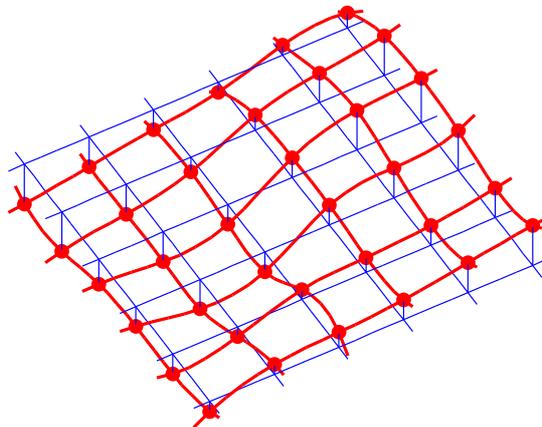


RUI MANUEL DIAS CORTESÃO DOS SANTOS BERNARDES

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS
METODOLOGIAS PARA O
MAPEAMENTO MULTIMODAL
DA MÁCULA



COIMBRA
2008

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS
METODOLOGIAS PARA O
MAPEAMENTO MULTIMODAL
DA MÁCULA

RUI MANUEL DIAS CORTESÃO DOS SANTOS BERNARDES

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS
METODOLOGIAS PARA O
MAPEAMENTO MULTIMODAL
DA MÁCULA

COIMBRA
2008

*Dissertação de doutoramento apresentada
à Faculdade de Medicina da Universidade
de Coimbra*

A Faculdade de Medicina de Coimbra não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta dissertação.

(Reg. da Fac. de Med. de Coimbra, 1931, Art.º 108, § único)

Trabalho realizado nos seguintes locais:

- Associação para a Investigação Biomédica e Inovação em Luz e Imagem (AIBILI)
(Prof. Doutor José Cunha-Vaz)
- Centro de Novas Tecnologias para a Medicina (CNTM)
- Instituto Biomédico para a Investigação em Luz e Imagem (IBILI) - Faculdade de Medicina - Universidade de Coimbra (FMUC)
(Prof. Doutor José Cunha-Vaz)
- Instituto de Sistemas e Robótica (ISR) - Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade de Coimbra (FCTUC)
(Prof. Doutor Jorge Dias)

AO AFONSO

Prefácio

O início deste trabalho pode datar-se de 1997 quando, como bolseiro, integrei um projecto de investigação do Prof. Doutor José Cunha-Vaz, a decorrer no IBILI – Instituto Biomédico para a Investigação em Luz e Imagem, onde tomei conhecimento pela primeira vez de uma área que até então me era completamente desconhecida, a retinopatia diabética, e do papel da barreira hemato-retiniana, cuja existência foi demonstrada no estudo realizado pelo Prof. Doutor José Cunha-Vaz na década de 1960. Daí para cá, o desenvolvimento desta área do conhecimento deve ser considerado pela sua relevância, pelo que usufruir do privilégio de para tal poder contribuir é motivo de enorme orgulho.

A imagiologia funcional da retina, com particular destaque para a função da barreira hemato-retiniana, bem como a integração desta com informações complementares, como o edema macular, era há muito uma necessidade identificada com vista a um melhor entendimento das alterações que ocorrem na retina em doentes diabéticos, uma doença em franca expansão no mundo ocidental. O trabalho aqui apresentado pretende contribuir para o conhecimento destas alterações, razão pela qual incidiu essencialmente em áreas relacionadas com estes dois tópicos.

Por todas as oportunidades que me foram concedidas desde o primeiro instante e pela enorme consideração pessoal que me merece, quero expressar o meu agradecimento e reconhecimento ao Prof. Doutor José Cunha-Vaz, o principal responsável por me ter envolvido na tarefa de apresentar esta dissertação, e sem o apoio do qual não a mesma não teria sido possível. Quero também expressar a enorme satisfação de poder colaborar com alguém cujo reconhecimento intelectual e científico é feito a uma escala pouco habitual.

Quero expressar o meu agradecimento ao Prof. Doutor Jorge Dias, o qual se mostrou desde o primeiro dia receptivo a participar neste trabalho, aceitando a responsabilidade da sua co-supervisão em conjunto com o Prof. Doutor José

Prefácio

Cunha-Vaz, numa fase em que eu próprio não tinha a certeza de ser capaz de a cumprir.

À Prof. Doutora Conceição Lobo, pela colaboração desde a primeira hora, por vezes em dias intermináveis, quero agradecer a amizade e expressar o meu reconhecimento pela enorme honestidade intelectual sempre presente.

Expresso o meu reconhecimento à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra por ter aceite a intenção da elaboração desta tese, mas também por ter acedido a que a mesma transitasse para a Faculdade de Medicina onde esta dissertação é agora apresentada.

À Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra expresso também o meu apreço por ter aceite a transferência proposta e que a apresentação desta dissertação aí tenha lugar.

Quero agradecer à ALCON, na pessoa do Dr. Pedro Coloma, pela bolsa de investigação *Investigador Principal ALCON na AIBILI em Degenerescência Macular e Glaucoma*, atribuída em 2006.

Ao IBILI, com destaque para o Centro de Oftalmologia, quero agradecer todas as facilidades concedidas e a colaboração de todos os envolvidos.

Quero manifestar o meu apreço a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho, aos actuais mas também aos anteriores colaboradores do Centro de Nova Tecnologias para a Medicina e aos diversos bolseiros que participaram nos vários projectos. Também ao Centro de Ensaios Clínicos da AIBILI pela cooperação sempre prestada.

A todos aqueles que manifestaram desde sempre o apoio incondicional sem esperarem qualquer retorno por esse motivo, a quem chamamos Amigos, quero agradecer todo o apoio prestado. Não quero no entanto de deixar de expressar uma palavra especial ao Major Eng. Rui Ferreira e ao Dr. Paulo Barros pela amizade sempre demonstrada.

Finalmente à minha família, sem o apoio da qual esta tarefa não teria sido possível e a quem o agradecimento não cabe nestas linhas, à Paula por suportar as minhas infundáveis ausências e em especial ao Afonso, a quem dedico este trabalho.

Coimbra, Junho de 2008
Rui Bernardes

Abreviaturas

AF	–	Angiografia Fluoresceínica
AMD	–	<i>Age-related Macular Degeneration</i>
ASB	–	Albumina Sérica Bovina
<i>BDES</i>	–	<i>Beaver Dam Eye Study</i>
BHR	–	Barreira Hemato-Retiniana
BRB	–	<i>Blood Retinal Barrier</i>
BSA	–	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<i>CCD</i>	–	<i>Charge Coupled-Device</i>
CNV	–	<i>Choroidal Neovascularization</i>
CPS	–	Contagens Por Segundo
CSLO	–	<i>Confocal Scanning Laser Ophthalmoscope</i>
CSME	–	<i>Clinically Significant Macular Edema</i>
<i>DC</i>	–	<i>Direct Current</i>
DCCT	–	<i>Diabetes Control and Complication Trial</i>
DM	–	Diabetes Mellitus
DME	–	<i>Diabetic Macular Edema</i>
DMI	–	Degenerescência Macular ligada à Idade
DP	–	Desvio Padrão
DPI	–	<i>Dots Per Inch</i>
DR	–	<i>Diabetic Retinopathy</i>
DRS	–	<i>Diabetes Retinopathy Study</i>

Abreviaturas

EMCS	–	Edema Macular Clinicamente Significativo
EMD	–	Edema Macular Diabético
EPR	–	Epitélio Pigmentado da Retina
ETDRS	–	<i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>
EUA	–	Estados Unidos da América
FAZ	–	<i>Foveal Avascular Zone</i>
FCT	–	Fundação para a Ciência e a Tecnologia
FIR	–	<i>Finite Impulse Response</i>
FWHM	–	<i>Full Width at Half Maximum</i>
GRIN	–	<i>GRadient INdex (lenses)</i>
HeNe	–	<i>Helium Neon</i>
HRA	–	<i>Heidelberg Retina Angiograph</i>
HSV	–	<i>Hue-Saturation-Value (color space)</i>
ICG	–	<i>Indocyanine Green Angiography</i>
JAMA	–	<i>Journal of American Medical Association</i>
LASER	–	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LED	–	<i>Light Emitting Diode</i>
LIT	–	Linear e Invariante no Tempo
LU	–	<i>Leakage Units</i>
LoG	–	<i>Laplacian of Gaussian</i>
MLI	–	Membrana Limitante Interna
NaFl	–	Fuoresceína Sódica
NIST	–	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NVC	–	Neovascularização Coroideia
OCT	–	<i>Optical Coherence Tomography</i>
OCVL	–	Oftalmoscópio Confocal de Varrimento Laser
PBS	–	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCA	–	<i>Principal Component Analysis</i>
pH	–	Potencial Hidrogeniônico
PSF	–	<i>Point Spread Function</i>

Abreviaturas

RD	–	Retinopatia Diabética
RDNP	–	Retinopatia Diabética Não Proliferativa
RDP	–	Retinopatia Diabética Proliferativa
RGB	–	<i>Red-Green-Blue (color space)</i>
RLA	–	<i>Retinal Leakage Analyzer</i>
RNFL	–	<i>Retinal Nerve Fiber Layer</i>
RT-Atlas	–	<i>Retinal Thickness Atlas</i>
RTA	–	<i>Retinal Thickness Analyzer</i>
SD	–	<i>Standard Deviation</i>
SFP	–	<i>Stereo Fundus Photography</i>
SNR	–	<i>Signal-to-Noise Ratio</i>
STSF	–	Solução-Tampão Salina de Fosfatos
TIFF	–	<i>Tagged Image File Format</i>
TPS	–	<i>Thin-Plate Spline</i>
UKPDS	–	<i>United Kingdom Prospective Diabetic Study</i>
USA	–	<i>United States of America</i>
WESDR	–	<i>Wisconsin Epidemiology Study of Diabetic Retinopathy</i>
WHO	–	<i>World Health Organization</i>

Unidades

(Múltiplos e Sub-múltiplos)

Comprimento:

<i>m</i>	–	metro
<i>mm</i>	–	milímetro ($10^{-3} m$)
μm	–	micrómetro ($10^{-6} m$)
<i>nm</i>	–	nanometro ($10^{-9} m$)

Massa:

<i>kg</i>	–	quilograma
<i>g</i>	–	grama ($10^{-3} kg$)
<i>mg</i>	–	milígrama ($10^{-6} kg$)
μg	–	micrograma ($10^{-9} kg$)
<i>ng</i>	–	nanograma ($10^{-12} kg$)

Tempo:

<i>s</i>	–	segundo
<i>fs</i>	–	femtosegundo ($10^{-15} s$)
<i>minuto</i>	–	60 <i>s</i>
<i>hora</i>	–	3600 <i>s</i>

Volume:

<i>l</i>	–	litro ($10^{-3} m^3$)
<i>ml</i>	–	mililitro ($10^{-6} m^3$)
μl	–	microlitro ($10^{-9} m^3$)

Unidades

Difusão:

$$m^2 \cdot s^{-1}$$
$$cm^2 \cdot s^{-1} = 10^{-4} m^2 \cdot s^{-1}$$

Permeabilidade:

$$m \cdot s^{-1}$$
$$cm \cdot s^{-1} = 10^{-2} m \cdot s^{-1}$$

Símbolos Matemáticos

Alfabeto Grego

$A \alpha$	Alfa	$B \beta$	Beta	$\Gamma \gamma$	Gama
$\Delta \delta$	Delta	$E \epsilon$	Epsilon	$Z \zeta$	Zeta
$H \eta$	Eta	$\Theta \theta$	Téta	$I \iota$	Iota
$K \kappa$	Capa	$\Lambda \lambda$	Lambda	$M \mu$	Miu
$N \nu$	Niu	$\Xi \xi$	Csi	$O \omicron$	Omicron
$\Pi \pi$	Pi	$P \rho$	Ró	$\Sigma \sigma$	Sigma
$T \tau$	Tau	$\Upsilon \upsilon$	Upsilon	$\Phi \phi$	Fi
$X \chi$	Qui	$\Psi \psi$	Psi	$\Omega \omega$	Omega

Símbolos relacionais

$=$	igual a
\approx	aproximadamente igual a
\neq	diferente de
\equiv	definido por
\doteq	corresponde a
$<$	menor que
\leq	menor ou igual a
$>$	maior que
\geq	maior ou igual a

Álgebra

$[a, b]$	intervalo fechado
$]a, b[$	intervalo aberto
$[a, b[$	intervalo fechado à esquerda e aberto à direita
$]a, b]$	intervalo aberto à esquerda e fechado à direita
a^m	a elevado a m (potência m de a)
$\log a$	logaritmo decimal de a
$\ln a$	logaritmo natural de a (base e)
$\delta(t)$	impulso unitário ($\delta(t) = 1, t = 0; \delta(t) = 0, t \neq 0$)
$\mathbf{A} = (a_{ij})$	matriz \mathbf{A} com elementos (a_{ij})
\mathbf{A}^T	transposta da matriz \mathbf{A}
\mathbf{A}^{-1}	inversa da matriz \mathbf{A}
$\mathbf{A} \odot \mathbf{B}$	produto Hadamard das matrizes \mathbf{A} e \mathbf{B}
	$(\mathbf{A} \odot \mathbf{B})_{ij} = \mathbf{A}_{ij} \mathbf{B}_{ij}$
$\mathbf{a} = (a_i)$	vector coluna em \mathbb{R}^n com elementos (a_i)
$[a_1^{(i)}, \dots, a_n^{(i)}]^T$	vector coluna $\mathbf{a}^{(i)}$ definido pelo seus componentes $a_j^{(i)}$
$\alpha \mathbf{a}$	multiplicação de um vector por um escalar
$\ \mathbf{a}\ $	norma de \mathbf{a}
$\mathbf{a} \cdot \mathbf{b}$	produto interno (ou escalar) dos vectores \mathbf{a} e \mathbf{b}
$\mathbf{a} \odot \mathbf{b}$	produto Hadamard dos vectores \mathbf{a} e \mathbf{b}
	$(\mathbf{a} \odot \mathbf{b})_i = \mathbf{a}_i \mathbf{b}_i$

Geometria

\overline{AB}	segmento de recta entre A e B
\overrightarrow{AB}	segmento de recta de A para B
rad	radiano
$^\circ$	grau

Símbolos Matemáticos

Números Complexos

i (ou j)	unidade imaginária ($i^2 = -1$)
z^*	complexo conjugado de z

Funções Trigonométricas

sen	seno
cos	cosseno
tg	tangente
tg^{-1}	arco-tangente

Análise

$\sum_{i=1}^n$	somatório de n termos (de $i = 1$ a n)
$f(), \phi()$	notação para função, e.g., $y = f(x)$, $u = \phi(x, y)$
Δ	diferença ou incremento, e.g., Δx
$f'(x), f''(x)$	primeira e segunda derivada de $f(x)$
$f^{(n)}(x)$	derivada de ordem n de $f(x)$
$y', y'', y^{(n)}$	primeira, segunda e derivada de ordem n de y
$\frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial^n}{\partial x^n}$	derivada parcial de ordem 1 e n
$\frac{\partial^2}{\partial x \partial x}$	derivada parcial de ordem 2 em ordem a x e y (por esta ordem)
$\int_a^b f(x) dx$	integral definido de $f(x)$ entre a e b
$\int f(x) dx$	integral indefinido de $f(x)$ (primitiva de $f(x)$, $F(x)$)

Transformadas

\mathcal{F}	transformada de Fourier
\mathcal{F}^{-1}	transformada de Fourier inversa

Diversos

erf	função erro
erfc	complementar da função erro
$*$	convolução, e.g., $f * g$
$E\{\cdot\}$	operador esperança matemática
$\arg \min_{\tau} f(\tau)$	estimação de τ ($\hat{\tau}$) que minimiza $f(\tau)$
$\overline{\mathbf{A}}$	mapeamento linear de \mathbf{A} para o intervalo $[0, 1]$
	$\overline{\mathbf{A}} = (\mathbf{A} - \min(\mathbf{A})) / (\max(\mathbf{A}) - \min(\mathbf{A}))$

Índice

Lista de Tabelas	xxix
Lista de Figuras	xxxi
Capítulo 1 Introdução ao Conceito	1
1.1 Incidência macular das patologias mais frequentes: Retinopatia Diabética e Degenerescência Macular Ligada à Idade	2
1.2 Limitações das metodologias actualmente existentes	4
Capítulo 2 Revisão das Técnicas de Diagnóstico Actualmente Existentes	9
2.1 Fotografia do fundo ocular	10
2.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria	13
2.3 Tomografia por coerência óptica	19
Capítulo 3 Desenvolvimento de Novos Métodos	23
3.1 Fotografia do fundo ocular	24
3.1.1 Contagem de microaneurismas	24
O registo da localização vs. o número total de microaneurismas	24
O co-registo de imagem para determinação das taxas de formação e desaparecimento de microaneurismas .	25
Resultados	30
3.1.2 <i>RetMarker</i>	33
O conceito <i>RetMarker</i>	33
O co-registo de imagem como suporte ao conceito	34

Índice

Detecção e mapeamento das alterações do fundo ocular ao longo do tempo	36
Resultados	37
3.1.3 Co-registo de fotografias do fundo ocular	43
Detecção da fóvea	43
Detecção do disco óptico	45
Detecção da rede vascular	49
O co-registo rígido	52
O co-registo projectivo	58
3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria	64
3.2.1 Mapeamento das alterações da barreira hemato-retiniana	64
Instrumentação e aquisição de dados	66
Função de resposta a impulso unitário	68
Pré-processamento	71
Compensação dos movimentos oculares	72
Filtragem dos perfis de intensidade	75
Cálculo da imagem do fundo ocular	76
Modelo físico da difusão	77
Desconvolução	81
Modelo físico da retina	82
Quantificação do derrame de fluoresceína da circulação sanguínea para o humor vítreo	83
Resultados	84
3.2.2 Quantificação da fluorescência	89
Introdução à quantificação de fluorescência	89
Métodos	91
Instrumentação	94
Células de calibração	101
A fluorescência no vítreo e no plasma	102
Desenvolvimento de instrumentação para a calibração automática de oftalmoscópios confocais	103
A quantificação de angiografias fluoresceínicas	107
Escala de cores	110

Índice

Resultados	111
Notas finais	113
3.3 Tomografia por coerência óptica	117
3.3.1 Aumento da resolução do mapeamento da espessura da mácula	117
As limitações da técnica original	118
Desenvolvimento de um modelo matemático de espessura da retina humana (RT-Atlas)	121
O registo dos varrimentos do tomógrafo para o RT-Atlas	130
Combinação de conjuntos de varrimentos radiais e circulares na área macular	134
Mapeamento da espessura da mácula	139
Resultados	143
Capítulo 4 Combinação das Diferentes Metodologias – Mapeamento Multimodal	155
4.1 O co-registo multimodal	156
4.2 A necessidade de modelos deformáveis	160
4.3 Primeiros resultados	171
4.4 Perspectivas para o futuro	177
Discussão	179
Conclusões	191
Apêndice A	195
Apêndice B	199
Apêndice C	203
Apêndice D	223
Bibliografia	227
Índice Remissivo	239

Lista de Tabelas

3.1	Desempenho na detecção da fóvea e do disco óptico.	47
3.2	Concentrações nas células de calibração.	102
3.3	Quantificação de fluorescência: resultados.	115
3.4	Diferenças entre <i>RT-Atlas</i> para populações normais.	126
3.5	Tabela de classificações para o registo de varrimentos <i>OCT</i>	146
4.1	Comparação entre co-registo rígido, projectivo e deformável.	171

Lista de Figuras

1.1	Esquema simplificado do olho humano.	4
2.1	Retinografia digital.	12
2.2	Espectro de emissão e excitação para a fluoresceína sódica.	15
2.3	Angiografia fluoresceínica digital.	16
3.1	Fotografia do fundo ocular (digitalizada).	27
3.2	Detecção de aresta na imagem do fundo ocular.	28
3.3	Região de interesse delimitada.	29
3.4	Correcções no espaço de cor de fotografias do fundo ocular.	30
3.5	Contagem de microaneurismas.	31
3.6	Retinografia com deficiente iluminação.	35
3.7	Diferenças entre imagens.	39
3.8	Projecção de diferenças.	40
3.9	O <i>RetMarker</i> num olho saudável.	41
3.10	O <i>RetMarker</i> num olho com RD e EMCS.	42
3.11	Detecção da fóvea e disco óptico.	48
3.12	Redes vasculares de duas retinografias a co-registar.	52
3.13	Redes vasculares em coordenadas polares.	53
3.14	Redes vasculares após co-registo rígido.	54
3.15	Resultado do co-registo rígido de duas retinografias.	55
3.16	Representação de objectos: coordenadas cartesianas vs. polares.	56
3.17	Esquema de representação de um ponto em coordenadas polares.	57
3.18	Determinação de cruzamentos/bifurcações na rede vascular.	58
3.19	Rede vascular detectada numa retinografia.	59

Lista de Figuras

3.20 Co-registo de duas retinografias (exemplo 1/3).	61
3.21 Co-registo de duas retinografias (exemplo 2/3).	62
3.22 Co-registo de duas retinografias (exemplo 3/3).	62
3.23 Erro de co-registo de duas retinografias.	63
3.24 Procedimento para o cálculo do derrame de fluoresceína.	65
3.25 Função de resposta a impulso unitário.	71
3.26 Planos confocais e respectivos deslocamentos.	73
3.27 Filtragem passa-baixo.	75
3.28 Aumento de contraste local.	77
3.29 Modelo físico do processo.	78
3.30 Simulação do processo de derrame.	86
3.31 Resultado do processo de desconvolução.	87
3.32 Mapas de derrame de fluoresceína.	88
3.33 Dados <i>NIST</i>	92
3.34 Dados <i>ThermoFisher</i>	93
3.35 Dados <i>Univ. Coimbra, NIST e ThermoFisher</i>	94
3.36 Dependência da fluorescência com o pH.	95
3.37 Adaptador protótipo para <i>HRA</i> clássico.	96
3.38 Adaptador protótipo instalado no <i>HRA</i> clássico.	97
3.39 Imagens de célula de calibração com -3 e +3 dioptrias.	98
3.40 Sequência que mostra o fundo ocular e uma célula de calibração em 32 planos confocais.	99
3.41 Perfil de intensidade com as contribuições do olho e da célula de calibração.	100
3.42 Aspecto do modelo de uma célula de calibração.	102
3.43 Espectros de emissão de fluoresceína sódica.	103
3.44 Componentes de um adaptador.	104
3.45 Adaptador para o <i>HRA</i> clássico.	105
3.46 Adaptador instalado no <i>HRA</i> clássico.	106
3.47 Esquema da célula de calibração vista pelo sistema.	107
3.48 Melhor ajuste de uma recta.	108
3.49 Escala de cores.	110
3.50 Conversão intensidade/concentração (voluntário saudável).	111

Lista de Figuras

3.51 Conversão intensidade/concentração (voluntário saudável).	112
3.52 Conversão intensidade/concentração (RD).	113
3.53 Conversão intensidade/concentração (NVC).	113
3.54 Conversão intensidade/concentração (RD antes e após fotocoagulação <i>laser</i>).	114
3.55 Nova célula de calibração.	115
3.56 Imagem de concentração (<i>OphtiCal software</i>).	116
3.57 Detalhes de calibração (<i>OphtiCal software</i>).	116
3.58 Sistema de coordenadas maculares.	122
3.59 Mapa típico do RTA.	123
3.60 <i>RT-Atlas</i> de duas populações.	128
3.61 Influência do número de amostras na determinação do <i>RT-Atlas</i> . . .	129
3.62 Teste de registo <i>Stratus OCT</i> para o <i>RT-Atlas</i>	141
3.63 Comparação de resultados de registo <i>Stratus OCT</i> – <i>RT-Atlas</i>	142
3.64 Histograma de diferenças.	142
3.65 O <i>RT-Atlas</i>	145
3.66 Mapa de espessura da mácula de voluntário saudável.	147
3.67 Mapa de espessura da mácula de doente com RDNP.	148
3.68 Mapa de espessura da mácula de doente com DMI.	149
3.69 Mapa de espessura da mácula de doente com DMI.	150
3.70 Mapa de espessura da mácula de voluntário saudável.	151
3.71 Base normativa – mapa 124 áreas.	152
3.72 Mapas <i>OCT</i> de 124 áreas de voluntário saudável.	153
3.73 Mapas <i>OCT</i> de 124 áreas de doente com RD.	154
4.1 Retinografia com rede vascular.	162
4.2 Angiografia obtida com OCVL.	163
4.3 Co-registo de rede vascular em coordenadas polares.	166
4.4 Co-registo multimodal (rígido).	167
4.5 Co-registo multimodal (projectivo).	167
4.6 Deformações locais.	168
4.7 Co-registo multimodal (deformável).	169
4.8 Co-registo multimodal.	170

Lista de Figuras

4.9 Retinografia com vasos e cruzamentos/bifurcações assinalados. . .	172
4.10 Co-registo multimodal (rígido).	173
4.11 Co-registo multimodal (deformável).	173
4.12 Co-registo multimodal (deformável).	174
4.13 Co-registo multimodal (deformável).	174
4.14 Co-registo multimodal (deformável).	175
4.15 Co-registo multimodal: <i>OCT</i> , <i>RLA</i> e retinografia.	175
4.16 Co-registo multimodal: <i>OCT</i> , <i>RLA</i> e retinografia.	176

Resumo

As diversas patologias oculares, com especial incidência naquelas aqui focadas, a retinopatia diabética (RD) e a degenerescência macular ligada à idade (DMI), representam um risco para a visão e uma carga para a sociedade quer pelos custos humanos quer pelos custos económicos envolvidos.

Os processos desenvolvidos ao longo deste trabalho, têm como objectivo principal tornar o conhecimento destas patologias mais aprofundado, de modo a melhor percebermos os mecanismos envolvidos nas alterações maculares associados às mesmas.

As diversas modalidades abordadas neste trabalho são analisadas no Capítulo 2, enquanto os desenvolvimentos propostos e realizados são relatados no Capítulo 3.

A integração das diferentes metodologias, com vista a uma melhor percepção da realidade de um sistema complexo como o da retina, é tratada no Capítulo 4. Aqui são desenvolvidos os processos básicos conducentes ao co-registo multimodal, os quais são utilizados para a integração de informação morfológica e funcional.

À visão proporcionada pela integração de modalidades complementares foi já reconhecida validade e importância, tanto nesta como noutras áreas.

Na Discussão é feito um resumo dos desenvolvimentos realizados e a respectiva relação com trabalhos de outros autores, bem como a listagem das principais publicações e comunicações científicas efectuadas durante a realização deste trabalho.

Os vários projectos ao longo dos quais o trabalho aqui reportado foi efectuado, projectos de investigação científica nacionais e internacionais, são mencio-

Resumo

nados nas Conclusões. É ainda feita referência a novos estudos os quais irão fazer uso dos conhecimentos adquiridos. É também feita referência a um estudo já em curso o qual pretende aferir a validade da fenotipagem realizada em doentes diabéticos, fenotipagem realizada com recurso a metodologias aqui abordadas, e.g. a imagem multimodal.

Summary

From the several ocular pathologies, with special emphasis on the ones herewith dealt with, diabetic retinopathy (RD) and age-related macular degeneration (AMD), represent a threat for vision and a burden for the society because of both the social and economic impact.

The key objective of the processes developed along this work is to increase the knowledge on these pathologies and, in this way, to promote the better understanding on the diseases mechanisms involved in the associated macular changes.

On Chapter 2, the several modalities focused in this work are analyzed, while the proposed and achieved developments are reported in Chapter 3.

The integration of the different modalities for the broader overview of the retina complex system is dealt with in Chapter 4. Here, the basic processes for the multimodal co-registration, to be used for the integration of morphological and functional information, are developed.

The importance of the global overview made available by the integration of complementary modalities, was already recognized both on this and other areas of knowledge.

In the Discussion a summary is made on the achieved developments, the respective relation to published work from several other authors, and on the main publications and scientific communication made throughout the time span of this work.

The several projects along which the work here reported was carried-out, both national and international scientific research projects, are mentioned at the Conclusions. A reference was made to projects that will make use of the knowledge here gathered. A newly started project, which intends to validate

Summary

a phenotype system for DR patients made using some of the processes here developed, e.g. multimodal imaging, is also mentioned.

Capítulo 1

Introdução ao Conceito

1.1 Incidência macular das patologias mais frequentes: Retinopatia Diabética e Degenerescência Macular Ligada à Idade

A retinopatia diabética (RD), i.e. as alterações da retina associadas à diabetes, é uma das principais causas de cegueira legal no mundo desenvolvido. As estimativas apontam 10% como valor de taxa da população diabética em 2010 na União Europeia. Do outro lado do Atlântico, há cerca de 100 000 novos diabéticos a cada ano de acordo com [Kin95]. Para além do mais, esta doença multifactorial afecta sobretudo a população activa, com idades entre os 24 e os 74 anos de idade [AGK⁺98] tendo por isso um custo socio-económico elevado. Este aspecto é tão mais importante quanto as alterações demográficas da patologia da diabetes do tipo 2 (não-insulino dependentes) envolvem um número crescente de doentes nos países em desenvolvimento o que tornará este num problema à escala global [GHP03].

Vários estudos multicêntricos foram estabelecidos aos longo dos anos para lidarem com este problema, de entre os quais se podem destacar o *Diabetic Retinopathy Study (DRS)*, o *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Group (ETDRS)*, o *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)* e o *United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)*.

Os principais critérios clínicos para a avaliação clínica da retinopatia diabética foram estabelecidos no âmbito do estudo *ETDRS*, a maioria baseada em fotografias do fundo ocular, os quais permanecem ainda em utilização no protocolo com o mesmo nome.

Um dos sinais iniciais observáveis da retinopatia diabética é a presença de microaneurismas (o que corresponde ao nível 1 da escala *ETDRS*), embora estes não sejam específicos da diabetes já que 7% da população não-diabética apresenta microaneurismas no fundo ocular, que entre outros factores podem estar relacionados com a hipertensão.

Níveis mais avançados da escala *ETDRS* vão desde as hemorragias ao edema macular, sendo esta uma das causas de baixa de visão na diabetes.

Num estado avançado da retinopatia diabética, a retinopatia diabética proliferativa (RDP), há lugar ao desenvolvimento de novos vasos, os quais, se não

1.1 Incidência macular: RD e DMI

tratados, conduzem à sua proliferação e a hemorragias frequentes.

Do estudo realizado entre 1980 e 1992, o *Wisconsin Epidemiology Study of Diabetic Retinopathy (WESDR)*, cuja população consistiu maioritariamente em Americanos de ascendência Europeia, diabéticos do tipo 2 e com 30 ou mais anos de idade, 50% apresentavam um qualquer nível de retinopatia, 5% apresentavam RDP e 5% apresentavam edema macular clinicamente significativo (EMCS).

Ao fim de 10 anos, 71% dos indivíduos sem quaisquer alterações iniciais apresentavam já algum tipo de alteração, 60% progrediram em 2 ou mais níveis na escala *ETDRS*, 16% apresentavam RDP e 13% edema macular clinicamente significativo [KKMC95a, KKM⁺84b, KKM⁺84a, KKM⁺84c, KKMC95b].

Relativamente à degenerescência macular ligada à idade (DMI), esta é uma patologia que se caracteriza pela surgimento de alterações degenerativas progressivas da retina na área macular.

No estudo *Beaver Dam Eye Study (BDES)*, relativo à degenerescência macular ligada à idade [PP05] com base numa população de 4 926 indivíduos com idades entre os 43 e os 86 anos, 15,6% apresentavam sinais iniciais de DMI (*drusa* duros com anomalias pigmentares ou *drusa* moles), enquanto 1,6% apresentavam sinais de DMI mais avançada (neovascularização ou atrofia geográfica), pelo que foi estimado que 640 000 americanos entre os 75 e os 86 anos sofram de DMI.

Ao fim de 10 anos, relativamente aos indivíduos sem alterações iniciais no início do estudo, 10,9% apresentavam já alterações iniciais, enquanto a percentagem relativa aos indivíduos com sinais mais avançados foi de 2,1%, o que permitiu estimar que 1,9 milhões de indivíduos entre os 65 e os 84 anos desenvolveriam sinais avançados de DMI.

O risco para a cegueira nesta patologia é ainda mais preocupante uma vez que 25% dos doentes com atrofia geográfica e boa acuidade visual ao fim de um período de 4 anos são considerados legalmente cegos [SBT⁺99].

1.2 Limitações das metodologias actualmente existentes

As técnicas que irão ser abordadas visam a obtenção de informação da retina do olho humano, o qual funciona como uma dupla lente positiva que forma uma imagem real numa superfície sensível à luz, a retina.

A focagem das imagens na retina deve-se principalmente ao efeito conjunto da córnea e do cristalino, sendo a superfície da córnea ligeiramente achatada de modo a reduzir as aberrações esféricas, enquanto o cristalino é uma lente *GRIN* em que o índice de refração varia de 1,406 no centro a 1,386 na periferia.

A íris, por intermédio da pupila, regula a quantidade de luz que penetra no olho, podendo o diâmetro de abertura variar de 2 *mm* (em condições de luz muito intensa) a 8 *mm* na escuridão.

Um esquema simplificado do olho humano pode ser visto na figura 1.1.

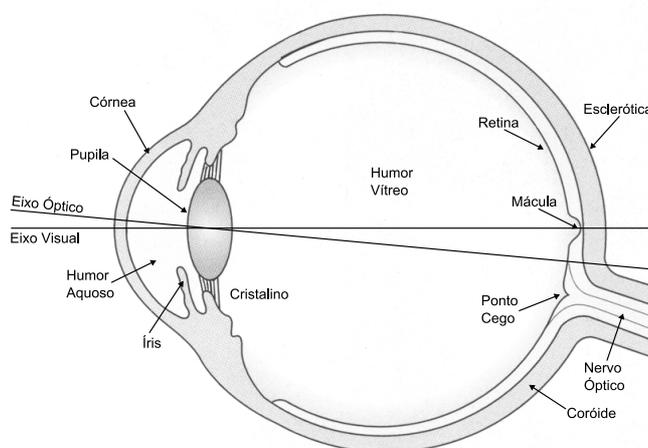


Figura 1.1: Esquema simplificado do olho humano onde são mostradas as principais estruturas e os eixos óptico e visual.

As duas referências globais da retina humana e que terão importância para o trabalho desenvolvido, são a fóvea e o disco óptico. A fóvea é a área macular

1.2 Limitações metodologias actuais

onde se forma a imagem da visão detalhada, por conter a maior densidade de fotoreceptores, cones e bastonetes, sendo os primeiros os responsáveis pela detecção de cores e dos quais existem entre 6 e 7 milhões. Por outro lado, os bastonetes são muito mais sensíveis e existem distribuídos de modo irregular pela retina num total de 125 milhões. O disco óptico é o ponto de entrada das fibras nervosas que transportam a informação recolhida pelo fotoreceptores para o cérebro, mas também o ponto de entrada/saída dos vasos que irrigam a retina.

