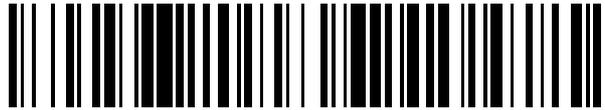


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 733**

51 Int. Cl.:

G06T 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2012 E 12756553 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2710551**

54 Título: **Calibración continua y en tiempo real de imágenes microscópicas basadas en fibras**

30 Prioridad:

16.05.2011 US 201161486551 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.06.2015

73 Titular/es:

**MAUNA KEA TECHNOLOGIES (100.0%)
9, rue d'Enghien
75010 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**SAVOIRE, NICOLAS y
VERCAUTEREN, TOM**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 537 733 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Calibración continua y en tiempo real de imágenes microscópicas basadas en fibras

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere de manera general a un método para el procesamiento de imágenes obtenidas por medio de detectores de imagen con funciones de transferencia no uniformes y posiciones espaciales irregulares y, en particular, por medio de una guía de imágenes consistente en una pluralidad de fibras ópticas.

10 ANTECEDENTES

Cuando se realiza la obtención de imágenes por barrido láser mediante un haz de fibras ópticas, la salida bruta es un grupo de muestras de la señal directamente observada por el detector durante el barrido.

15 Como se describe en la Patente de EE.UU. N° 7.903.848, a partir de esta salida bruta se puede reconstruir en un primer momento una imagen bruta. En esta imagen bruta, a cada fibra dada pueden estar asociados varios píxeles. Cada uno de esos píxeles asociados a una fibra dada proporciona una medida diferente de la señal devuelta por el mismo volumen espacial del tejido, situado enfrente de la fibra en su extremo distal. Esta señal devuelta puede ser debida a fluorescencia, retrodispersión, o a cualquier otra radiación producida por la interacción entre la luz incidente y el tejido.

20 Esas diversas medidas son diferentes porque la cantidad exacta de luz de excitación inyectada en la fibra durante el barrido depende en realidad de la posición espacial del punto láser con respecto a la fibra. Además, si el punto láser se solapa con varias fibras, la medida correspondiente puede componer la señal devuelta recogida por estas fibras. Típicamente, a partir de los valores de los datos brutos, se puede hacer una estimación de la señal devuelta posiblemente asociada al volumen espacial situado enfrente de la fibra mediante un método en cierto modo *ad hoc* como en la Patente de EE.UU. N° 5.878.159, o con un modelo estadístico riguroso como en la Patente de EE.UU. N° 7.903.848. Esta estimación resultante es entonces la medida que se puede asociar a la fibra dada.

30 Habiendo hecho esto, se puede ver conceptualmente cada fibra como si actuara como un único detector, o un único píxel CCD. Pero este CCD imaginario es diferente a los CCD comunes, al menos por cuatro razones:

- a. El haz de fibras no está compuesto por fibras espaciadas regularmente. Este CCD imaginario no es una cuadrícula;
- 35 b. La cantidad de luz inyectada, transmitida y a continuación recogida es también específica para cada fibra, en parte porque los diámetros de las fibras no son todos iguales y porque las ópticas del sistema proximal tienen aberraciones. Como consecuencia de ello, los píxeles de este CCD imaginario suelen tener, al menos, diferentes sensibilidades;
- 40 c. En las interfases de las fibras o dentro de las propias fibras se pueden producir algunos efectos de dispersión óptica (Rayleigh, Fresnel, Raman, etc.) y, debido a ello, también puede aparecer alguna señal, ya sea lineal o no lineal. Por esas razones, la señal devuelta recogida procedente de una fibra no es nula incluso si no hay señal objeto producida directamente por el tejido. Asimismo, este valor de fondo es diferente para cada fibra; y
- 45 d. Además, esos tres fenómenos mencionados anteriormente pueden variar con el tiempo. Por ejemplo, en el contexto de la obtención de imágenes por fluorescencia, si las fibras presentan algo de autofluorescencia, generalmente su intensidad disminuirá debido al fotoblequeo ("*photobleaching*").

50 En resumen, después de la asociación de píxel bruto a fibra, cada fibra se puede ver como un detector de un único píxel con una función de transferencia específica (por ejemplo, desplazamiento -"offset"- específico y ganancia o sensibilidad específica). Por lo tanto, el sistema de obtención de imágenes es irregular en el sentido de que las funciones de transferencia son variables en el tiempo y no uniformes, es decir, dependen del píxel, y en el sentido de que los píxeles están situados de manera irregular en el dominio espacial. En lo que sigue, para mayor claridad, nos referimos a estos detectores conceptuales como fibras, pero debería ser evidente que la explicación no tiene por qué estar restringida a fibras físicas reales.

55 En la Patente de EE.UU. N° 5.878.159 la obtención de imágenes por medio de un haz de fibras ópticas se realiza con un haz de fibras coherentes, es decir, un haz de fibras en el cual la disposición espacial de las fibras se mantiene a lo largo de toda la longitud del haz. En otros escenarios puede ser ventajoso utilizar un haz de fibras incoherentes. En este caso, la asociación de píxel bruto a fibra también tiene que tener en cuenta la correspondencia dentro-fuera de la fibra, de modo que todavía se pueda ver cada fibra como un detector de un único píxel cuya posición espacial con respecto a las otras fibras en el extremo distal es conocida. La recuperación de la correspondencia dentro-fuera de la fibra se puede realizar por diferentes medios, tales como los presentados en Lazaro et al., Sensors, 2009, o en Demuynck y Menendez, WSEAS Transactions on Signal Processing, 2008. Las Patentes de EE.UU. N° 7.903.848 y N° 5.878.159 proponen diferentes medios de procesamiento de datos obtenidos por detectores con funciones de transferencia de las fibras no uniformes. La Patente de EE.UU. N° 5.878.159 sólo describe una invención en la cual las funciones de transferencia de las fibras son funciones lineales simples (la señal devuelta por la fibra se modela como el producto de la señal objeto por una constante de ganancia dependiente de

la fibra). Por lo tanto esa patente no aborda el caso en el cual la señal de fondo puede no ser nula cuando la señal objeto es nula. La Patente de EE.UU. N° 7.903.848 describe un método de procesamiento de imágenes que realiza un ajuste basado en funciones de transferencia afines de las fibras. Esto se puede conseguir obteniendo dos imágenes, una en un medio de fondo homogéneo (por ejemplo, aire o agua) y una en un medio homogéneo que tenga una señal objeto fuerte (por ejemplo, una solución fluorescente en el caso de un microscopio fluorescente). A continuación, a partir de estas dos imágenes se deducen las funciones de transferencia afines de la fibra (es decir, los desplazamientos y las ganancias). Se debería observar que aunque, para mayor claridad, nos referimos a estas imágenes de referencia como si fueran obtenidas en medios homogéneos, en otros contextos pueden simplemente corresponder a señal objeto homogénea (por ejemplo, imágenes de campo plano).

Los sistemas de obtención de imágenes basados en fibras se utilizan habitualmente, por ejemplo, para realizar endomicroscopía, es decir, endoscopia a nivel microscópico. En un contexto clínico como este, obtener las dos imágenes requeridas por la Patente de EE.UU. N° 7.903.848 antes de cada uso del sistema de obtención de imágenes, es decir, antes de cada procedimiento de endomicroscopía, es problemático. Es más, poner el extremo distal del haz de fibras en el interior de un medio homogéneo podría poner en riesgo la limpieza o asepsia de la fibra que puede entrar en contacto con el paciente y, al mismo tiempo, podría hacer más engorroso el procedimiento para el médico. También debería ser evidente que, en otros casos de uso, encontrar el medio homogéneo correcto podría no ser trivial. Para abordar este problema pero poder todavía realizar un ajuste basado en funciones de transferencia afines de las fibras, la Solicitud de Patente PCT N° PCTIB2009008012 describe una invención en la cual antes del procedimiento sólo se obtiene la imagen de fondo, típicamente en el aire. Esta imagen de fondo se mapea a continuación de forma automática a datos (por ejemplo, imágenes de fondo y de señal objeto fuerte) que se han obtenido antes del procedimiento (por ejemplo durante la fabricación) y que están almacenados junto con el sistema de obtención de imágenes (por ejemplo en un ordenador de control). A partir de la imagen de fondo obtenida in situ y de los datos previamente mapeados, la Solicitud de Patente PCT N° PCTIB2009008012 deduce las ganancias y los desplazamientos de las funciones de transferencia afines de las fibras. El sistema de obtención de imágenes comprende típicamente una unidad perdurable (por ejemplo, la unidad de barrido láser) y un accesorio desechable (por ejemplo un haz de fibras). En la estrategia de la Solicitud de Patente PCT N° PCTIB2009008012, típicamente sólo el accesorio desechable estará disponible durante la fabricación para obtener los datos necesarios para el procesamiento de imágenes in situ, mientras que la unidad perdurable permanecerá en la ubicación del usuario final. Asimismo, debería ser evidente que cualquier dato obtenido durante la fabricación permanecerá constante en el tiempo aunque las características del sistema de obtención de imágenes puedan variar a largo plazo, por ejemplo debido al envejecimiento o a las características ambientales. Por lo tanto, los datos sólo pueden ser una aproximación sesgada de lo que habría sido obtenido con el sistema de obtención de imágenes final completo en el momento de la obtención de la imagen. Esto producirá una aproximación sesgada de las funciones de transferencia de las fibras y, por lo tanto, conducirá a una calidad de imagen inferior a la óptima. Asimismo, esta solución requiere que el accesorio desechable sea enviado al usuario final con los datos correspondientes a dicho accesorio. Es necesario que el método de procesamiento de imágenes acceda a los datos y esto típicamente requerirá un procedimiento de instalación engorroso antes del primer uso del accesorio desechable.

