. Jornada de Educacao en Sensoriamento Remoto no Ambito do Mercosul*, Sao Leopoldo, 2004.
- [21] A. C. P. Leal, «Segmentación de imágenes por textura,» 2006.
- [22] K. S. a. I. D. Robert M. Haralick, *Textural Features for image classification*, USA: IEEE, 1973.
- [23] C. K. K. A. K. S. e. a. Rolf B. Saager, «Multi-layer silicone phantoms for the evaluation of quantitative optical techniques in skin imaging,» *SPIE*, vol. 7567, 2010.
- [24] Á. M. F. Doval, *Una aproximación sistemática a la holografía-TV y desarrollo de nuevas técnicas para la cuantificación y análisis de magnitudes dinámicas con periodicidad temporal*, Universidad de Vigo: PhD Tesis, 1997.