Globalmente, as técnicas actualmente disponíveis apresentam limitações de diversa ordem tais como o deficiente mapeamento das alterações detectadas relativamente à localização da fóvea, ou mesmo o acompanhamento dessas alterações ao longo do tempo.

A fóvea é de facto a zona nobre a preservar e a proteger dada a sua função vital para a visão detalhada necessária no dia-a-dia de qualquer indivíduo.

É por isso de fundamental importância que todo o mapeamento macular se faça relativamente a esta referência anatómica e funcional, considerando naturalmente que entre duas lesões semelhantes é de maior risco para a visão aquela localizada junto à fóvea comparativamente com uma qualquer outra localização na retina.

Reveste-se assim de condição fundamental que qualquer mapeamento se faça relativamente a esta referência.

Por outro lado, os métodos que têm a fóvea como referência geográfica não têm em consideração a necessidade de obtenção de um mapeamento mais detalhado nesta área e tendem, em contrapartida, a obter um mapeamento com igual resolução qualquer que seja a localização onde este é realizado. Um exemplo gritante é o caso do mapeamento da espessura da retina com o *OCT (Optical Coherence Tomograph - Carl Zeiss Meditec, Dublin, California, EUA)* que, embora consiga uma maior densidade de medidas de espessura no centro do respectivo mapa e este seja realizado preferencialmente centrado na fóvea, apresenta como medida da espessura um valor médio para uma área correspondente a um círculo de 1000 μm de diâmetro, o que tem como implicação uma menor sensibilidade na detecção de alterações nesta área primordial da visão.

Por outro lado, a generalidade dos sistemas disponíveis fornece apenas informação morfológica, eventualmente a de maior facilidade de obtenção, embora

Capítulo 1. Introdução ao Conceito

a informação funcional, relativa à visão ou a um qualquer outro aspecto, seja tão ou mais importante do que esta. Como exemplo, poderá utilizar-se um dos aspectos que será objecto de desenvolvimento neste trabalho e que se prende com a obtenção de uma imagem funcional da barreira hemato-retiniana (BHR), *in vivo*, o que significa que a informação obtida nos indica o estado de funcionamento da barreira que tem como função a preservação dos fotorreceptores, obviamente com as naturais consequências para a visão no caso da sua degradação.

A adicionar a todos estes aspectos, deve considerar-se a dificuldade existente correntemente no acompanhamento das lesões ao longo do tempo, sendo este um factor primordial no acompanhamento da evolução de qualquer estado patológico, já que nos indica o sentido e velocidade desta mesma progressão, seja ela o sentido de um agravamento da patologia ou o contrário.

Sem um eficaz meio de acompanhamento das alterações do fundo ocular, quer morfológicas quer funcionais, há um manancial de informação eventualmente presente em cada uma das várias modalidades que pode estar a ser negligenciado e por esse motivo atrasar a evolução do conhecimento das alterações em curso na retina associadas a uma determinada patologia.

Indo ainda mais longe, o facto de não estarem disponíveis métodos de imagem multimodal que permitam correlacionar as várias modalidades disponíveis, parece ser uma limitação que se sobrepõe a todas aquelas já mencionadas.

Todos estes factos levaram ao desenvolvimento dos processos descritos neste trabalho, tal como a possibilidade de comparação da evolução das alterações do fundo ocular (secção 3.1.2), a necessidade de desenvolvimento de uma imagem funcional da barreira hemato-retiniana (secção 3.2.1), a possibilidade de normalização da angiografia fluoresceínica (secção 3.2.2), o mapeamento do edema macular relativamente à fóvea e com resolução aumentada (secção 3.3) e finalmente os processos de integração das diversas modalidades (secção 4), com a preocupação fundamental de obtenção de resoluções elevadas e de que os processos de co-registo sejam tais que tenham em consideração a formação das respectivas imagens de modo a poderem ser corrigidos todos os aspectos possíveis, tal como o processo de co-registo deformável das imagens funcionais para as referências morfológicas na área central e de já referida importância para a visão.

1.2 Limitações metodologias actuais

Este cuidado colocado na área central é claramente suportado pelos seguintes argumentos. Embora a fóvea ocupe apenas uma área de 0,02% da totalidade da retina e apenas contenha 0,3% do total de cones, ela contém 25% das células ganglionares [PP05]. Significativo é também o facto de 40% do cortex visual primário ser responsável pelo processamento dos 5° centrais da retina a que corresponde uma área circular de 1000 μm de diâmetro.

Todos estes factos são assim a favor da necessidade de um mapeamento das várias técnicas com a maior resolução possível e da extrema importância de se conhecerem as alterações que aqui ocorrem.

Capítulo 2

Revisão das Técnicas de Diagnóstico Actualmente Existentes

2.1 Fotografia do fundo ocular

A fotografia do fundo ocular, ou retinografia, é claramente a modalidade mais utilizada, quer para diagnóstico quer para simplesmente documentar a aparência do fundo ocular de um dado olho num particular instante.

De acordo com [TSB03, YKGC06], a fotografia do fundo ocular humano surgiu em 1886 num trabalho conjunto de W. Jackman e J. Webster. Mais tarde, em 1929, foi obtida a primeira fotografia do fundo ocular a cores, no mesmo ano em que A. Bedell publicou o primeiro atlas de fotografia estéreo do fundo ocular.

A retinografia com utilização de um *flash* foi obtida pela primeira vez em 1949 por A. Rizzutti. Actualmente, quando se fala de fotografia do fundo ocular já não se considera outra possibilidade que não a fotografia digital.

Os sistemas que permitem a realização da retinografia, os retinógrafos, utilizam um sistema de iluminação que tem como objectivo a uniformidade da iluminação do fundo ocular. Para este efeito, utilizam um anel de luz fazendo esta entrar pela pupila dilatada, luz essa que é reflectida pela retina através do centro da pupila de modo a ser capturada pelo sensor, geralmente um sistema *CCD*.

Os retinógrafos são normalmente descritos pelas suas características, da quais se destacam os ângulos de aquisição permitidos, que definem qual a porção da retina que pode ser obtida em cada imagem. Há assim vários retinógrafos com ângulos que variam tipicamente entre os 30° e os 50°, havendo no entanto sistemas especializados para ângulos distintos como é o caso de retinógrafos capazes de obter imagens até 140°.

Outra das classificações utilizadas para os retinógrafos (ou câmaras) diz respeito às condições de obtenção de imagens, sendo classificadas em midriáticas ou não-midriáticas. As primeiras requerem a dilatação da pupila com recurso a fármacos, enquanto as segundas fazem uso da dilatação natural após um período de adaptação do utente a um ambiente com um baixo nível de luminosidade. Estas últimas são utilizadas essencialmente para documentação do fundo ocular ou para efeitos de rastreio de populações.

Dos aspectos que permitem distinguir os retinógrafos fazem parte a resolução das imagens digitais fornecidas por cada um deles, havendo uma panóplia de opções quer em termos de resolução quer em termos de sensor utilizado. Este

2.1 Fotografia do fundo ocular

é de resto um aspecto que passa já a ser autónomo relativamente ao retinógrafo se este for considerado apenas o sistema físico responsável pela iluminação do fundo ocular e pela recolha da luz reflectida.

Um retinógrafo é no entanto hoje em dia, um equipamento do qual faz parte não apenas o sistema base de recolha de imagens, mas também o sistema de base de dados onde as informações acerca do utente bem como as respectivas retinografias são armazenadas, sendo este também um aspecto que distingue retinógrafos entre si pela sua capacidade de armazenamento.

Finalmente, devemos considerar ainda a possibilidade de efectuar manipulações nas imagens adquiridas, a regulação de contraste, nível de iluminação e outros, que permitem efectuar correcções que sistemas em utilização até há pouco tempo não permitiam.

Novas especificações surgem assim nesta área, tal como o formato digital da imagem, o uso ou não de compressão digital e se a mesma ocorre com ou sem perdas. Todos estes factores pesam hoje em dia quando nos referimos a uma imagem do fundo ocular e estes são aspectos ainda não considerados aquando da definição da generalidade do protocolos em utilização em ensaios clínicos. Neste sentido, não é de estranhar um estudo multicêntrico acabar por recolher retinografias com resoluções distintas e em formatos de imagem também distintos, embora os princípios para o processo de aquisição, o ângulo a utilizar e a localização do fundo ocular onde as imagens devem ser obtidas estejam completamente especificadas nos respectivos protocolos, o que demonstra que o processo de adaptação está ainda em curso.

Informação acerca da história da fotografia, princípios e características podem ser consultados em [YKGC06].

Um exemplo de uma retinografia pode ser vista na figura 2.1.



Figura 2.1: Exemplo de retinografia digital de um olho esquerdo, obtida com um ângulo de 30° e com 3872×2592 píxeis.

2.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

Quer a angiografia fluoresceínica quer a fluorofotometria dependem da fluorescência emitida pelas moléculas da substância de contraste utilizada, marcador fluorescente, que no contexto do tópico em análise é a fluoresceína sódica, razão pela qual interessa definir as suas principais características.

Marcadores fluorescentes são assim moléculas caracterizadas pela existência de níveis energéticos que favorecem a transferência de electrões entre diferentes orbitais pela absorção e emissão de fotões. Durante o processo de absorção a molécula passa a um estado excitado, podendo posteriormente recuperar, para o estado inicial, pela libertação da energia excedentária através da emissão de fotões, embora possa ocorrer outro tipo de libertação de energia sem recurso à emissão destes.

Uma molécula fluorescente é deste modo caracterizada pelo seu espectro de excitação (absorção) e de emissão, respectivamente a distribuição de energia capaz de produzir emissão num dado comprimento de onda e, a distribuição de energia de emissão quando excitada num comprimento de onda específico.

Dois tipos de fluoróforos podem coexistir no fundo ocular, os fluoróforos endógenos e os fluoróforos exógenos. A angiografia fluoresceínica baseia-se na presença destes últimos ao passo que os primeiros (endógenos) são os responsáveis pela autofluorescência. Pode ainda considerar-se, em sentido mais lato, que a fluorescência endógena é toda aquela existente não intencionalmente para um fim específico, o que no caso presente será a obtenção de uma imagem do fundo ocular com esta substância de contraste [Doc97].

De modo a poder obter-se uma informação acerca da presença de um determinado marcador fluorescente, é necessário verificarem-se algumas condições, nomeadamente que os espectros de excitação e emissão sejam o mais separados possível, que a contribuição dos fluoróforos endógenos seja diminuta comparativamente com a fluorescência exógena, mas ainda que a excitação se produza num comprimento de onda compatível com o espectro dos emissores existentes (*LEDs*, *lasers*, etc...) e que o respectivo espectro de emissão do marcador fluorescente seja compatível com os sistemas de aquisição disponíveis (fotodíodos, fotomultiplicadores, *CCDs*, etc...). O fluoróforo de excelência utilizado

Capítulo 2. Revisão das Técnicas de Diagnóstico Existentes

em oftalmologia, onde se enquadra o presente trabalho, é a fluoresceína sódica (NaFl , $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Na}_2$), ou simplesmente fluoresceína, usado na prática clínica devido à sua não-toxicidade, nível de fluorescência e dimensão das moléculas (376 Daltons) [DB95, Doc97].

Após a administração de fluoresceína esta é conjugada pelo fígado e excretada pelo rim. O principal conjugado existente na corrente sanguínea é a fluoresceína monoglucoronada, cuja fluorescência se situa entre 1/34 e 1/3 da fluoresceína sódica em função do comprimento de onda utilizado [MB86]. No entanto, 5 *minutos* após a administração de fluoresceína sódica, a fluoresceína monoglucoronada é responsável por apenas 5% da fluorescência medida, nas condições de utilização em todo o trabalho aqui apresentado, razão pela qual a sua contribuição não será considerada.

A fluoresceína, um traçador da família dos *Xantenos*, foi sintetizada pela primeira vez em 1871 por Johann von Bayer e usada por Paul Ehrlich em 1882 para estudar o percurso do humor aquoso em olhos de animais [Mas06]. Os espectros de excitação (com emissão medida a 515 *nm*) e de emissão (com excitação a 490 *nm*) podem ser vistos na figura 2.2 e apresentam um pico de absorção nos 492 *nm* e um pico de emissão nos 511 *nm*, enquanto os picos reportados em [GHP03] são nos 490 *nm* e nos 510 *nm*, respectivamente.

Nesta mesma imagem é mostrado o efeito do pH da solução de fluoresceína, onde claramente se observa a diminuição da emissão com a diminuição do pH (curvas a preto).

A angiografia fluoresceínica como técnica de diagnóstico foi introduzida em 1961 [NA61] e a sua utilização sistemática contribuiu consideravelmente para o conhecimento actual da retinopatia diabética [CV06]. Esta baseia-se na obtenção de uma imagem do fundo ocular após administração do traçador (a fluoresceína sódica como fluoróforo exógeno) com recurso à excitação das moléculas deste e com a utilização de filtros de excitação e emissão apropriados de modo a captar apenas a fluorescência proveniente da emissão e não da reflexão da luz de excitação.

Um exemplo de uma angiografia fluoresceínica digital, obtida 30,7 *s* após a administração intravenosa do traçador, pode ser vista na figura 2.3.

A evolução da instrumentação disponível tem tido um papel primordial para o

2.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

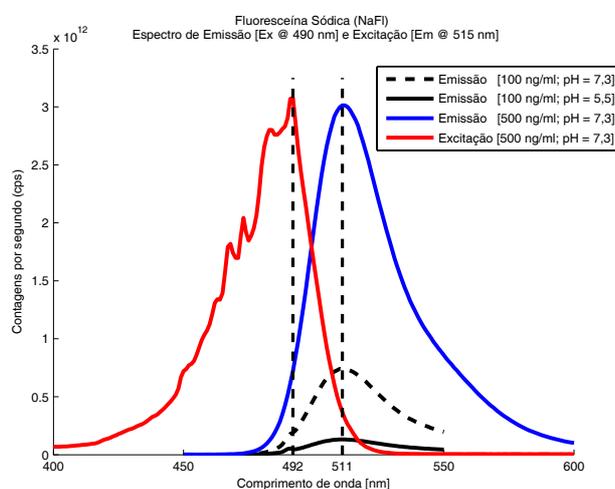


Figura 2.2: Espectro de emissão e excitação para a fluoresceína sódica, respectivamente curva a azul e a vermelho. Neste gráfico, também é mostrado o efeito da dependência do nível de emissão com o pH da solução (curva a preto).

avanço do conhecimento acerca da retinopatia diabética, com especial incidência na avaliação *quantitativa* da barreira hemato-retiniana (BHR).

Neste âmbito, o desenvolvimento do *oftalmoscópio confocal de varrimento laser* é de particular importância, razão pela qual os próximos parágrafos serão utilizados na sua análise.

Das várias aproximações efectuadas ao desenvolvimento de um sistema confocal, aquela seguida por Marvin Minsky foi a que mais repercussões teve, sendo ainda hoje os oftalmoscópios confocais muito semelhantes, conceptualmente, ao original deste autor cuja patente de 19 de Dezembro de 1961 (*USA Patent 3,013,467*) foi submetida em 7 de Novembro de 1957 com o título *Microscopy Apparatus*. O sistema patenteado utiliza uma fonte de luz não coerente – o trabalho inicial é de 1955 e o *laser* viria a ser inventado apenas em 1960 por Theodore Maiman – fazendo por isso uso de dois orifícios confocais, cuja palavra significa que os mesmos se encontram co-focados [Mas06]. À data desta invenção, o varrimento consistia em fazer mover o objecto de estudo, sendo por isso o tempo de aquisição para os estudos do próprio Marvin Minsky de 10 s por imagem, ao contrário do que sucedia com a utilização de discos de Nipkow (Paul



Figura 2.3: Angiografia fluoresceínica digital de um doente diabético obtida 30.7 s após a administração intravenosa do traçador (fluoresceína sódica na proporção de 14 mg/kg de peso do doente).

Nipkow) cuja invenção remonta a 1884 e que permite a obtenção de imagens a uma taxa superior, fazendo uso de múltiplos orifícios confocais dispostos segundo um arranjo geométrico específico sobre dois discos que rodam solidários segundo o mesmo eixo.

Em 1981 é publicado um trabalho sobre o desenvolvimento de um sistema de varrimento para a obtenção de imagens do fundo ocular [WH81]. Este veio permitir a aquisição de uma imagem por deflexão de um feixe *laser* o que, ao contrário dos oftalmoscópios anteriores, evita a iluminação simultânea da totalidade da retina permitindo por isso uma resolução lateral superior. Este sistema é passível de utilizações distintas tal como demonstra a obtenção de dados de perimetria [MTWH82], trabalho publicado no ano seguinte ao da instrumentação.

Em 1984 um novo trabalho [Web84] agrega os sistema de varrimento e confocal, criando assim o *oftalmoscópio confocal de varrimento laser* (OCVL) (*confocal scanning laser ophthalmoscope - CSLO*) que deu origem a vários mo-

2.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

delos comerciais e que teve por isso um papel importante na obtenção de dados do fundo ocular com uma qualidade muito superior até à então aí obtida.

No entanto em 1975, ainda antes da criação desta instrumentação, foi dado um passo importante para a possibilidade de aferir o estado da barreira hemato-retiniana (BHR) com a aplicação da fluorofotometria para a avaliação clínica de patologias do segmento posterior com o trabalho [CVACF75] ao qual se seguiram outros [WOK⁺78, WKKB79, KA81]. A história resumida da fluorofotometria ocular pode ser encontrada em [CV85].

O princípio subjacente à fluorometria (ou fluorofotometria) reside no facto da fluoresceína sódica penetrar para o interior do globo ocular (cavidade vítrea/humor vítreo) em quantidades mínimas em olhos de indivíduos saudáveis, ao passo que essa penetração é mais elevada em doentes diabéticos bem como noutras patologias para além da retinopatia diabética.

Convém aqui realçar o facto de anteriormente terem sido já criados equipamentos para a obtenção de informação quantitativa tal como referido em [WK70] e que referencia a instrumentação criada por David Maurice e apresentada em [Mau63], estando no entanto estes equipamentos limitados a medições na córnea e câmara anterior.

A fluorometria do vítreo, com relevância para o presente estudo, foi dada a conhecer no trabalho [CVGVN79] onde um novo fluorometro para a medição das alterações da barreira hemato-retiniana é apresentado tendo por base uma lâmpada-de-fenda Haag-Streit modelo 360.

No entanto, apenas em 1983 [ZBCV83c, ZBCV83b] foi apresentado o sistema comercial *Coherent Fluorotron Master (CFM – OcuMetrics Inc., Mountain View, CA, EUA)*, o qual se mantém até hoje e que tornou possível a realização de inúmeros estudos tal como o apresentado em [ZBRCV85]. O seu princípio de funcionamento, consiste na aquisição de uma série de medidas efectuadas ao longo de um eixo óptico que passa pelo ponto de fixação, rejeitando em cada local a fluorescência proveniente de localizações anteriores e posteriores à localização da medição corrente, sendo por isso um sistema confocal. Embora o sistema forneça apenas uma medida única para todo o pólo posterior, este mesmo sistema tornou possível a comparação objectiva entre doentes e/ou a monitorização do mesmo doente (olho) ao longo do tempo.

Capítulo 2. Revisão das Técnicas de Diagnóstico Existentes

Contudo, a necessidade de mapear as alterações da barreira hemato-retiniana de modo a poder correlacioná-las localmente com outros parâmetros, tais como a presença de edema macular, levou ao desenvolvimento de um novo sistema de medição baseado num *oftalmoscópio confocal de varrimento laser* protótipo da Zeiss (*Carl Zeiss, Jena, Alemanha*). De entre as limitações desta instrumentação, devemos referir o facto do plano confocal estar em movimento constante ao longo da aquisição e o facto do sinal ser adquirido em modo entrelaçado, i.e. linhas pares e linhas ímpares são objecto de medição em varrimentos consecutivos e encontram-se por isso em planos confocais distintos. A conjugação destes dois aspectos com o número muito limitado de planos confocais, apenas 9, obriga à utilização do movimento constante do plano de aquisição e do modo entrelaçado para aumentar o número de planos confocais à custa de uma redução da resolução lateral do sistema. Foi deste modo foi possível obter informação em 18 planos confocais separados de 150 μm e com esta informação trazer novos achados para a investigação clínica, estando o sistema e os dados inicialmente obtidos descritos em [BIS⁺99] e em [LBSCV99].

Publicações subsequentes demonstraram não apenas a exequibilidade da técnica mas também o seu valor clínico [LBCV00] bem como a possibilidade oferecida com as referências do fundo ocular para a integração de informações de diferentes fontes e modalidades de imagem [BLCV02].

Embora com todas estas limitações, foi possível obter dados importantes na progressão da retinopatia diabética, tais como a reversibilidade das alterações da barreira hemato-retiniana nos estádios iniciais da doença [LBACV01], de entre outros [LBF⁺04, LFS⁺04, CVB05].

No entanto, a instrumentação utilizada não está comercialmente disponível, não permitindo por esse motivo alargar a utilização desta técnica a outros grupos de investigação com interesse nesta área o que levou ao desenvolvimento do trabalho reportado na secção 3.2.1.

2.3 Tomografia por coerência óptica

A tomografia por coerência óptica é uma modalidade de imagem médica relativamente recente na área da oftalmologia, cujo princípio se baseia num vasto campo do conhecimento. Esta técnica encontra-se extensivamente detalhada em [BT02].

O princípio da aplicação foi demonstrado em 1991 [HSL⁺91] e em 1994 foi publicado o primeiro trabalho com dados obtidos do fundo ocular *in vivo* [IHS⁺94].

Esta modalidade permite obter imagens de estruturas da retina, em profundidade, ao longo de um segmento de recta ou ao longo de um círculo. Em qualquer dos casos, estas aquisições correspondem a varrimentos efectuados em modo *B*, cada um dos quais é composto por múltiplas aquisições em modo *A*, terminologia utilizada pela analogia com os ultrasons.

É possível com recurso a esta técnica obter uma imagem semelhante a uma imagem histológica com a enorme vantagem de ser realizada *in vivo*.

A informação obtida é dada pela intensidade das reflexões correspondentes a alterações no índice de refacção para uma dada localização e a uma dada profundidade, sendo esta fornecida pelo deslocamento efectuado por um espelho de referência.¹

O *OCT* veio revolucionar as imagens obtidas do fundo ocular ao revelar as estruturas de retinas funcionais e patológicas, *in vivo*, e com resoluções de 1 a 15 μm , que correspondem a 1 a 2 ordens de grandeza relativamente a sistemas de imagiologia convencionais tais como os ultrasons, a ressonância magnética ou a tomografia computadorizada.

Embora com um princípio semelhante ao dos ultrasons, o *OCT* tem óbvias diferenças. Ao contrário destes, o *OCT* não necessita de contacto directo com a amostra biológica. Por outro lado, embora apresente uma resolução superior, comparativamente com a resolução de 150 μm dos ultrasons a 10 MHz, a penetração na amostra biológica é limitada.

Deve chamar-se a atenção que, embora existam sistemas de ultrasons com resoluções superiores aos referidos, da ordem do 20 μm , estes têm uma capa-

¹Os sistemas mais recentes não têm partes móveis e obtêm por isso velocidades de aquisição superiores em 3 a 4 ordens de grandeza.

Capítulo 2. Revisão das Técnicas de Diagnóstico Existentes

cidade de penetração de 4 a 5 *mm*, o que limita a sua utilização ao segmento anterior do olho, não permitindo por isso a obtenção de imagens do fundo ocular.

O *OCT* usa a interferometria de baixa coerência para obter resoluções elevadas, sendo que as resoluções espaciais da ordem das dezenas de micrometros correspondem a resoluções temporais da ordem dos femtosegundos (*fs*). Medições de tempos desta ordem de grandeza podem ser obtidas com recurso a dispositivos ópticos conhecidos como interferómetros.

Nestes dispositivos, um feixe de baixa coerência, normalmente um feixe *laser*, é dirigido para um divisor de feixe sendo um dos feixes resultantes dirigido para a amostra e o outro para uma referência. O feixe dirigido para a amostra sofre reflexões nas várias estruturas a diferentes profundidades, correspondendo a alterações no índice de refração, e permite por isso discriminar as várias estruturas oculares (na área de aplicação em causa). Por outro lado, o segundo feixe sofre reflexão no espelho de referência, cuja posição pode ser alterada.

Ambos os sinais reflectidos, pela amostra e pela referência, são recombinados e quantificados por um fotodetector.

Resulta daqui, que as medidas efectuadas com o *OCT* a partir do sinal recombinado da amostra e do espelho de referência, correspondem ao nível de alteração do índice de refração para uma particular posição deste. Fazendo variar essa posição e registando o sinal obtido, ficamos na presença de um varrimento em modo *A*. Da identificação neste sinal das estruturas responsáveis por transições entre índices de refração é determinada a espessura da retina no local de aquisição do sinal, considerada como a distância entre a *membrana limitante interna* e o *epitélio pigmentado da retina*.

Um varrimento em modo *B*, permite assim obter tantas medidas da espessura da retina quantos os varrimentos em modo *A* que lhe deram origem.

Uma imagem correspondente a um corte histológico, é obtida pela colocação lado-a-lado dos múltiplos varrimentos em modo *A* de um mesmo varrimento em modo *B*. Cada píxel é assim proporcional à diferença entre os índices de refração e a imagem pode ser mostrada como monocromática ou fazendo uso de pseudocor, o que facilita a inspecção visual em função das pequenas diferenças que importam detectar.

Do acima exposto deve referir-se a diferença entre a resolução do sistema

2.3 Tomografia por coerência óptica

em profundidade (varrimento em modo *A*) e lateral (varrimento em modo *B*). Neste último a resolução é inferior e dependente do número e localização dos vários varrimentos em modo *A* que compõem o varrimento em modo *B*, estando por isso dependente da estabilidade posicional da amostra devido à existência de movimentos sacádicos, se realizado *in vivo*.

Embora, como descrito, o sistema apresente intrinsecamente resoluções elevadas, sendo a resolução lateral da ordem dos $20 \mu m$, o mapeamento dos valores de espessura para uma retina estão muitíssimo condicionados nos sistemas existentes, *OCT* modelo 2 e *Stratus*, fornecendo apenas 9 valores de espessura para cobrir toda a área macular num diâmetro de $6000 \mu m$ (uma área de $\approx 28 mm^2$ do fundo ocular). Para além disso, este mapa é construído com base em apenas 6 varrimentos radiais (modo *B*), não tomando em consideração a posição dos mesmos no fundo ocular nem a existência de movimentos sacádicos.

Ainda assim, a literatura é abundante na análise de diversas patologias utilizando estes mapas, o que claramente demonstra a enorme apetência pela utilização desta técnica.

Capítulo 3

Desenvolvimento de Novos Métodos

3.1 Fotografia do fundo ocular

3.1.1 Contagem de microaneurismas

O registo da localização vs. o número total de microaneurismas

A fotografia do fundo ocular tem sido o método de eleição no seguimento da retinopatia diabética dado ser uma modalidade minimamente invasiva (ou não invasiva se não se considerar a interacção da luz com o tecido biológico), ser tecnicamente fácil de realizar e bem tolerada pelos doentes, resultando daí a sua utilização em rastreio de populações [AGK⁺98].

Os microaneurismas e as hemorragias são os primeiros sinais visíveis no fundo ocular a poderem ser captados por esta modalidade de imagem, podendo ser contados, o que tem sido sugerido como um indicador da progressão da retinopatia [KMMK95].

Num estudo baseado em angiografias fluoresceínicas foram observados o aparecimento 395 novos microaneurismas e o desaparecimento de 258 microaneurismas anteriormente identificados, num intervalo de tempo de 2 anos, o que mostra que este não é um processo estacionário mas antes um processo dinâmico [HI96].

Deve ser tido em conta que o desaparecimento de um microaneurisma não é um processo irreversível mas antes um processo que indica uma deterioração da rede vascular.

Estes aspectos implicam que a contagem de novos microaneurismas deve tomar em consideração o local onde os mesmos são detectados no fundo ocular, o que significa que a detecção de um microaneurisma numa dada localização só corresponde a um novo microaneurisma se efectivamente nessa localização não houve registos anteriores, caso contrário trata-se simplesmente do mesmo microaneurisma mas que entretanto e devido às condições da rede vascular tinha deixado de estar visível.

Daqui se infere a necessidade de obter um registo da localização dos microaneurismas no fundo ocular para efectivamente se poder falar de uma taxa de progressão.

No âmbito do trabalho aqui apresentado, foi implementado um processo

3.1 Fotografia do fundo ocular

de co-registo de imagem de modo a poder contabilizar-se o número de novos microaneurismas durante um qualquer intervalo de tempo, o qual corresponde ao tempo que decorre entre a primeira e a última imagem a ser considerada para cada olho.

Deve salientar-se que a marcação (detecção) dos microaneurismas utilizado neste trabalho foi realizado por especialistas e não por um processo de análise de imagem, pelo que os resultados obtidos estabelecem a comparação entre o modo tradicional, em que apenas o número total é considerado independentemente de corresponderem ou não aos mesmos ou a novos microaneurismas, e o aqui proposto em que a localização é um factor chave e que determina se estamos na presença efectiva de um novo microaneurisma.

O problema da detecção de microaneurismas em imagens do fundo ocular foi já abordado por diversos autores, quer utilizando angiografias fluoresceínicas [SPSF92, HI96, MCN99, GCO⁺03], quer em imagens *Red-free* (as quais apenas utilizam o canal verde das retinografias em *RBG*) [HSO⁺00], ou ainda utilizando retinografias (imagens *RBG*) [LGL⁺03]. De todos estes autores, apenas [HI96] e [GCO⁺03] tiveram uma abordagem semelhante à aqui seguida, ainda que com diferenças importantes.

O co-registo de imagem para determinação das taxas de formação e desaparecimento de microaneurismas

Um ponto prévio à definição do tipo de co-registo a utilizar, e que se prende com o tipo de imagens que se pretendem co-registar deve ser aqui colocado.

O aspecto que importa realçar e que tem implicações acerca de decisões a tomar relativamente ao co-registo prende-se com o mapeamento de uma superfície noutra, e em que condições esse mapeamento pode ser realizado.

Da geometria diferencial, a curvatura de uma superfície é essencialmente caracterizada por dois parâmetros:

- a curvatura média num ponto P :

$$H = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) ,$$

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

- a curvatura de *Gauss* num ponto P :

$$K = \frac{1}{R_1 R_2},$$

onde R_1 e R_2 são os maior e menor raios de curvatura da superfície no ponto P [BSMM03].

Significa isto que a retina, sendo o olho aproximadamente esférico, corresponde a uma superfície com uma curvatura de *Gauss* K , enquanto a superfície representada por uma imagem do fundo ocular tem uma curvatura de *Gauss* nula. Este facto tem como implicações práticas a impossibilidade de obter uma representação do fundo ocular numa qualquer imagem sem distorções.

Deste modo, considerando que do ponto de vista prático não é possível obter imagens sempre segundo a mesma projecção, duas imagens distintas do mesmo fundo ocular correspondem a dois mapeamentos da retina em dois planos distintos, cada um dos quais contém uma dada distorção, o que implica que entre as duas imagens exista uma transformação não rígida, razão pela qual o co-registo rígido não foi aqui considerado. Deve no entanto notar-se que o efeito desta distorção será dependente da abertura do sistema de imagem e da amplitude do deslocamento do objecto entre imagens.¹

Colocados estes pontos prévios, vão considerar-se processos de co-registos projectivos para obter o co-registo entre imagens do fundo ocular sempre que as mesmas correspondam a imagens obtidas por sistemas *CCD* ou sejam imagens digitalizadas de fotografias convencionais do fundo ocular, o que é o caso nesta secção.²

As imagens a processar são assim imagens fotográficas convencionais, correspondentes ao campo 2, i.e. centradas na mácula, com 50° e obtidas com com uma *KOWA FX-500S* (*Kowa Optimed, Inc, Torrance, EUA*) e cujas imagens (positivos) foram digitalizadas a 1200 *DPI* com recurso a um digitalizador *Minolta SC-100* (*Konica Minolta Holdings, Inc., Tokyo, Japan*) dando origem a imagens do tipo *TIFF* sem compressão e com uma resolução de 4032×2688 píxeis.

¹Na secção 3.2.1 vai fazer-se uso do co-registo rígido (apenas translação). Tal deve-se ao facto de aí se estar em presença de um ângulo de aquisição de 20° e ainda que outros métodos aí empregues teriam um desempenho com resultados inferiores aos assim obtidos.

²O co-registo de imagem aqui utilizado é do tipo projectivo e encontra-se desenvolvido na secção 3.1.3 (página 58).

3.1 Fotografia do fundo ocular

Estas imagens são compostas por uma área circular, limitada verticalmente, e por uma área rectangular. A primeira contém a imagem do fundo ocular e a segunda a identificação do doente.

Sendo as imagens originais em positivo (por contraposição ao negativo da fotografia comum), resulta da respectiva digitalização que a área de interesse, que corresponde à área do fundo ocular, não se encontra sempre na mesma posição, pelo que, qualquer processamento a efectuar, terá de ser precedido por uma fase de segmentação desta região.

Um exemplo de uma imagem tipo digitalizada é mostrada na figura 3.1.



Figura 3.1: Imagem de uma fotografia digitalizada do fundo ocular, com a região de interesse à direita, e a identificação do doente à esquerda (mascarada para efeitos de confidencialidade).

A segmentação da região de interesse pode assim ser facilmente obtida pelo detecção de um círculo, cujo raio é conhecido e cujos limites verticais são definidos por duas rectas paralelas e aproximadamente horizontais.