Además de los defectos ya enumerados de estas estrategias anteriormente mencionadas, todas ellas comparten otras limitaciones comunes. Debido a que, típicamente, las imágenes de referencia (señal de fondo y señal de objeto fuerte) no se obtienen en un medio que tiene exactamente las mismas propiedades físicas (por ejemplo, apertura numérica) que el objeto de interés final (cuyas propiedades a menudo se desconocen), las funciones de transferencia de las fibras estimadas, en cualquier caso, sólo serán aproximaciones sesgadas de las funciones de transferencia de las fibras vistas en el objeto. En otras palabras, estas funciones de transferencia de las fibras típicamente no sólo dependen de la unidad perdurable y del accesorio desechable sino que dependen del montaje de imagen *completo*, incluido el medio explorado.

Además, ninguna de estas estrategias anteriormente mencionadas puede hacer frente a funciones de transferencia de las fibras variables en el tiempo. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, este escenario es al menos típico en el caso de fibras que muestran una señal de fondo de autofluorescencia. Típicamente, los valores de desplazamiento debidos a la autofluorescencia de las fibras disminuyen con el tiempo, y en una cantidad diferente de una fibra a la otra, lo que hace que cualquier medida realizada antes de la utilización sea escasamente relevante. No sólo no refleja el nivel de fondo medio observado en tiempo real durante el procedimiento, sino que la diferencia en la variación de este fondo de una fibra a otra afecta a la calidad de la imagen y eventualmente aparece como un *velo* en la imagen, es decir, como un patrón estático. Una correcta iluminación previa de las fibras justo antes del uso del sistema de obtención de imágenes puede producir una estabilización de la autofluorescencia y, por lo tanto, puede considerarse una solución potencial. Sin embargo, esto impone fuertes restricciones al usuario final y no se generaliza a otros fenómenos físicos variables en el tiempo.

La técnica anterior muestra que el problema de los detectores de imagen no uniformes surge en otros campos y que se ha abordado con diferentes métodos, como se muestra por ejemplo en Weiss, ICCV 2001, o en Kuhn et al, Astronomical Society of the Pacific 1991. Por consiguiente, existe una necesidad de un sistema y método que permitan el procesamiento de los datos proporcionados por detectores de este tipo.

SUMARIO

El objeto de la invención propuesta es proporcionar una nueva forma de realizar un ajuste basado en estas funciones de transferencia no uniformes, variables en el tiempo, de las fibras, de manera que cuando se observe un medio uniforme se obtenga una imagen uniforme. A la estimación de las funciones de transferencia de las fibras para la realización de ajustes basados en ellas se le llamará calibración del sistema de obtención de imágenes. Describimos un método que garantiza una optimización continua y en tiempo real de la calibración calculada directamente a partir de imágenes objeto obtenidas por el sistema de obtención de imágenes durante su utilización. Por lo tanto, nuestra invención no requiere necesariamente que se obtengan datos de calibración previos, ya sea in situ con un procedimiento engorroso para el usuario o durante una etapa de la fabricación con una transmisión potencialmente compleja de los datos al usuario.

Los objetos, rasgos, efectos operativos y méritos anteriormente mencionados, y otros, de la invención, resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción y de los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

A continuación, se describirá la invención de forma más concreta por medio de una realización preferente haciendo referencia a los dibujos:

La Figura 1 es un diagrama de estados de ejemplo que representa, a alto nivel, los componentes principales de un sistema de acuerdo con la presente invención.

La Figura 2 es un diagrama de estados de ejemplo que representa las transiciones entre modos de funcionamiento potenciales de la invención descrita en este documento.

La Figura 3 representa un diagrama de flujo de ejemplo del subcomponente de gestión de la deriva del sistema de obtención de imágenes representado en la Figura 2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En general, las realizaciones de la invención proporcionan un método que puede hacer frente a funciones de transferencia de las fibras que sean más complejas que un simple factor de ganancia, al aspecto de la variación en el tiempo de la función de transferencia de las fibras, y a la distribución espacial irregular de los detectores.

Visión general de la calibración a ciegas

Las realizaciones de la invención permiten encontrar una calibración óptima del sistema de obtención de imágenes basada en la señal objeto de entrada que recibe dicho sistema. A esta calibración se le podría llamar ciega en el sentido de que no se basa necesariamente en datos de calibración previos específicos.

La observación básica detrás de la presente invención es que, cuando fibras vecinas miran a objetos físicos, dichas fibras vecinas *ven* casi la misma señal objeto a lo largo del tiempo. Esta propiedad es debida a la naturaleza mayoritariamente continua de las imágenes. Esto se ha estudiado en detalle para imágenes naturales y se cumple para casi todas las imágenes de objetos físicos. Dado que las funciones de transferencia de las fibras son típicamente constantes en el tiempo o varían lentamente en comparación con la variación de la señal objeto, las señales devueltas observadas procedentes de fibras vecinas estarán muy correlacionadas en el tiempo. Dado un modelo de las funciones de transferencia de las fibras, se puede deducir un modelo de las funciones de relación entre fibras vecinas. Cada nuevo fotograma proporciona una medida de muestra para cada función de relación de cada conjunto de fibras vecinas. Acumulando una cantidad suficiente de estas medidas del objeto de interés, nuestra invención calcula una buena estimación de estas funciones de relación. Como se hará más evidente más adelante, a este paso de estimación de las funciones de relación también se le puede denominar paso de regresión. Invertiendo el sistema completo de funciones de relación, la presente invención proporciona una estimación adaptada de las funciones de transferencia de las fibras. También se puede usar una opción alternativa, más exigente desde el punto de vista de cálculo. Por ejemplo, en vez de un procedimiento de dos pasos, regresión-inversión, en algunos casos podría ser ventajoso construir una única función de coste, basada en la discrepancia entre las medidas y las funciones de transferencia de las fibras unidas. A continuación se puede optimizar esta función de coste con respecto a las funciones de transferencia de las fibras.

El principio de nuestra invención no está restringido a fibras vecinas espaciales directas sino que puede funcionar siempre que se defina una gráfica *de afinidades* que una las fibras que se sabe que estadísticamente *ven* señales objeto muy correlacionadas. En algunas realizaciones de la invención en las que afinidad puede estar relacionada con vecindad espacial, esta gráfica se puede construir típicamente a partir de una triangulación de Delaunay de las posiciones de las fibras, lo cual es un medio intuitivo de definir vecindad espacial. Además, el objeto y la señal devuelta no tienen por qué estar restringidos a valores escalares sino que pueden ser perfectamente valores vectoriales como en el sistema de obtención de imágenes descrito en la Patente de EE.UU. N° 7.869.679.

Derivación matemática general de la calibración ciega

Sea p_i la posición espacial de la fibra i con respecto a la posición espacial de una fibra arbitraria, por ejemplo, de la primera;

Sea $v_i(t)$ la señal devuelta medida por la fibra i en el instante t . $v_i(t)$ puede ser escalar o vectorial;

Sea $u_i(t)$ la señal objeto *vista* por la fibra i en el instante t . $u_i(t)$ puede ser escalar o vectorial;

Sea $\psi_i(\cdot)$ la función de transferencia de la fibra i . Debido a que se asume que las funciones de transferencia de las fibras son constantes o varían lentamente en el tiempo en comparación con la señal objeto, para mayor simplicidad, no las indexamos por tiempo;
Sean E los bordes de la gráfica de *afinidades* de las fibras.

5

Dadas estas notaciones, tenemos, teniendo en cuenta el ruido de obtención de imagen:

$$v_i(t) \approx \psi_i(u_i(t)) \quad (1)$$

10 Con la suposición de que para cualquier pareja $(i,j) \in E$ de fibras que forman un borde de la gráfica de afinidades, la señal objeto vista por las dos fibras está muy correlacionada y sólo se diferencia en un término de ruido que puede ser grande sólo en un conjunto disperso de bordes, tenemos:

$$u_i(t) \approx u_j(t) \quad (2)$$

15

$$\psi_i(u_i(t)) \approx \psi_j(u_j(t)) \quad (3)$$

$$v_i(t) \approx \psi_i(\psi_j^{-1}(v_j(t))) = \psi_i \circ \psi_j^{-1}(v_j(t)) \quad (4)$$

20 Debería resultar evidente que la relación anterior no tiene por qué estar restringida a casos en los que las señales objeto vistas por las dos fibras relacionadas sólo se diferencian en un término de ruido, sino que también se podría adaptar a casos en los que las fibras relacionadas observan versiones transformadas con ruido de la señal objeto con funciones de transformación conocidas.

25 La idea detrás de la presente invención es utilizar estas relaciones para estimar la función de transferencia de las fibras. Dada una variación suficiente de la señal objeto $u_i(t)$ (y por lo tanto también, por suposición, de $u_j(t)$), habrá grandes variaciones de $v_i(t)$ y de $v_j(t)$. A partir de esta señal devuelta, nuestra invención propone estimar las funciones de transferencia compuestas $\psi_i \circ \psi_j^{-1}$ para cada par de fibras relacionadas en la gráfica de *afinidades*. Los resultados de este paso de regresión conducen a un sistema de ecuaciones sobredeterminado que se puede invertir, o resolver, para obtener una estimación de todas las funciones de transferencia de las fibras.

30

Visión general de la calibración adaptativa variable en el tiempo

Aunque cada calibración ciega se basa en la suposición de que las funciones de transferencia de las fibras son constantes en el tiempo, nuestra invención se puede utilizar para estimar funciones de transferencia de las fibras variables en el tiempo trabajando en ventanas temporales en las cuales la suposición sigue siendo válida. En una realización preferente de la descripción, el método acumulará la señal de retorno observada en un búfer cuyo tamaño máximo se elige de acuerdo con la suposición anterior. En cuanto el búfer contiene suficiente información se puede lanzar un procedimiento de calibración ciega.

35

40 En la Figura 1 se ilustra una visión general de ejemplo de cómo la invención puede manejar la citada calibración variable en el tiempo con ventanas temporales.

La estimación de las funciones de relación a partir de señales devueltas por fibras vecinas requiere una cierta cantidad de muestras con un rango de valores suficientemente amplio para obtener una estimación precisa. Por ejemplo, si el extremo distal del haz de fibras permanece en el aire, las fibras sólo recogen ruido y señal de fondo y no es posible realizar ninguna regresión. Es necesario que la señal objeto recogida por las fibras varíe a lo largo del tiempo. En un contexto típico de obtención de imágenes, el movimiento de las fibras con respecto al objeto explorado generará el amplio rango de señales observadas por las fibras. En otras realizaciones, las variaciones de la señal objeto pueden proceder de variaciones del propio objeto como ocurrirá si el objeto es sometido a fotoblanqueo. Otra realización podría comprender variaciones activas de la señal, lo que significa que las variaciones podrían ser motivadas por acciones intencionadas tales como, por ejemplo, modulación de la iluminación o movimientos haz-objeto impuestos.

45

50

Cuanto mayor sea la ventana temporal, más precisas serán las regresiones y por lo tanto más precisas serán también las calibraciones. Sin embargo, en algunos casos también podría ser ventajoso obtener una estimación rápida. Por ejemplo, si la calibración inicial (la que se utiliza antes de que se pueda lanzar la primera calibración ciega) se basa en un conocimiento previo poco detallado, para el usuario será muy interesante disponer de una primera estimación rápida que será refinada posteriormente. Adaptando su criterio en la ventana temporal, la presente invención se puede utilizar para conseguir ese resultado.

55

60

Inicialización

La calibración se puede inicializar de muchas formas diferentes. Una de las opciones más evidentes sería utilizar la técnica anterior para realizar la inicialización. Por ejemplo, se puede utilizar una imagen de fondo que se obtendrá en

la puesta en marcha del sistema de obtención de imágenes. Sólo esto puede ya proporcionar una primera estimación útil de algunos parámetros de las funciones de transferencia de las fibras, mientras que los demás parámetros se pueden configurar de acuerdo con una previa potencialmente no informativa. Otra opción complementaria es utilizar datos que se han calculado previamente durante la fabricación como se describe en la Solicitud de Patente PCT N° PCTIB2009008012.

Otra opción, que se puede combinar con las anteriores, se basa en grabar las calibraciones una vez que se han estimado. Durante la puesta en marcha del sistema de obtención de imágenes, el método puede ir a buscar una calibración grabada, si existe alguna de un uso anterior del sistema de obtención de imágenes.

Sin embargo, típicamente el sistema de obtención de imágenes no estará exactamente en la misma configuración entre dos usos diferentes. Por ejemplo, si el sistema de obtención de imágenes comprende una unidad perdurable y un accesorio desechable que tienen que ser desconectados (por ejemplo, para tareas de limpieza), la reconexión entre usos modificará potencialmente la apariencia de las fibras en la imagen bruta. Esto hace que la grabación y recarga de la calibración sea una operación no trivial. Ventajosamente, la grabación de una calibración se puede realizar con la ayuda de la obtención de una imagen *de referencia*, por ejemplo, en el aire o fondo, la primera vez que se calibra el sistema de obtención de imágenes. Esto se puede hacer, por ejemplo, junto con la obtención de la imagen de fondo para la primera inicialización del sistema de obtención de imágenes. Esta imagen *de referencia* se puede utilizar para identificar las fibras cuyas funciones de transferencia están grabadas. La imagen y la posición de las fibras se pueden almacenar en disco. Una vez que se dispone de una estimación de la calibración, las funciones de transferencia estimadas de las fibras se pueden almacenar junto con la imagen de referencia. En la siguiente calibración del sistema de obtención de imágenes, la imagen de referencia se puede mapear con la imagen de fondo y las funciones de transferencia de las fibras previamente almacenadas se pueden usar como inicialización.

Como se ha mencionado anteriormente, estas estrategias se pueden combinar de diferentes maneras. Por ejemplo, algunas partes de las funciones de transferencia de las fibras pueden proceder de la calibración grabada, mientras que otras podrían proceder de estrategias alternativas como las presentadas en la técnica anterior, pero sin estar limitadas a ellas. También se puede utilizar una imagen obtenida durante la fabricación para que sirva como imagen de referencia para la grabación.

Estabilizando la calibración ciega

Como debería resultar evidente de la descripción anterior, realizar una nueva calibración ciega implica una gran cantidad de regresiones y la resolución de un gran sistema inverso de ecuaciones. Es bien sabido que dichos problemas podrían no ser sencillos de resolver debido a errores numéricos e inestabilidades. Ahora proporcionamos algunos medios para estabilizar los cálculos, más allá de los medios estándar, que son particularmente apropiados para ser usados en determinadas realizaciones de la presente invención. Se debería observar que no es necesario que algunas de las técnicas propuestas estén restringidas al caso de funciones de transferencia de las fibras variables en el tiempo, sino que también pueden ser útiles para el caso más sencillo de funciones de transferencia de las fibras que sean constantes en el tiempo.

Típicamente, las técnicas de regresión estándar se basan en un modelo gaussiano del ruido. En nuestro caso, no hay ninguna razón para que el ruido en la medida de las funciones de relación de las fibras esté distribuido como una normal y es más probable que siga una distribución de cola larga, en la que los valores grandes corresponden a bordes fuertes en la imagen obtenida. Estos valores grandes actúan como valores atípicos en la regresión, y pueden distorsionar fuertemente los resultados de la regresión. En segundo lugar, las regresiones clásicas son asimétricas. Estas regresiones clásicas suponen que la variable independiente está libre de errores lo cual típicamente no es el caso en nuestro escenario. Para evitar las limitaciones anteriores, nuestra invención se puede utilizar en conjunto con métodos de regresión ortogonales robustos incluidos, pero no limitados a, estimadores M, mínimos cuadrados recortados y similares. Además, nuestra invención también se puede beneficiar de la utilización de un modelo estadístico preciso del ruido para realizar una regresión adaptada. Esto se podría hacer por ejemplo con estimadores de máxima verosimilitud.

En un escenario típico, también podría ser útil aplicar algo de preprocesamiento a la medida de las funciones de relación de las fibras antes de realizar la regresión. Por ejemplo, cuando el método estime que hay datos suficientes para realizar una calibración ciega, podría ser ventajoso eliminar los datos correspondientes a fibras saturadas y filtrar los datos para conseguir una cobertura relativamente uniforme del rango dinámico. El objetivo de este paso es evitar tener demasiados valores similares para las regresiones. Efectivamente, esto puede, en algunos casos, distorsionar las regresiones, y las estadísticas robustas. Por ejemplo, un estimador de la mediana no puede manejar el caso en que más de la mitad del número total de muestras representan fondo. Puede existir el problema opuesto: si hay muy pocos fotogramas de fondo, las regresiones podrían ser imprecisas. Para aliviar este problema, se podrían añadir fotogramas de fondo *virtuales*. De forma más general, se pueden asignar pesos a las muestras para igualar mejor los correspondientes histogramas.

Todavía haciendo referencia al problema de regresión y a la construcción del sistema a resolver, pueden aparecer otros problemas prácticos. Una vez que se han calculado las regresiones, algunos resultados de regresión pueden tener una mayor confianza que otros. Por tanto, podría ser interesante tener en cuenta estas confianzas, por ejemplo

asignando un peso a las correspondientes ecuaciones en el sistema inverso a resolver. Para ello, se puede utilizar una medida estándar de la bondad del ajuste como por ejemplo el coeficiente de determinación R^2 o cualquier otra medida de la bondad del ajuste mejor adaptada al modelo de ruido.

5 Además, también puede suceder que algunas fibras del haz de fibras estén *muertas*, que no transmitan casi ninguna luz. Las regresiones calculadas entre esas fibras y sus vecinas probablemente serán incorrectas. En este caso, podría ser deseable detectar y desechar las correspondientes regresiones. Por ejemplo, esto se puede hacer fijando un umbral para la medida de confianza (por ejemplo, la bondad del ajuste). Si la confianza está por debajo del umbral, la correspondiente regresión se puede utilizar con un peso cero en el sistema inverso. Si se eliminan demasiadas relaciones, el rango del sistema puede disminuir. En un modo de funcionamiento típico, este rango estará relacionado con el número de componentes conectados en la gráfica *de afinidades* que unen las fibras. La solución para cada componente es independiente de las otras, dado que no existen relaciones entre ellos. Si existen varios componentes conectados, hay varias opciones disponibles para calcular la calibración final. En algunas realizaciones de la invención, todos los componentes conectados se pueden resolver de manera independiente. En otras realizaciones, podemos elegir calcular sólo las funciones de transferencia de las fibras del mayor componente conectado y propagar los resultados al resto de las fibras. En otras realizaciones adicionales, las soluciones para cada componente independiente se pueden fusionar, por ejemplo, imponiendo algunas restricciones de suavidad.

10 En algunas realizaciones de la presente invención, podríamos tener acceso a información previa acerca de las funciones de relación entre fibras vecinas o acerca de las funciones de transferencia de las fibras. Esta información se podría utilizar para regularizar los cálculos de las regresiones o la inversión del sistema.