A aplicação de uma detecção de arestas do tipo LoG (Laplaciano de uma Gaussiana) (equação 3.1) à imagem da figura 3.1 resulta na imagem da figura 3.2.

$$\text{LoG}(x, y) = -\frac{1}{\pi \sigma^4} \left[1 - \frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2} \right] e^{-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}}. \quad (3.1)$$

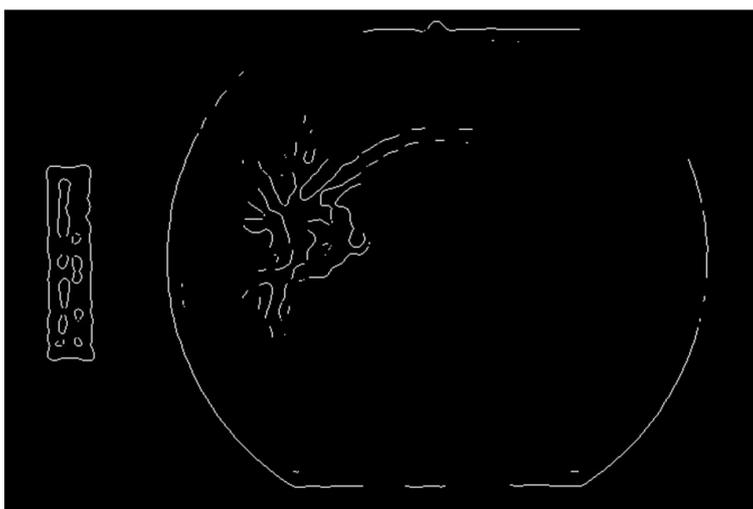


Figura 3.2: Imagem binária das arestas detectadas na imagem da figura 3.1 .

A detecção das rectas horizontais, definidas pelos pontos aresta da imagem binária da figura 3.2, é obtida com recurso à *Transformada de Radon* da imagem binária considerando apenas ângulos de 10° em torno da horizontal (a montagem dos positivos nos respectivos suportes não permite um maior grau de liberdade). A utilização deste processo deveu-se ao facto desta transformada se encontrar implementada no *Matlab*.³

A determinação do círculo seguiu um processo semelhante ao utilizado na *Transformada de Hough* modificada, mas uma vez que é conhecido o raio (r) do círculo que se pretende determinar, foi criado um espaço paramétrico cuja únicas variáveis correspondem ao centro do mesmo.

Cada píxel da imagem binária pode ser considerado como o centro de um círculo e os acumuladores no espaço paramétrico à distância r deste ponto

³A generalidade dos processos desenvolvidos nesta tese foram implementados em *Matlab* (*Matlab – The MathWorks Inc., Natick, MA, EUA*).

3.1 Fotografia do fundo ocular

incrementados de uma unidade, pelo que ao acumulador com maior votação corresponde o centro do círculo pretendido.

O resultado deste processo pode ser visto na figura 3.3.

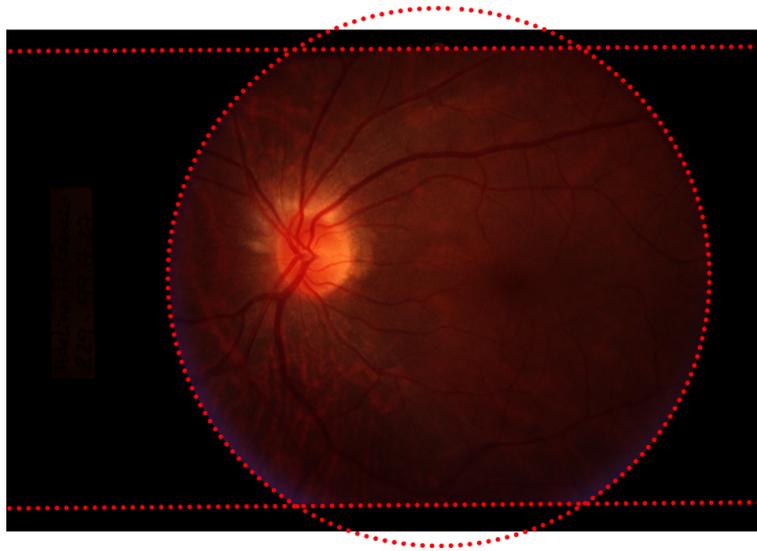


Figura 3.3: Região de interesse delimitada em imagem fotográfica digitalizada do fundo ocular, definida por um círculo e duas rectas horizontais.

Determinada a região de interesse, esta vai ser o alvo de processamento para dois fins distintos. O primeiro deve-se à necessidade de permitir uma melhor inspecção visual conducente à marcação dos microaneurismas, o segundo, corresponde à obtenção do co-registo entre imagens do mesmo fundo ocular.

No primeiro caso (inspecção visual) optou-se pela criação de duas novas versões digitais desta imagem, uma em que é ocupada toda a gama dinâmica do sinal considerando a totalidade do espaço *RGB* e outra que faz utilização de toda a gama dinâmica do sinal considerando cada um dos planos de cor independentemente, i.e. os canais *R*, *G* e *B*, respectivamente $\mathbf{I}^{(R)}$, $\mathbf{I}^{(G)}$ e $\mathbf{I}^{(B)}$. Estas transformações correspondem, respectivamente, às equações 3.2 e 3.3.

$$\mathbf{I}^{(i)}(x, y) = k \frac{\mathbf{I}^{(i)}(x, y) - \min(\mathbf{I}^{(R)}, \mathbf{I}^{(G)}, \mathbf{I}^{(B)})}{\max(\mathbf{I}^{(R)}, \mathbf{I}^{(G)}, \mathbf{I}^{(B)}) - \min(\mathbf{I}^{(R)}, \mathbf{I}^{(G)}, \mathbf{I}^{(B)})}, \quad (3.2)$$

$$\mathbf{I}^{(i)}(x, y) = k \frac{\mathbf{I}^{(i)}(x, y) - \min(\mathbf{I}^{(i)})}{\max(\mathbf{I}^{(i)}) - \min(\mathbf{I}^{(i)})}, \quad (3.3)$$

com i o plano de cor ($i = \{R, G, B\}$), $k = 255$ o máximo valor admissível para cada plano de cor e $\mathbf{I}(x, y)$ o píxel (x, y) de \mathbf{I} .

O resultado de ambas as opções pode ser visto na figura 3.4.

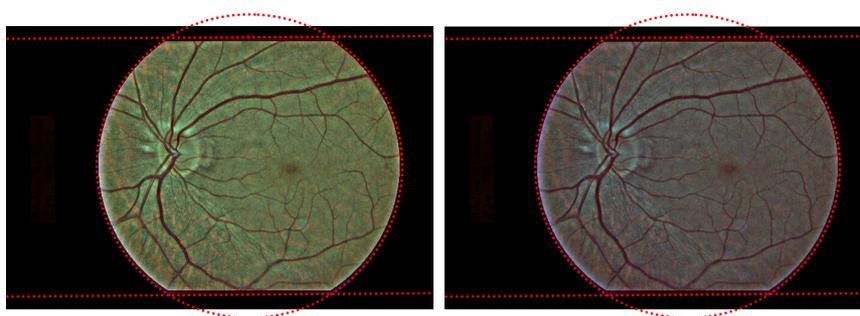


Figura 3.4: A melhoria relativamente à imagem 3.1 é notória, quer considerando todo o espaço de cor (à esquerda) quer considerando cada canal independentemente (à direita).

Resultados

A utilização de um sistema de marcação assistida em que o utilizador assinala a localização em cada imagem da presença de cada microaneurisma, associado à possibilidade de co-registo das respectivas imagem, permite efectuar o mapeamento de todas as marcações realizadas numa dada sequência de imagens numa única referência do fundo ocular e identificar em que visita um particular microaneurisma se encontrava presente, tal como mostrado na imagem da figura 3.5.

É assim possível a extracção de parâmetros adicionais tais como:

- Número por visita: a aproximação tradicional;
- Número acumulado: permite saber o números de microaneurismas já identificados para a retina em causa (ainda que possam não ser todos visíveis simultaneamente);

3.1 Fotografia do fundo ocular

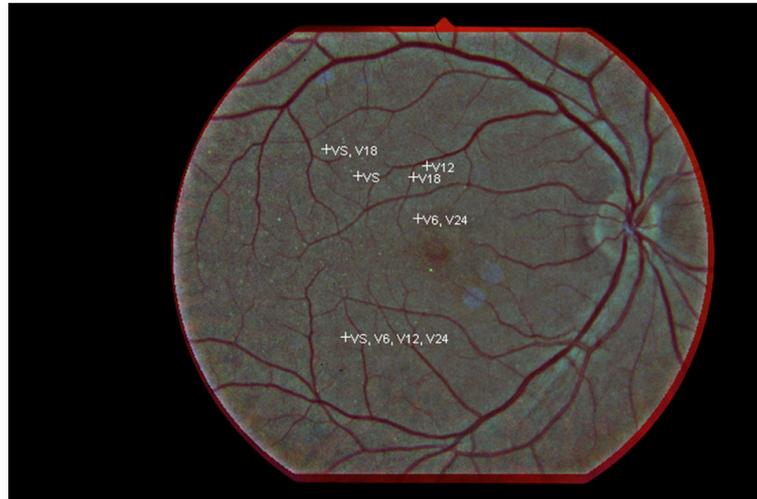


Figura 3.5: Nesta imagem são mostradas a projecção dos microaneurismas detectados numa sequência de imagens ao longo de 2 anos (a cada 6 meses), sendo a sequência identificada por VS, V6, V12, V18 e V24 (por esta ordem).

- Taxa de formação: o parâmetro que indica a progressão das alterações vasculares;
- Taxa de desaparecimento: considera os microaneurismas deixados de detectar a partir de determinada visita;
- Tempo de vida: o tempo entre a primeira e a última detecção de cada microaneurisma;
- Factor de qualidade: dado que um microaneurisma, uma vez existente, não desaparece mas apenas pode deixar de estar visível, este factor de qualidade considera o número de vezes que um particular microaneurisma deixou de estar temporariamente visível.

Num estudo piloto realizado recorrendo a este processo, em 33 olhos de 23 doentes com fotografias obtidas a cada 6 meses durante 2 anos, o número de microaneurismas segundo o processo tradicional variou entre os 103 em VS (visita inicial - de selecção) e os 102 em V24 (visita do mês 24), tendo sido obtida uma contagem de 95 microaneurismas em V12. Estes dados parecem estar de acordo com o esperado devido ao controlo metabólico dos doentes aqui considerados.

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

No entanto, considerando a localização de cada um dos microaneurismas individualmente, o número de microaneurismas passou dos iniciais 103 (VS) para 359 (V24), o que efectivamente indica uma clara progressão, ainda que não sejam todos visíveis em simultâneo. Considerando uma taxa de formação individual, por olho, obteve-se uma distribuição da taxa de formação com média \pm DP: $3,9 \pm 4,7$ microaneurismas/ano.

Estes números permitem retirar conclusões obviamente distintas das anteriormente possíveis, ao mesmo tempo que mostra que a indicação única do número total de microaneurismas mascara por completo a realidade de um processo dinâmico como este.

Um outro estudo ainda em curso e que utiliza este processo, permitiu já verificar a melhor correlação destes parâmetros com os restantes parâmetros sistémicos dos doentes envolvidos e é, inclusivamente, um factor importante na fenotipagem de doentes relativamente ao risco de rápida progressão das respectivas condições patológicas associadas à retinopatia diabética.

3.1.2 *RetMarker*

O conceito *RetMarker*

Para a compreensão da evolução das patologias da retina é de fundamental importância o registo das alterações que aí ocorrem, a forma como se relacionam e a forma como progridem, quer em termos de localização quer em termos de extensão. A importância destes dois factores, localização e extensão, pode ser claramente aferida pela definição de edema macular clinicamente significativo (EMCS) definido em [Gro85].

A mesma necessidade e o mesmo princípio também se aplicam se se falar da progressão dos resultados de um dado tratamento, em que naturalmente se espera observar uma diminuição das alterações do fundo ocular.

Colocado neste contexto e desta forma, é obviamente entendida qualquer das alterações mencionadas como alterações relativamente a um dado padrão de normalidade, padrão este que não é seguramente fácil de definir. No entanto, também resulta do exposto a importância de avaliar de forma diferencial as mudanças que ocorrem num dado intervalo de tempo, por comparação entre um dado estado inicial e um estado num tempo distinto deste.

Assim sendo, o significado de alteração é agora o de comparação não com um padrão normal mas sim com um estado inicial, quer este seja considerado normal ou patológico.

Se o estado inicial for o padrão normal, significa que quaisquer alterações serão eventualmente indicadoras de uma acção patológica. No caso do estado inicial conter já alterações relativamente a um padrão normal, então as diferenças detectadas poderão ser quer devidas a uma progressão da patologia quer devidas a uma regressão da mesma, não sendo as diferenças detectadas por si só indicadoras do sentido da alteração.

A avaliação de sequências temporais de imagens do fundo ocular, com especial incidência na fotografia, é assim uma técnica de diagnóstico muito difundida para a análise de alterações visíveis no fundo ocular. Lesões como hemorragias, exudados e outras, e a respectiva progressão ao longo do tempo, são importantes indicadores de doenças sistémicas tais como a diabetes ou a hipertensão [EHL⁺00].

De modo a facilitar o processo de análise de sequências temporais, mas não

a substituir a análise feita por alguém com treino específico para tal, desenvolveu-se o processo descrito nesta secção, o *RetMarker*, cujo conceito é o de assinalar de modo automático as alterações verificadas numa sequência de retinografias, indicando ao processo aquela que deve ser considerada a imagem base. A imagem base estabelece por isso o padrão para uma dada sequência, sendo todas as restantes imagens comparadas com esta.

O co-registo de imagem como suporte ao conceito

Um aspecto fundamental para a comparação entre imagens, é que as mesmas se encontrem num referencial único, i.e. que cada píxel de cada imagem corresponda à mesma localização do fundo ocular, o que significa que as mesmas terão de ser previamente co-registadas entre si.

O co-registo de imagem aqui utilizado é do tipo projectivo e encontra-se desenvolvido na secção 3.1.3 (página 58).

Sendo as imagens aqui consideradas imagens *RGB*, interessa definir o modo de obtenção da imagem referência do fundo ocular a utilizar no processo de co-registo.

As imagens disponíveis, que correspondem à realidade de um centro com uma vasta colecção obtida ao longo de anos de acompanhamento de doentes com as patologias alvo no desenvolvimento deste trabalho, foram obtidas por uma câmara *Zeiss* (*Carl Zeiss, Jena, Alemanha*), modelo *FF450*, e são caracterizadas por terem sido adquiridas por um detector *3CCD*, com um ângulo de 50° e com uma resolução de 768×576 píxeis.

Uma imagem típica pode ser vista na figura 3.6 na qual é notória a deficiente iluminação com a inerente dificuldade de análise.

Para a obtenção de uma imagem com vista ao seu co-registo com outras imagens do mesmo fundo ocular, é necessário efectuar um pré-processamento conducente à correcção da deficiente iluminação, bem como a conversão do espaço *RGB* para uma imagem monocromática.⁴

Deste modo, para a conversão da imagem no formato pretendido ao mesmo

⁴Todas as imagens monocromáticas aqui consideradas têm valores para os respectivos píxeis no intervalo $[0, 1]$.

3.1 Fotografia do fundo ocular

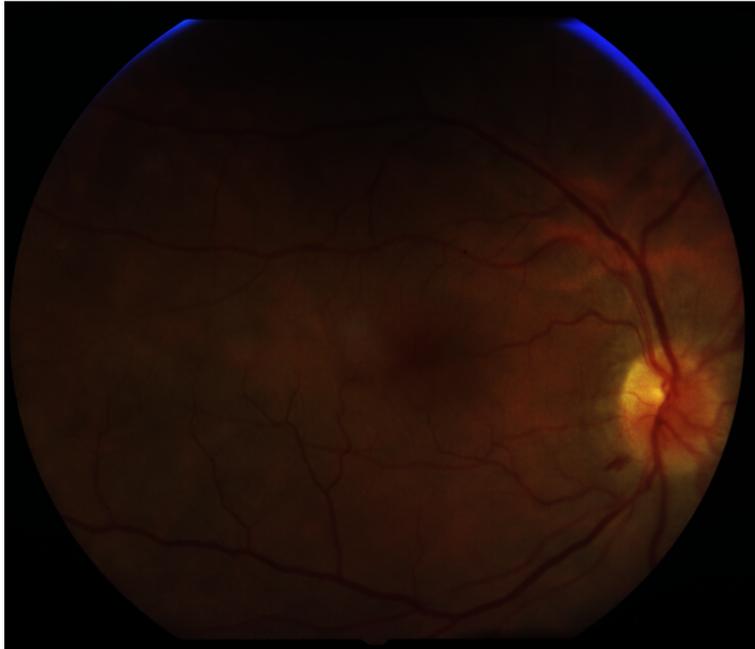


Figura 3.6: Retinografia onde é possível verificar uma deficiência de iluminação típica.

tempo que se procura obter o melhor contraste possível, é utilizada a análise de componentes principais (*PCA*) (ver Apêndice A) considerando cada um dos canais de cor como uma variável independente [PB99]. A imagem pretendida é aquela correspondente ao maior valor próprio, a qual é de seguida linearmente mapeada para o intervalo de valores definido para as imagens monocromáticas.

As imagens assim obtidas são analisadas com vista à detecção das respectivas características, e.g. rede vascular, de forma a permitir o seu co-registo com imagens do mesmo fundo ocular, o que se encontra detalhado na secção 3.1.3 (página 43).

Deteção e mapeamento das alterações do fundo ocular ao longo do tempo

Para a comparação de imagens, após o respectivo co-registo, deve considerar-se a necessidade de normalização para as condições de aquisição, sejam elas técnicas, e.g. nível de iluminação, quer sejam devidas a condições de aquisição imputáveis ao doente, e.g. catarata, dilatação ou outras.

Há por este motivo a necessidade de efectuar um pré-processamento de modo a normalizar as imagens a serem comparadas, tendo sido adoptado o processo desenvolvido em [FGR05]. As imagens assim obtidas, são ainda filtradas com um filtro passa-baixo de modo a atenuar efeitos devidos a erros de focagem e a erros de co-registo, os quais são tipicamente da ordem do píxel. Deste processo resulta uma imagem \mathbf{I} monocromática para cada imagem RGB de uma particular sequência em análise.

Considerando uma sequência de $N + 1$ imagens a analisar, imagens $\mathbf{I}^{(i)}$ ($i = \{1, \dots, N\}$) e $\mathbf{I}^{(0)}$ a imagem base com a qual toda a restante sequência é comparada, obtêm-se N imagens diferença calculadas como

$$i(x, y)_{dif}^{(i)} = \begin{cases} \log (|i(x, y)^{(i)} - i(x, y)^{(0)}|) & , \quad i(x, y)^{(i)} \neq i(x, y)^{(0)} \\ 0 & , \quad i(x, y)^{(i)} = i(x, y)^{(0)} \end{cases} \quad (3.4)$$

com $i(x, y)$ o píxel de coordenadas (x, y) da imagem \mathbf{I} . A utilização da função \log nesta expressão tem como objectivo a ampliação relativa de pequenas diferenças entre imagens e que por isso correspondem às de maior dificuldade de detecção.

O resultado da aplicação dos princípios acima expostos a uma sequência de duas imagens pode ser visto na figura 3.7.

De modo a capturar as alterações principais detectadas numa sequência, é possível considerar cada imagem diferença ($\mathbf{I}_{dif}^{(i)}$) como correspondendo a uma dada banda de uma imagem hiperespectral e deste modo aplicar de novo a análise de componentes principais para obter a melhor projecção do conjunto dessas diferenças.

Assim, à sequência $\mathbf{I}^{(0)}, \mathbf{I}^{(1)}, \mathbf{I}^{(2)}, \dots, \mathbf{I}^{(N)}$ correspondem as imagens diferença $\mathbf{I}_{dif}^{(1)}, \mathbf{I}_{dif}^{(2)}, \dots, \mathbf{I}_{dif}^{(N)}$ e a diferença resultante para a visita K , ($K = \{2, \dots, N\}$) é o resultado da análise PCA das imagens $\mathbf{I}_{dif}^{(1)}, \dots, \mathbf{I}_{dif}^{(K)}$ e não apenas $\mathbf{I}_{dif}^{(K)}$.

3.1 Fotografia do fundo ocular

O resultado deste processo é finalmente projectado na imagem base, podendo no entanto vê-lo em qualquer uma das restantes imagens. É ainda possível identificar a origem temporal de cada uma das alterações detectadas, o que é conseguido codificando cada uma das diferenças com uma cor específica. Assim, qualquer que sejam as sequências consideradas, as alterações de uma particular imagem, e.g. a terceira da sequência, serão assinaladas sempre com a cor correspondente (figura 3.8).

Deve ter-se a atenção ao facto de numa dada sequência poder detectar-se uma alteração relativamente à condição inicial, alteração essa que poderá, ainda na mesma sequência, regredir para a condição inicial. Considerou-se que esta era uma informação com relevância clínica pelo que foi atribuída uma cor específica para esse fim.

Assim, um local assinalado a branco no resultado de uma dada sequência, significa que nessa sequência e para esse local foi detectada uma alteração relativamente à condição inicial da retina, mas também que no final da sequência essa área retornou à condição inicial.

Resultados

Os resultados obtidos pelo processo desenvolvido com base no conceito *RetMarker*, podem ser vistos nas figuras 3.9 e 3.10, respectivamente para um voluntário saudável e para um doente com retinopatia diabética e edema macular clinicamente significativo e balizam por isso as condições de funcionamento deste processo.

A codificação das alterações segundo uma escala de cores, permite conhecer a sequência das alterações e deste modo a progressão ou regressão ao estado inicial correspondente à imagem escolhida como base.

Foi ainda definido, como regra a aplicar nesta codificação, manter-se a mesma cor se uma alteração permanecer ao longo de várias imagens da sequência, deste modo indicando claramente a localização temporal onde a alteração foi pela primeira vez detectada.

Os resultados mostrados e os testes efectuados demonstraram a utilidade desta técnica e a validade do conceito. É óbvio o ganho de informação obtido pela análise da sequência mostrada para o olho do indivíduo diabético, com a

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

profusão das alterações verificadas ao longo do tempo, as quais não resultam imediatas pela observação da imagem. A utilidade deste processo prende-se no entanto com o direccionar da atenção do responsável pela análise da imagem do fundo ocular para os locais onde essas alterações estão presentes, segundo a importância relativa da alteração para toda a sequência, cabendo-lhe a tarefa de decidir se essas são ou não alterações significativas ou mesmo se resultam de artefactos nas imagens, e.g. sujidade nas lentes da câmara.

O processo aqui reportado encontra-se em fase de avaliação pela *Carl Zeiss, Jena*, Alemanha, para eventual inclusão no *software* fornecido por este fabricante.

3.1 Fotografia do fundo ocular

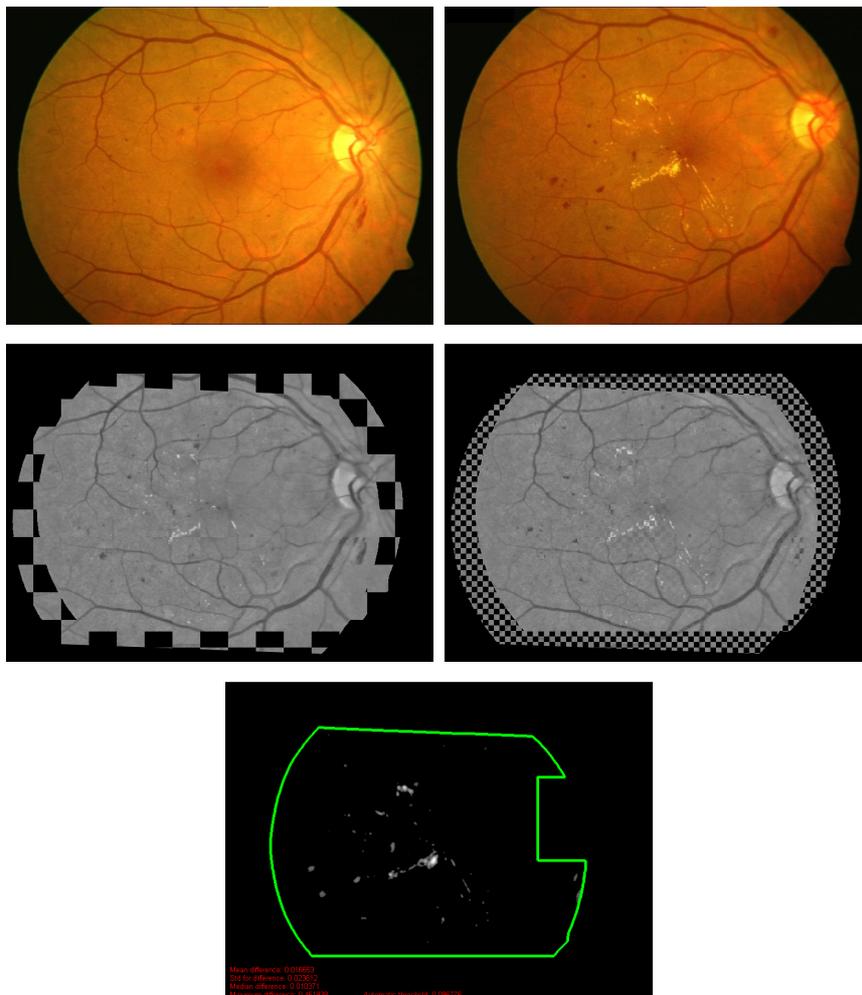


Figura 3.7: Na linha superior encontram-se as imagens a comparar. O resultado do co-registo pode ser observado na linha central no formato *tabuleiro de xadrez* e a diferença pode ser observada na linha inferior. O traço a verde demarca a área comum resultante do pré-processamento e do co-registo e define onde vão ser determinadas as alterações. A área do disco óptico é também removida da área de comparação. Todo este processo é automático.

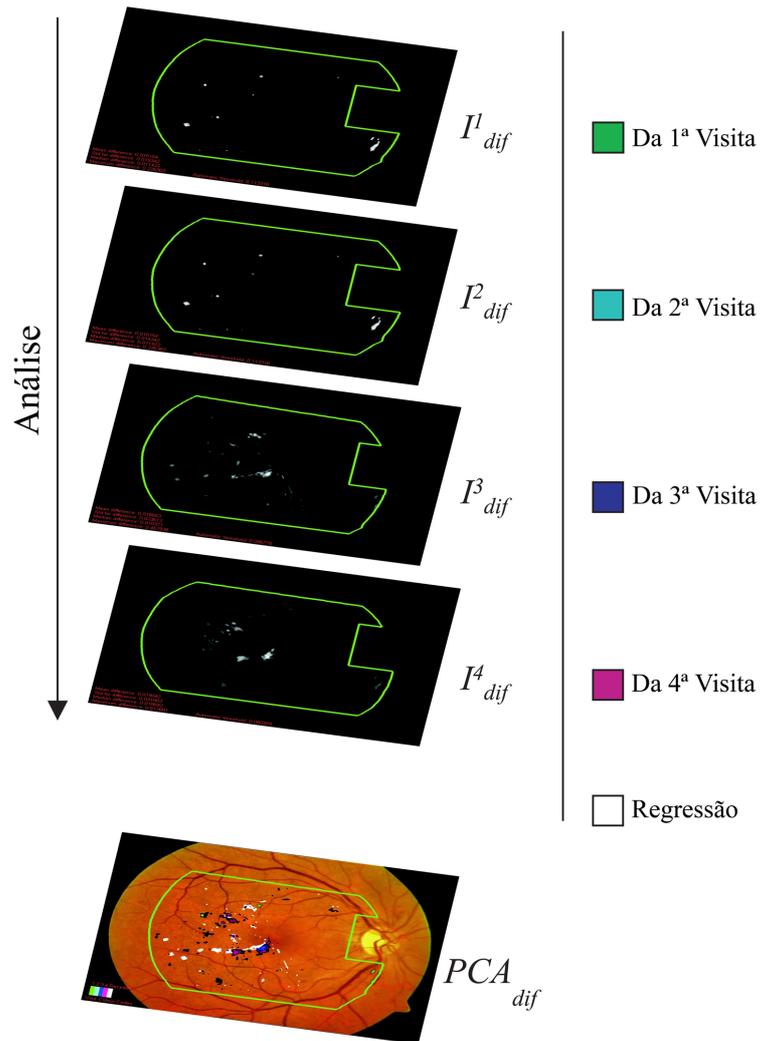


Figura 3.8: Projecção de diferenças de uma sequência de 5 imagens na retinografia inicial.

3.1 Fotografia do fundo ocular

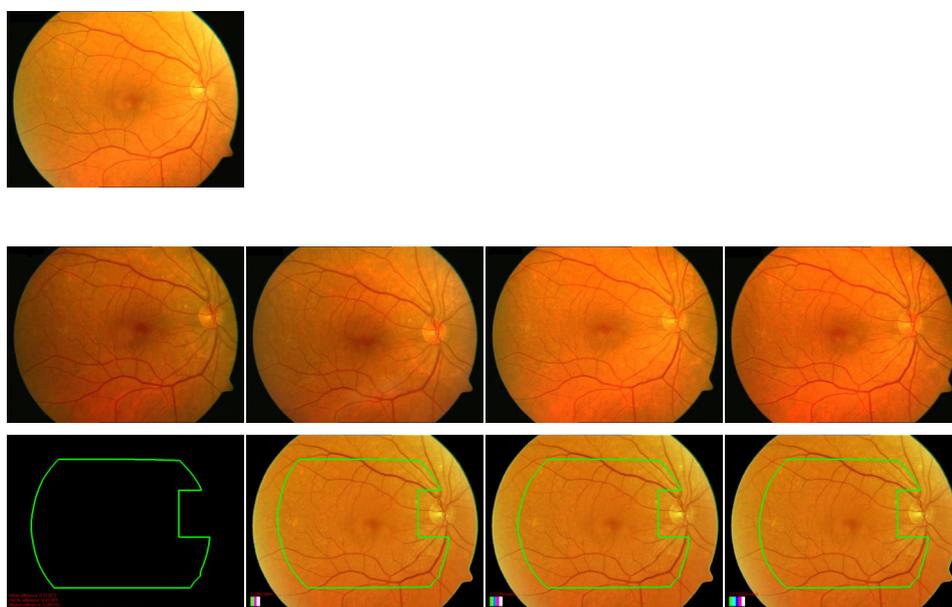


Figura 3.9: Caso de um indivíduo saudável. A imagem base é mostrada na linha superior e as imagens correspondentes à sequência na linha central, da esquerda para a direita. Na linha inferior é mostrada a primeira imagem diferença (à esquerda) e das diferenças sucessivas projectadas na imagem base, seguindo a mesma sequência temporal. Não foi detectada qualquer alteração.

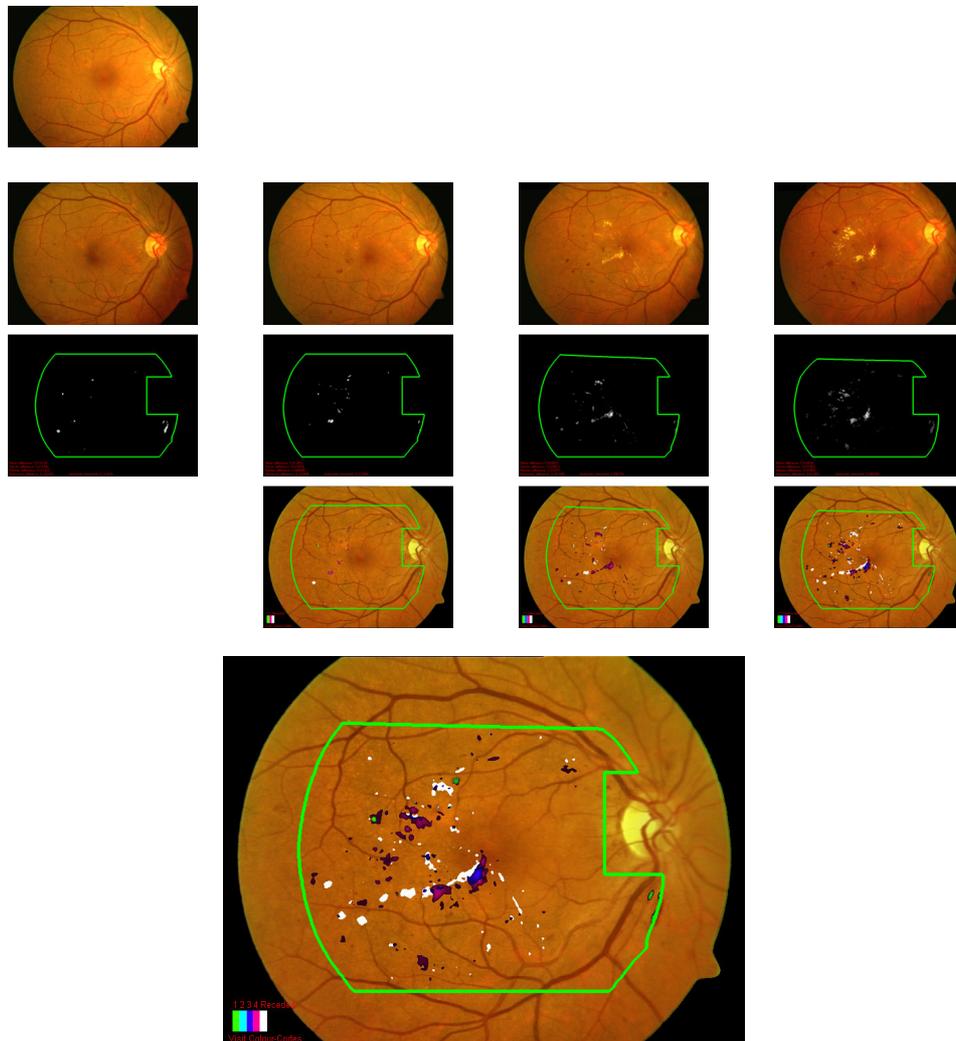


Figura 3.10: O *RetMarker* num olho com RD e EMCS. No canto superior esquerdo é mostrada a imagem base da sequência e na linha 2 a sequência temporal das imagens do fundo ocular (da esquerda para a direita). As imagens diferença correspondentes são mostradas na linha 3. As projecções das *PCAs* resultantes encontram-se mapeadas para a imagem base (linha 4). Em destaque o resultado global da sequência. Cada diferença está codificada de acordo com o instante em que pela primeira vez foi detectada (código de cores no canto inferior esquerdo). A branco mostram-se áreas e que retornaram à condição inicial.

3.1.3 Co-registo de fotografias do fundo ocular

Os processos necessários ao co-registo de imagem, no contexto do trabalho aqui desenvolvido, têm como requisito a sua aplicabilidade a uma percentagem significativa de imagens de modo a poder ser considerada a sua aplicação a uma prática diária, quer seja num ambiente de investigação quer seja num ambiente de prática clínica.

Embora o co-registo de imagem seja uma área de grande actividade científica e de desenvolvimentos frequentes, deve notar-se que esses mesmos desenvolvimentos são maioritariamente realizados para áreas de aplicação específicas e cuja transposição para a área da imagem em oftalmologia, sujeita às mais diversas situações clínicas e de aquisição de imagem [CST⁺99], não garante a respectiva aplicabilidade, razão pela qual este é um problema recorrente.

Perante estes factos, os processos aqui aplicados seguem uma abordagem específica e que nos dão mais garantias de aplicabilidade a um número significativo de imagens.