15 Por ejemplo, si se obtiene una imagen de fondo inicial antes del uso del sistema de obtención de imágenes y si se asume que la señal de fondo permanece constante en el tiempo, se podría realizar un ajuste en la señal devuelta basado en la señal de fondo y de esta forma se podría trabajar sobre funciones de transferencia de las fibras simplificadas. Otro ejemplo sería el caso en que, de nuevo, se obtiene una imagen de fondo inicial pero en el que se dispone de un modelo de la evolución temporal de la señal de fondo (por ejemplo, disminución de la autofluorescencia). Esta ley de evolución temporal se podría introducir en la regresión y en la inversión del sistema. Las ventajas de estas realizaciones se harán más evidentes en lo que sigue, cuando se desarrollen en un ejemplo práctico.

20 Algunas realizaciones de la presente invención, cuando se usan en modo variable en el tiempo, también se podrían beneficiar de la introducción de una suavidad o consistencia temporal en las calibraciones estimadas. Esto se podría hacer, por ejemplo, introduciendo el resultado de la calibración previa como un término de regularización en el sistema a resolver. Otras opciones incluyen, pero no están limitadas a, escalar simplemente las calibraciones, de manera que calibraciones consecutivas coincidan en términos del brillo final de la señal objeto estimada.

Interacción con otros potenciales componentes de procesamiento de imagen

25 En muchos sistemas de obtención de imágenes, además de las funciones de transferencia de las fibras, podría existir una función de transferencia del sistema global ajustable que se puede afinar en función de los datos de entrada. Un escenario típico sería el ajuste de la ganancia de la cadena de detección o una fluctuación de la luz del láser de excitación. Estos ajustes se realizan a menudo para evitar la saturación de los detectores y para mantener la señal dentro de un rango dinámico óptimo para la electrónica. Con mínimas adaptaciones, nuestra invención puede manejar estos casos. Sea $\gamma_i(\cdot)$ la función de transferencia (conocida) ajustable del sistema global, la señal devuelta medida por la fibra i en el instante t se convierte ahora en:

$$v_i(t) = \gamma_i(\psi_i(u_i(t)))$$

30 Transformando las muestras en $\tilde{v}_i(t) = \gamma_i^{-1}(v_i(t))$, se puede aplicar el mismo proceso de calibración a $\tilde{v}_i(t)$.

35 Además de estos cambios globales conocidos en el sistema de obtención de imágenes, también puede suceder que durante el uso se puedan ejecutar controles automáticos para comprobar y potencialmente corregir cualquier deriva de la configuración del sistema de obtención de imágenes. Por ejemplo, si el sistema de obtención de imágenes comprende una unidad perdurable y un accesorio desechable que es necesario conectar entre sí, la configuración global puede ser muy sensible a la conexión. Cualquier deriva en el conector producirá un cambio de configuración que puede afectar a la asociación de píxel bruto a fibra y hacer que las funciones de transferencia de las fibras se queden obsoletas. Un remapeo de la imagen bruta obtenida en ese momento a la imagen de referencia resolverá el problema de asociación de píxel bruto a fibra pero las funciones de transferencia de las fibras anteriores aún podrían quedarse obsoletas. En otros casos, también podría ocurrir que la deriva de la configuración sea detectada por el sistema y potencialmente se realiza un ajuste basado en ella sin que esto tenga ningún impacto duradero sobre las funciones de transferencia de las fibras. La presente invención se puede adaptar a cualquiera de estos cambios, permanentes o temporales, de la configuración del sistema de obtención de imágenes. En caso de un cambio permanente, podría ser ventajoso pedir que se realice una nueva calibración ciega en cuanto se haya acumulado

suficiente señal devuelta nueva. En caso de un cambio temporal, podría ser ventajoso simplemente detener la acumulación de señal devuelta hasta que se sepa que el sistema ha vuelto a su configuración previa.

Modos de fuera de línea y de tiempo diferido

5 Partes del sistema de calibración descrito anteriormente en este documento eran especialmente apropiadas para un modo de funcionamiento en línea. Sin embargo, con pequeñas modificaciones el algoritmo de calibración se podría aplicar como un postprocesamiento a secuencias ya obtenidas o con algo de retraso a una secuencia obtenida en ese momento.

10 Si las funciones de transferencia de las fibras son casi constantes en el tiempo, en modo fuera de línea, potencialmente no existe ninguna necesidad de disponer de un búfer histórico y potencialmente no existe ninguna necesidad de decidir cuándo lanzar la estimación, dado que se puede utilizar toda la secuencia para calcular la nueva calibración.

15 La calibración estimada a partir de una secuencia larga también se podría aplicar a una secuencia corta obtenida poco después o poco antes, para la cual no habría sido posible realizar una estimación debido a no disponer de suficientes datos.

20 En otra realización del modo fuera de línea, se pueden combinar varias secuencias para obtener una mejor estimación de la calibración, y se puede aplicar la calibración a todas las secuencias de entrada.

Además, en modo fuera de línea o de tiempo diferido, todavía se puede utilizar una ventana temporal pero no es necesario que sea cerrada por el fotograma obtenido en ese momento. Por ejemplo, podría ser ventajoso elegir una ventana temporal centrada en el fotograma obtenido en ese momento.

25 **DETALLES DE IMPLEMENTACIÓN DE EJEMPLO PARA FUNCIONES DE TRANSFERENCIA AFINES DE LAS FIBRAS**

30 En lo que sigue, derivamos el modelo completo para el caso de función de transferencia afín de la fibra. Una función de transferencia afín de la fibra se puede caracterizar totalmente mediante un desplazamiento y una ganancia. Por lo tanto, nos centraremos en la estimación de estos dos parámetros para cada fibra. Para mayor claridad, nos concentramos en técnicas de obtención de imágenes microscópicas basadas en fibras existentes, incluidas la obtención de imágenes por fluorescencia, la Generación de Segundo Armónico (SHG) y la Dispersión Coherente de Raman Antistokes (CARS), aunque el caso de funciones de transferencia afines de las fibras no está restringido a estos tipos específicos de obtención de imágenes.

35 Dado un modelo afín para funciones de transferencia de las fibras y utilizando fibras por parejas (los bordes de la gráfica de afinidades), obtenemos funciones de transferencia compuestas $\psi_i \circ \psi_j$. Los coeficientes de estas funciones afines que unen las señales devueltas temporales de parejas de fibras vecinas son los coeficientes de corrección para calibrar una fibra con respecto a la otra. Estos pueden ser vistos conceptualmente como el gradiente de los mapas de desplazamiento y ganancia aunque esta idea está mal definida en mallas irregulares tales como la nuestra. De esta forma, el cálculo de la calibración del sistema está conceptualmente cerca de la recuperación de desplazamientos y ganancias a partir de su gradiente.

Modelo de obtención de imágenes por fluorescencia

45 En el caso típico de obtención de imágenes por fluorescencia mediante fibras, la intensidad recogida por el detector viene, por una parte, de una señal de fondo generada en las propias fibras (debida a efectos de autofluorescencia, dispersión Raman y similares) y, por otra parte, de una fluorescencia generada por el tejido observado.

50 En fluorescencia clásica (también conocida como fluorescencia de un fotón), las dos intensidades son proporcionales a la intensidad de la fuente de luz y, en diferentes grados, a la transmisión de las fibras individuales (en la longitud de onda de la excitación y en las longitudes de onda de la fluorescencia) así como a las eficiencias de acoplamiento con las fibras. Pero mientras que el fondo depende sólo de las propiedades de las fibras, la señal del tejido depende de, y es proporcional a, la concentración de moléculas fluorescentes en el interior del tejido.

55 De esta forma, la señal recogida se puede sintetizar como una suma de:

- a. un valor variable, proporcional a la concentración de moléculas fluorescentes, dependiendo el coeficiente sólo de las fibras, y
- b. un valor constante, que sólo depende de las fibras.

60 Con mayor detalle, la ley de Beer-Lambert dice que la intensidad de fluorescencia es también proporcional a algunos coeficientes de absorción y emisión, los cuales son específicos para las moléculas fluorescentes. En este contexto, no podemos separarlos de la propia *concentración*. En lo que sigue, el término concentración se debe entender como una *concentración efectiva*, es decir, como el producto de la concentración real por los coeficientes de absorción y emisión.

65

De la explicación anterior, podemos observar que el modelo de obtención de imágenes por fluorescencia es una particularización de un modelo afín de obtención de imágenes.

5 Existen otros tipos de fluorescencia, tales como la excitación de dos fotones. En este caso, la señal ya no es proporcional a la intensidad de la fuente de luz, sino a su cuadrado. Por consiguiente, la dependencia con las eficiencias de acoplamiento en las fibras y con su transmisión en la longitud de onda de excitación también está elevada al cuadrado. Sin embargo, la dependencia con la concentración de moléculas fluorescentes en el tejido sigue siendo la misma, es decir, lineal, debido a la suma incoherente de las contribuciones de moléculas individuales.

10 Por lo tanto debería ser evidente que, también en esta situación de dos fotones, el modelo de obtención de imágenes por fluorescencia sigue siendo una particularización de un modelo afín de obtención de imágenes, pero con coeficientes que, por supuesto, son diferentes a los usados para fluorescencia clásica.

15 Otro modelo de obtención de imágenes microscópicas
Esta descripción se puede generalizar a modalidades de obtención de imágenes incluso más sofisticadas, tales como por ejemplo la Generación de Segundo Armónico (SHG) y la Dispersión Coherente de Raman Antistokes (CARS). Esta vez, la contribución de las moléculas individuales se suma de forma coherente, es decir, en amplitud, haciendo que la intensidad resultante varíe con el cuadrado de la concentración de moléculas. Pero la señal recogida por el detector sigue siendo la suma de dos contribuciones:

- 20 a. una señal del tejido, proporcional al cuadrado de la concentración con algún coeficiente multiplicativo que depende de las fibras, y
- 25 b. una señal de fondo aditiva que depende de las fibras.

De esta explicación, observamos que todavía nos enfrentamos a una particularización de un modelo afín de obtención de imágenes, siempre y cuando, en lugar de trabajar con una *concentración efectiva*, trabajemos ahora con el cuadrado de esta cantidad.

30 En las siguientes secciones, no distinguiremos entre los diferentes modelos de obtención de imágenes presentados anteriormente, y nos referiremos siempre a una *concentración generalizada*, la cual se puede entender como la propia *concentración efectiva*, o como una función de ella. Esto incluye su cuadrado para los casos de Generación de Segundo Armónico (SHG) y Dispersión Coherente de Raman Antistokes (CARS). En cualquier caso debería ser evidente que la fluorescencia, la SHG y la CARS sólo se presentan como modelos habituales de obtención de imágenes, pero que otros tipos de obtención de imágenes se pueden beneficiar de nuestra invención.

35 Evaluación matemática de la suposición principal
De ahora en adelante, simplemente llamamos α_i a la ganancia de la fibra y β_i al desplazamiento de la fibra. La calibración del sistema requiere estimar estos valores, para poder recuperar la señal objeto.

En las secciones anteriores mencionamos que nuestra invención se basa en la hipótesis de que fibras vecinas ven casi la misma cosa. En el caso específico de la obtención de imágenes microscópicas, esta hipótesis se deriva de manera natural de la naturaleza mayoritariamente continua de la *concentración generalizada*.

- 45 a. \mathbf{p}_i sigue haciendo referencia a la posición espacial de la fibra i con respecto a la posición espacial de una fibra arbitraria, por ejemplo, de la primera;
- b. Sea $v_i(t)$ la señal devuelta medida por la fibra i en el instante t . En este contexto ya no se escribe la v en negrita para resaltar el hecho de que ahora nos concentramos en señal escalar;
- 50 c. Sea $C(\rho)$ la *concentración generalizada* en la posición ρ en el objeto explorado;
- d. Sea $\varphi(t)$ la posición espacial del extremo distal del haz de fibras en el instante t con respecto al objeto explorado;
- e. Por lo tanto, la *concentración generalizada* en el volumen explorado por la fibra i , $u_i(t)$, viene dada por $u_i(t) = C(\varphi(t) + \mathbf{p}_i)$

55 Dadas estas notaciones, el modelo afín se puede formular como:

$$v_i(t) = \alpha_i u_i(t) + \beta_i \quad (5)$$

60 Sea E el conjunto de bordes de una gráfica de vecindad espacial. Típicamente podemos utilizar, por ejemplo, una gráfica no dirigida asociada con la triangulación de fibras de Delaunay. Sea $(i, j) \in E$, tenemos

$$v_j(t) = \alpha_j C(\varphi(t) + \mathbf{p}_j) + \beta_j$$

$$\begin{aligned}
 &= \alpha_j \mathcal{L}(\varphi(\mathbf{t}) + \mathbf{p}_i + \mathbf{p}_j - \mathbf{p}_i) + \beta_j \\
 &= \alpha_j \mathcal{L}(\varphi(\mathbf{t}) + \mathbf{p}_i) + (\mathbf{p}_j - \mathbf{p}_i) \cdot \nabla \mathcal{L}(\varphi(\mathbf{t}) + \mathbf{p}_i) + \beta_j + o(\|\mathbf{p}_j - \mathbf{p}_i\|) \\
 &= \frac{\alpha_j}{\alpha_i} (v_i(\mathbf{t}) - \beta_i) + \beta_j + (\mathbf{p}_j - \mathbf{p}_i) \cdot \nabla \mathcal{L}(\varphi(\mathbf{t}) + \mathbf{p}_i) + o(\|\mathbf{p}_j - \mathbf{p}_i\|)
 \end{aligned}$$

5

Con la suposición natural de que las variaciones de la concentración generalizada son casi siempre suaves y de que las variaciones bruscas son raras (lo que significa que la distribución de valores gradiente es dispersa), la última ecuación se puede reescribir como:

10

$$v_j(\mathbf{t}) = \frac{\alpha_j}{\alpha_i} (v_i(\mathbf{t}) - \beta_i) + \beta_j + X_{\mathbf{t}} \quad (6)$$

donde $X_{\mathbf{t}}$ es un término de ruido cuya distribución es dispersa. Un ejemplo de distribución de este tipo es la distribución de Laplace. De (6), se observa que, efectivamente, señales devueltas recogidas por dos fibras vecinas pueden estar aproximadamente relacionadas por una ecuación afín y que, por lo tanto, estarán muy correlacionadas.

15

Modelo afín del sistema

En este caso afín, la idea detrás de la presente invención de utilizar las funciones de relación de las fibras para estimar la calibración se traduce en la utilización de estas relaciones para estimar $\{\alpha_i\}$ y $\{\beta_i\}$. Considérense las señales devueltas $v_i(t)$ y $v_j(t)$ observadas procedentes de dos fibras vecinas, los coeficientes a_{ij} , b_{ij} de la relación afín entre las dos señales devueltas se pueden estimar mediante una regresión afín:

20

$$v_j(\mathbf{t}) \sim a_{ij} v_i(\mathbf{t}) + b_{ij}$$

25

Identificando los coeficientes con los de la ecuación (6) obtenemos:

$$\begin{cases} a_{ij} = \frac{\alpha_j}{\alpha_i} \\ b_{ij} = \beta_j - \frac{\alpha_j}{\alpha_i} \beta_i \end{cases}$$

o, en otros términos:

30

$$\begin{cases} a_{ij} \alpha_i - \alpha_j = 0 \\ a_{ij} \beta_i - \beta_j = -b_{ij} \end{cases} \quad (7)$$

Considerando todas las parejas de fibras vecinas, obtenemos dos sistemas lineales, uno cuyas incógnitas son las α_i y uno cuyas incógnitas son las β_i . Por lo tanto, esto nos permite estimar una calibración a partir de relaciones afines calculadas a partir de la señal devuelta sin calibrar observada.

35

En las siguientes partes, consideramos sólo las relaciones afines entre fibras vecinas y, típicamente, nos basamos en la triangulación de Delaunay para definir vecindad. Por supuesto, también podríamos buscar relaciones afines entre fibras que estén alejadas, por ejemplo, alejadas entre sí por dos o tres bordes.

40

Regresiones: estimación de relaciones afines

Utilizando el modelo (6), queremos estimar los coeficientes de regresión a y b a partir de dos conjuntos de señales devueltas observadas $x_k = v_i(t_k)$ y $y_k = v_j(t_k)$ recogidas procedentes de dos fibras vecinas i y j y muestreadas en instantes $\{t_k\}_{1 \leq k \leq m}$:

45

$$y_k = ax_k + b + X_{t_k}$$

Mínimos cuadrados ordinarios

50

El método más clásico sería utilizar regresión por mínimos cuadrados:

$$(\hat{a}, \hat{b}) = \arg \min_{a, b} \sum_{k=1}^m (y_k - ax_k - b)^2$$

Sin embargo, existen varias desventajas asociadas con este método. En primer lugar, no hay ninguna razón para que X esté distribuida como una normal y es más probable que siga una distribución de cola larga, correspondiendo los valores grandes a bordes fuertes en la imagen obtenida. Como se ha mencionado anteriormente, estos valores grandes pueden distorsionar la estimación por mínimos cuadrados. También se observa que la regresión por mínimos cuadrados es asimétrica. Supone que la variable x independiente está libre de errores. Una consecuencia es que el resultado de la regresión $x_k = a'y_k + b'$ no será la inversa de la regresión $y_k = ax_k + b$. Un ruido en la variable independiente, como tenemos aquí, sesgará la estimación de la pendiente hacia 0, lo cual se conoce como *sesgo de atenuación*.

5
10 Regresión ortogonal robusta
Dado que tenemos una regresión con error en las variables, es decir, con error de medida en ambas variables, si la suposición de que la varianza del error es la misma para ambas variables es razonable, podría ser ventajoso utilizar una regresión ortogonal para estimar a y b. En una regresión ortogonal, la función objetivo es la suma de las distancias a la línea de regresión al cuadrado:

$$\hat{\theta} = \arg \min_{\{\theta|\theta_1^2+\theta_2^2=1\}} \sum_{k=1}^m (\theta_1 x_k + \theta_2 y_k + \theta_3)^2$$

15
20 Esta estrategia puede ayudar a fijar el *sesgo de atenuación*. También, como se ilustró anteriormente, para tener en cuenta la presencia de valores atípicos, nuestro método puede utilizar ventajosamente métodos de regresión robustos. En realizaciones de nuestra invención se puede utilizar cualquier método robusto que se haya propuesto en la técnica anterior, mínima mediana de cuadrados, mínimos cuadrados recortados, mínima desviación absoluta, estimadores M, etc.