O processo de co-registo tratado nesta secção visa o co-registo de imagens retinográficas, centradas na fóvea e com um ângulo de aquisição de pelo menos 40°. Este processo desenvolve-se em várias fases sendo obtido um co-registo rígido que servirá de aproximação inicial ao co-registo projectivo, pretendido pelas razões anteriormente apresentadas (secção 3.1.1, página 25).

Os processos de co-registo aqui descritos são definidos para imagens monocromáticas, o que implica a conversão de imagens com informação cromática em imagens monocromáticas. Esta operação é obtida com recurso à análise de componentes principais (*PCA*) considerando cada plano de cor (em imagens *RGB*) como uma variável independente (ver Apêndice A).

O primeiro passo com vista ao co-registo de imagens do fundo ocular é dado com a detecção das estruturas principais da retina humana aí detectáveis, a fóvea, o disco óptico e a rede vascular, as quais são tratadas nos parágrafos seguintes.

Detecção da fóvea

A estimação da localização da fóvea numa imagem da retina humana foi já abordada por diversos autores em diversos trabalhos, tais como [PBDK98,

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

SBCW99, IS99, LC03, FGP⁺07, NICR⁺07, DAUC07], fazendo uso de diversas técnicas e suposições.

Em [PBDK98], o centro da fóvea foi estimado segmentando primeiro os pixels de menor valor da imagem e determinando, de seguida, o centro de massa da região obtida. Este processo foi adoptado em [NICR⁺07] e um processo semelhante foi utilizado em [DAUC07].

A utilização de um modelo Gaussiano foi usado em [SBCW99] escolhendo um tamanho para o modelo e respectivo desvio padrão apropriado às imagens a processar, em função da resolução de imagem e ângulo de aquisição utilizado.

Uma aproximação distinta foi seguida em [IS99] com a utilização de um modelo estatístico de Bayes.

A partir da segmentação da rede vascular e do melhor ajuste de uma parábola às arcadas temporais principais, em [LC03] estima-se a localização da fóvea como a área de menor intensidade média, e de tamanho apropriado, encontrada ao longo do eixo principal da parábola. Um processo análogo é também seguido em [FGP⁺07].

O processo adoptado no presente trabalho segue o modelo proposto em [SBCW99]. Assim, a detecção da fóvea baseia-se na propriedade da mesma se apresentar numa retinografia como uma área de menor intensidade relativamente à área envolvente, podendo ser modelada por uma Gaussiana invertida cuja expressão é

$$g(x, y) = k \left[1 - \frac{1}{2} e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} \right], \quad (3.5)$$

com (x, y) as coordenadas relativamente ao centro da fóvea/Gaussiana e σ feito igual a metade do diâmetro do disco óptico para cada par resolução de imagem/ângulo de aquisição. $k \in \mathbb{R}^+$ e foi considerado como unitário, o que não influencia o resultado obtido.

A determinação da localização da fóvea numa retinografia é deste modo estimada determinando o coeficiente de correlação de Pearson (3.6) entre blocos de imagem (\mathbf{W}) a processar e o modelo (3.5) (\mathbf{G}). Para cada bloco \mathbf{W}_i , resulta um valor (r_i) no intervalo $[-1, 1]$, com 0 a ausência de correlação, e -1 e 1 a melhor correlação inversa e a melhor correlação directa, respectivamente. Ao bloco a que corresponde o melhor coeficiente da correlação de Pearson ($\max(r_i)$) é aquele considerado representar a fóvea na imagem e cuja localização do

3.1 Fotografia do fundo ocular

respectivo centro corresponde à localização do centro da fóvea.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N w_i g_i - \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N w_i \sum_{i=1}^N g_i}{\sqrt{\left(\sum_{i=1}^N w_i^2 - \frac{1}{N} \left(\sum_{i=1}^N w_i\right)^2\right) \left(\sum_{i=1}^N g_i^2 - \frac{1}{N} \left(\sum_{i=1}^N g_i\right)^2\right)}}, \quad (3.6)$$

com w e g os vectores obtidos pela concatenação das colunas da matriz correspondentes à área (\mathbf{W}_i) da imagem a analisar e da matriz que representa o modelo da fóvea (\mathbf{G}), respectivamente.

Os resultados obtidos com este processo podem ser vistos na tabela 3.1 para um conjunto de imagens de teste representativas das condições de utilização do método.

Detecção do disco óptico

À semelhança da detecção da fóvea, também a detecção do disco óptico tem sido alvo de diversas abordagens. Com excepção de [IS99], todos os restantes trabalhos mencionados na detecção da fóvea abordam a questão da detecção do disco óptico [PBDK98, SBCW99, LC03, FGP⁺07, NICR⁺07, DAUC07]. Também em [LHS⁺04] e [FGR04] são propostas soluções para este problema.

Em [PBDK98], a detecção é realizada pelo ajuste de um círculo às arestas do contorno do disco óptico através da utilização da *Transformada de Hough*. As arestas são determinadas apenas em localizações pré-definidas da imagem, em função desta corresponder à imagem de um olho esquerdo ou direito, respectivamente o terço esquerdo e o terço direito da imagem, considerando que a mesma é centrada na área macular. Isto equivale à utilização de um mapa da função densidade de probabilidade para a localização do disco óptico para cada píxel da imagem, embora neste caso sejam consideradas áreas com função densidade de probabilidade homogénea. É referido ainda neste trabalho, que embora o disco óptico não seja circular, o ajuste de um círculo se faz para evitar a utilização de contornos activos (*Snakes*).

Em [SBCW99], a localização do disco óptico é estimada pela determinação da área da imagem com maior variância local, a qual se deve a este ser o ponto

de entrada/saída dos vasos que irrigam a retina e que são responsáveis pelas elevadas variações de intensidade aí verificadas.

Uma aproximação radicalmente distinta é seguida em [LC03] com a utilização da análise de componentes principais. A abordagem efectuada é realizada em dois passos, sendo que o primeiro elege regiões candidatas a partir do nível de intensidade da imagem. Assim, a áreas com elevadas intensidades médias é aplicada a detecção baseada em *PCAs*.

A partir da utilização de um conjunto de imagens de treino (*training set*), foram determinados os respectivos *eigendisks* e mantidos aqueles que na sua totalidade representam 90% de toda a variância do conjunto de treino. Posteriormente, para cada píxel candidato a centro do disco óptico na imagem em análise é obtida uma sub-imagem \mathbf{W} . A localização do disco óptico na imagem é definida pela localização de \mathbf{W} para a qual é obtida a menor distância Euclidiana entre \mathbf{W} e a sua representação no espaço *PCA*.

Um processo que emprega modelos apropriados, seguido de uma segmentação com recurso a contornos activos, é proposto em [LHS⁺04]. É inicialmente utilizado um modelo que consiste no Laplaciano de uma Gaussiana, ao qual é removida uma área vertical, que atravessa o centro do modelo, de modo a evitar tomar em consideração a habitual presença de grandes vasos nesta localização (embora exista uma grande variedade de morfologias). É determinada a melhor localização deste modelo na imagem, com recurso ao coeficiente de correlação de Pearson. Tal como em [LC03], também aqui são utilizados contornos activos para estimar o contorno do disco óptico em torno da posição anteriormente determinada.

Deve aqui mencionar-se o trabalho [FGR04], o qual propõe um método baseado na direccionalidade da rede vascular de modo a permitir estimar a localização de discos ópticos, mesmo que não visíveis por se encontrarem fora da área da imagem.

Finalmente, enquanto em [NICR⁺07] se faz uso de uma conjugação de processos, em [DAUC07] é feita a detecção de uma área circular de maior intensidade média para toda a imagem.

Com a aproximação proposta em [SBCW99], foi possível detectar 85% do discos ópticos nas imagens de teste já utilizadas para a detecção da fóvea.

Por esse motivo, foi efectuada uma outra abordagem no presente trabalho,

3.1 Fotografia do fundo ocular

a qual consiste na obtenção de uma versão filtrada da imagem a processar com recursos a filtros morfológicos. O operador empregue, o operador de *fecho*, que consiste na operação de *dilatação* seguida da operação *erosão*, permite minimizar a influência da presença dos vasos na área do disco óptico.⁵ Após esta operação, é obtida a correlação-cruzada da imagem filtrada com uma função Gaussiana.

À localização correspondente ao maior valor da correlação-cruzada, é atribuída a propriedade de este ponto pertencer ao interior do disco óptico, mas não necessariamente representar o seu centro.

A partir deste ponto, são construídos perfis de intensidade da imagem filtrada em múltiplas direcções radiais, os quais são filtrados e segmentados com recurso à técnica *mean shift analysis* proposta em [TCW01]. Com este processo, são assim determinados um conjunto de pontos que estabelecem os limites do disco óptico. Este pontos permitem a determinação da elipse que melhor se lhes ajusta e estimar assim a localização do centro do disco óptico como sendo o ponto correspondente ao centro da elipse.

Os resultados obtidos podem ser encontrados na tabela 3.1 e corresponde à passagem de um nível de detecção de 85%, com o processo proposto em [SBCW99], para 100% com a abordagem aqui proposta, para o mesmo conjunto de imagens de teste.

Na figura 3.11 é mostrado o resultado das detecções mencionadas, incluindo o resultado do processo baseado na variância.

Tabela 3.1: Desempenho na detecção da fóvea e do disco óptico num conjunto de teste de 20 imagens.

Algoritmo	Taxa de Sucesso	Tempo de processamento
Detecção da fóvea	100%	4,0 s
Detecção do disco óptico		
Variância	85%	7,5 s
Correlação	100%	17,0 s

Em posse da estimativa destas duas localizações do fundo ocular (fóvea e disco óptico), seria já possível estimar uma transformação que mapeia uma das

⁵As operações morfológicas aqui tratadas e aplicadas a imagens não binárias, correspondem à aplicação do máximo/mínimo da área do *kernel*, respectivamente para a operação de dilatação/erosão, ao pixel onde o mesmo está a ser aplicado.

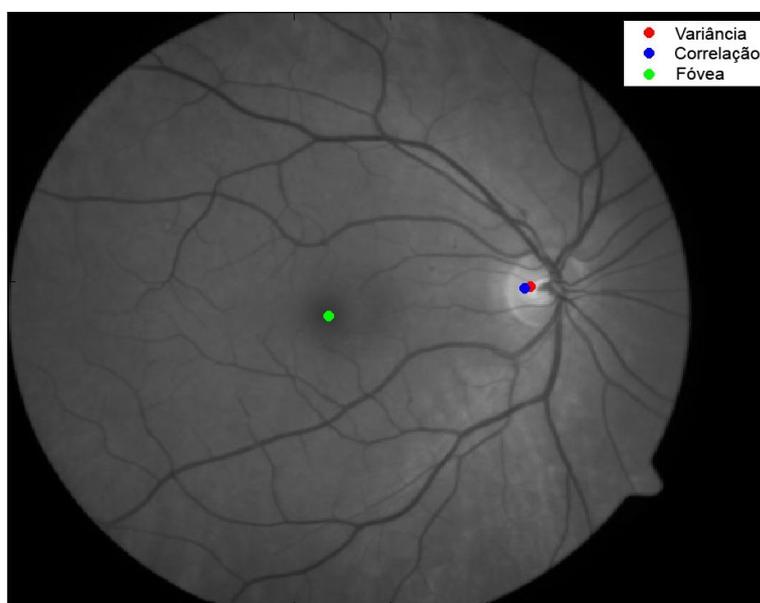


Figura 3.11: Detecção da fóvea e disco óptico.

imagens para o espaço imagem da outra, considerando um factor de escala e uma transformação rígida, sendo o factor de escala dado pelo quociente entre as distâncias medidas entre a fóvea e o disco óptico para cada imagem, o ângulo de rotação dado pelo ângulo formado pelo segmentos de recta fóvea-disco óptico e a translação pela diferença entre as coordenadas da fóvea ou do disco óptico em cada imagem.

Deve no entanto notar-se que a detecção da fóvea ou do disco óptico não dão garantias de reprodutibilidade para a mesma localização anatômica, especialmente se se verificar uma alteração do objecto imagem (a retina) devido a uma qualquer condição patológica ou de aquisição de imagem.

Foi por esse motivo foi desenvolvido um novo processo com vista à obtenção deste co-registo, o que de resto veio a ter uma aplicação no co-registo multimodal, como se verá noutro capítulo, sendo necessário para tal proceder à segmentação da rede vascular.

Detecção da rede vascular

A detecção da rede vascular foi inicialmente obtida com recurso a ferramentas baseadas na geometria diferencial, considerando uma imagem como uma superfície, e cujo método empregue seguiu o utilizado em [Ste96].

Uma imagem pode assim ser considerada como uma função $z(x, y)$ e os vasos da retina como os cumes ou os vales desta superfície, dependendo da modalidade de imagem em causa. No presente caso, retinografias, os vasos são representados pelos vales, já que estes se apresentam com um nível de sinal inferior ao do tecido circundante.

A superfície pode ser localmente aproximada por um polinómio de Taylor de segunda ou terceira ordem e uma localização (píxel) à qual corresponde uma derivada direccional elevada (derivada direccional de segunda ordem) é considerada como fazendo parte de um vaso.

A orientação local de um vaso pode ser determinada pelos *valores próprios* da matriz Hessiana (3.7), a qual é obtida a partir das derivadas parciais locais, z_{xx} , z_{yy} e z_{xy} .

$$H(x_0, y_0) = \begin{bmatrix} z_{xx}(x_0, y_0) & z_{xy}(x_0, y_0) \\ z_{xy}(x_0, y_0) & z_{yy}(x_0, y_0) \end{bmatrix}. \quad (3.7)$$

As derivadas locais mencionadas podem por sua vez ser obtidas com recurso à convolução da imagem com filtros apropriados, e.g.

$$F_x = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad F_y = \begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}. \quad (3.8)$$

Sendo $\mathbf{n} = [n_x, n_y]^T$ o *vector próprio* associado ao *valor próprio* de maior valor absoluto (com $\|\mathbf{n}\| = 1$) de $H(x, y)$ (3.7), um ponto $p = (x_0, y_0)$ pertence ao centro do vaso se se verificar a condição

$$\nabla I(x_0, y_0) \cdot \mathbf{n} = 0. \quad (3.9)$$

No entanto, dada a natureza discreta das imagens, a condição definida por (3.9) é verificada apenas para um número diminuto de pontos, razão pela qual se faz uso da abordagem seguida em [MAMD04] considerando

$$\nabla I(x_0 + \Delta x, y_0 + \Delta y) \cdot \mathbf{n} = 0, \quad (3.10)$$

com $\Delta x, \Delta y \in [-0, 5, 0, 5]$.

Escrevendo

$$(\Delta x, \Delta y) = (t n_x, t n_t), t \in \mathbb{R}, \quad (3.11)$$

define-se

$$t = -\frac{n_x z_x(x_0, y_0) + n_y z_y(x_0, y_0)}{n_x^2 z_{xx}(x_0, y_0) + 2 n_x n_y z_{xy}(x_0, y_0) + n_y^2 z_{yy}(x_0, y_0)}. \quad (3.12)$$

Se as equações 3.11 e 3.12 combinadas verificarem a equação 3.10, então o píxel de coordenadas (x_0, y_0) é considerado como pertencendo ao centro do vaso.

A detecção dos píxeis que definem o centro dos vasos da imagem produz, naturalmente, uma série de artefactos, os quais podem ser eliminados com recurso a filtros morfológicos.

Este método não é, contudo, suficientemente robusto para a aplicação em causa, nem fornece a segmentação da rede vascular necessária quando se considera uma área de 20° centrada na fóvea, o que irá ser necessário para alguns do co-registos a efectuar mais à frente neste trabalho, razão pela qual foram procuradas alternativas disponíveis na literatura.

Em [BCT⁺98], é seguido um processo de filtragem passa-baixo da imagem após o qual é aplicado um filtro de mínimo, método que não permite obter a segmentação com a exactidão aqui requerida.

O algoritmo proposto em [HKG00] fornece melhores resultados seguindo um processo de classificação, mas requer o ajuste de um total de 5 parâmetros para estabelecer vários limiares para um píxel ser considerado como fazendo parte de um vaso, o que, dada a variabilidade pretendida nesta aplicação, não se revela a melhor opção.

Um processo com recurso a um limiar adaptativo é proposto em [JM03]. Os resultados demonstrados não são no entanto apropriados à necessidade da obtenção da segmentação da rede vascular na área central, uma vez que a segmentação de vasos de menor calibre se traduz na adição de ruído à

3.1 Fotografia do fundo ocular

segmentação dos vasos de maior calibre, o que é demonstrado no trabalho referenciado.

Também os processos referidos em [SL03], capítulos 5 e 6, não fornecem a segmentação necessária da rede vascular para a área de interesse, que, como já referido, irá ser necessário para o co-registo de modalidades baseadas em OCVL.

A detecção da rede vascular proposta em [MC06], usa a detecção do centro dos vasos como ponto de partida, sendo esta detecção baseada num trabalho anterior dos mesmos autores o qual faz uso, por sua vez, de operadores diferenciais direccionais, tal como a aproximação inicial aqui utilizada e descrita no início desta secção.

De todas as aproximações, a proposta em [DV05] é aquela que melhores resultados fornece, quer em termos qualitativos quer na quantidade de rede vascular capaz de segmentar na área central da retina, e é, por conseguinte, o processo utilizado no decurso deste trabalho.

A transformada de imagem (*Transformada de Contourlet*) proposta em [DV05], permite obter a representação de uma imagem, em múltiplas escalas e múltiplas direcções, com recurso a estruturas alongadas, as quais permitem uma melhor representação de estruturas presentes em imagens de cenas naturais, tais como os vasos presentes em imagens da retina, em que pontos de descontinuidade (arestas) se encontram ao longo de curvas suaves que representam os limites de objectos físicos.

O processo consiste assim na aplicação de uma transformada para a obtenção de pontos aresta, transformada semelhante à *Transformada de Wavelet*, após a qual se aplica uma transformada direccionais para a detecção do segmento do contorno do qual os pontos aresta fazem parte.

No trabalho referenciado, os autores propõem um banco de filtros o qual utiliza a Pirâmide Laplaciana para a determinação dos pontos de descontinuidade, seguido da aplicação de um banco de filtros direccionais que estabelece a ligação entre os pontos de descontinuidade detectados. A *Transformada de Contourlet* faz, deste modo, uso de estruturas alongadas em várias escalas, direcções e com vários rácios entre o comprimento e a largura das mesmas.

A aplicação do operador morfológico esqueletização (*thinning*) à imagem binária resultante da segmentação da rede vascular, permite obter uma imagem binária que representa o centro dos vasos detectados, imagem binária que será

utilizada no processo de co-registo projectivo.

O co-registo rígido

Com os processos acima descritos, estamos agora em posse da localização de dois pontos característicos importantes da retina humana, a fóvea e o disco óptico, bem como da rede vascular, para cada imagem a co-registar. A rotação entre imagens é assim passível de ser estimada obtendo a representação da rede vascular em coordenadas polares e determinando aí a respectiva translação.

Como origem do sistema de coordenadas polares para cada imagem vai ser utilizada a localização estimada para a fóvea, por motivos que serão abordados aquando do co-registo multimodal.

As redes vasculares de duas retinografias a co-registar encontram-se representadas na figura 3.12, em coordenadas cartesianas, e na figura 3.13, em coordenadas polares, sendo as mesmas mostradas com cores distintas.

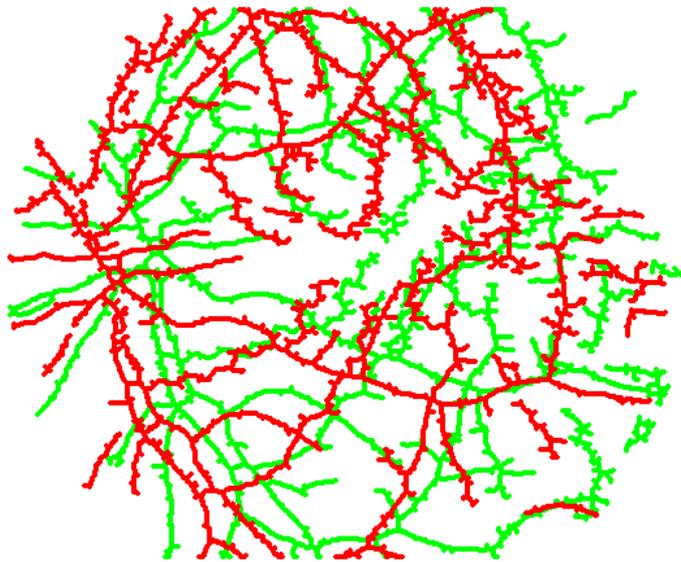


Figura 3.12: Redes vasculares de duas retinografias a co-registar. As cores indicam os pontos da rede vascular de uma e de outra imagem.

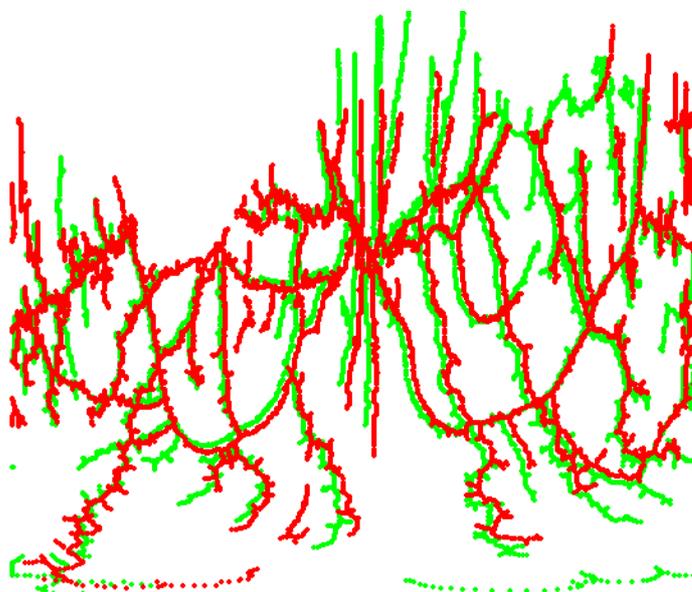


Figura 3.13: Redes vasculares em coordenadas polares. As cores indicam os pontos da rede vascular de uma e de outra imagem.

A rotação, em coordenadas cartesianas, é obtida estimando a translação em coordenadas polares, tal como acima referido, a qual pode ser determinada por um processo de correlação-cruzada. No entanto, foi aqui utilizado um processo de correlação de fase [PHGK77, WBB89] por questões de robustez, o qual será utilizado e detalhado na compensação do movimentos oculares (secção 3.2.1, página 72).

O resultado deste processo, já em coordenadas cartesianas, pode ser visto na figura 3.14 e o respectivo co-registo na figura 3.15.

Um aspecto que resulta óbvio de todo este processo, prende-se com a elevadíssima dependência da determinação das referências para o sistema de coordenadas polares, i.e. a determinação da localização da fóvea em cada imagem. No entanto, a questão não se coloca na exactidão das referências, mas antes na diferenças entre as localizações determinadas relativamente ao fundo ocular. Isto significa que uma determinação incorrecta da localização da fóvea, desde que consistente entre imagens, não tem quaisquer consequências para o processo. Ao invés, a falta de consistência desta determinação poderá ter efeitos

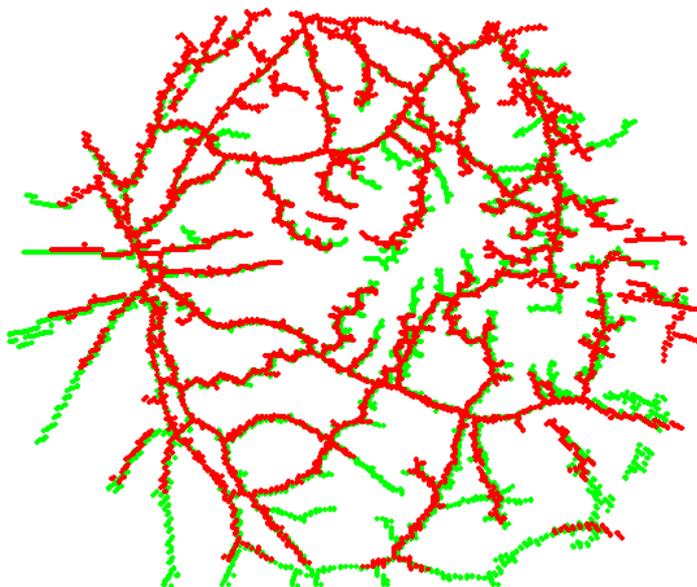


Figura 3.14: Redes vasculares após co-registo rígido. As cores indicam os pontos da rede vascular de uma e de outra imagem.

muito nefastos, no que diz respeito ao co-registo a obter.

Este problema conduz-nos à questão de saber se é possível determinar o deslocamento relativo entre as referências obtidas, independentemente de representarem ou não a localização da fóvea.

A conversão de coordenadas cartesianas para coordenadas polares, de pontos sintéticos, a partir de dois referenciais distintos, simula a determinação de duas localizações distintas para a fóvea num mesmo fundo ocular. A figura 3.16 mostra um conjunto de pontos que formam um círculo em torno de um determinado ponto p , bem como um segundo conjunto de pontos ao longo de um segmento de recta com orientação radial relativamente ao mesmo ponto. Ambos os conjuntos de pontos foram representados no espaço de coordenadas polares quer relativamente a p quer relativamente a p' . Na imagem correspondente ao sistema de coordenadas polares é visível que cada ponto tem uma representação distinta se visto a partir de p ou p' , o que implica uma distorção na representação dos mesmos pontos objecto, distorção essa que aumenta com a diminuição da distância dos mesmos à origem dos eixos (em coordenadas polares).

3.1 Fotografia do fundo ocular

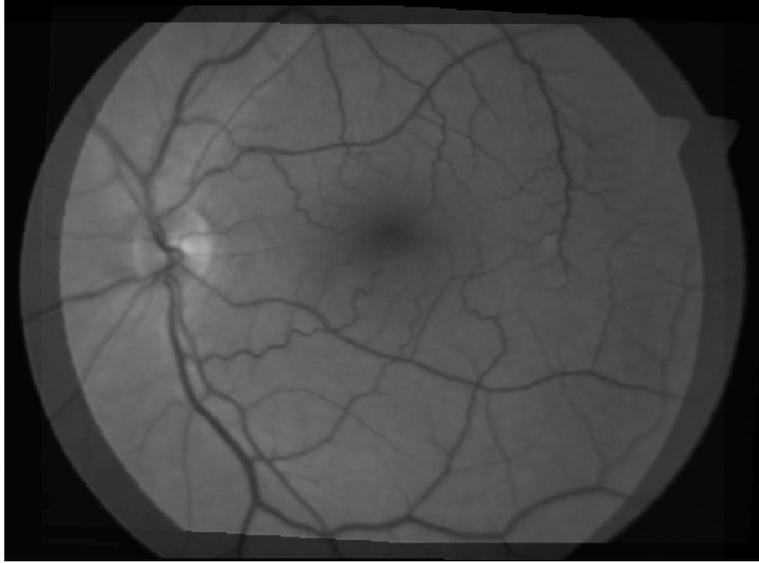


Figura 3.15: Resultado do co-registo rígido de duas retinografias mostradas em transparência e com a informação monocromática utilizada para o registo.

Como se pode ver no esquema representado na figura 3.17, o ponto assinalado no círculo mostrado terá uma representação (ρ_1, α_1) ou (ρ_2, α_2) se colocado em coordenadas polares a partir de p ou de p' . Pretende assim determinar-se o vector $\mathbf{v}_C = [\rho_C, \alpha_C]^T$, o qual nos indica o deslocamento relativo entre os referenciais utilizados para a conversão de coordenadas cartesianas para coordenada polares de um mesmo ponto.

Do esquema mostrado, vem:

$$\begin{aligned} \mathbf{v}_2 &= \mathbf{v}_1 - \mathbf{v}_c \\ &= [\rho_1 \cos(\alpha_1), \rho_1 \text{sen}(\alpha_1)]^T - [\rho_C \cos(\alpha_C), \rho_C \text{sen}(\alpha_C)]^T \quad (3.13) \\ &= [\rho_1 \cos(\alpha_1) - \rho_C \cos(\alpha_C), \rho_1 \text{sen}(\alpha_1) - \rho_C \text{sen}(\alpha_C)]^T \end{aligned}$$

Determinando $\|\mathbf{v}_2\|$, obtemos

$$\rho_2 = \sqrt{\rho_1^2 + \rho_C^2 - 2\rho_1\rho_C \cos(\alpha_1 - \alpha_C)}. \quad (3.14)$$

Efectuando a transposição para o co-registo de retinografias, para a determinação de ρ_C e α_C vão considerar-se as imagens binárias que resultam da

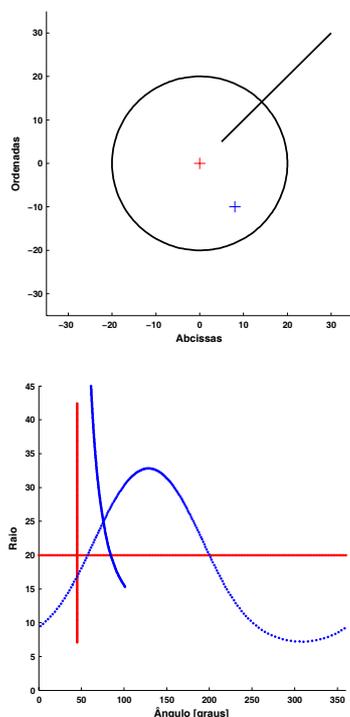


Figura 3.16: Na imagem superior, são mostrados dois objectos em coordenadas cartesianas, bem como duas origens para a representação dos mesmos em coordenadas polares, assinaladas a vermelho e a azul. Na imagem inferior, é visível a diferenças entre a representação dos mesmo objectos considerando duas origens do sistema de coordenadas polares distintas. As cores indicam a origem escolhida para o sistema de coordenadas polares na imagem superior.

representação da rede vascular em coordenadas polares. Estas imagens têm dimensões $M \times 360$, com M o valor máximo de ρ e 360 a discriminação do ângulo (representando $\alpha \in [0, 2\pi[rad$).

Para cada uma das imagens obtemos assim uma imagem binária, I_p e $I_{p'}$, que representa a respectiva rede vascular em coordenadas polares.

É agora possível determinar a correlação-cruzada de uma sub-imagem W' de $I_{p'}$, centrada em $(\rho(i), \alpha(i))$, com I_p , o que resultará na determinação de $\Delta\rho$ e $\Delta\alpha$.

Um ponto definido por $(\rho + \Delta\rho, \alpha + \Delta\alpha)$ pode ser representado num sistema

3.1 Fotografia do fundo ocular

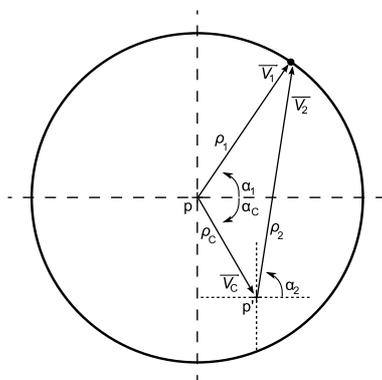


Figura 3.17: Este esquema relaciona a representação de um mesmo ponto em dois sistemas de coordenadas polares.

de eixos $\rho\alpha$ e ao conjunto de pontos assim obtidos pode determinar-se o melhor ajuste, por um processo de otimização, da função (3.15).

$$\rho(\rho_1, \alpha_1, \rho_C, \alpha_C) = \sqrt{\rho_1^2 + \rho_C^2 - 2 \rho_1 \rho_C \cos(\alpha_1 - \alpha_C)}. \quad (3.15)$$

Os parâmetros estimados $\hat{\rho}_C$ e $\hat{\alpha}_C$, assim obtidos, correspondem aos parâmetros ρ_C e α_C da equação (3.14) e definem o vector \mathbf{v}_C da figura 3.17, pelo que é possível determinar a posição relativa das origens dos eixos.

Em posse destes dados, obtém-se um ponto em cada imagem que representa a mesma localização anatómica e que estabelece por isso a translação entre as imagens a co-registar, e torna possível obter uma representação em coordenadas polares da rede vascular sem distorções, o que permite determinar a rotação entre as imagens.

O processo aqui desenvolvido, permite a obtenção de um co-registo rígido robusto, o qual corresponde à aproximação inicial a utilizar para a determinação dos co-registos projectivos.

O co-registo projectivo

Pelas razões já referidas, o processo de co-registo rígido não é considerado suficiente para a obtenção do co-registo de imagens do fundo ocular.

Optou-se assim pela implementação de uma transformação projectiva como processo de co-registo não-rígido.⁶

Para este processo, é necessário determinar um conjunto de pares de correspondências entre as imagens a co-registar, sendo necessário assegurar, dentro dos limites possíveis, que essas correspondências se refiram à mesma localização anatómica. A utilização como aproximação inicial do resultado do co-registo rígido aparece assim como natural, limitando o estabelecimento de pares de correspondências a áreas locais, o que permite diminuir o número total de pares estabelecidos.

As localizações anatómicas consideradas para o processo de co-registo são as obtidas pelo cruzamento e/ou bifurcação dos vasos, os quais podem ser determinados a partir da segmentação da rede vascular pelo cálculo da correlação-cruzada da imagem binária correspondente com uma matriz de 1's de tamanho 3×3 (figura 3.18). As localizações a que correspondem valores de correlação-cruzada igual ou superior a 3, são consideradas como potenciais cruzamentos/bifurcações, daqui em diante apenas referidos como pontos característicos. Na figura 3.19 mostra-se o resultado da determinação destes pontos característicos numa retinografia, sendo a rede vascular mostrada a verde e os pontos característicos a azul.

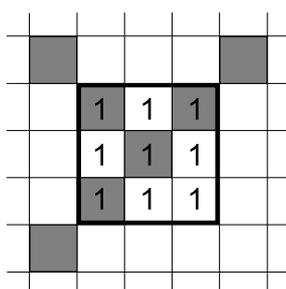


Figura 3.18: Determinação de cruzamentos/bifurcações na rede vascular.

⁶Será ainda abordado um outro tipo de co-registo não-rígido baseado em modelos deformáveis.

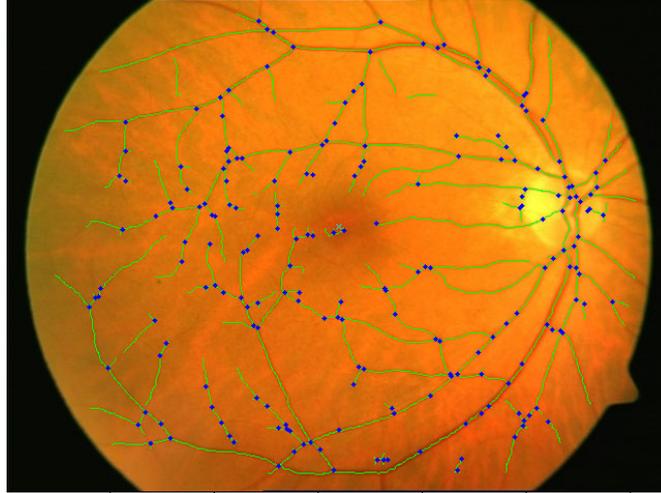


Figura 3.19: A rede vascular detectada numa retinografia é mostrada, a verde, sobreposta à imagem original e os pontos detectados como cruzamentos/bifurcações da rede vascular estão assinalados a azul.

Dadas duas imagens a co-registar, \mathbf{I} e \mathbf{I}' e um ponto característico de \mathbf{I} , $p = (x_0, y_0)$, este só será considerado para o co-registo se existirem pontos característicos numa sub-imagem \mathbf{W}' , de $(N + 1) \times (N + 1)$, de \mathbf{I}' centrada em $p' = (x'_0, y'_0)$ dado por

$$\mathbf{p}' = \mathbf{T} \mathbf{p}, \quad (3.16)$$

com $\mathbf{p}' = [x'_0, y'_0, 1]^T$, $\mathbf{p} = [x_0, y_0, 1]^T$ e \mathbf{T} a matriz de transformação obtida pelo co-registo rígido anterior.

O processo acima descrito, permite determinar quais os pontos característicos numa imagem com eventual correspondência na imagem a co-registar.

Para o estabelecimento dos pares de pontos entre ambas as imagens, foi utilizado o procedimento *Softassign Procrustes* proposto em [RCB97], o qual não requer o estabelecimento prévio de quaisquer pares de pontos e descarta pontos sem correspondência.

Escrevendo as equações considerando coordenadas homogêneas, obtemos

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

$$\begin{bmatrix} w x' \\ w y' \\ w \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \\ 1 \end{bmatrix}, \quad (3.17)$$

de onde se obtém

$$\begin{cases} (a_{31}x + a_{32}y + 1)x' = a_{11}x + a_{12}y + a_{13} \\ (a_{31}x + a_{32}y + 1)y' = a_{21}x + a_{22}y + a_{23} \end{cases}, \quad (3.18)$$

de que resulta

$$\begin{cases} x' = a_{11}x + a_{12}y + a_{13} - a_{31}xx' - a_{32}yy' \\ y' = a_{21}x + a_{22}y + a_{23} - a_{31}xy' - a_{32}yy' \end{cases}. \quad (3.19)$$

Colocando na forma matricial e considerando N pontos ($N \geq 4$), obtém-se

$$\begin{bmatrix} x'_1 \\ y'_1 \\ x'_2 \\ y'_2 \\ \vdots \\ x'_N \\ y'_N \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_1 & y_1 & 1 & 0 & 0 & 0 & -x_1x'_1 & -y_1y'_1 \\ 0 & 0 & 0 & x_1 & y_1 & 1 & -x_1y'_1 & -y_1y'_1 \\ x_2 & y_2 & 1 & 0 & 0 & 0 & -x_2x'_2 & -y_2y'_2 \\ 0 & 0 & 0 & x_2 & y_2 & 1 & -x_2y'_2 & -y_2y'_2 \\ \vdots & & & & & & & \\ x_N & y_N & 1 & 0 & 0 & 0 & -x_Nx'_N & -y_Ny'_N \\ 0 & 0 & 0 & x_N & y_N & 1 & -x_Ny'_N & -y_Ny'_N \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_{11} \\ a_{12} \\ a_{13} \\ a_{21} \\ a_{22} \\ a_{23} \\ a_{31} \\ a_{32} \end{bmatrix}, \quad (3.20)$$

ou

$$\mathbf{p}' = \mathbf{B} \mathbf{a}. \quad (3.21)$$

Daqui se pode obter a solução pela determinação da pseudo-inversa de Moore-Penrose, de que resulta

$$\mathbf{a} = (\mathbf{B}^T \mathbf{B})^{-1} \mathbf{B}^T \mathbf{p}', \quad (3.22)$$

ficando assim determinada a matriz de transformação projectiva \mathbf{A} definida pelos elementos de \mathbf{a} (3.23).

3.1 Fotografia do fundo ocular

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & 1 \end{bmatrix}. \quad (3.23)$$

Os resultados obtidos, aplicado a pares de imagens retinográficas com níveis de qualidade distintos, podem ser observados nas figuras 3.20 a 3.22.

A não restrição dos pontos característicos a uma vizinhança em torno do resultado do co-registo rígido, poderá resultar como na figura 3.23.

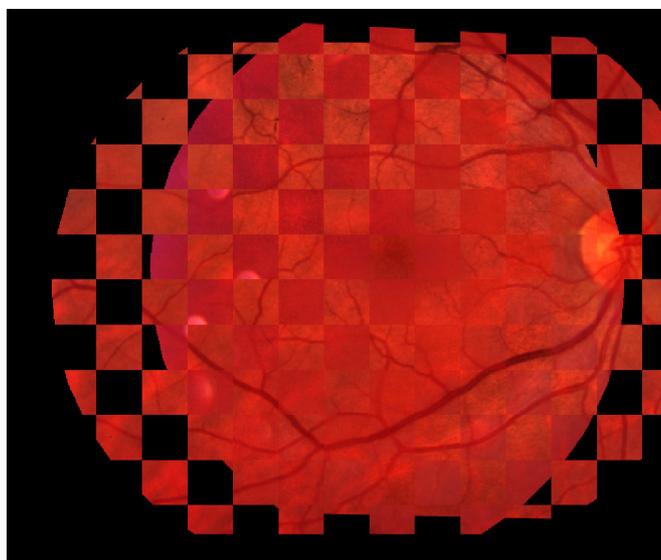


Figura 3.20: Co-registo de duas retinografias (exemplo 1/3).

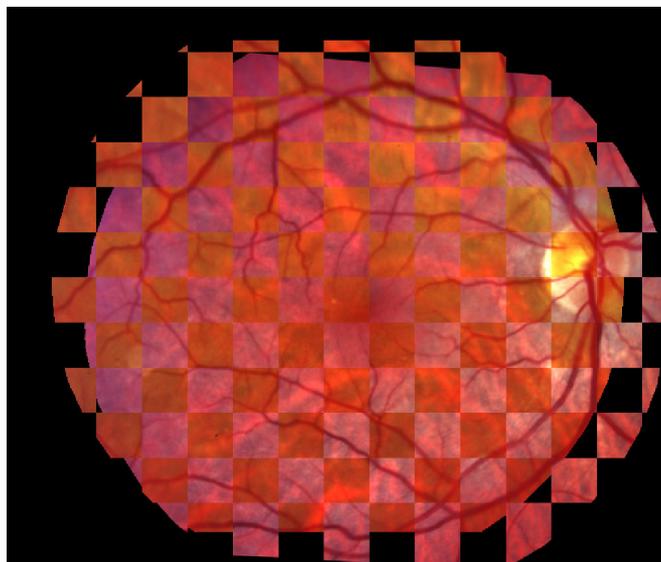


Figura 3.21: Co-registo de duas retinografias (exemplo 2/3).

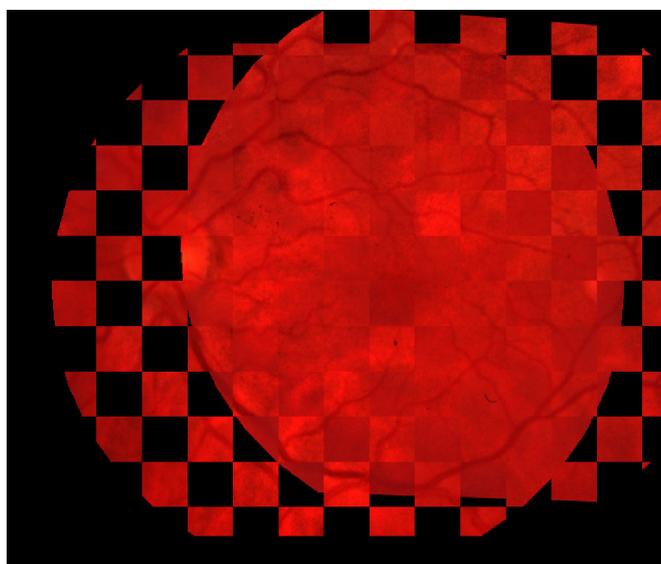


Figura 3.22: Co-registo de duas retinografias (exemplo 3/3).

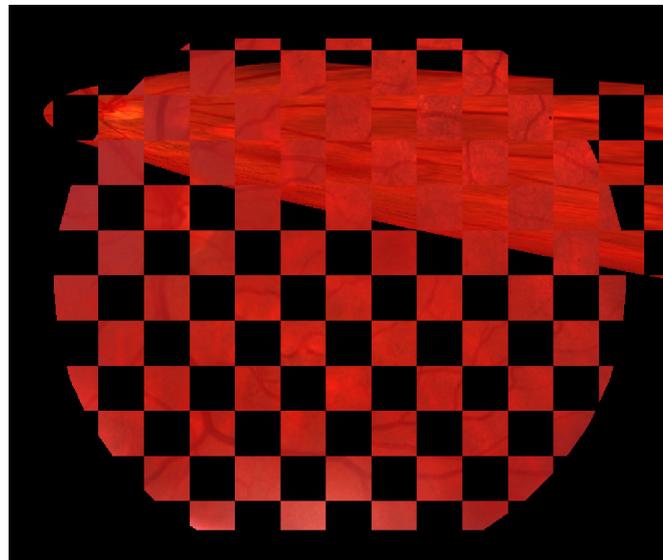


Figura 3.23: Erro de co-registo de duas retinografias por não aplicação de restrições ao emparelhamento de pontos característicos.

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

3.2.1 Mapeamento das alterações da barreira hemato-retiniana

O objectivo do trabalho apresentado nesta secção e desenvolvido na sequência de trabalhos anteriores (ver secção 2.2), é o de calcular e mapear o derrame de fluoresceína que ocorre da circulação sanguínea para o humor vítreo humano, *in vivo*, derrame este que está directamente relacionado com a permeabilidade da barreira hemato-retiniana para a fluoresceína (de agora em diante simplesmente referida como permeabilidade sempre que não surjam dúvidas e seja vantajoso).

Uma vez que esta barreira é afectada pela diabetes Mellitus, embora também o seja por outras patologias associadas à perda progressiva de visão, é de particular importância que o seu estado seja verificado e monitorizado ao longo do tempo, com especial incidência em doentes diabéticos.

Ao contrário do que sucedeu com o trabalho anterior [BIS⁺99, LBSCV99] o aqui reportado utiliza dados adquiridos com um *oftalmoscópio confocal de varrimento laser* comercialmente disponível, sendo presentemente estes os dois únicos sistemas a permitirem efectuar este cálculo com recurso a técnicas de imagiologia tridimensional (3D) para a obtenção da distribuição volumétrica da fluoresceína na retina e vítreo humanos e *in vivo*.

Para o estabelecimento de uma correlação directa entre o derrame de fluoresceína e a morfologia da retina, em ambos os casos é gerada uma imagem do fundo ocular a partir da informação volumétrica recolhida.

Quando se iniciou a procura de alternativas para a instrumentação utilizada em [BIS⁺99, LBSCV99], os critérios estabelecidos incluíram a disponibilidade comercial do sistema, o acesso facilitado aos detalhes da instrumentação e a possibilidade de introdução de modificações na fase de produção. Com base nestes critérios foi seleccionado o *Heidelberg Retina Angiograph (HRA – Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Alemanha)*, ao qual foram introduzidas alterações quer na fase de produção quer posteriormente após o teste de várias soluções para o diâmetro do orifício confocal. As diferenças mais significativas entre os dois sistemas, o sistema protótipo *Zeiss* e o sistema *Heidelberg*, consistem no sensor utilizado, fotomultiplicador vs. díodo fotomultiplicador, e no facto de, no segundo, o plano confocal ser mantido inalterado durante a aquisição de cada um dos 32 planos confocais.

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

O esquema do procedimento para o cálculo do índice de permeabilidade encontra-se representado na imagem da figura 3.24.

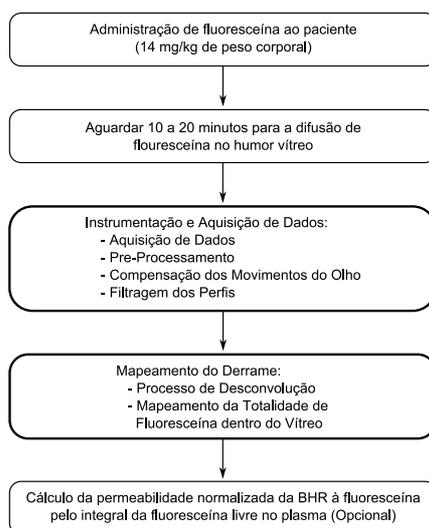


Figura 3.24: Procedimento para o cálculo do derrame de fluoresceína da circulação sanguínea para o humor vítreo. O bloco "Instrumentação e Aquisição de Dados" trata da aquisição de dados e de todos os passos necessários até à desconvolução. O bloco "Mapeamento do Derrame" realiza a desconvolução e constrói o mapa de derrame de fluoresceína e o bloco final, opcional, permite a calibração do sistema e obtenção do valor da permeabilidade da barreira hemato-retiniana para a fluoresceína.

Para o cálculo do índice de permeabilidade da barreira hemato-retiniana para a fluoresceína, é necessário determinar a quantidade de traçador (fluoresceína) que atravessou a barreira hemato-retiniana da corrente sanguínea para o vítreo. Este valor deve ser posteriormente normalizado para o total de fluoresceína livre, ou seja, para o integral da concentração de fluoresceína livre presente na corrente sanguínea desde a sua administração intravenosa ao instante da aquisição [CCK85].

Instrumentação e aquisição de dados

O HRA é um *oftalmoscópio confocal de varrimento laser* capaz de registar a distribuição volumétrica (3D) da fluorescência no olho humano *in vivo*. Efectua varrimentos em 32 planos confocais cobrindo 10×10 , 20×20 ou 30×30 graus do fundo ocular, cada um dos quais composto por 256×256 ou 512×512 píxeis. Também a distância entre o primeiro e o último plano confocal pode ser feita variar de 0 a 7 *mm* com incrementos de 1 *mm*. Como resultado, é possível obter um volume de informação de $256 \times 256 \times 32$ ou $512 \times 512 \times 32$ voxels, cada qual codificado num *byte*.

Este sistema utiliza como fonte de luz de excitação um *laser* de Árgon ($\lambda = 488 \text{ nm}$) e um filtro de barreira com frequência-de-corte nos 510 *nm*, o que permite rejeitar a generalidade da luz reflectida e deste modo quantificar apenas a luz proveniente da emissão resultante da excitação das molécula de fluoresceína pela fonte de Árgon.

A potência óptica pode ser compensada de -12 a +12 dioptrias e a taxa máxima de aquisição de imagem no modo de angiografia fluoresceínica é de 20 *imagens/s*.

Neste sistema, relativamente à configuração original, foram introduzidas duas alterações: um comutador, que permite alterar entre o modo de aquisição padrão e o modo de aquisição modificado, e o orifício confocal.

A primeira destas alterações determina um deslocamento da aquisição do vítreo para a retina/coróide relativamente à aquisição padrão. No modo padrão e após focagem na retina do doente, operação efectuada pelo operador do sistema, o plano confocal é automaticamente movido para o interior do vítreo por forma a que o último plano confocal adquirido corresponda ao determinado pelo operador. No modo modificado, o deslocamento inicial para o interior do vítreo é reduzido para 2/3 para que o restante 1/3 do varrimento corresponda a planos confocais na retina e coróide, com o objectivo de permitir a reconstrução do perfil da intensidade de fluorescência.

A segunda modificação consistiu na redução do diâmetro do orifício confocal original, de 400 μm para 200 μm , de modo a aumentar a confocalidade do sistema, ainda que à custa da diminuição da relação sinal-ruído devido à redução a 25% da área do mesmo. Esta escolha foi efectuada com base numa série de experiências com diferentes orifícios confocais, já que a diminuição do seu diâmetro dá

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

origem a uma maior confocalidade do sistema com a correspondente redução da quantidade de luz recolhida, o que dificulta a recolha de informação pela redução da relação sinal-ruído e restringe o tempo de aquisição após administração da substância de contraste [PB81, KLAM⁺81, LAKJ82, MLF⁺82, ZBCV83a].

O protocolo utilizado para a aquisição de dados é:

- Modo de aquisição: FA;
- Intervalo de tempo de aquisição: 1,6 s com início entre 10 e 20 *minutos* após a administração intravenosa da fluoresceína na dose de 14 mg/kg de peso;
- Ângulo de aquisição: 20° (imagem centrada na fóvea);
- Profundidade de varrimento: 7 mm;
- Focagem: ajustada de modo a obter a melhor imagem do fundo ocular;
- Velocidade de aquisição: 20 *imagens/s*;
- Resolução de imagem: 256 × 256 píxeis.

Seguindo este protocolo, cada plano confocal dista do(s) seu(s) vizinho(s) de 225,81 μm , sendo que 2/3 dos 32 planos focais serão aquisições efectuadas no vítreo.

O aspecto mais negativo deste sistema reside no seu tempo de aquisição: 1,6 s à frequência máxima de aquisição (20 *imagens/s*). Devido aos movimentos sacádicos, quer voluntários quer involuntários, as imagens correspondentes aos planos focais devem ser alinhadas entre si de modo a ser possível construir um perfil de intensidade (fluorescência) em qualquer localização do fundo ocular. Deste modo, ainda que o protocolo estabeleça a resolução do sistema em 256 × 256 píxeis por plano confocal, o volume a processar será naturalmente inferior numa diferença que dependerá da amplitude das sacadas. Por outro lado, a razão da escolha desta resolução e não da resolução superior (512 × 512 píxeis) prende-se com a necessidade de aumentar a relação sinal-ruído, que foi drasticamente reduzida aquando da redução do orifício confocal dos originais 400 para os 200 μm de diâmetro. Ainda assim, foi decidido efectuar uma decimação de factor 2, após a compensação dos movimentos oculares e antes do processo de desconvolução.

Função de resposta a impulso unitário

A aquisição da distribuição volumétrica da fluorescência no olho humano depende da combinação das características ópticas da instrumentação e do próprio olho. De modo a adaptar-se a diferentes olhos, o sistema dispõe de uma compensação de potência óptica passível de ser ajustada entre -12 e +12 dioptrias.

Um sistema é dito linear e invariante no tempo (LIT) se obedecer aos princípios da homogeneidade, aditividade e linearidade, i.e.:

homogeneidade:

$$\begin{aligned}\hat{i}(t) &= \alpha i(t) \\ \hat{o}(t) &= h(\alpha i(t)) = \alpha h(i(t))\end{aligned}, \quad (3.24)$$

aditividade:

$$\begin{aligned}i(t) &= \sum_k a_k i_k(t) \\ o(t) &= \sum_k a_k h(i_k(t))\end{aligned}, \quad (3.25)$$

linearidade:

$$\begin{aligned}\hat{i}(t) &= i(t - \tau) \\ \hat{o}(t) &= h(i(t - \tau)) = o(t - \tau)\end{aligned}, \quad (3.26)$$

com $i()$, $o()$ e $h()$ respectivamente a entrada, a saída e a função de transferência do sistema.

Para a caracterização do sistema em estudo (o *HRA*) é necessário determinar a respectiva função de resposta a impulso unitário ($\delta(t)$). Um conjunto de experiências efectuadas permite afirmar que o sistema obedece aos princípios acima apresentados, sendo portanto um sistema linear e invariante no tempo.

Da teoria dos sistemas lineares, a saída $o()$ de um sistema pode ser calculada a partir da sua entrada $i()$ e da sua função de transferência $h()$ pela respectiva convolução, i.e.

$$o = h * i. \quad (3.27)$$

A partir das propriedades da convolução e derivação da transformada de Fourier, obtém-se:

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

$$o' = h * i' , \quad (3.28)$$

com o' e i' as derivadas de $o()$ e $i()$, respectivamente.

A aplicação deste princípio foi inicialmente efectuada com um dispositivo de teste composto por uma lente de 66 dioptrias, para simular a potência óptica do olho humano, de uma pupila artificial de 8 mm de diâmetro, para simular a pupila humana nas condições de exame e, um conjunto de *cuvettes* contendo soluções de fluoresceína com concentrações conhecidas.

Com o sistema nesta configuração, a distância lente-*cuvette* foi ajustada de modo a obter uma função degrau, i.e. de modo a obter num dos extremos do varrimento (em profundidade) medidas fora da *cuvette* e no outro extremo medidas no interior da *cuvette*.

Considerando um sistema de coordenadas XYZ , em que (x, y) representa as coordenadas num plano confocal e z representa a coordenada ao longo do eixo óptico (normal ao plano confocal), e sendo i a função degrau unitário (função Heaviside – $H(z)$), vem,

$$H(z) = \begin{cases} 1 & , z > 0 \\ \frac{1}{2} & , z = 0 \\ 0 & , z < 0 \end{cases} , \quad (3.29)$$

e obtém-se de (3.27):

$$\begin{aligned} o(z) &= h(z) * i(z) \\ &= h(z) * H(z) \end{aligned} . \quad (3.30)$$

De (3.28) e (3.30) obtém-se:

$$\begin{aligned} o'(z) &= h(z) * H'(z) \\ &= h(z) * \delta(z) , \\ &= h(z) \end{aligned} \quad (3.31)$$

de onde é possível obter a função de resposta a impulso unitário fazendo a entrada igual a uma função degrau unitário e derivando a saída do sistema.

O melhor ajuste para a função de resposta a impulso unitário é uma *Lorentziana* cuja equação é:

$$h(z) = \frac{2Aw}{\pi(w^2 + 4(z - z_c)^2)}, \quad (3.32)$$

com w largura a meia-altura (*FWHM*), A a área sobre a curva de $z = -\infty$ a $z = +\infty$ e z_c a abcissa para a qual o máximo da função ($2A/\pi w$) ocorre.

Para a determinação da função de resposta a impulso unitário foi utilizado um conjunto de *cuvettes*, com soluções com diferentes concentrações de fluoresceína, para cada uma das quais foram obtidas várias aquisições nas condições já mencionadas usando diferentes profundidades de varrimento (5, 6 e 7 mm). Para cada uma das aquisições, foram construídos vários perfis de intensidade de fluorescência usando diferentes áreas da imagem. Para além das naturais diferenças no parâmetro z_c , não foram determinadas diferenças significativas para os parâmetros A ou w , o que demonstra a invariância do sistema relativamente às coordenadas da imagem.

O processo de obtenção do melhor ajuste baseou-se quer na derivada (diferenças finitas) da saída do sistema (resposta à medição das *cuvettes*) quer usando a primitiva da função *Lorentziana* (3.33). O espaçamento entre planos confocais variou de 161,29 μm (varrimentos com 5 mm de profundidade) a 225,81 μm (varrimentos com 7 mm de profundidade).

$$\int \frac{2Aw}{\pi(w^2 + 4(z - z_c)^2)} dz = \frac{A}{\pi} \operatorname{tg}^{-1} \left(\frac{2(z - z_c)}{w} \right). \quad (3.33)$$

A largura a meia-altura foi assim estimada em 1287 μm , embora um factor de correcção de 0,75 tenha permitido obter resultados da desconvolução mais de acordo com o esperado.

O gráfico da figura 3.25 mostra a função de resposta a impulso unitário obtida para uma dada aquisição, à qual corresponde um largura a meia-altura de 1253,2 μm .

O conhecimento da função de resposta a impulso unitário, vai ser utilizado no processo de desconvolução para permitir estimar a distribuição da fluoresceína no olho humano e deste modo estimar o total de fluoresceína que atravessou a barreira hemato-retiniana e penetrou no vítreo.

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

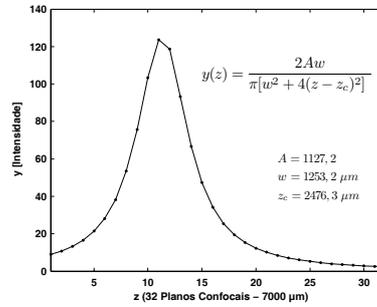


Figura 3.25: Perfil obtido a partir de uma aquisição efectuada numa superfície fluorescente e que representa a função de resposta a impulso unitário. A largura a meia-altura correspondente é de $1253,2 \mu m$, obtida pelo ajuste de uma *Lorentziana* aos dados. Os parâmetros de ajuste estão mostrados na imagem.

Pré-processamento

A fase de pré-processamento consiste na importação dos dados e na verificação dos respectivos valores relativamente a condições pré-estabelecidas.

Um perfil de intensidade média de fluorescência ao longo do eixo óptico é inicialmente determinado. Este perfil é posteriormente analisado relativamente à sua forma para determinar a existência de varrimentos nulos (ausência de pico de intensidade, perfis de muito baixa intensidade e número de máximos locais) (3.34) e relação sinal-ruído (SNR) (3.35).

$$|\mu(z_i) - \mu(z_{i-1})| \leq 2, \forall i \in \{2, \dots, 32\}, \quad (3.34)$$

$$SNR = 10 \log \frac{\sigma_{sinal}^2}{\sigma_{ruído}^2}, \quad (3.35)$$

onde $\mu(z_i)$ é o valor médio de fluorescência do plano confocal i e σ_{sinal}^2 e $\sigma_{ruído}^2$ são as variâncias dos planos confocais com maior e menor intensidade média ao longo do eixo óptico, respectivamente.

Deste modo, apenas aquisições cujo perfil de intensidade média de fluorescência tem apenas um máximo local e $SNR \geq 9 \text{ dB}$ são considerados para processamento.

Deve aqui notar-se que a expressão para SNR (3.35) pode indicar valores errados para aquisições de dados sintéticos tais como os anteriormente descritos

para a caracterização do sistema. Neste caso, a aquisição em planos confocais correspondentes a localizações no interior da *cuvette* podem determinar uma variância reduzida comparativamente à variância no exterior dessa mesma *cuvette*, o que determinará um pequeno valor de SNR.

Compensação dos movimentos oculares

Como já referido, devido às sacadas é necessário compensar estes movimentos de modo a ser possível construir um perfil de intensidade de fluorescência ao longo de uma qualquer posição da imagem do fundo ocular. Esta compensação é efectuada com recurso à correlação de fase [PHGK77, WBB89], a qual se baseia na propriedade do deslocamento da transformada de Fourier, i.e.

$$F(u) = \mathcal{F}\{f(x)\} \longleftrightarrow \mathcal{F}\{f(x - a)\} = e^{j2\pi a u} F(u) . \quad (3.36)$$

Dadas duas imagens, $g_1(x, y)$ e $g_2(x, y)$, as respectivas transformadas de Fourier podem ser escritas na forma de Euler como

$$\begin{aligned} G_1(u, v) &= \mathcal{F}\{g_1(x, y)\} = |G_1(u, v)| e^{j\phi_1(u, v)} \\ G_2(u, v) &= \mathcal{F}\{g_2(x, y)\} = |G_2(u, v)| e^{j\phi_2(u, v)} \end{aligned} , \quad (3.37)$$

de onde

$$G_1(u, v) G_2^*(u, v) = |G_1(u, v)| |G_2(u, v)| e^{j(\phi_1(u, v) - \phi_2(u, v))} . \quad (3.38)$$

Fazendo $\Phi(u, v) = \phi_1(u, v) - \phi_2(u, v)$ (a diferença de fase) vem,

$$e^{j\Phi(u, v)} = \frac{G_1(u, v) G_2^*(u, v)}{|G_1(u, v) G_2^*(u, v)|} , \quad (3.39)$$

e finalmente

$$d(x, y) = \mathcal{F}^{-1}\{e^{j\Phi(u, v)}\} . \quad (3.40)$$

O máximo de $d(x, y)$, que ocorre para (x_d, y_d) , indica o deslocamento em x e y , respectivamente dx e dy .

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

Este processo é aplicado a todo o volume compensando assim os movimentos sacádicos ao longo da aquisição, durante a qual a testa e o queixo do doente são mantidos pressionados contra os respectivos suportes, de modo a minimizar eventuais deslocamentos, com especial incidência nos movimentos em z (ao longo do eixo óptico) que não poderiam ser corrigidos e que alterariam os perfis de intensidade a analisar.

No entanto esses movimentos, a existirem, provocarão o aparecimento de dois ou mais máximos locais e a aquisição será rejeitada com base nos critérios de aplicabilidade da técnica mencionados no tópico de pré-processamento.

A figura 3.26 mostra um conjunto de planos confocais pertencentes à mesma aquisição (no topo) e os respectivos deslocamentos determinados segundo (3.40) no gráfico (em baixo).

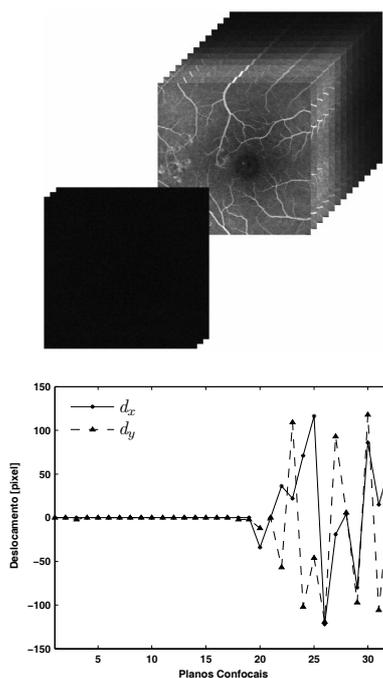


Figura 3.26: Informação volumétrica composta por 32 planos confocais (no topo) e os respectivos deslocamentos em x (dx) e y (dy) (em baixo) cujos valores positivos correspondem a deslocamentos para a direita e para cima, respectivamente.

Devido à rápida diminuição da intensidade ao longo do eixo óptico, à medida

que nos afastamos do plano da retina e os planos confocais se deslocam para o interior do globo ocular (cavidade vítrea), a relação SNR e como consequência o deslocamento determinado entre planos confocais contíguos podem aumentar devido ao aumento do ruído e diminuição do sinal (diminuição/ausência de referências morfológicas do fundo ocular). O limite estabelecido para considerar um plano como fazendo parte do volume a processar tem em conta parâmetros como o deslocamento e a intensidade média do respectivo plano confocal. Deste modo, ainda que todas as aquisições sejam compostas por 32 planos confocais, nem todos serão considerados para o processamento.

Foi considerado um número mínimo de 17 planos confocais para o processamento e extracção da informação pretendida. Este número provou ser o suficiente enquanto simultaneamente permite o acesso a mais de 90% das aquisições realizadas em ambiente clínico, o qual é um parâmetro de extrema importância na aplicabilidade da técnica.

É agora possível, depois da correcção dos movimentos oculares, construir um perfil de intensidade de fluorescência em qualquer posição do fundo ocular sem misturar diferentes estruturas a diferentes profundidades de aquisição.

O facto de planos confocais correspondentes a leituras efectuadas no vítreo poderem ser alinhados, deve-se à relativamente elevada largura a meia-altura (*FWHM*) da função de resposta a impulso unitário, o que permite que parte da informação morfológica da retina seja ainda visível nesses planos e do facto do método de cálculo do deslocamento não se basear em marcas anatómicas (pontos fiduciais endógenos), que seriam de difícil extracção. Também o facto de não serem considerados todos os planos confocais não representa qualquer desvantagem, já que o tempo disponibilizado para a difusão da fluoresceína no vítreo, tempo este que medeia entre a administração intravenosa da fluoresceína e a aquisição dos dados, não permitem que esta penetre mais de 1,5 *mm* para o interior da cavidade vítrea. Assim sendo, mesmo considerando o pior cenário, que corresponde a obter apenas 10 dos 17 planos confocais como medidas efectuadas no vítreo, isto corresponde a um varrimento de 2 *mm* no interior de vítreo, cobrindo deste modo todo o volume de interesse.

Filtragem dos perfis de intensidade

Após a correção dos movimentos oculares, o perfil de intensidade de fluorescência para cada localização do fundo ocular necessita de ser filtrado.

Um filtro passa-baixo de resposta finita (*FIR*) foi determinado para permitir a remoção das componentes de alta frequência que, dada a função de resposta a impulso unitário já determinada, não poderão corresponder a leituras reais mas sim leituras devidas à adição de ruído, ao mesmo tempo que permite a recuperação da forma do perfil de intensidade de fluorescência.

O filtro que permitiu obter os melhores resultados é um filtro de ordem 4 e frequência-de-corte de $0,6 \text{ rad/amostra}$ (frequência relativa, com 1 rad/amostra a frequência de amostragem).

A figura 3.27 mostra um sinal original típico e o respectivo sinal filtrado com o filtro acima especificado, sendo o perfil mais suave o correspondente ao sinal filtrado, onde o eixo dos x representa o número do plano confocal e o eixo dos y representa a intensidade de fluorescência.

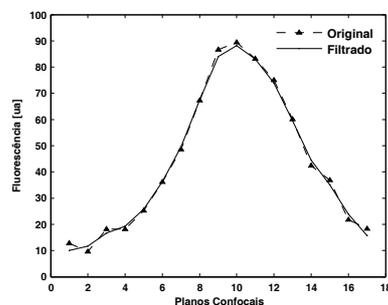


Figura 3.27: Efeito da filtragem passa-baixo de um perfil de intensidade de fluorescência típico. A linha a cheio representa o sinal original e a linha a traço-ponto representa o resultado da aplicação do filtro.

Cálculo da imagem do fundo ocular

Uma imagem de referência do fundo ocular é gerada determinando a média das 3 imagens de maior valor médio de todo o volume.

De modo a melhorar esta referência, e apenas para inspecção visual, foi implementado um algoritmo para aumento do contraste local [NSB⁺00].

Dada a relativamente reduzida dimensão do orifício confocal e o facto do sensor utilizado ser um díodo fotomultiplicador, a imagem correspondente ao plano confocal de maior intensidade média, e que corresponde àquele focado no plano da retina, em doentes de idade mais avançada e/ou olhos com opacidades dos meios, bem como aqueles que apresentam uma dilatação da pupila inferior à necessária, apresentam caracteristicamente imagens de intensidade reduzida comparativamente aos restantes.