25 Bondad del ajuste
Como se ha mencionado anteriormente, en parte debido a potenciales fibras *muertas* en el haz de fibras, podría ser ventajoso detectar y desechar regresiones que sean malos ajustes. Además de las medidas estándar de bondad del ajuste tales como el coeficiente de determinación R^2 , las realizaciones de nuestra invención se pueden beneficiar de la utilización de una versión robusta del coeficiente de determinación R^2 tales como:

$$r_{\text{robusto}}^2 = \frac{(\sum_{k=1}^m w_k (x_k - \bar{x})(y_k - \bar{y}))^2}{\sum_{k=1}^m w_k (x_k - \bar{x})^2 \sum_{k=1}^m w_k (y_k - \bar{y})^2} \quad (8)$$

30
35 Donde w_k son los pesos finales procedentes del estimador robusto, donde $\bar{x} = \frac{\sum_{k=1}^m w_k x_k}{\sum_{k=1}^m w_k}$ e $\bar{y} = \frac{\sum_{k=1}^m w_k y_k}{\sum_{k=1}^m w_k}$. De forma similar al coeficiente de determinación R^2 , r_{robusto}^2 está dentro del intervalo [-1,1].

40 Regresiones alternativas
En los métodos de regresión anteriores, no se tiene en cuenta la estructura del ruido. Sin embargo, podría ser ventajoso hacerlo. Por ejemplo, si hacemos la hipótesis de que el ruido X tiene una distribución de Laplace, entonces el estimador de máxima verosimilitud para la regresión es uno que minimiza la suma de diferencias absolutas:

$$\hat{\theta}_{ML} = \arg \min_{\{\theta|\theta_1^2+\theta_2^2=1\}} \sum_{k=1}^m |\theta_1 x_k + \theta_2 y_k + \theta_3|$$

45
50 Además, en los métodos de regresión anteriores, se suponía implícitamente que el ruido era homocedástico, es decir, que la varianza del ruido era la misma para todas las muestras, aunque, en parte debido a la inestabilidad del barrido, el sistema de obtención de imágenes puede exhibir un ruido multiplicativo. Como consecuencia de ello, las muestras con mayor valor pueden verse afectadas por un ruido con una varianza mayor. Para tener en cuenta este ruido heterocedástico, haciendo la hipótesis de que la varianza del ruido es proporcional al valor de la muestra, realizaciones de la presente invención podrían optimizar ventajosamente el error relativo en la regresión:

$$\hat{\theta} = \arg \min_{\{\theta|\theta_1^2+\theta_2^2=1\}} \sum_{k=1}^m \left| \frac{\theta_1 x_k + \theta_2 y_k + \theta_3}{x_k + y_k} \right|$$

55 Resolución de sistemas lineales

Estimación de la Ganancia

Una vez que se han calculado las regresiones, es necesario resolver los sistemas lineales (7). Ambos sistemas lineales comparten el mismo lado izquierdo. Primero, considérese el sistema lineal de la ganancia:

5
$$\{a_{ij}\alpha_i - \alpha_j = 0\}_{(i,j) \in E} \tag{9}$$

10 Sea n el número de fibras, y sea $m = |E|$ el número de bordes en la gráfica de afinidades que unen las fibras vecinas, por ejemplo, triangulación de Delaunay. En un escenario típico en el que el patrón de fibras es hexagonal, tenemos $m \approx 3n$. Sean $E = (u_k, v_k)_{1 \leq k \leq m}$ los bordes de la gráfica de afinidades. Sea A una matriz $m \times n$ tal que:

$$A_{ki} = \begin{cases} -a_{u_k v_k} & \text{si } i = u_k \\ 1 & \text{si } i = v_k \\ 0 & \text{en el resto de casos} \end{cases}$$

15 A es una matriz dispersa, hay sólo dos coeficientes distintos de cero en cada fila. El sistema lineal (9) se puede reescribir como $A \cdot \alpha = 0$. Obsérvese que 0 es una solución trivial pero no interesante. Si α es una solución no trivial, entonces $\lambda \alpha$ es también una solución. Esto era de esperar dado que lo que medimos es la ganancia relativa entre las fibras y, por lo tanto, cualquier factor multiplicativo aplicado a las ganancias de la fibra no modificará las ganancias relativas.

20 Sin pérdida de generalidad, podemos añadir la restricción $\|\alpha\| = 1$. El sistema está sobredeterminado, y la solución por mínimos cuadrados

$$\hat{\alpha} = \arg \min_{\|\alpha\|=1} \|A\alpha\|^2$$

25 es el autovector correspondiente al menor autovalor de $A'A$. El autovector se puede calcular utilizando algoritmos SVD dispersos.

30 Aunque para resolver el sistema se podrían utilizar algoritmos SVD dispersos, realizaciones de la presente invención podrían también hacer uso de la estructura del problema. Dado que las ganancias a estimar son positivas y que típicamente el error en ellas se puede modelar mejor como multiplicativo, el problema se puede trasponer ventajosamente al campo logarítmico:

$$\left\{ \log \frac{\alpha_j}{\alpha_i} = \log a_{ij} \right\}_{(i,j) \in E}$$

35 o, en otros términos:

$$\{\tilde{\alpha}_j - \tilde{\alpha}_i = \tilde{a}_{ij}\}_{(i,j) \in E} \tag{10}$$

40 Donde $\tilde{\alpha}_i = \log \alpha_i$ y $\tilde{a}_{ij} = \log a_{ij}$.

Sea M la matriz $m \times n$ tal que:

45
$$M_{ki} = \begin{cases} -1 & \text{si } i = u_k \\ 1 & \text{si } i = v_k \\ 0 & \text{en el resto de casos} \end{cases} \tag{11}$$

El sistema (10) se puede reescribir como $M \cdot \tilde{\alpha} = \tilde{a}$. El rango de M es $n-1$. Para hacer que la solución sea única y regularizar el sistema, podemos añadir a priori que las ganancias son próximas a 1 (y que su logaritmo es próximo a 0):

50
$$\tilde{\alpha} = \arg \min_{\tilde{\alpha}} \|M\tilde{\alpha} - \tilde{a}\|^2 + \lambda \|\tilde{\alpha}\|^2$$

55 Como se mencionó anteriormente, otras realizaciones ventajosas de la invención pueden tener en cuenta la confianza que tenemos en las relaciones (10). Dependiendo de las medidas de bondad del ajuste proporcionadas por la estimación de regresión podemos añadir más peso a las relaciones en las cuales hay una fuerte confianza. Sea g_{ij} la medida de bondad del ajuste como define por ejemplo la ecuación (8) para la regresión de las fibras i y j .

Podría ser ventajoso utilizar una función continua w que sea igual a cero por debajo de un umbral de bondad del ajuste dado y que a continuación decrezca.

Sea W la matriz diagonal de pesos definida por $W_{kk} = w(g_{u_k, v_k})$. El sistema con los pesos añadidos es:

$$\tilde{\alpha} = \underset{\alpha}{\operatorname{arg\,min}} \|W(M\tilde{\alpha} - \tilde{\alpha})\|^2 + \lambda \|\tilde{\alpha}\|^2 \quad (12)$$

El sistema (12) se puede resolver, por ejemplo, con cualquier algoritmo de factorización QR disperso directo o mediante cualquier método iterativo.

Estimación del desplazamiento

El sistema lineal para la estimación del desplazamiento es:

$$\beta_j - \frac{\alpha_j}{\alpha_i} \beta_i = b_{ij} \quad (13)$$

Existen varias formas de resolver el sistema, que incluyen pero no están restringidas a:

a. El factor $\frac{\alpha_j}{\alpha_i}$ se puede aproximar mediante a_{ij} .

b. Utilizando una estimación de α obtenida de acuerdo con el método presentado en la sección anterior, se puede calcular el factor $\frac{\alpha_j}{\alpha_i}$.

c. Utilizando una estimación de α obtenida de acuerdo con el método presentado en la sección anterior, se puede estimar \tilde{b}_{ij} utilizando $\frac{v_j}{\alpha_j} \approx \frac{v_i}{\alpha_i} + \tilde{b}_{ij}$, resolver a continuación el sistema lineal $\tilde{\beta}_j - \tilde{\beta}_i = \tilde{b}_{ij}$ deducir $\tilde{\beta}_i = \alpha_i \tilde{\beta}_i$.

Si se dispone de una estimación inicial del desplazamiento, por ejemplo, una imagen de fondo obtenida durante la calibración del sistema de obtención de imágenes, realizaciones de la invención pueden utilizarla para regularizar la solución. Por ejemplo, si se sabe que el fondo disminuye de acuerdo con una ley multiplicativa, el fondo β de la fibra en el instante t_1 se puede aproximar a partir del fondo $\beta^{(0)}$ en el instante t_0 , mediante $q\beta^{(0)}$ donde q es un factor desconocido. Sustituyendo $\beta_i = q\beta_i^{(0)}$ en (13), obtenemos:

$$q\beta_j^{(0)} - \frac{\alpha_j}{\alpha_i} q\beta_i^{(0)} = b_{ij}$$

Una estimación robusta de q puede ser proporcionada, por ejemplo, por:

$$\hat{q} = \operatorname{mediana}_{(i,j)} \frac{b_{ij}}{\beta_j^{(0)} - \beta_i^{(0)} \cdot \alpha_{ij}}$$

A partir de esta estimación, podemos obtener una aproximación $\tilde{\beta} = \hat{q}\beta^{(0)}$ de β y utilizar este valor como una regularización para el sistema (13). Asignando pesos al sistema como se describió en la sección anterior, la estimación del desplazamiento se puede reescribir como:

$$\tilde{\beta} = \min_{\beta} \|W(A \cdot \beta - b)\|^2 + \lambda \|\beta - q\beta^{(0)}\|^2 \quad (14)$$

Donde A es la matriz $m \times n$ definida en (11).

A continuación, ventajosamente, se puede resolver la ecuación (14) con cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

Decidiendo cuándo lanzar la estimación

En el contexto de función de transferencia afín de las fibras, sigue siendo necesario decidir cuándo se puede hacer una estimación. En este escenario, describimos dos criterios que puede ser ventajoso ensayar. En primer lugar, podríamos necesitar que un cuantil pequeño de los coeficientes de correlación entre fibras vecinas calculados para las últimas p muestras esté por encima de un umbral dado. Esto garantizará que probablemente haya una buena relación afín entre la mayoría de las señales devueltas de fibras vecinas.