Sendo $f(x, y)$ a imagem original, a imagem com aumento de contraste local é dada por

$$g(x_i, y_i) = \text{Max}_{\text{level}} \frac{\phi(f(x_i, y_i), \mu_w, \sigma_w) - \phi(f_{\min}, \mu_w, \sigma_w)}{\phi(f_{\max}, \mu_w, \sigma_w) - \phi(f_{\min}, \mu_w, \sigma_w)}, \quad (3.41)$$

onde $\text{Max}_{\text{level}}$ é o valor máximo permitido para o sinal de saída ($g(x, y)$), f_{\min} (f_{\max}) é o valor mínimo (máximo) de $f(x, y)$ e μ_w e σ_w são a média e o desvio padrão de $w(x, y)$, uma sub-imagem de $f(x, y)$ centrada em (x_i, y_i) e de tamanho $N \times N$.

A função ϕ é definida como

$$\phi(x, \mu_w, \sigma_w) = \left[1 + e^{\frac{\mu_w - x}{\sigma_w}} \right]^{-1}. \quad (3.42)$$

Os valores típicos para os parâmetros $\text{Max}_{\text{level}}$ e N são, respectivamente, 255 e 31. O valor estabelecido para N foi escolhido com base numa avaliação subjectiva e que corresponde à percepção da melhor angiografia fluoresceínica obtida por este método para diferentes valores do parâmetro em análise. Por outro lado, o valor do parâmetro $\text{Max}_{\text{level}}$ foi escolhido de modo a preservar o número de níveis de intensidade utilizados relativamente à imagem original.

Dada a reduzida dimensão das imagens obtidas pelo *HRA*, com o limite máximo de 256×256 píxeis seguindo o protocolo estabelecido, e para reduzir o efeito dos bordos da imagem, invés de se considerarem os valores exteriores como nulos considerou-se a imagem como circular.

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

O resultado da aplicação deste processo a uma imagem típica pode ser visto na imagem da figura 3.28. A imagem do fundo ocular mostrada à direita é o resultado da aplicação deste processo à imagem da esquerda. O aumento dos detalhes é notório.

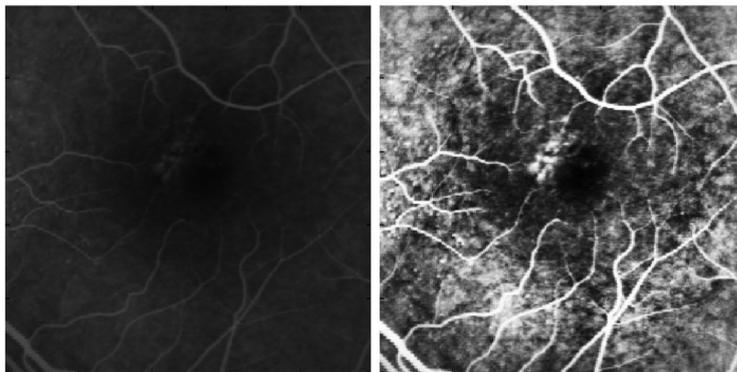


Figura 3.28: Aumento de contraste local. Esquerda: imagem original. Direita: imagem obtida pelo aumento de contraste local, mostrando uma imagem mais contrastada (apenas para efeito de referência do fundo ocular).

Modelo físico da difusão

Ainda que o processo que regula o movimento da fluoresceína no vítreo seja conhecido, sendo um processo de difusão o qual depende apenas do gradiente de concentração, junto ao interface retina-vítreo e para o intervalo de tempo considerado, é necessário estabelecer o perfil de intensidade de fluorescência esperado de modo a incluir o respectivo modelo no processo de desconvolução. Este depende necessariamente do tempo após a administração intravenosa da fluoresceína, já que várias horas após a administração da substância de contraste a concentração na corrente sanguínea será inferior à concentração no vítreo e por esse motivo a difusão será efectuada em sentido contrário. Convém ainda realçar o facto de existir um processo de transporte activo, portanto contrário ao gradiente de concentração, sendo no entanto o mesmo desprezável relativamente à quantidade de fluoresceína que atravessa a barreira hemato-retiniana da circulação

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

sanguínea para o vítreo.

Os factos acima expostos demonstram claramente a necessidade de estabelecer um perfil de intensidade junto do interface retina-vítreo para o intervalo de tempo de interesse para a aplicação do processo aqui desenvolvido e que é o intervalo de tempo entre 10 e 20 *minutos*, sendo o limite superior determinado pela capacidade de recolha de luz do fundo ocular e o menor pela necessidade de permitir a difusão da fluoresceína para o interior do vítreo.

O processo de difusão da fluoresceína da corrente sanguínea para o vítreo pode ser modelada por um sistema de dois compartimentos (figura 3.29) separados por uma barreira (a barreira hemato-retiniana), modelo do qual se obtém

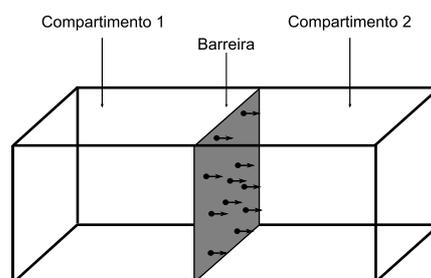


Figura 3.29: Modelo físico do processo com base num sistema de dois compartimentos separados por uma barreira.

$$J = P \Delta C, \quad (3.43)$$

onde J é a densidade de corrente, P a permeabilidade da barreira hemato-retiniana para a fluoresceína e ΔC a diferença de concentrações entre os dois compartimentos.

Uma vez no interior do vítreo, o movimento da fluoresceína pode ser modelado por um processo uni-dimensional e isotrópico dado por (primeira lei de Fick)

$$F = -D \frac{\partial C}{\partial x}, \quad (3.44)$$

onde F é a taxa de transferência por unidade de área, C é a concentração de fluoresceína no vítreo e D é o coeficiente de difusão.

A equação fundamental diferencial da difusão é obtida da anterior e corresponde à segunda lei de Fick

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} . \quad (3.45)$$

Considerando, por hipótese, que a concentração de fluoresceína se mantivesse constante na corrente sanguínea (o que não se verifica dada a conversão da fluoresceína em fluoresceína monoglucoronada no fígado e a sua excreção pelo sistema renal) obter-se-ia uma solução determinística dada por

$$C(x, t) = C_0 \operatorname{erfc} \frac{x}{2\sqrt{Dt}} , \quad (3.46)$$

onde $\operatorname{erfc}(z) = 1 - \operatorname{erf}(z)$ [Cra70].

Ainda que esta expressão pudesse ser uma representação suficientemente exacta para os primeiros minutos após a administração intravenosa da fluoresceína, esta não foi considerada de utilidade prática. Para além do mais, a concentração de fluoresceína na circulação sanguínea (concentração de fluoresceína no plasma) ($C_p(t)$) não pode ser considerada constante para o intervalo de tempo de interesse para o qual ocorrem as aquisições ($t \in [10, 20]$ minutos). De facto Zeimer et al. [ZBCV83a] determinou uma expressão para a concentração de fluoresceína no plasma, sendo esta dada por

$$C_p(t) = K (10^{-1,17t} + 0,115 \times 10^{-0,34t} + 0,025 \times 10^{-0,044t}) , \quad (3.47)$$

onde K depende da dose administrada e da absorção, e t é o tempo após administração intravenosa em horas. De acordo com esta equação a concentração de fluoresceína decresce para 76,4% e para 52,0%, respectivamente para 10 e 20 minutos após a administração. Esta é uma expressão semelhante à determinada em [KONK92] a menos de um termo na soma.

No presente trabalho, foi seguida uma aproximação distinta na procura de uma solução para o processo de difusão expresso por (3.43)-(3.45). Deste modo foi empregue o método dos elementos finitos para a resolução de (3.45) de modo determinar a forma do perfil de concentração no interior do vítreo junto ao interface deste com a retina e para o intervalo de tempo com interesse para o modelo/aplicação.

Este modelo assume a barreira hemato-retiniana como homogénea, o transporte activo como desprezável e o vítreo intacto. Assim, o coeficiente de difusão

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

(D) e a permeabilidade (P) são consideradas constantes [CCK85, DBLA89, LAKCL85, LDLA90, SLMLA01]. Foram corridas diversas simulações para vários valores para o coeficiente de difusão e para o valor de permeabilidade. Para a simulação mostrada (figura 3.30, página 86), os valores para D e P são, respectivamente, $9,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ e $22 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

Para o parâmetro D existem valores distintos publicados na literatura [CCK85, ZBCV83a, DBLA89] enquanto para P foi escolhido o valor médio do intervalo estabelecido em [LBSCV99].

A simulação considerou o intervalo de tempo de interesse ($t \in [0, 20]$) ainda que apenas numa percentagem diminuta de doentes possam ser obtidas imagens para tempos superiores a 16 *minutos* após a administração intravenosa de fluoresceína.

Os resultados para a simulação para 10, 15 e 20 *minutos* após administração do traçador e nas condições estabelecidas anteriormente podem ser observadas na figura 3.30 onde é claramente ilustrada a penetração da fluoresceína no vítreo ao longo do tempo e como o perfil mono-exponencial em função da distância à interface retina-vítreo (eixo dos z em μm) para o período de tempo considerado expressa razoavelmente o perfil obtido. Deste modo é possível incluir este modelo mono-exponencial no processo de desconvolução como sendo a melhor representação da distribuição da concentração de fluoresceína no vítreo.

Os círculos a cheio representam dados calculados e a linha representa o melhor ajuste obtido aos dados mostrados, os quais resultam nas seguintes expressões

$$\begin{aligned}y(x) &= 246,9 e^{-0,0074 x}, t = 10 \text{ minutos} \\y(x) &= 313,1 e^{-0,0059 x}, t = 15 \text{ minutos} \\y(x) &= 366,0 e^{-0,0051 x}, t = 20 \text{ minutos}\end{aligned} \quad (3.48)$$

Uma análise mais detalhada permite observar que o ajuste não é perfeito, que varia ao longo do tempo e que esta função embora razoável não integra todos os detalhes do perfil real. No entanto, este grau de exactidão é suficiente para a presente aplicação.

Com esta simulação, foi demonstrado que a curva esperada como perfil de concentração de fluoresceína no vítreo pode ser modelada por uma exponencial, cujos parâmetros podem ser estimados a partir dos dados para o intervalo de tempo considerado para a aplicação deste processo. O conjunto de simulações

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

efectuadas com a utilização de diversos valores para D e P suportam esta declaração.

Desconvolução

O perfil de intensidade de fluorescência medido pelo *HRA* não representa por si só a distribuição real da substância de contraste, mas sim o resultado da convolução desta com a função de resposta a impulso unitário do sistema. É por isso fundamental desconvoir cada um destes perfis de modo a recuperar a real distribuição de concentração de fluoresceína no vítreo.

Ainda que existam diversas metodologias para a desconvolução, esta aplicação tem particularidades próprias que necessitam de ser consideradas, a primeira das quais é o facto de existir um número muito reduzido de amostras, 32 como limite máximo teórico, sendo na realidade em número inferior como anteriormente mencionado. Outra reside no facto de não ser possível obter uma quantidade de fluorescência (e respectiva concentração) negativa, o que limita a valores não negativos a distribuição desta. Para além do mais, a curva de concentração no vítreo, tal como foi já estabelecida, deverá ser incluída no processo de desconvolução de modo a produzir um resultado de acordo com o modelo físico estabelecido.

De modo a observar estes condicionalismos, foi estabelecida a seguinte metodologia (procedimental):

- Estabelecimento do perfil da função de resposta a impulso unitário a partir dos parâmetros estimados com amostras a cada $50 \mu m$;
- Substituição do perfil medido pelo perfil filtrado para redução do ruído;
- Utilização de um processo iterativo que:
 1. inicialmente considere uma entrada hipotética como um vector de zeros (espaçados de $50 \mu m$ tal como na função de resposta a impulso unitário);
 2. efectue o cálculo da saída hipotética pela determinação da convolução entre a entrada hipotética e a função de resposta a impulso unitário;
 3. determine a interpolação (*spline*) desta saída hipotética para as posições do perfil medido;
 4. efectue o cálculo da diferença entre a saída teórica e o perfil medido;

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

5. determine a interpolação linear entre a saída teórica e o perfil medido;
6. actualize a entrada teórica com uma fracção do erro (λ);
7. verifique a existência de valores negativos de concentração (para a entrada teórica);
8. determine a localização do máximo da versão actualizada da entrada teórica (considerada a localização do interface retina-vítreo);
9. coloque o foco nesta localização com a actualização do respectivo valor com 50% da actualização anterior;
10. garanta a diminuição do perfil com o aumento da distância para a interface retina-vítreo (localização no vítreo) a partir da localização anterior;
11. obtenha o melhor ajuste de uma exponencial aos dados;
12. substitua os dados pelos valores calculados pelo ajuste exponencial;
13. repita os passos (2)–(12) deste processo até ao máximo de iterações ou até a diferença entre a saída medida e a saída teórica seja inferior a 5%.

Este processo determina a definição do interface retina-vítreo como sendo a localização do pico (valor máximo) no sinal desconvoluido, localização a partir da qual o sinal deve obedecer a uma exponencial cujo valor decresce com o aumento da distância à interface retina-vítreo.

Para o mapeamento da área do fundo ocular coberta pela aquisição, este processo de desconvolução necessita de ser repetido para cada um dos píxeis da imagem do fundo ocular.

Modelo físico da retina

O varrimento efectuado pelo *HRA* durante a aquisição volumétrica do fundo ocular, considerando uma profundidade de 7 *mm* tal como estabelecido no protocolo, significa a existência de planos confocais no vítreo, na retina e na coróide.

A figura 3.31 (página 87) mostra que o perfil desconvoluido não consiste num único impulso como representação da retina, mas antes num trem de impulsos.

A localização do interface retina-vítreo é aqui considerada como a localização do impulso de maior amplitude do sinal desconvoluido, tal como já mencionado na secção anterior. O trem de impulsos desde esta localização para a direita traduzem

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

as leituras efectuadas no interior do vítreo, enquanto os impulsos localizados para a esquerda traduzem as leituras efectuadas na retina. As várias camadas que compõem a retina podem ser encontradas em [SHH86] e explicam a existência do trem de impulsos mostrado.

Quantificação do derrame de fluoresceína da circulação sanguínea para o humor vítreo

A fluoresceína presente no vítreo, para uma particular localização do fundo ocular correspondente às coordenadas (x, y) (mantendo a definição do sistema de coordenadas XYZ como anteriormente definido - página 69) é dada por

$$LU(x, y) = \int_{z_0}^{z_1} C_{vit}(x, y, z) dz, \quad (3.49)$$

onde $C_{vit}(x, y, z)$ é a concentração de fluoresceína no humor vítreo e LU são unidades de derrame (*leakage units*). Os valores típicos para os parâmetros z_0 e z_1 são, respectivamente, $100 \mu m$ e $1000 \mu m$, com $z_0 = 0$ a localização do interface retina-vítreo.

Interessa aqui analisar a expressão da equação (3.49) de modo a saber-se exactamente o que está a ser medido e as respectivas unidades.

Sendo $C_{vit}(x, y, z)$ a concentração, cujas unidade comuns na área de aplicação do método são ng/ml , estas correspondem efectivamente a $10^{-6} kg/m^3$ ($1 ng = 10^{-12} kg$ e $1 ml = 10^{-6} m^3$). Por outro lado, a concentração num particular ponto (x, y, z) , a que corresponde o valor $C_{vit}(x, y, z)$, traduz a concentração média de um volume $\Delta x \Delta y \Delta z$, com $\Delta x \Delta y$ função da resolução da imagem do fundo ocular e do ângulo de aquisição utilizado. Excepto num factor de escala, este volume elementar tem unidades de m^3 , donde resultam como unidades para $LU(x, y)$ o kg , o que significa que efectivamente estamos a medir a quantidade de massa que atravessa a barreira hemato-retiniana para uma particular localização do fundo ocular.

O modelo físico da difusão estabelecido anteriormente permite também determinar a expressão para $C_{vit}(x, y, z)$ como sendo da forma

$$C_{vit}(x, y, z) = k(x, y) e^{-\alpha(x, y) z}, \quad (3.50)$$

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

com $k(x, y) \geq 0$ e $\alpha(x, y) > 0$, $\forall x \in \{1, \dots, M\}$, $y \in \{1, \dots, N\}$, e $M \times N$ o tamanho da imagem do fundo ocular. Os valores de $k(x, y)$ e $\alpha(x, y)$ são obtidos pelo processo de desconvolução anteriormente descrito (página 81).

Os mapas de derrame são assim dados por

$$LU(x, y) = \frac{k(x, y)}{\alpha(x, y)} \left[e^{-\alpha(x, y) z_0} - e^{-\alpha(x, y) z_1} \right], \quad (3.51)$$

onde $k(x, y)$ e $\alpha(x, y)$ são obtidos pelo ajuste de uma exponencial ao perfil desconvoluído correspondendo a medições efectuadas no interior do vítreo (fazendo já parte do próprio processo de desconvolução) para as coordenadas (x, y) da imagem do fundo ocular.

Resultados

Para o teste do sistema aqui apresentado foram seleccionadas uma série de situações clínicas típicas e já caracterizadas em estudos prévios [LBSCV99] de acordo com o seguinte agrupamento:

- Voluntários saudáveis, situação de controlo: três olhos de voluntários saudáveis de diferentes grupos etários;
- Olhos com fluorescência endógena: três olhos com depósitos lipídicos (*drusa*);
- Olhos com alterações da barreira hemato-retiniana: três olhos com retinopatia diabética não-proliferativa;
- Olhos com alterações claras da barreira hemato-retiniana: dois olhos sujeitos a fotocoagulação por *laser* de Árgon.

Os resultados da aplicação da metodologia aqui desenvolvida a casos com diferentes níveis de alteração da barreira hemato-retiniana são mostrados na figura 3.32 (página 88), em que as imagens correspondentes ao fundo ocular se encontram à esquerda e os respectivos mapas de derrame de fluoresceína à direita. Estes 4 casos correspondem ao esperado em função de cada uma das situações representadas e permitem por isso a verificação do desempenho do sistema com casos típicos e bem caracterizados. O sistema foi ainda testado

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

numa série de doentes com retinopatia diabética (diabetes tipo 2) com resultados de acordo com a evolução esperada da doença.

Deve ser chamada a atenção para o facto dos mapas mostrados com uma falsa escala de cores representarem o derrame tal como definido em (3.49), i.e. o integral de z_0 a z_1 , com $z = 0$ a posição do interface retina-vítreo definida como sendo a posição de maior amplitude do sinal desconvoluido. Cada um destes perfis representa a distribuição da intensidade de fluorescência ao longo do eixo óptico uma vez que não foi efectuada qualquer conversão para equivalentes de concentração.

Para os olhos com a barreira hemato-retiniana intacta, os olhos de voluntários saudáveis e os olhos com depósitos lipídicos (*drusa*), tornou-se clara a relativa independência do sistema para o nível de fluorescência do fundo ocular na medição da quantidade de derrame, e que este quantifica apenas a quantidade de fluorescência relativa às medições efectuadas no interior do vítreo e não na rede vascular/retina. O facto de qualquer dos mapas não ser puramente homogéneo, mostrando focos de derrame na vizinhança de alguns vasos, deve-se a que mesmo com a função da barreira hemato-retiniana intacta ocorrer algum derrame devido à dimensão das moléculas da fluoresceína.

Particularmente significativo é o facto de olhos com múltiplos depósitos lipídicos, e por isso com elevada autofluorescência, mostrarem valores de derrame dentro dos limites determinados para os olhos com a barreira hemato-retiniana intacta.

Os olhos com retinopatia diabética não-proliferativa mostraram claramente um aumento do derrame de fluoresceína da circulação sanguínea para o humor vítreo (figura 3.32-c)).

Por outro lado, a fotocoagulação focal induz alterações profundas e localizadas da barreira hemato-retiniana, tendo os mapas de derrame dos olhos sujeitos a fotocoagulação de *laser* Árgon mapeado clara e significativamente essas mesmas alterações.

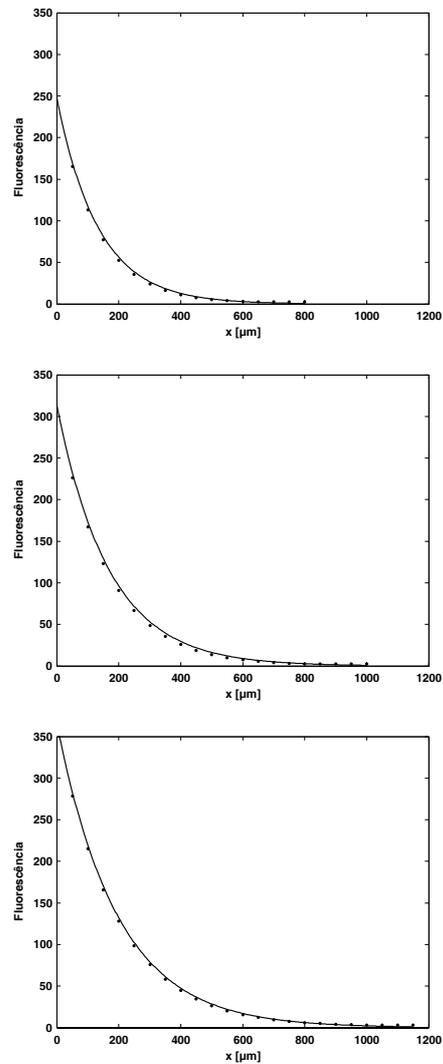


Figura 3.30: Resultado do processo de simulação do derrame de fluoresceína para o humor vítreo para 10, 15 e 20 *minutos* após "administração" (de cima para baixo). O eixo dos z mostra a distância ao interface retina-vítreo ($z = 0$) em μm . Os pontos mostram os valores calculados e as linhas os melhores ajustes exponenciais simples. É notória a penetração de fluoresceína para o vítreo ao longo do tempo.

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

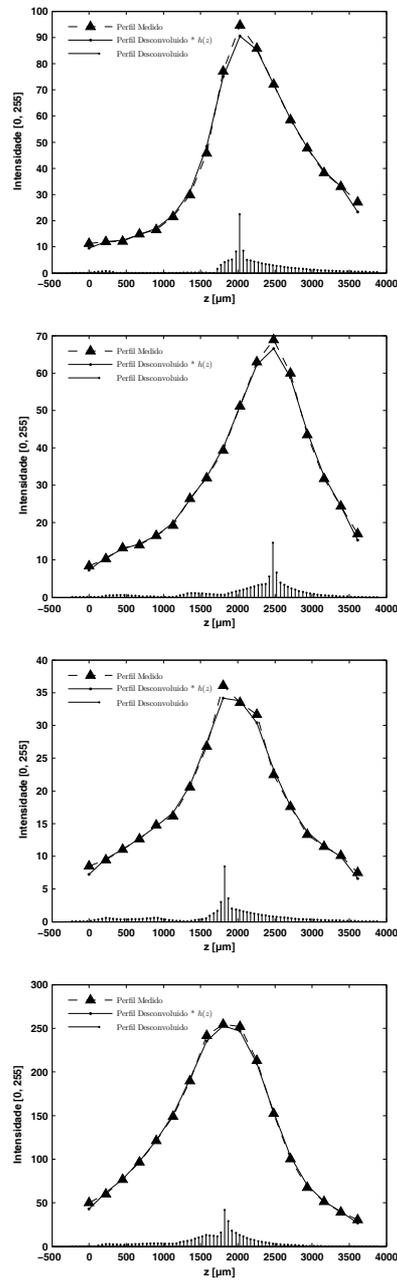


Figura 3.31: Resultado do processo de desconvolução para quatro casos distintos, sendo notória a maior penetração no caso do gráfico inferior. (Notar também a diferenças entre as escalas de intensidade).

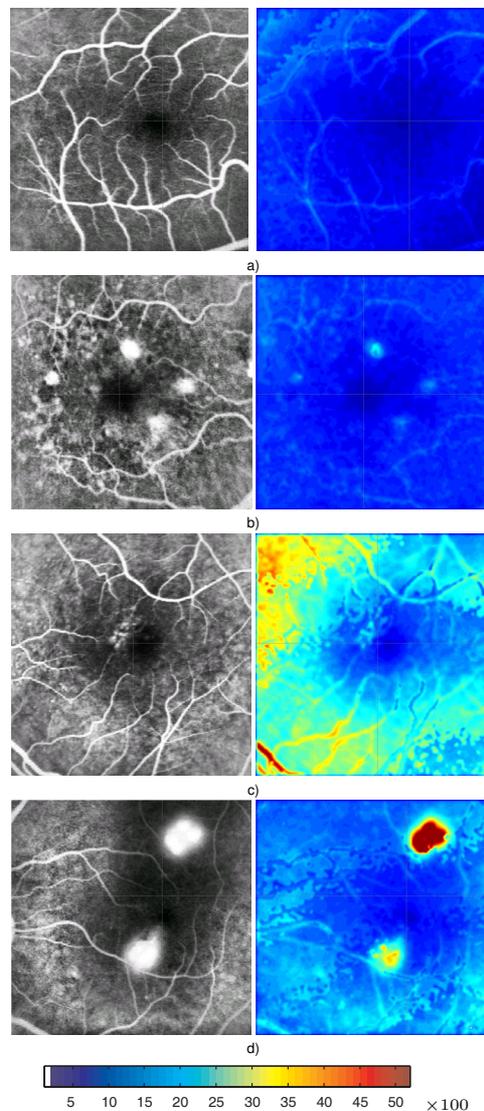


Figura 3.32: Resultados obtidos com o sistema de mapeamento de derrame de fluoresceína da circulação sanguínea para o humor vítreo e respectivas referências dos fundo ocular (com aumento de contraste local). a) Olho esquerdo de uma voluntária saudável de 35 anos (barreira intacta). b) Olho direito de uma mulher de 76 anos com pequenos *drusa* (barreira intacta). c) Olho esquerdo de uma doente de 62 anos com retinopatia diabética não-proliferativa. d) Olho esquerdo de uma doente de 46 anos com retinopatia diabética 3 dias após fotocoagulação *laser*.

3.2.2 Quantificação da fluorescência

Introdução à quantificação de fluorescência

A presente secção visa reportar o trabalho desenvolvido com vista à quantificação (objectiva) de uma das técnicas imagiológicas mais utilizadas em oftalmologia, a angiografia fluoresceínica. Deve no entanto salientar-se que embora este seja o ponto de partida, o processo desenvolvido pode ser efectivamente aplicado com claras vantagens a quaisquer sistemas baseados na medição de fluorescência, podendo inclusivamente ser utilizado com outros traçadores, o que está efectivamente em curso para a angiografia com verde de indocianina (*ICG*).

O princípio da fluorescência e os aspectos com interesse para este trabalho foram já abordados no início da secção 2.2 pelo que não serão aqui repetidos.

A técnica objecto deste desenvolvimento regista a presença do traçador no fundo ocular com a utilização de fontes de luz apropriadas, bem como de filtros de excitação e de emissão igualmente apropriados.

Embora a angiografia fluoresceínica seja uma técnica de diagnóstico muito importante para áreas como a retinopatia diabética (RD), a degenerescência macular ligada à idade (DMI) ou a neovascularização coroideia (NVC) [CWM⁺07, BY00], esta técnica tem como principal inconveniente o facto de não ser quantitativa e de estar por isso sujeita a interpretações que dependem do nível de conhecimento e experiência de um particular indivíduo.

Tal como referido em [CWM⁺07], a literatura é rica em relatórios de análises de angiografias fluoresceínicas e em métodos que visam tomar em consideração diversos factores com influência na imagem adquirida. Factores tão simples como o tempo de integração da imagem, o tempo equivalente à abertura do obturador de uma câmara fotográfica, e não fornecido pelos fabricantes dos equipamentos, têm um óbvio peso no resultado final se se pretender mais do que comparar entre diferentes regiões de uma mesma imagem de uma particular aquisição. Significa isto que múltiplos factores intrínsecos à diversa instrumentação e ao modo de operação condicionam em muito o resultado final e não existem correntemente processos capazes de lidar com os mesmos no sentido de os remover.

Estas limitações condicionam a comparação de angiografias fluoresceínicas entre laboratórios, entre equipamentos, entre doentes e mesmo entre visitas de um mesmo doente ainda que realizadas pelo mesmo técnico com recurso à mesma

instrumentação.

O objectivo deste trabalho é por isso de remover todos estes factores de variabilidade da técnica de modo a torná-la objectivamente quantitativa, significando isto que os valores quantitativos a reportar deverão ser dependentes da variabilidade atribuível ao doente e não à técnica. No entanto, isto é apenas apenas parcialmente realizável dado que a recuperação dos parâmetros intrínsecos da instrumentação e respectiva operação podem apenas ser aferidos até à saída do feixe de excitação e de novo após a entrada da resultante emissão. Ou seja, factores como o posicionamento do doente, o diâmetro da pupila e a transmitância dos meios oculares, entre outros, continuam a ter influência no resultado final e não poderão ser corrigidos. Ainda assim, o objectivo é válido e corresponde a um passo importante para a normalização dos dados recolhidos independentemente da origem relativamente à instrumentação utilizada e respectiva configuração.

Em suma, pretende-se com este trabalho permitir quantificar de modo objectivo a luz de fluorescência que atinge o fotodetector de uma particular instrumentação, usada para a realização de uma particular angiografia fluoresceínica, recuperando de forma completamente automática todos os parâmetros de utilização capazes de influenciar o resultado final, ao mesmo tempo que se toma em consideração a eficiência quântica da fluoresceína nos meios oculares, o plasmas e o vítreo.

A técnica a desenvolver deve ainda ser universal no sentido de ser passível de ser aplicada a instrumentação já existente de um modo minimamente invasivo para a mesma, a qual deverá manter as suas características básicas inalteradas bem como o seu modo de funcionamento e protocolos de utilização, este um aspecto principal já que não obrigará à formação dos utilizadores, ao mesmo tempo que permite fazer uso da experiência acumulada.

A instrumentação em causa, e cuja aplicação no âmbito desta tese é a da aplicação em oftalmologia na prática clínica de investigação numa primeira fase, e na prática clínica generalizada numa segunda fase, consiste assim num oftalmoscópio com capacidade de realização de angiografia fluoresceínica, sistema já referenciado no final da secção 2.2 e na secção 3.2.1.

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

Métodos

Diversos factores contribuem para a alteração da quantidade de fluorescência proveniente da fluoresceína sódica, tais como a concentração, o motivo óbvio e que traduz a informação pretendida para o método de diagnóstico em causa, a temperatura, o pH (potencial hidrogeniónico) e o próprio meio onde esta substância de contraste se encontra presente.

Perante estes factos, qualquer que seja a solução deste problema terá de se demonstrar a invariabilidade da solução de fluoresceína para as condições de aplicabilidade à prática clínica, bem como da sua origem relativamente à sua produção e que a aferição das características de fluorescência são independentes onde são obtidas, pelo que laboratórios distintos e utilizando equipamentos distintos obterão essencialmente as mesmas características para uma solução equivalente. Só na posse destes dados valerá a pena resolver o restante processo.

Uma dificuldade adicional em todo este processo resulta da não existência de uma solução de fluoresceína padrão a partir da qual outras soluções possam ser aferidas relativamente às respectivas características. Existe no entanto um conjunto muito diminutos (de apenas algumas doses) de uma solução *padrão* (*NIST SRM 1932 - NIST Standard Reference Material 1932*) disponível no *NIST* (*National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, EUA*), uma entidade de reconhecida competência no estabelecimento de padrões internacionalmente aceites. Sendo este um trabalho realizado no decurso de um projecto internacional e com ambições globais, é exigível que qualquer solução fornecida obedeça a princípios aceites internacionalmente.

Deste modo, foi realizado um ensaio multicêntrico que englobou a obtenção das características de fluorescência de soluções de fluoresceína proveniente de diversos fabricantes, tendo sido efectuadas medições na Universidade de Coimbra, no próprio *NIST* e na empresa *ThermoFisher Scientific (Portsmouth, NH, EUA)*.

Foram utilizadas diversas soluções com concentrações entre os 0,1 e os 1000 *ng/ml* em *PBS* (*phosphate buffered saline*) com pH 7,4 e com medidas de emissão nos 510 *nm*. Todas as leituras foram normalizadas para o *NIST SRM 1932* de modo a permitir a respectiva comparação.

Os resultados obtidos, que podem ser vistos nas figuras 3.33 a 3.35, demonstram a rastreabilidade das várias fontes de fluoresceína a este *padrão* [SMA⁺07].

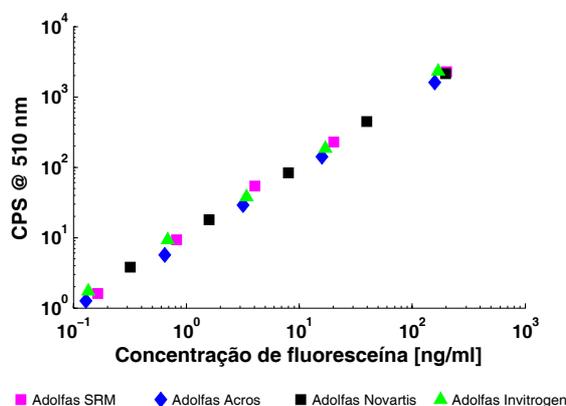


Figura 3.33: Dados *NIST*.

Dos dados, pode concluir-se que os mesmos são comparáveis considerando todas as potenciais fontes de erro, desde a pesagem aos processos de diluição, o que valida as diferentes fontes de fluoresceína incluindo a forma injectável.

Foi ainda no decurso deste estudo verificada a dependência da fluorescência com o pH, como se mostra na figura 3.36, com o pH entre os 5,0 e os 10,0 e que mostra o mesmo comportamento para as três fontes testadas.

Outro teste importante relativamente às soluções de fluorescência é a identificação da dependência do nível de fluorescência com o meio na qual estas se encontram, por forma a determinar a eficiência quântica no plasma e no vítreo.

Com recurso a um espectrofluorímetro, foram realizadas medições com múltiplas soluções de múltiplas concentrações e com diferentes pH's. Na sequência destes testes foi possível simular ambos os meios oculares utilizando *PBS* evitando deste modo recorrer ao plasma e vítreo humanos, utilizados apenas durante a fase exploratória dos testes mencionados.

Devido ao facto das células de calibração terem de ser expedidas entre continentes, foi ainda considerado um novo factor com vista à estabilidade das soluções. Por este motivo, foram realizados estudos complementares para a utilização de soluções sob a forma de gel em substituição da forma líquida, que além de permitir melhorar a estabilidade da solução evitam a evaporação à temperatura ambiente.