En segundo lugar, podría ser necesario que una fracción dada de las fibras tenga al menos un número grande de muestras dentro de la ventana temporal cuya señal devuelta no sea simplemente el fondo (por ejemplo, autofluorescencia) de la fibra, sino que también tenga en cuenta la señal objeto recogida en el extremo distal de la

fibra. Para determinar si una muestra no procede sólo del fondo de la fibra, realizaciones de la invención podrían por ejemplo comprobar si su valor es superior al último valor de desplazamiento estimado para la fibra más un factor del ruido estimado de la fibra, por ejemplo, desviación estándar, máxima desviación absoluta y similares. Un criterio de este tipo puede garantizar que el rango de valores recogidos por las fibras es lo suficientemente amplio para hacer una regresión fiable.

Además podemos calcular el coeficiente de correlación entre fotogramas sucesivos:

$$rcc(v(t_i), v(t_{i+1})) = \frac{Cov(v(t_i), v(t_{i+1}))}{[Var(v(t_i)) \cdot Var(v(t_{i+1}))]^{1/2}}$$

Si este coeficiente está por encima de un umbral dado, podemos considerar entonces que no existe movimiento haz-objeto. Si muchas imágenes sucesivas no tienen ningún movimiento haz-objeto, podríamos quedarnos sólo con la primera de éstas en la historia. Este filtrado puede ser ventajoso porque fotogramas sucesivos casi idénticos no hacen necesariamente que las regresiones sean más precisas. Por el contrario, pueden sesgar las regresiones entre fibras a ambos lados de los bordes fuertes.

Estimación rápida de fondo

En el contexto de la obtención de imágenes por fluorescencia, el fondo autofluorescente de la fibra típicamente disminuye en el tiempo, rápidamente al principio si el haz de fibras no ha sido iluminado previamente y más lentamente a continuación. En el mecanismo presentado en la sección anterior, las ganancias y los desplazamientos se estiman sólo cuando se ha recogido suficiente señal observada útil. Con esta estrategia hay dos inconvenientes potenciales. Primero, potencialmente se deja pasar la oportunidad de estimar fondo en el instante más favorable, cuando el haz de fibras no recoge casi ninguna señal objeto distal (este escenario típicamente aparece cuando el haz de fibras necesita estar en contacto con el objeto explorado). Segundo, si el haz de fibras ve sólo señales objeto de alta fluorescencia y nunca señales objeto bajas, entonces los coeficientes b_{ij} de ordenada en el origen de la regresión serán imprecisos, y también lo serán los desplazamientos resultantes. Esta es la razón por la que, en este caso, podría ser ventajoso no intentar realizar ninguna estimación de fondo.

En una realización preferente de la invención, se podría hacer una estimación rápida de fondo alternativa. Esta estimación rápida de fondo se basa en la hipótesis hecha en una sección anterior, de que los desplazamientos $\beta(t)$ en el instante t pueden ser correctamente aproximados mediante $q\beta(t_0)$, lo que significa que para obtener una nueva estimación de fondo sólo es necesario estimar un parámetro, q .

Describimos ahora un algoritmo para actualizar rápidamente el fondo. Puede funcionar como se explica a continuación. Para cada fotograma, el algoritmo identifica muestras que tienen mucha probabilidad de medir fondo. Se marcan las fibras para las cuales se cumple este criterio. Se procesan fotogramas hasta que se ha marcado una fracción fijada de las fibras. En este punto, podemos buscar todos los valores del búfer histórico que están por debajo del desplazamiento en ese instante y hacer una estimación de q a partir de ellos. Una estimación de ejemplo viene dada por:

$$\hat{q} = \text{mediana}_{t_j \text{ histórico}} \{ v_i(t_j) / \beta_i^{(0)} \mid v_i(t_j) < \beta_i^{(0)} \} \quad (15)$$

Modos de funcionamiento

La estimación de la calibración explicada en las secciones anteriores es esencialmente un proceso en línea, que acumula fotogramas de manera continua y que estima una nueva calibración cuando está disponible suficiente información. Sin embargo, dependiendo del instante, pueden ser deseables comportamientos ligeramente diferentes. En la puesta en marcha, se puede querer una estimación rápida, incluso aunque ésta no sea muy precisa. Una vez que se proporciona una estimación inicial, se podría realizar una estimación más lenta pero más precisa. Como resultado de ello, la calibración en línea se puede modelar como un diagrama de estados. Cada estado puede tener diferentes parámetros para la estimación, la decisión de lanzamiento y la estimación de los coeficientes de calibración.

En una realización preferente de la invención, se pueden definir cinco estados, los cuales se ilustran en la Figura 2:

- a. En el estado inicial, se puede querer una estimación rápida y se pueden fijar los parámetros en consecuencia. Podría ser ventajoso estimar sólo ganancias dado que los desplazamientos calculados a partir de la imagen de fondo obtenida durante la calibración inicial deberían ser todavía precisos. Por supuesto, es posible realizar una estimación rápida del fondo. Una vez que se ha realizado con éxito una estimación de la ganancia, el sistema puede pasar al segundo estado, sin borrar su búfer histórico. La lógica detrás de esto es conservar el búfer histórico y acumular más fotogramas para refinar la estimación anterior. Si se intenta realizar una estimación pero ésta falla, el sistema puede permanecer en este estado sin borrar el búfer histórico, y esperar a que se hayan acumulado más fotogramas antes de intentar otra estimación.

5 b. En el segundo estado, se pueden ajustar los parámetros para conseguir una estimación precisa. De nuevo, podría ser ventajoso estimar sólo ganancias. Por supuesto, es posible realizar una estimación rápida del fondo. Una vez que se ha realizado con éxito una estimación de ganancia, el sistema puede pasar al tercer estado y se puede borrar el búfer histórico. Si se intenta una estimación pero ésta falla, el sistema puede permanecer en este estado y el búfer histórico se puede borrar.

10 c. El tercer estado sería un estado *de crucero*. En comparación con el segundo estado, típicamente, sólo aumenta el tamaño del búfer histórico. La estimación de la ganancia y del fondo están habilitadas, así como la estimación rápida del fondo. Dependiendo de si una estimación tiene éxito o fracasa, el sistema puede permanecer en este estado, pero el búfer histórico se puede borrar después de cada estimación (excepto potencialmente para estimación rápida del fondo).

15 d. El cuarto estado es un estado especial al cual puede pasar el sistema cuando se detecte una deriva permanente de la configuración del sistema de obtención de imágenes. En este caso, puede ser necesario volver a estimar las ganancias calculadas. Este estado es bastante similar al primero dado que podemos querer una nueva estimación de ganancia rápidamente. Después de que se haya intentado realizar una estimación, dependiendo de si tiene o no tiene éxito, el sistema puede regresar al estado en el que se encontraba antes de moverse a este otro estado. La Figura 3 presenta un diagrama de flujo de los pasos que se pueden dar cuando se encuentra dicha deriva permanente.

20 e. El quinto estado es también un estado especial al cual puede pasar el sistema cuando se detecte una deriva temporal de la configuración del sistema de obtención de imágenes. En este caso, el sistema puede permanecer en este estado hasta que se corrija la deriva y después de eso puede volver al estado en el que estaba antes de moverse a este estado. La Figura 3 presenta un diagrama de flujo de los pasos que se pueden dar cuando se encuentra dicha deriva temporal.

25 Aunque la anterior descripción por escrito de la invención permite a una persona con experiencia ordinaria en la técnica hacer y utilizar lo que en la actualidad se considera que son las mejores realizaciones de la misma, las personas con experiencia ordinaria en la técnica comprenderán y apreciarán la existencia de variaciones, combinaciones, y equivalentes de las realizaciones, métodos y ejemplos específicos contenidos en este documento. Por lo tanto la invención no debería estar limitada por las realizaciones, métodos y ejemplos descritos anteriormente, sino por todas las realizaciones y métodos dentro del alcance de la invención descrita.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para calibrar un sistema de obtención de imágenes que comprende detectores de imagen con funciones de transferencia no uniformes y posiciones espaciales irregulares, donde el método comprende:
- 10 acumular datos procedentes de múltiples imágenes obtenidas por el sistema de obtención de imágenes; definir una gráfica *de afinidades* cuyos bordes definen parejas de detectores que miden una señal relacionada; realizar un análisis estadístico sobre los datos acumulados a partir de cada pareja de detectores; y resolver un sistema construido a partir de los resultados del análisis estadístico para estimar la función de transferencia de cada detector, el conjunto de las cuales compone una calibración del sistema de obtención de imágenes.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el análisis estadístico comprende regresiones.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual la calibración se realiza en cuanto un cuantil de un coeficiente de correlación asociado a una regresión sobre los datos acumulados alcanza un umbral.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual se realiza una calibración adaptativa variable en el tiempo cambiando una ventana de acumulación de datos.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual se realiza calibración de manera continua en cuanto un cuantil de un coeficiente de correlación asociado a una regresión sobre los datos acumulados alcanza un umbral.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual los datos acumulados se componen a partir de imágenes sucesivas para las cuales un coeficiente de correlación calculado entre dichas imágenes sucesivas alcanza un umbral.
- 30 7. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el cual diferentes parámetros de las funciones de transferencia del detector se actualizan en instantes diferentes dependiendo del contenido de los datos acumulados.
- 35 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la calibración se inicializa con la ayuda de imágenes de referencia, en particular una imagen de fondo.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual cada calibración se puede grabar y restaurar para otras inicializaciones.
- 40 10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la gráfica *de afinidades* se construye a partir de información de vecindad, en particular, basándose en la triangulación de Delaunay de la posición espacial de los detectores.
- 45 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la utilización de la calibración para reconstrucción de imagen.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual los datos se pre-procesan o se filtran antes de realizar el análisis estadístico de los detectores unidos.
- 50 13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual los cálculos se estabilizan utilizando información previa, medidas de bondad del ajuste obtenidas de regresiones, o métodos de cálculo robustos.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual los cálculos se estabilizan utilizando información previa sobre las restricciones de evolución temporal o de suavidad temporal.
- 55 15. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual se utiliza un modelo de una evolución temporal del fondo para actualizar la estimación inicial del fondo.
- 60 16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la calibración se calcula fuera de línea o en tiempo diferido.
17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en el cual, para calcular la calibración, se combinan varias secuencias diferentes de imágenes.

18. Un sistema de obtención de imágenes para obtención de imágenes, que comprende detectores de imagen con funciones de transferencia no uniformes y posiciones espaciales irregulares y un aparato para implementar un método de calibración de dicho sistema de obtención de imágenes, comprendiendo el aparato:
- 5 medios para acumular datos procedentes de múltiples imágenes;
 medios para definir una gráfica *de afinidades* cuyos bordes definen parejas de detectores que miden señal relacionada;
 medios para realizar análisis estadístico sobre los datos acumulados procedentes de cada pareja de detectores; y
- 10 medios para resolver un sistema construido a partir de los resultados del análisis estadístico para estimar la función de transferencia de cada detector, el conjunto de las cuales compone una calibración del sistema de obtención de imágenes.
19. El sistema de obtención de imágenes de acuerdo con la reivindicación 18, que comprende además medios para grabar y cargar calibraciones calculadas.
- 15 20. El sistema de obtención de imágenes de acuerdo con la reivindicación 18, que comprende:
- una guía de imágenes que comprende una pluralidad de fibras ópticas, actuando cada fibra como un único detector de imagen.
- 20 21. El sistema de obtención de imágenes de acuerdo con la reivindicación 20, en el cual el sistema de obtención de imágenes es un sistema de obtención de imágenes microscópico, en particular por fluorescencia estándar, por fluorescencia de dos fotones, por Generación de Segundo Armónico (SHG) o por Dispersión Coherente de Raman Antistokes (CARS).
- 25 22. El sistema de obtención de imágenes de acuerdo con la reivindicación 21, en el cual el sistema de obtención de imágenes tiene varias bandas de obtención de imágenes, en particular bandas espectrales.

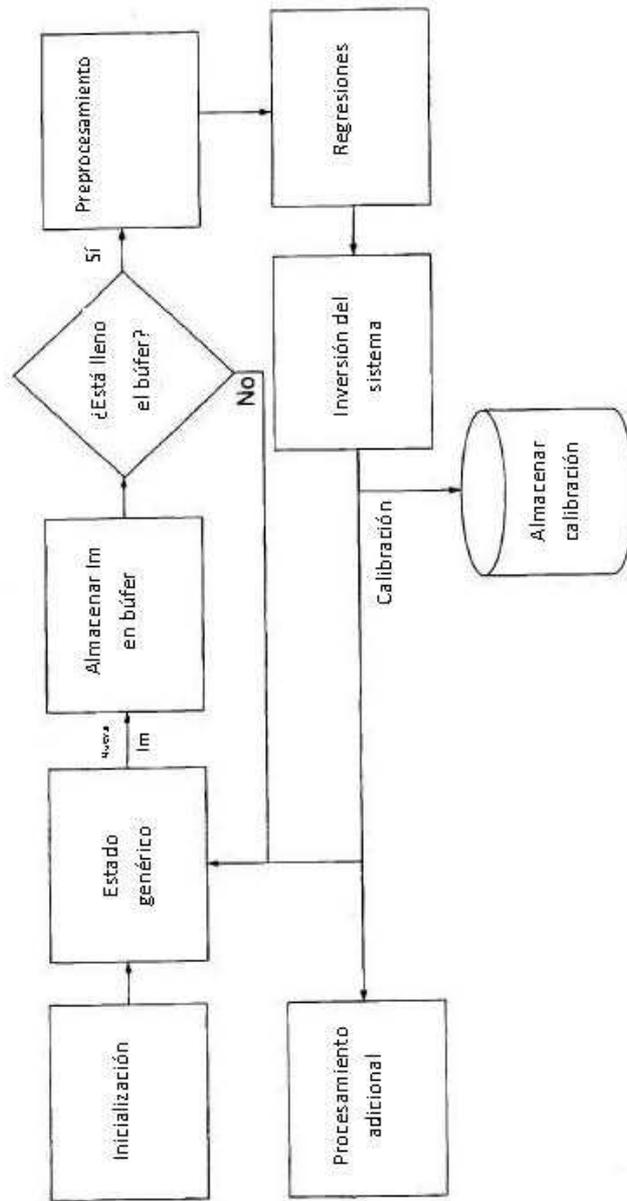


FIG.1

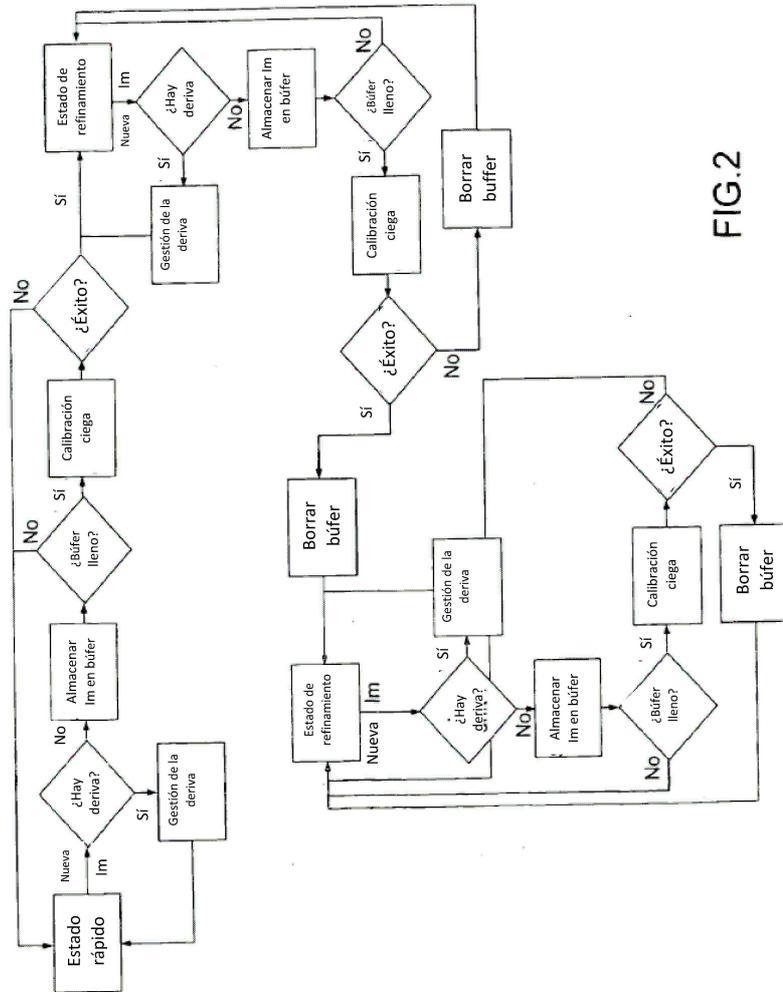


FIG.2

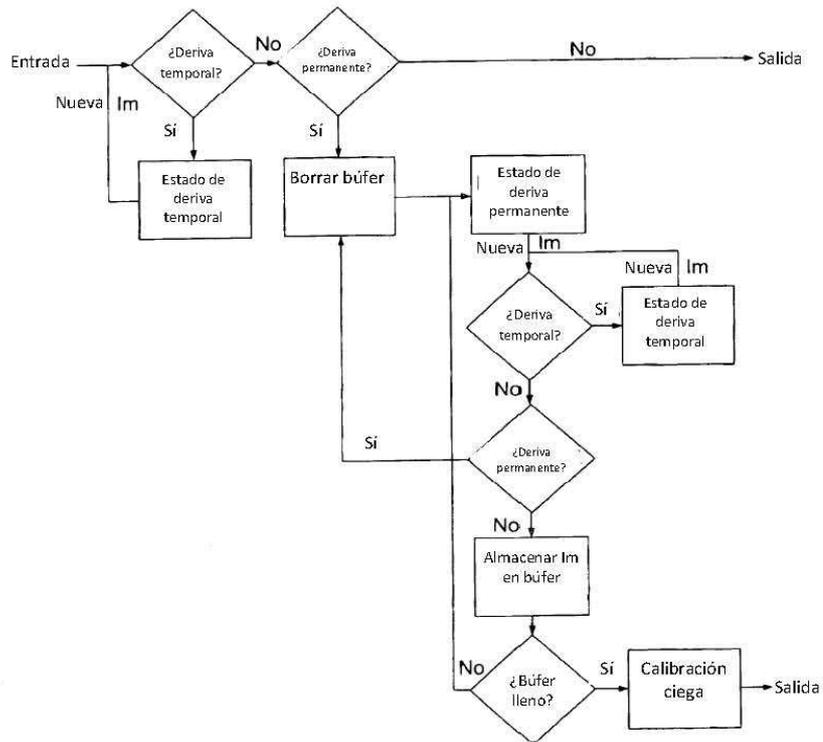


FIG.3