Juntando todos estes resultados, foi possível afinar um conjunto de soluções

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

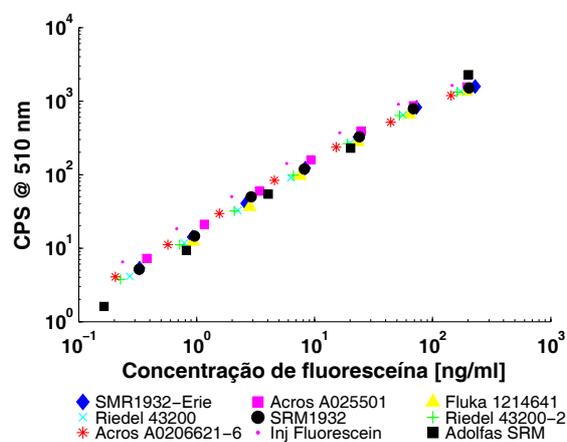


Figura 3.34: Dados *ThermoFisher*.

que com as respectivas concentrações e pH's permitem simular os meios oculares relativamente à respectiva fluorescência, sem recurso a quaisquer componentes biológicos humanos.

Até este ponto apenas foi aferida a possibilidade de efectuar medições de fluorescência a partir de soluções de fluoresceína sódica, faltando no entanto o desenvolvimento de todo o processo conducente à sua quantificação

A exequibilidade deste processo depende assim de uma solução em que o factor traçador está já colocado de parte.

Interessa agora resolver o problema de calibrar automaticamente um qualquer oftalmoscópio para uma particular aquisição. Para além desta calibração, interessa também aferir as condições do sistema durante o processo de aquisição, o que tem como implicações práticas não apenas a recuperação de um factor de ganho (variável e ajustável pelo utilizador) mas também saber qual a concentração mínima que uma particular configuração permite medir, i.e. a partir de que valor do sinal se está efectivamente a medir fluorescência e por conseguinte todos os valores inferiores estão ao nível do ruído, para além de outros factores de interesse para a instrumentação, e finalmente, a conversão de unidades arbitrárias em unidades de concentração, e.g. *ng/ml*.

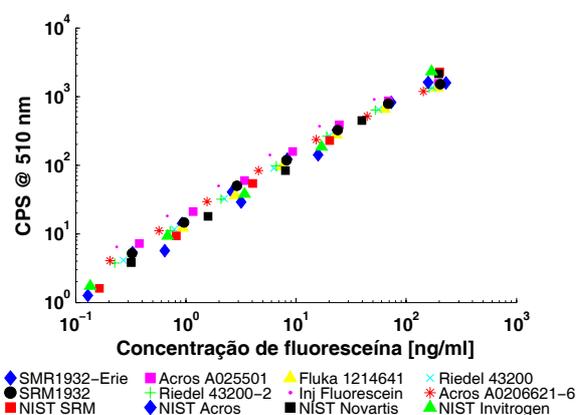


Figura 3.35: Dados *Universidade de Coimbra, NIST e ThermoFisher*.

Instrumentação

Neste trabalho foi usado o *oftalmoscópio confocal de varrimento laser Heidelberg Retina Angiograph (HRA versão clássica – Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Alemanha)*, embora o princípio desenvolvido possa ser aplicado a outros modelos e inclusive a qualquer sistema de imagem epiluminescente.

O sistema de aquisição de imagem do fundo ocular utilizado é assim um sistema que alia as propriedades confocais com as propriedades de varrimento *laser*. Das suas características, com significado para o trabalho aqui apresentado, fazem parte a obtenção de um conjunto de planos confocais, características estas que foram já apresentadas na secção 3.2.1 e que podem ser consultadas em [BDCV05].

A solução para o problema reside precisamente na possibilidade de efectuar medições em planos confocais distintos ao longo do eixo óptico. Esta característica permite-nos colocar o sistema de padrões de fluorescência num plano confocal distinto do objecto de interesse, a retina, e deste modo obter numa mesma aquisição a informação proveniente de ambos.

Para uma aquisição simultânea é assim necessário um sistema divisor de feixe que permita dividir o feixe de excitação de modo a dirigir um dos feixes resultantes para a nossa amostra biológica, que no caso da presente aplicação consiste numa retina humana e *in vivo*, e o segundo feixe para um sistema de padrões.

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

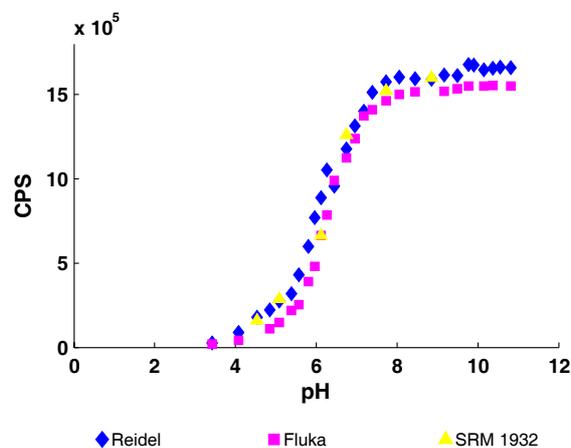


Figura 3.36: Dependência da fluorescência com o pH.

Este sistema de padrões terá necessariamente de simular a presença de fluoresceína em ambos os meios oculares, bem como o pH padrão. Deve ainda permitir a determinação do limite inferior de detecção e possuir uma distribuição de concentrações capazes de abranger uma parte significativa da gama dinâmica do sistema, sem no entanto colocar o sistema em risco frequente de saturação, i.e. os maiores valores de concentração a serem amostrados devem ser tais que na generalidade das situações do dia-a-dia não saturem para as condições de aquisição exigíveis para uma larga percentagem de doentes.

Destas considerações resulta a necessidade de obter uma célula de calibração composta por vários compartimentos individuais, cada um dos quais deverá conter uma solução de fluoresceína de concentração conhecida e que simula um particular meio do fundo ocular. Um dos compartimentos deverá ser composto por uma solução de concentração nula, para a detecção do nível do sinal na ausência de fluoresceína e pelo menos dois outros compartimentos deverão existir de modo a proporcionar uma recta de calibração. De facto, optou-se pela existência de 4 destes compartimentos seguindo uma progressão geométrica (de razão 2) de valores de concentração de modo a cobrir a gama de leituras possíveis para as condições anteriormente especificadas.

Resulta assim, que uma célula de calibração deverá conter 5 compartimentos para a simulação de um dado meio ocular o que significa um total de 10 compar-

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

timentos considerando a existência do plasma e do vítreo como meios onde se pode verificar a presença de fluoresceína, o primeiro dos quais se deve à própria administração do traçador e o segundo se deve ao derrame desta através da barreira hemato-retiniana.

A demonstração inicial do conceito e da exequibilidade da solução proposta foi realizada construindo o protótipo mostrado na figura 3.37 o qual é composto apenas por um adaptador para fixação ao porto de saída do *HRA* (porto óptico), um divisor de feixe e uma régua onde é possível ajustar a distância entre a célula de calibração e o divisor de feixe e assim colocar a célula de calibração no plano confocal de interesse, que estará naturalmente dentro dos limites de aquisição do oftalmoscópio mas num plano confocal distinto do plano confocal da retina.

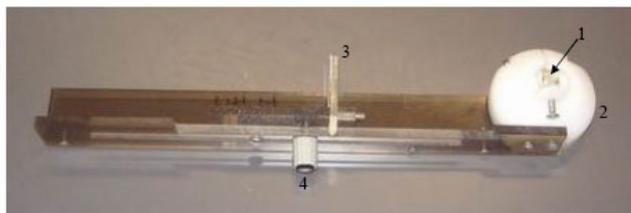


Figura 3.37: Adaptador protótipo para *HRA* clássico composto por: 1 – divisor de feixe; 2 – adaptador de fixação ao porto óptico; 3 – célula de calibração; 4 – ajuste da posição da célula de calibração.

Com este arranjo óptico, faz-se uso do mesmo feixe de excitação, do mesmo sistema de varrimento e do mesmo fotodetector. Todos estes aspectos permitem assegurar as mesmas condições de aquisição, dada a simultaneidade da aquisição na amostra e na célula de calibração, o que coloca agora o problema da separação das fontes de informação já que para as posições das imagens a que correspondem leituras nos vários compartimentos existe sobreposição com a contribuição do fundo ocular. Este aspecto será abordado mais à frente.

Na figura 3.38 é possível observar a colocação deste protótipo no *HRA* e na figura 3.39 é possível observar as imagens obtidas com uma célula de calibração de teste, usando duas compensações ópticas que permitem simular as condições de aquisição em olhos com potências ópticas distintas. É notório o deslocamento

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

da imagem da célula de calibração entre planos confocais para a sequência mostrada.



Figura 3.38: Adaptador protótipo instalado no *HRA* clássico.

Deve salientar-se que o protótipo mostrado se adapta externamente ao *HRA* sem haver lugar a qualquer modificação no seu sistema óptico original. O divisor de feixe utilizado é um divisor cúbico de banda larga (*Melles-Griot 03BSC003*) com um rácio de 50/50 e uma transmitância de 45%. Não foram empregues ou removidos quaisquer elementos de óptica refractiva (lentes), cumprindo assim o requisito de obter um sistema minimamente invasivo do ponto de vista da instrumentação base existente.

Importa no entanto chamar aqui a atenção para o facto deste arranjo óptico implicar a redução em 50% do feixe de excitação, bem como de outros 50% da luz de fluorescência emergente do fundo ocular, antes desta atingir o fotodetector. Se relativamente à atenuação do feixe de excitação esta pode ser compensada pelo aumento de potência do *laser*, na exacta proporção da atenuação, já relativamente à atenuação da luz de emissão nada se pode fazer, uma vez que não constitui opção um aumento compensatório da potência de excitação por motivo de potência máxima admissível na retina.

Esta foi efectivamente a solução adoptada para evitar uma redução a 25% no sinal adquirido, relativamente às condições normais de funcionamento do sistema na sua configuração original, ainda que tal fosse aceitável.

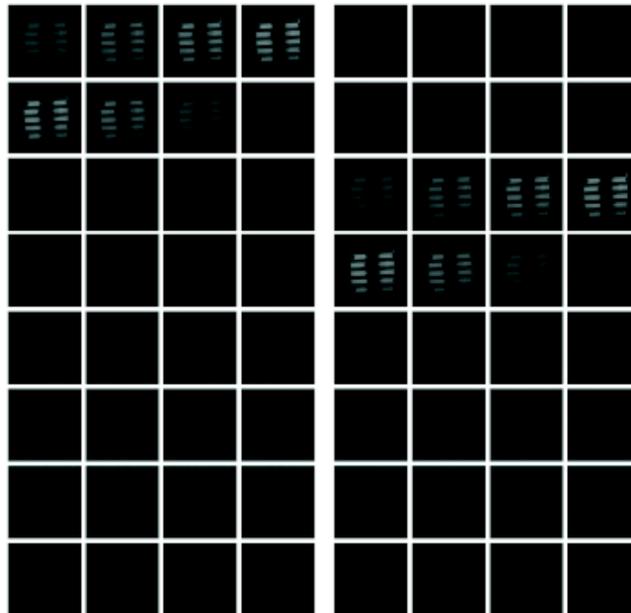


Figura 3.39: Imagens de célula de calibração com -3 e +3 dioptrias mantendo a posição da célula de calibração inalterada. Deve notar-se o deslocamento nas imagens ao longo dos 32 planos confocais da sequência da esquerda para a sequência da direita (~ 8 planos confocais).

A demonstração do conceito é evidente na figura 3.40 com o fundo ocular e a célula de calibração a serem mostradas numa mesma sequência que corresponde a uma única aquisição.

Por outro lado, a figura 3.41 mostra a separabilidade das fontes de informação.

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

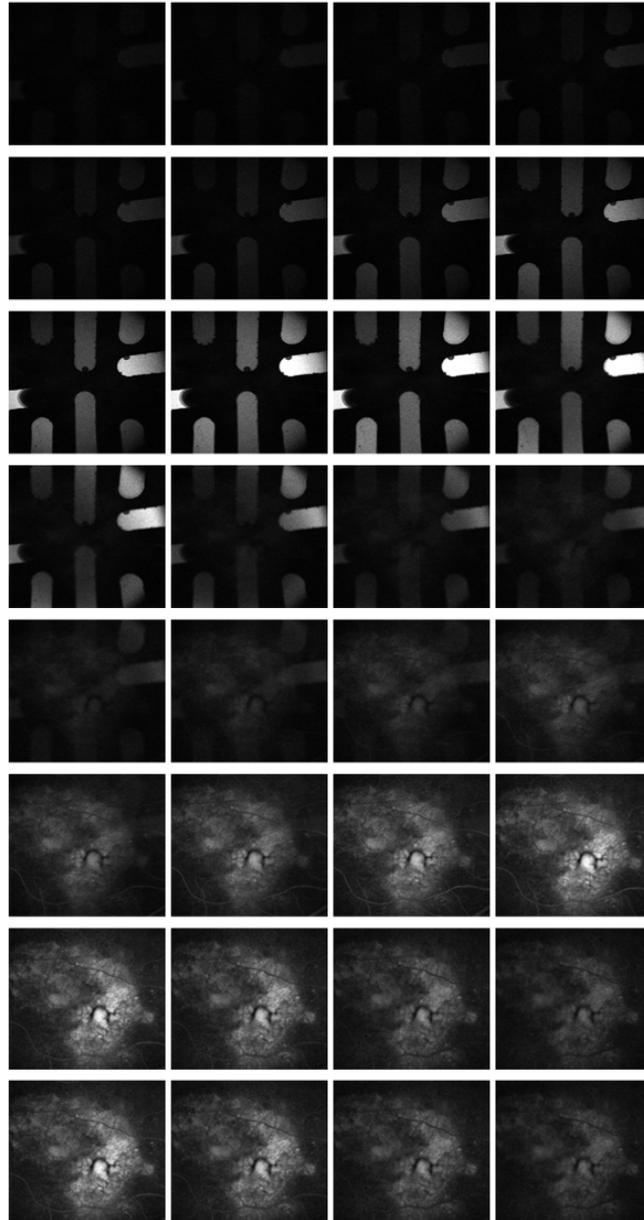


Figura 3.40: Na sequência (da esquerda para a direita e de cima para baixo) é possível identificar a célula de calibração (linhas 2 a 4) e o fundo ocular (linhas 6 a 8).

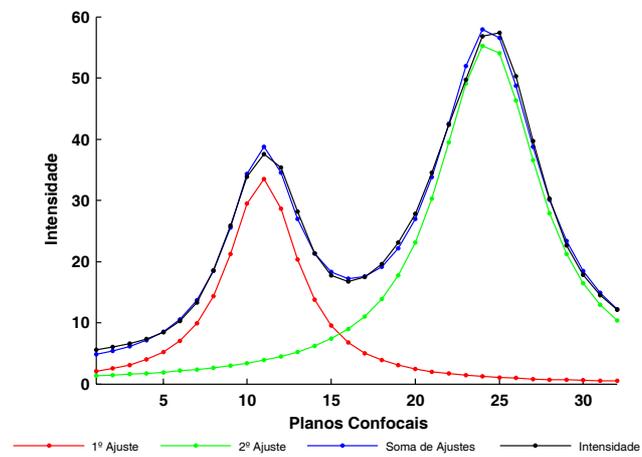


Figura 3.41: Os perfis mostram a contribuição de cada um dos objectos, o fundo ocular e a célula de calibração, a que correspondem o pico de intensidade da esquerda e da direita, respectivamente (curva a preto). O resultado do ajuste de duas *Lorentzianas* (curva a azul), a contribuição devida apenas à célula de calibração (curva a verde), e a contribuição devida ao fundo ocular (curva a vermelho).

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

Células de calibração

Ainda que possa parecer uma questão marginal e de menor importância, existe uma dificuldade na concepção das células de calibração relativamente ao seu processo de construção cuja realização física foi responsabilidade da *ThermoFisher Scientific*.

Inicialmente as células de calibração foram construídas colando duas superfícies de vidro especial, de elevada transmitância para os comprimentos de onda da luz de fluorescência (ver secção 2.2), sendo uma das partes maquinada de modo a esculpir sulcos mais tarde preenchidos com as soluções pretendidas. Depois de maquinada uma das partes, as duas metades sofrem um processo de colagem seguido da respectiva secagem.

Após os primeiros testes tornou-se notória a diminuição da fluorescência com tempo, dependência essa que mais tarde e no seguimento de variadíssimos testes se provou ser devida à cola utilizada e a um processo de secagem imperfeito. Ainda que muitas soluções tenham sido ensaiadas, com secagens prolongadas sobre radiação ultravioleta, não foi possível evitar o efeito da dependência temporal, o que levou à necessidade de uma nova abordagem.

Variadíssimas soluções e geometrias foram utilizadas ao longo do processo de desenvolvimento pelo que as imagens mostrarão diferentes geometrias, sendo que o princípio de funcionamento se mantém inalterado.

A decisão final foi a de se utilizarem tubos capilares colados sobre um substrato cuja função se reduz a manter a geometria pretendida. Ainda assim, embora os problemas de dependência temporal do nível de fluorescência tenham sido reduzidos, novos problemas surgiram com a selagem destes mesmos capilares, que na versão mais recente das células de calibração consistem em micro-tampões de silicone posteriormente fixadas (externamente e por isso sem contacto com a solução) com cola de resina de epoxi.

Como anteriormente mencionado, estas células de calibração são compostas por 10 compartimentos (tubos capilares com 1 mm^2 de secção recta interna), divididos em dois conjuntos de 5 compartimentos cada, um simulando o plasma e o outro simulando o vítreo, o qual é essencialmente composto por ácido hialurónico.

Foram deste modo estabelecidas as concentrações especificadas na tabela 3.2.

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

Tabela 3.2: Concentrações (em *ng/ml*) utilizadas nos vários compartimentos das células de calibração e respectivos pH's.

Compartimento #	Plasma [pH 5,5]	Compartimento #	Vítreo [pH 7,3]
1	2400	6	800
2	1200	7	400
3	600	8	200
4	300	9	100
5	0	10	0

O aspecto de um dos modelos de células de calibração utilizados ao longo do processo de desenvolvimento pode ser visto na figura 3.42.



Figura 3.42: Aspecto do modelo de uma das múltiplas versões de células de calibração utilizadas ao longo do processo de desenvolvimento. Os compartimentos 1 a 5 contêm soluções que simulam o soro e os compartimentos 6 a 10 contêm soluções que simulam o vítreo.

A fluorescência no vítreo e no plasma

Uma vez que existem dois meios oculares distintos, interessa saber quais as respectivas eficiências quânticas relativamente à fluorescência proveniente de uma solução de fluoresceína sódica nesses mesmos meios.

Foi por isso determinada a relação entre as medidas de fluorescência para esses meios pelo rácio entre os valores máximos obtidos para os respectivos espectros, medidos num espectrofluorímetro *SPEX Fluorog 1681 Spectrometer*,

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

utilizando para excitação o comprimento de onda apropriado à aplicação em causa ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$) e efectuando as medições a 510 nm (λ_{em}).

Foi assim determinada a relação de fluorescência de 1:3,6 do vítreo para o plasma, relação esta que será agora tomada em conta para todas as medições efectuadas nestes meios.

A figura 3.43 mostra os espectros obtidos para ambos os meios e para uma solução PBS (STSF - Solução-Tampão Salina de Fosfatos).

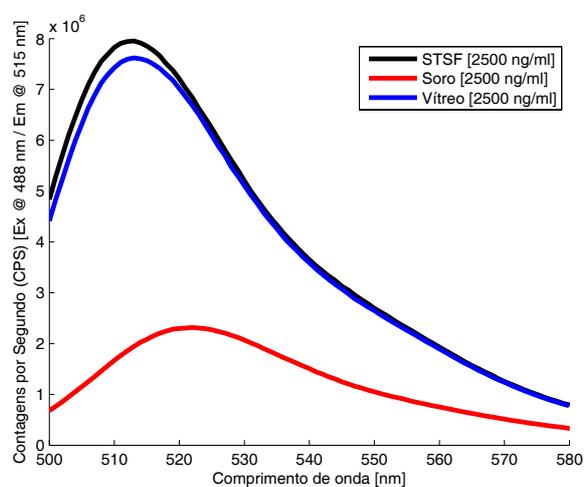


Figura 3.43: Espectros de emissão de fluoresceína sódica em STFS, plasma e vítreo.

Desenvolvimento de instrumentação para a calibração automática de oftalmoscópios confocais

Após a demonstração do conceito e da exequibilidade do sistema, foi desenvolvido um novo adaptador já com uma concepção mais elaborada, mantendo contudo os princípios básicos que permitiram solucionar o problema inicial.

A figura 3.44 mostra as partes constituintes deste novo sistema, cuja versão já na sua forma final pode ser observada na figura 3.45.

Esta versão é agora composta por um divisor de feixe, tal como na versão anterior, e contém uma nova lente colocada entre o divisor e a célula de calibração



Figura 3.44: Componentes de um adaptador para o *HRA* clássico (os adaptadores para o *HRA* modelo 2 são em tudo semelhantes excepto no sistema de fixação ao porto óptico).

de modo a permitir a correcta focagem da mesma e de modo a proporcionar a visualização de toda a área contendo os compartimentos da célula de calibração.

Este sistema dispõe ainda de um adaptador de modo a aferir a proporção entre os feixes resultantes do divisor de feixe, que em teoria será de 1:1, mas que necessita de ser aferido para cada divisor de feixe utilizado e em caso de necessidade afectar as respectivas medidas do factor correspondente.

Nesta implementação, o adaptador pode ser rodado até posições fixas de modo a evitar o contacto com os doentes, existindo assim uma posição para obter imagens do olho direito e uma posição para a obtenção de imagens do olho esquerdo.

Na figura 3.46 é mostrado o sistema instalado no *HRA* com o adaptador no modo de aferição do divisor de feixe, sendo visíveis duas células de calibração, uma em cada braço do sistema. Em duas aquisições, com a troca de posição das células de calibração, é determinada a razão entre as intensidades de cada um dos feixes.

Resolvido o problema do *hardware*, é agora necessário desenvolver o processo de extracção dos dados de calibração. Estes irão posteriormente ser

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria



Figura 3.45: Adaptador para o *HRA* clássico com e sem sistema de calibração do divisor de feixe, imagem superior e inferior, respectivamente.

utilizados na conversão das imagens de fluorescência (em unidades arbitrárias) em imagens cujas unidades são de concentração, i.e. o valor de cada píxel representa agora o valor de concentração de fluoresceína na amostra.

Por questões de facilidade de utilização, o *software* foi desenvolvido como um *plugin* para o *EyeExplorer Software*, o sistema de gestão de informação do *HRA*.

Quando observada pelo sistema de aquisição, uma célula de calibração (do tipo *J*, um dos vários tipos utilizados) tem a distribuição dos respectivos compartimentos na imagem como mostrado na figura 3.47.

A identificação de cada compartimento numa imagem é determinada por um processo de correlação-cruzada da mesma com uma imagem binária correspon-

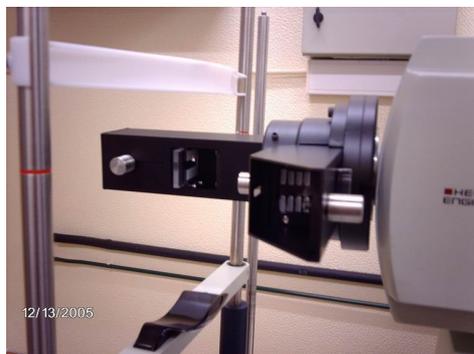


Figura 3.46: Adaptador instalado no *HRA* clássico em modo de calibração do divisor de feixe e onde são visíveis duas células de calibração (uma em cada braço do sistema). A posição mais à esquerda corresponde à posição de colocação de um doente a analisar.

dente à definição da célula de calibração, existindo uma máscara (imagem binária) para cada tipo de célula de calibração utilizada.

Determinado o plano confocal correspondente à leitura da célula de calibração e a localização da célula de calibração na imagem respectiva, é assim possível determinar as leituras correspondentes a cada um dos compartimentos e que são consideradas como o maior valor médio de uma área de 10×10 píxeis.

Este processo é obviamente efectuado após se proceder à separação das fontes como acima referido e mostrado na figura 3.41.

Vão assim ser correlacionadas as medidas de intensidade (em unidades arbitrárias) com os respectivos valores de concentração, para cada um dos meios oculares, de acordo com os valores da tabela 3.2.

O processo de calibração é independente de qual o meio em análise e consiste em obter o melhor ajuste aos dados (intensidade vs. concentração).

Por razões históricas que se prendem com os processos utilizados na citometria de fluxo, uma técnica utilizada para contar e analisar as características moleculares de partículas microscópicas, que sofreu um processo de quantificação e análise semelhante ao aqui implementado, todo o processo que correlaciona leituras e concentrações é transferido para o espaço $\log - \log$.



Figura 3.47: Esquema da célula de calibração vista pelo sistema para a posição *olho direito* e respectiva numeração dos compartimentos. Para o olho esquerdo a imagem será simétrica relativamente ao eixo horizontal.

A quantificação de angiografias fluoresceínicas

O processo de determinação do melhor ajuste de uma recta a um conjunto de dados é normalmente entendida como a obtenção dos parâmetros que minimizam o erro quadrático médio para a variável considerada como independente. Este não corresponde, contudo, ao melhor ajuste, entendido como aquele que minimiza a soma das distâncias de todos os pontos à recta (figura 3.48).

Este ajuste pode assim ser obtido por um processo de optimização para a determinação dos parâmetros (m, b) , respectivamente o declive e o ordenada na origem, sendo este modelo utilizável uma vez que em caso algum iremos ter rectas do tipo $x = x_0$.

Da figura 3.48 obtém-se

$$\begin{cases} d_1^2 = (y_1 - y_i)^2 \\ y_1 = m x_1 + b \end{cases} \Rightarrow d_i^2 = (m x_1 + b - y_i)^2. \quad (3.52)$$

Por outro lado,

$$d^2 = d_1^2 \cos(\alpha), \quad (3.53)$$

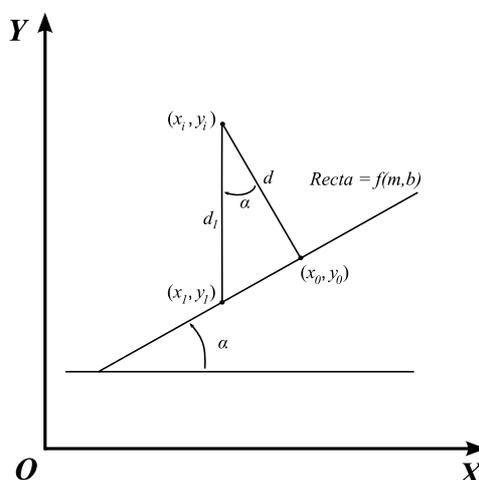


Figura 3.48: Melhor ajuste de uma recta a dados experimentais que minimiza a distância dos ponto à recta segundo a normal à mesma.

e

$$\cos^2(\alpha) = \frac{1}{\text{tg}^2(\alpha) + 1} = \frac{1}{m^2 + 1}, \quad (3.54)$$

donde

$$d_i = \sqrt{\frac{(b + m x_i - y_i)^2}{m^2 + 1}}. \quad (3.55)$$

Pretende-se assim estimar $\mathbf{v} = [m, b]$ que minimiza o erro dado por

$$\eta = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N d_i^2 \quad (3.56)$$

$$= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{(b + m x_i - y_i)^2}{m^2 + 1}, \quad (3.57)$$

com $N = 4$ o número de pontos e (x_i, y_i) os pares leitura/concentração.

A equação da recta assim determinada, o melhor ajuste aos dados segundo o critério da menor distância dos pontos à recta, é precisamente a recta de calibração que permite obter a conversão dos dados de unidades arbitrárias em unidades de concentração.

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

Uma vez na posse do melhor ajuste, podemos determinar os parâmetros de funcionamento do nosso sistema, definidos pela Linearidade (L), pela Janela de Análise, pelo Número de Décadas (N_D) e pelo Limiar de Detecção (L_D).

Antes da definição de cada um destes parâmetros devemos definir os seguintes conceitos (no espaço $\log - \log$):

- $x^{(i)}$ refere-se à abcissa do ponto i e corresponde a um valor de leitura na imagem;
- $y^{(i)}$ refere-se à ordenada correspondente a $x^{(i)}$ e corresponde a uma dada concentração;
- $x_{Proj}^{(i)}$ é a abcissa que satisfaz $m x_{Proj}^{(i)} + b = y^{(i)}$;
- $y_{Proj}^{(i)}$ é a ordenada que satisfaz $y_{Proj}^{(i)} = m x^{(i)} + b$.

Linearidade A linearidade do sistema é obtida determinando a diferença entre as leituras em cada compartimento e os valores esperados para essas leituras segundo a recta de calibração. A linearidade é assim dada por

$$L = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \text{abs} \left(\frac{10^{x^{(i)}} - 10^{x_{Proj}^{(i)}}}{10^{x_{Proj}^{(i)}}} \right), \quad (3.58)$$

podendo também ser expressa em valor percentual.

Janela de Análise A janela de análise do sistema define as concentrações mínima (y_{min}) e máxima (y_{max}) possíveis de determinar numa aquisição e que são função da configuração do sistema, e.g. ganho do fotodetector. Os respectivos valores são dados por

$$\begin{cases} y_{min} &= 10^b \\ y_{max} &= 10^{m \log(255)+b} \end{cases}, \quad (3.59)$$

o que significa que y_{max} é a projecção do valor de concentração a que corresponderia o valor máximo admissível para a imagem (255 com a codificação de 1 byte por píxel).

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

Número de Décadas O número de décadas é definido por

$$N_D = \log(y_{max}) - \log(y_{min}) . \quad (3.60)$$

Limiar de Detecção O limiar de detecção é definido pela menor concentração possível de medir para cada aquisição e corresponde à projecção na recta de calibração da leitura efectuada para o compartimento de concentração nula (c_0), i.e.

$$L_D = 10^{m \log(c_0) + b} . \quad (3.61)$$

Escala de cores

Embora estejamos a falar de valores quantitativos, pode optar-se pela utilização de uma escala de cores que permita uma melhor detecção de transições correspondente a pequenas variações de intensidade, i.e. de concentração, para além daquela proporcionada pela utilização de pseudo-cor. Por este motivo foi criada uma escala de cores não linear.

Assim, para uma mesma diferença de concentração, a alteração correspondente entre níveis de cor é superior para concentrações inferiores. A escala utilizada pode ser vista na figura 3.49.

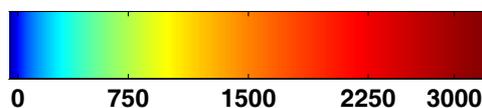


Figura 3.49: Escala de cores não linear para o mapeamento de concentrações.

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

Resultados

Resultou do processo desenvolvido a aplicação de uma patente provisória com o título *Method and Apparatus for Measuring Quantity of a Fluorochrome in a Biological Environment (U.S. Application number 60/867,933 - November 30, 2006)* [SCF⁺06] e a aplicação de uma patente definitiva *United States Patent Appl. Serial No. 11/946,933, November 30, 2007* com o mesmo título [SBFM07] (texto reproduzido no Apêndice C)⁷.

Como especificado, a aplicação do método desenvolvido permite converter unidades arbitrárias de fluorescência em unidades de concentração recorrendo à calibração para o respectivo meio de interesse, o plasma ou o vítreo.

A aplicação directa destes princípios pode ser vista na figura 3.50, onde se mostra um fundo ocular após administração da substância de contraste a a respectiva calibração para ambos os meios a partir do plano de maior intensidade (em ambas as conversões).

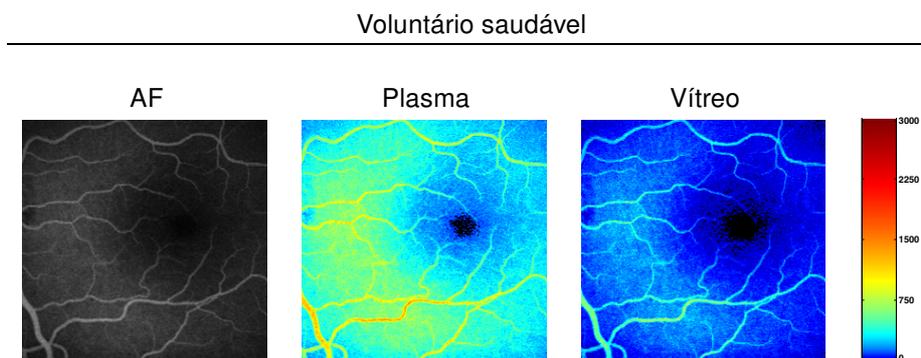


Figura 3.50: Conversão entre unidades arbitrárias (esquerda) e unidades de concentração no plasma e vítreo [ng/ml] de um voluntário saudável. Notar que os píxeis a preto nas imagens de concentração indicam que as leituras efectuadas se encontram abaixo do limiar de detecção

No entanto, recordando o processo desenvolvido na secção anterior, deve ter-se em conta que a leitura de fluorescência efectuada por uma câmara convencional, ou mesmo por um *oftalmoscópio confocal de varrimento laser*, faz a integração de informação ao longo de um dado percurso óptico, correspondendo

⁷Ver referência à patente final no capítulo Discussão (página 184).

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

à totalidade deste percurso no primeiro caso, ou apenas de parte no segundo, o que tem como implicação a soma das contribuições de ambos os meios, qualquer que seja o processo de leitura utilizado.

Pelo exposto, será de toda a vantagem utilizar o processo de desconvolução desenvolvido na secção anterior, permitindo deste modo a remoção de contribuições de planos confocais distintos e assim efectuar a calibração para cada um dos meios separadamente e para o plano confocal pretendido. Significa isto que o processo de desconvolução foi também alterado de modo a utilizar o factor de eficiência quântica relativa a cada um dos planos confocais ao longo do respectivo processo, conforme um dado plano confocal é considerado como correspondendo a leituras efectuadas no vítreo ou na retina (a que corresponde a calibração pelo plasma).

Os resultados seguintes, e ainda preliminares, incluem já estas considerações pelo que as imagens correspondentes ao plasma e ao vítreo significam o resultado da desconvolução no plano da retina e num plano do vítreo a $500 \mu m$ do interface retina-vítreo (figuras 3.51 a 3.54).

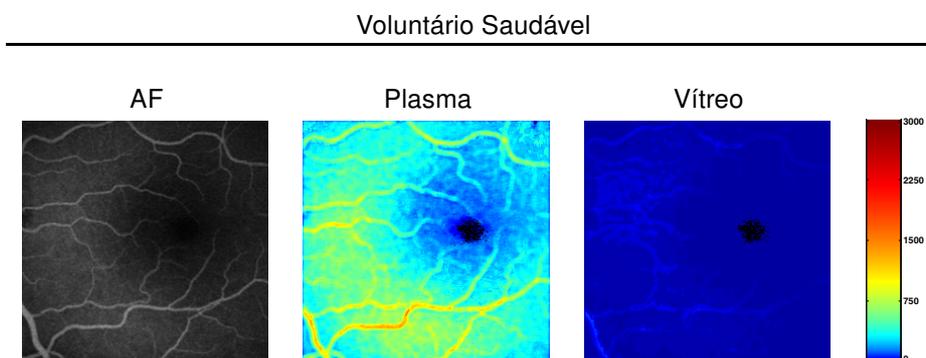


Figura 3.51: Conversão entre unidades arbitrárias (esquerda) e unidades de concentração no plasma e vítreo [ng/ml] (a $500 \mu m$ do interface retina-vítreo).

Os valores numéricos obtidos com alguns casos teste são mostrados na tabela 3.3, tendo tido em consideração os respectivos tempos de aquisição após administração da substância de contraste, a qual é biologicamente processada e eliminada como anteriormente referido.

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

Doente com Retinopatia Diabética

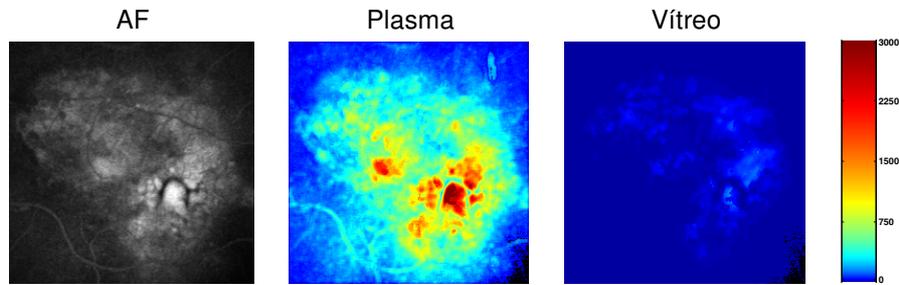


Figura 3.52: Conversão entre unidades arbitrárias (esquerda) e unidades de concentração no plasma e vítreo [ng/ml] (a $500 \mu m$ do interface retina-vítreo).

Doente com Neovascularização Coroideia

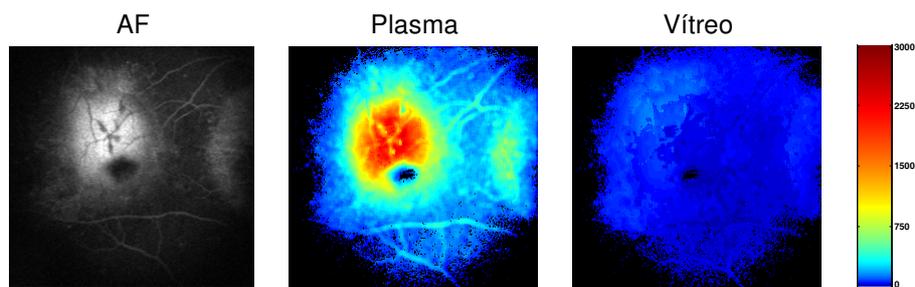


Figura 3.53: Conversão entre unidades arbitrárias (esquerda) e unidades de concentração no plasma e vítreo [ng/ml] (a $500 \mu m$ do interface retina-vítreo).

Notas finais

Os resultados aqui apresentados, foram obtidos na sua totalidade com recurso ao sistema óptico desenvolvido para o *HRA* modelos clássico e 2, sendo o sistema óptico constituído por um adaptador externo como mostrado ao longo desta secção.

Um desenvolvimento recente permitiu a inclusão de um novo tipo de célula de calibração no interior do *HRA* modelo 2, de tal modo que a mesma se encontra num plano conjugado da retina e por isso sempre co-focado com a mesma. Esta nova aproximação vai permitir eliminar a necessidade de qualquer adaptador óptico, sendo no entanto o princípio de funcionamento semelhante.

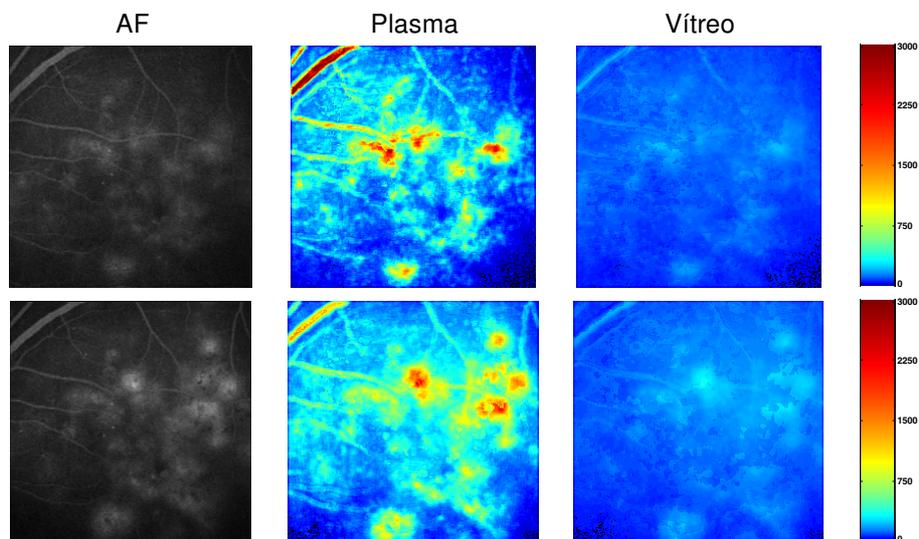


Figura 3.54: Conversão entre unidades arbitrárias (esquerda) e unidades de concentração no plasma e vítreo [ng/ml] (a $500 \mu m$ do interface retina-vítreo), antes e após fotocoagulação *laser*, respectivamente na linha superior e linha inferior.

O novo desenho da célula de calibração, mostrado na figura 3.55, tem os compartimentos contendo as soluções numa disposição que permite a obtenção da imagem do fundo ocular pela parte central da mesma. Deste modo, operando o sistema com um ângulo de aquisição de 30° é possível obter a mesma informação do fundo ocular que a obtida com os 20° habitualmente utilizados, e em simultâneo, obter as leituras provenientes dos 10 compartimentos da célula de calibração.

A mistura das fontes de informação não se verifica neste novo arranjo fazendo a célula de calibração opaca na parte voltada para o doente, evitando deste modo que o feixe de excitação atinja a retina quando direccionado para leituras na célula de calibração.

O software *OphTiCal*, desenvolvido como um *plugin* para o *EyeExplorer* pode ser parcialmente visto nas figuras 3.56 e 3.57, onde é possível observar a curva de calibração determinada automaticamente (figura 3.57) e o resultado da conversão

3.2 A angiografia fluoresceínica e a fluorofotometria

Tabela 3.3: Quantificação de fluorescência: resultados obtidos para condições clínicas típicas, onde Vaso, *Hiperfluo.* e Fundo significam, respectivamente, medições sobre um vaso, numa área hiperfluorescente e numa área não correspondente a nenhum dos casos anteriores. Vol. Saudável – Voluntário Saudável; RD – retinopatia diabética; NVC – neovascularização coroideia; pré-fotoc/pós-fotoc – pré/pós fotocoagulação *laser*.

	Plasma [ng/ml]			Vítreo [ng/ml]		
	Fundo	Vaso	<i>Hiperfluo.</i>	Fundo	Vaso	<i>Hiperfluo.</i>
Vol. Saudável	327	2514	–	5	37	–
RD	317	1084	8384	6	20	153
NVC	416	1124	5407	39	41	45
RD pré-fotoc	357	3059	4670	21	159	273
RD pós-fotoc	323	1606	4998	23	112	340



Figura 3.55: Novo modelo de célula de calibração para a quantificação de fluorescência sem recurso a adaptadores ópticos.

obtida, bem como os parâmetros de funcionamento do sistema para a aquisição correspondente à imagem mostrada.

Pode ainda ver-se o aspecto das células de calibração na nova configuração do sistema (figura 3.57), cuja vantagem final inclui a não necessidade de modificação da potência do *laser* uma vez que não há lugar a qualquer atenuação relativamente à configuração original do equipamento.

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

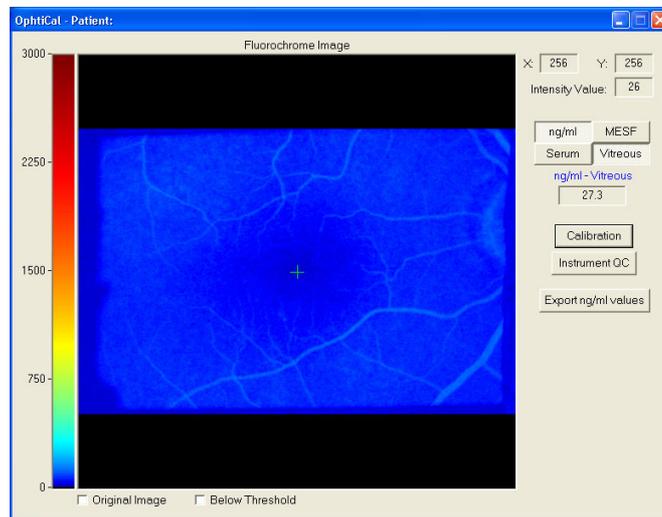


Figura 3.56: Imagem de concentração (*OphthiCal* software).

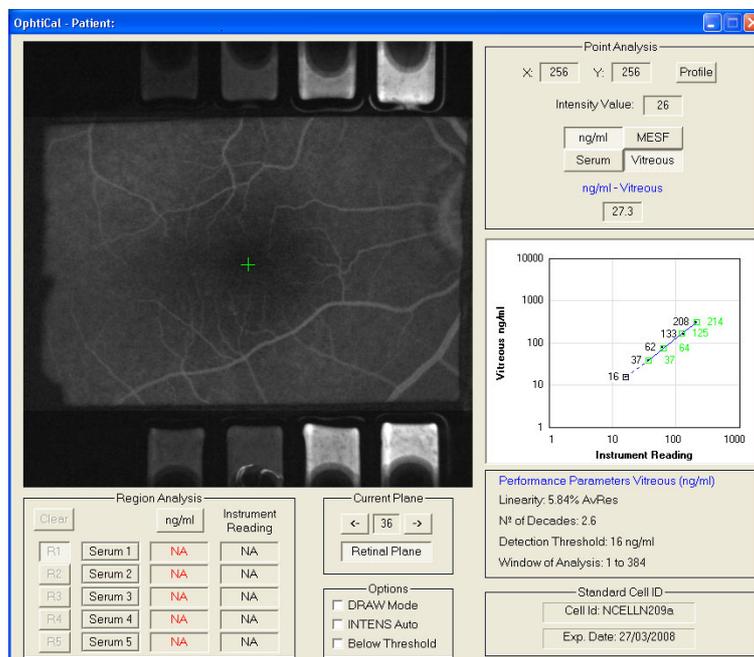


Figura 3.57: Detalhes de calibração (*OphthiCal* software).

3.3 Tomografia por coerência óptica

3.3.1 Aumento da resolução do mapeamento da espessura da mácula

Nesta secção é descrito o processo de aumento de resolução do mapeamento do edema macular a partir de leituras efectuadas pelo *Stratus OCT* com base no princípio da coerência óptica.

À semelhança dos sistemas de ultrasons, o *OCT* permite obter leituras nos modos *A* e *B*, indicando em cada uma das leituras em modo *A* o nível de transição entre índices de refacção ao longo do percurso óptico do feixe incidente na amostra.

Deve chamar-se a atenção para o facto de serem usados em todo este processo os valores de espessura da retina determinados pelo *OCT*, ou seja, exactamente os mesmos valores utilizados para a construção do mapa de espessuras original. Estas medidas de espessura são determinadas pela distância entre a *membrana limitante interna* (MLI) e o *epitélio pigmentado da retina* (EPR) para cada varrimento em modo *A*.

O edema macular, caracterizado por um aumento da espessura retiniana envolvendo a mácula [LBACV99], é uma manifestação frequente da retinopatia diabética [LBCV00] (RD) e da degenerescência macular relacionada com a idade (DMI) e é a principal causa de cegueira legal em doentes diabéticos do tipo 2 [CAZ03]. A monitorização e mapeamento das alterações maculares [LBCV00] ao longo do tempo tem fornecido informações preciosas no suporte à decisão clínica [LBACV01, CVBLA02, LBF⁺04]. Para além do mais, a monitorização do edema macular tem-se ainda revelado da maior importância noutras circunstâncias, tal como na pós-cirurgia da catarata [LFS⁺04].

A avaliação da espessura retiniana tem sido tradicionalmente efectuada por fotografia estéreo do fundo ocular e mais recentemente pelo recurso ao *OCT*, modelos 2 e *Stratus* (*Carl Zeiss Meditec, Dublin, California, EUA*) e *RTA* clássico e 2 (*Retinal Thickness Analyzer, Talia Technology, Lod Indst Area, Israel*).

A avaliação do edema macular por recurso à fotografia estéreo, consiste na obtenção de duas fotografias do fundo ocular a partir de duas posições distintas de modo a formarem um ângulo entre si. De seguida, um especialista em análise deste tipo de imagens fará a observação das mesmas com recurso

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

a um sistema ocular próprio para este fim (*stereoscopic viewers*), com vista à detecção de aumentos de espessura relativamente a um padrão considerado normal. Esta é uma avaliação *qualitativa* da espessura retiniana que acarreta consigo toda a subjectividade daí inerente, ainda que estabeleça diversos graus para o aumento de espessura assim determinado. Em contraste, quer o *OCT* quer o *RTA* representam avaliações *objectivas* do edema macular, tornando por isso possível quantificar o aumento da espessura retiniana relativamente a um padrão normal, ao mesmo tempo que remove toda a subjectividade inerente à técnica da fotografia estéereoscópica.

Variadíssimos relatórios existentes na literatura científica estabeleceram já a comparação entre as técnicas qualitativa e quantitativa(s), tendo a maioria demonstrado a vantagem das últimas sobre as primeiras [CVBLA02, SSL⁺02, SOB⁺91, HPD⁺98, ZSM⁺96, GRM⁺97, LSJR97, BT02, SPF04, CRH03, Sch99, PKPS⁺98, HIS⁺95, PSH⁺02, PBL⁺02].

As limitações da técnica original

Embora tanto o *OCT* como o *RTA* sejam técnicas quantitativas, a grande desvantagem do *OCT* relativamente ao *RTA* é a sua baixa resolução no mapeamento da espessura retiniana. Esta desvantagem não foi resolvida em qualquer dos modelos, 2 e *Stratus*, e permanece por isso por solucionar.⁸

Como resultado desta limitação, o mapa de espessura fornecido pelo sistema original pode considerar-se grosseiro uma vez que apenas fornece 9 valores de espessura para toda a área macular, uma área centrada na fóvea e com 6000 μm de diâmetro.

Até à presente data, os mapas de espessura retiniana obtidas com o *OCT* não têm em conta as posições relativas dos vários varrimentos em modo *B* entre si, nem a sua localização no fundo ocular.

⁸A existência do novo modelo de *OCT*, o *Cirrus OCT*, que faz parte dos chamados *Fourier domain OCT*, não sofre já deste problema uma vez que consegue efectuar um mapeamento completo numa área de interesse com resoluções até 200×200 varrimentos em modo *A*. No entanto, à data da elaboração deste texto estes sistemas estão apenas disponíveis em versões *pré-release* para teste e não na prática clínica. Por outro lado, prevê-se que os modelos *Stratus* estarão ainda disponíveis durante a próxima década, sendo a actual capacidade instalada de cerca de 7000 em todo o mundo.

3.3 Tomografia por coerência óptica

No trabalho reportado nesta secção abordaram-se estes problemas e desenvolveu-se uma técnica para a resolução dos mesmos com vista ao mapeamento do edema macular nas suas fases iniciais. Assim, o aumento da resolução do mapeamento da espessura macular é obtido por integração de varrimentos radiais e circulares. Simultaneamente, as posições relativas entre os vários varrimentos e destes com o centro da fóvea são estimadas. Todo o processo é realizado com recurso a dois conjuntos de varrimentos, um radial e um circular, cada qual composto por seis varrimentos individuais. O processo baseia-se no registo destes varrimentos para um *atlas* (modelo) da espessura da retina humana, o qual foi estabelecido para a realização deste trabalho sem recurso a referências morfológicas do fundo ocular. Neste contexto, *atlas* refere-se ao modelo que traduz a geometria de uma amostra de indivíduos saudáveis e que corresponde à terminologia utilizada na comunidade do mapeamento cerebral [Die06], ao contrário da utilização comum em que *atlas* se refere a um conjunto de imagens/mapas.

Uma aproximação inicial a este processo em 2003 [BMLCV03] permitiu a integração de qualquer conjunto de varrimentos (rectilíneos) por um processo de co-registo assistido pelo utilizador com recurso à referência do fundo ocular fornecida pelo *OCT* (modelo 2). Em 2004 foi desenvolvido um novo processo [BNV⁺04], já para o *Stratus OCT*, que permitia a integração de varrimentos rectilíneos e circulares com base num processo de co-registo baseado na minimização das diferenças entre leituras para as posições de intersecção estimadas dos vários varrimentos. Embora os métodos propostos permitissem o co-registo de vários varrimentos do *OCT* entre eles, nenhuma das aproximações teve em conta a localização dos varrimentos na área macular. Em 2005, Soerensen et al. [STS05] apresentou um método alternativo pela junção de dois conjuntos de varrimentos radiais, obtendo deste modo uma redução do ângulo entre varrimentos consecutivos de $\pi/6$ rad para $\pi/12$ rad. No entanto, o método proposto não considerou qualquer possibilidade para o registo dos vários varrimentos na área macular ou entre si, considerando apenas que todos eles se cruzariam nos respectivos centros (centros dos segmentos de recta definidos por cada um deles) e que todos estes centros se encontrariam sobre a fóvea.

No processo aqui reportado são necessários vários passos para a prossecução do objectivo deste trabalho, o primeiro dos quais se prende com a necessidade de estabelecer um modelo de espessura da retina (*RT-Atlas*) para uma população

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

padrão. Este modelo serve de base para o registo de medições efectuadas pelo *OCT* com recurso a um protocolo de aquisição que efectua uma série de 6 varrimentos radiais em modo *B*. A partir deste registo é obtido um mapa já com base no *OCT* e para o qual serão posteriormente co-registados uma série de varrimentos circulares, o que permite obter o co-registo entre os varrimentos radiais e circulares e deste modo obter um mapa com base no conjunto da totalidade das medições efectuadas.

No que diz respeito à instrumentação, o mapeamento da espessura da retina humana efectuada pelo *OCT* baseia-se em 6 varrimentos radiais (varrimentos em modo *B*) efectuados em 1,92 *s* segundo o *Fast Macular Protocol*. Estes varrimentos, de 6000 μm de comprimento (por defeito), fazem entre si um ângulo de $\pi/6 \text{ rad}$ e por esse motivo há lugar a uma interpolação considerável do ponto de vista das dimensões maculares, sendo esta interpolação crescente com a distância ao centro do mapa. Para além do mais, é esperado que todos os varrimentos se cruzem no centro do mapa e que o mesmo esteja localizado no centro da fóvea, não considerando assim eventuais erros de fixação por parte do doente e/ou erros de localização do centro da fóvea por parte do utilizador [BT02, SPF04, Sch99].

O *OCT* utilizado neste estudo, o *Stratus OCT*, tem disponíveis dois modos de operação com relevância para este processo, o modo *Fast Macular Protocol* (já mencionado) e o modo *Fast RNFL Protocol*. Enquanto o primeiro consiste na aquisição de 6 varrimentos radiais, o modo *Fast RNFL Protocol* consiste na aquisição de 6 varrimentos circulares com 1440, 1690, 1900, 2250, 2730 e 3400 μm de raio. Em ambos os casos cada varrimento é composto por 128 leituras em modo *A*, o que se traduz num número igual de medidas da espessura da retina.

Por outro lado, o *RTA* (versão 2), é um sistema baseado numa lâmpada-de-fenda que efectua uma série de varrimentos em 5 áreas de $3 \times 3 \text{ mm}^2$ da retina, estando 4 destas áreas lado-a-lado e a 5^a sobreposta sobre as anteriores e centrada na fóvea.

O *RTA* utiliza um feixe *laser* de HeNe (543 *nm*) o qual é projectado obliquamente na retina e do qual resulta a reflexão e dispersão do mesmo na *membrana limitante interna* e no *epitélio pigmentado da retina*, luz esta recolhida por uma câmara *CCD* (*charge-coupled device*). Devido ao ângulo entre a projecção do

3.3 Tomografia por coerência óptica

feixe e o ângulo de visualização do fundo ocular a partir da câmara *CCD*, é possível analisar o perfil de intensidade da luz recolhida. Este perfil consiste na sobreposição de duas curvas *Lorentzianas*, sendo que a cada um dos respectivos centros corresponde à localização de uma das estruturas que definem a espessura da retina, resultando assim a mesma na medição entre as respectivas distâncias corrigidas para o ângulo formado entre o feixe de *laser* incidente e o ângulo de visualização da câmara.

Para cada uma das 5 áreas analisadas pelo *RTA*, são analisadas 16 secções ópticas para o cálculo da espessura da retina, sendo estes valores conjugados no mapa final da espessura da retina numa grelha regular.

Desenvolvimento de um modelo matemático de espessura da retina humana (RT-Atlas)

Para a realização deste modelo, foi criado um atlas da espessura da retina humana com base em medições efectuadas com o *RTA*, para o qual irão ser registados os varrimentos efectuados pelo *OCT*.

Para o estabelecimento deste atlas (*RT-Atlas*) foram medidas as espessuras de várias retinas de voluntários saudáveis, num total de 40 retinas de 20 voluntários, com idades compreendidas entre os 40 e os 64 anos de idade (média \pm DP: 52,4 \pm 5,9 anos). Cada um dos mapas foi individualmente analisado para a detecção de eventuais anomalias relativamente ao padrão considerado normal do ponto de vista clínico. Deste modo foram eliminados 8 mapas tendo sido considerados apenas os restantes 32.

A construção de um atlas deste tipo é por si só um vasto campo de investigação [HRJ05, JFM⁺03, JDJG04]. Neste trabalho foi seguido um modelo misto onde inicialmente foi definido um novo sistema de coordenadas, designado por coordenadas maculares, cuja origem define o centro da fóvea, e cujo eixo dos x (eixo horizontal) define a recta que une este com o centro do disco óptico. Valores positivos de x encontram-se na área nasal relativamente à fóvea, estando por conseguinte os valores negativos de x na área temporal. Relativamente ao eixo dos y foi arbitrariamente estabelecido (por conveniência na implementação do *software*) que valores positivos e negativos neste eixo correspondem às áreas maculares inferior e superior, respectivamente (figura 3.58). Este novo sistema

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

de coordenadas é assim independente de ser referido relativamente a olhos esquerdos ou direitos e independente de uma qualquer retina em análise.

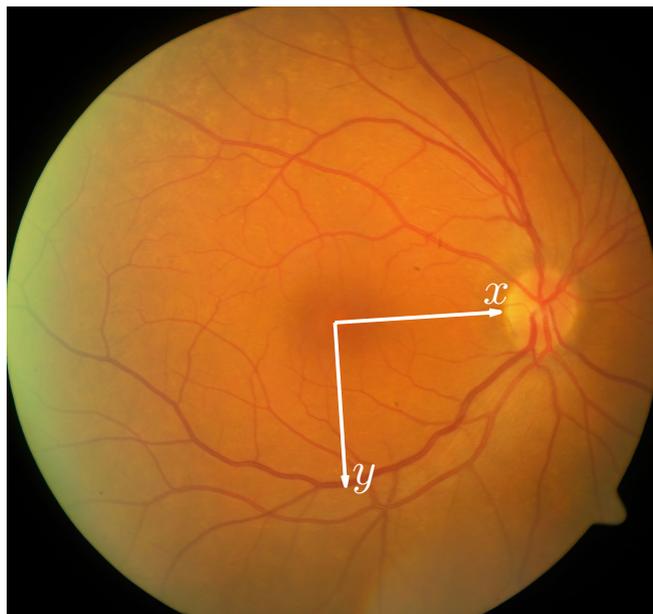


Figura 3.58: Esta figura mostra o conceito de coordenadas maculares, com a definição da origem dos eixos e respectivas orientações. De notar que valores positivos de x são sempre nasais relativamente à fóvea.

Foram assim efectuados 5 passos neste desenvolvimento: o co-registo dos vários mapas para coordenadas maculares, a determinação de um modelo inicial com recurso à análise de componentes principais, a repetição do co-registo dos mapas agora para o modelo inicial, a definição do modelo final com base neste segundo co-registo novamente com recurso à análise de componentes principais e, a definição matemática do modelo final que permita a sua determinação para um qualquer ponto em coordenadas maculares.

No primeiro passo, cada um dos mapas obtidos pelo *RTA* foi objecto de um registo rígido para coordenadas maculares com base na imagem do fundo ocular fornecida pelo próprio sistema.

Para estimar a localização do centro da fóvea nos mapas de espessura foram

3.3 Tomografia por coerência óptica

obtidos os melhores ajustes da parabolóide definida pela equação (3.62) aos mesmos.

$$f(x, y) = a + b (\alpha(x - x_0)^2 + \beta(y - y_0)^2)^c . \quad (3.62)$$

Neste ajuste é necessário estimar os parâmetros $a, b, c, \alpha, \beta, x_0$ e y_0 que minimizam o erro quadrático médio (η) entre os valores de espessura medidos pelo *RTA* e a própria parabolóide. Os parâmetros a, b, c, α, β permitem ajustar a forma da parabolóide à depressão foveal e x_0 e y_0 são os parâmetros de interesse para o processo.

Sendo $\mathbf{R}^{(i)}$ a matriz i de valores do *RTA* e \mathbf{F} a matriz que resulta da avaliação de $f()$ no domínio de $\mathbf{R}^{(i)}$, podem obter-se os vectores \mathbf{r} e \mathbf{f} , respectivamente pela concatenação das colunas de $\mathbf{R}^{(i)}$ e \mathbf{F} , donde

$$\eta = E \{ (\mathbf{r} - \mathbf{f}) \odot (\mathbf{r} - \mathbf{f}) \} . \quad (3.63)$$

Pretende assim estimar-se $\mathbf{v} = [a, b, c, \alpha, \beta, x_0, y_0]$ tal que

$$\hat{\mathbf{v}} = \arg \min_{\mathbf{v}} \eta , \quad (3.64)$$

e deste modo determinar o centro da depressão foveal a partir dos mapas de espessura, um exemplo do qual pode ser visto na figura 3.59.

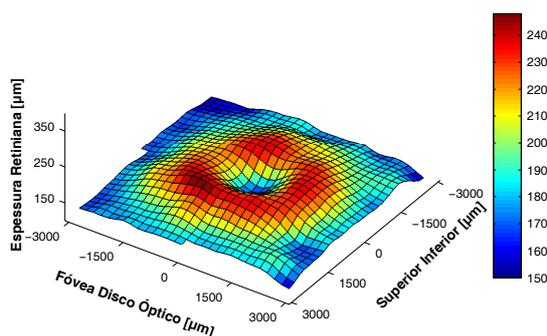


Figura 3.59: Exemplo de mapa de espessura da retina humana (para um olho direito).

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

Por outro lado, a rotação foi calculada a partir do centro da fóvea e do centro do disco óptico, assinalado pelo utilizador sobre a imagem do fundo ocular fornecida pelo *RTA*, uma imagem que é obtida não em simultâneo com as medidas de espessura, mas obtida imediatamente após a última leitura efectuada e sem que ocorra qualquer alteração no posicionamento do doente.

Foi deste modo determinada uma transformação rígida (translação e rotação) que permite expressar o mapa de espessuras em coordenadas maculares, i.e.

$$\tilde{\mathbf{R}}^{(i)} = \psi \left(\mathbf{T}_R^{(i)}, \mathbf{R}^{(i)} \right), \quad (3.65)$$

onde $\mathbf{R}^{(i)}$ é o mapa i ($i = \{1, \dots, K\}$) como fornecido pelo *RTA*, $\mathbf{T}_R^{(i)}$ a transformação (rígida) definida em (3.66) e ψ é uma função que aplica esta transformação ao mapa original e devolve o resultado da interpolação e re-amostragem numa grelha em coordenadas maculares comum a todos os $\tilde{\mathbf{R}}^{(i)}$.

$$\mathbf{T}_R^{(i)} = \begin{bmatrix} \cos(\theta) & -\text{sen}(\theta) & -\Delta x \\ \text{sen}(\theta) & \cos(\theta) & -\Delta y \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}. \quad (3.66)$$

O segundo passo é então dado obtendo uma primeira aproximação ($\mathbf{P}^{(1)}$) para o *RT-Atlas* através da análise de componentes principais,⁹ tal como definida no Apêndice A.

O terceiro passo, que visa melhorar a estimativa anterior, é dado efectuando o registo, com precisão sub-píxel, de cada um dos K mapas originais ($\mathbf{R}^{(i)}$) para o modelo $\mathbf{P}^{(1)}$, por um processo de optimização. Este processo de optimização pretende obter a minimização da média do quadrado das diferenças entre cada um dos mapas $\mathbf{R}^{(i)}$ e $\mathbf{P}^{(1)}$, pelo que se determinaram novas matrizes de transformação rígida $\hat{\mathbf{T}}_R^{(i)}$ ($i = \{1, \dots, K\}$) tais que

$$\hat{\mathbf{T}}_R^{(i)} = \arg \min_{\mathbf{T}_R^{(i)}} E \{ (\mathbf{x} - \mathbf{y}) \odot (\mathbf{x} - \mathbf{y}) \}, \quad (3.67)$$

⁹O facto de cada um dos mapas poder sofrer uma transformação distinta, significa que para uma particular posição em coordenadas maculares pode não haver K valores definidos mas sim um número inferior, razão pela qual o processo de análise pela análise de componentes principais é restringida apenas ao domínio definido pela intersecção $\tilde{\mathbf{R}}^{(1)} \cap \tilde{\mathbf{R}}^{(2)} \cap \dots \cap \tilde{\mathbf{R}}^{(K)}$.

3.3 Tomografia por coerência óptica

com \mathbf{x} o vector coluna resultado da concatenação das colunas da matriz dada por $\psi(\mathbf{T}_R^{(i)}, \mathbf{R}^{(i)})$, \mathbf{y} o vector coluna resultado da concatenação das colunas de $\mathbf{P}^{(1)}$ e $\psi()$ como definida em (3.65).

Obtém-se assim um novo conjunto de mapas em coordenadas maculares dados por

$$\hat{\mathbf{R}}^{(i)} = \psi(\hat{\mathbf{T}}_R^{(i)}, \mathbf{R}^{(i)}) . \quad (3.68)$$

A aplicação de critérios de aceitação dos resultados deste registo levaram à rejeição de 5 dos 32 mapas de espessura considerados, em virtude dos mesmos apresentarem valores estimados para a translação e/ou rotação ($[x, y]^T$ e θ , respectivamente) fora do intervalo de 1,75 desvios padrão da respectiva média, o que numa distribuição normal inclui mais de 90% dos casos.

No quarto passo obtém-se o *RT-Atlas* final (Σ) novamente com recurso à análise de componentes principais,¹⁰ a partir dos 27 mapas (olhos) correspondentes a 17 voluntários, com idades compreendidas entre os 40 e os 64 anos de idade (média±DP: 53,3 ± 5,9 anos – considerando cada um dos olhos como se proveniente de um indivíduo diferente).

A diferença entre os atlas inicial e final, respectivamente $\mathbf{P}^{(1)}$ e Σ , após o mapeamento de ambos para o intervalo $[0, 1]$, é de apenas 3,2%, o que significa que a aproximação inicial era já satisfatória.

Antes da obtenção de uma definição matemática para Σ , interessa determinar qual a sua estabilidade, i.e. se o número de mapas de espessura utilizados (27) é suficiente para ser representativo da população alvo. Para esta análise foram estabelecidos dois conjuntos de dados. O conjunto 1 formado por 18 olhos dos 12 voluntários mais jovens – com idades entre os 40 e os 55 anos (média±DP: 51,3 ± 3,5 anos) – e o conjunto 2 composto por 9 olhos dos 5 voluntários mais velhos – com idades entre os 57 e os 64 anos (média±DP: 59,3 ± 3,0 anos).

A cada um dos conjuntos agora estabelecidos foram aplicados todos os passos anteriores, de modo a obter um atlas a partir de cada um deles com vista à sua comparação e cujos respectivos mapas podem ser vistos na figura 3.60 (página 128).

¹⁰Tal como no segundo passo do processo, também aqui o processo de análise pela análise de componentes principais é restringida agora ao domínio definido pela intersecção $\hat{\mathbf{R}}^{(1)} \cap \hat{\mathbf{R}}^{(2)} \cap \dots \cap \hat{\mathbf{R}}^{(K)}$.

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

Para estabelecer a comparação entre estes dois mapas foram consideradas três possibilidades (diferenças) dadas por,

$$\begin{cases} \mathbf{D}_1 = (\overline{\Sigma} - \overline{\Sigma}_1) \odot (\overline{\Sigma} - \overline{\Sigma}_1) \\ \mathbf{D}_2 = (\overline{\Sigma} - \overline{\Sigma}_2) \odot (\overline{\Sigma} - \overline{\Sigma}_2) \\ \mathbf{D}_3 = (\overline{\Sigma}_1 - \overline{\Sigma}_2) \odot (\overline{\Sigma}_1 - \overline{\Sigma}_2) \end{cases}, \quad (3.69)$$

onde Σ_1 e Σ_2 são, respectivamente, os atlas resultantes dos conjuntos 1 e 2, e $\overline{\Sigma}$ significa o mapeamento linear de \mathbf{A} para o intervalo $[0, 1]$.

A média (μ_i) e o desvio padrão (σ_i) foram determinados para cada \mathbf{D}_i e os respectivos valores encontram-se na tabela 3.4. Destes valores, pode concluir-se que mesmo considerando as diferenças etárias entre os grupos criados, os atlas obtidos para cada um deles são semelhantes do ponto de vista da respectiva forma, já que os desvios padrão são pequenos para todas as diferenças \mathbf{D}_i , o que traduz uma uniformidade do mapa diferença.

Tabela 3.4: Esta tabela mostra a análise das diferenças detectadas pela criação de um *RT-Atlas* utilizando duas sub-populações da população de voluntários. As diferenças encontradas demonstram a captura da forma da espessura da retina mesmo para um reduzido número de mapas.

	\mathbf{D}_1	\mathbf{D}_2	\mathbf{D}_3
μ_i	0,0005	0,0013	0,0030
σ_i	0,0007	0,0014	0,0035

Um segundo teste foi realizado de modo a estabelecer a influência do número de olhos de voluntários no *RT-Atlas* final. Neste novo teste foram aleatoriamente seleccionados 3 mapas $\widehat{\mathbf{R}}^{(i)}$ a partir do qual se determinou um atlas inicial $(\overline{\Sigma}_0)$. Iterativamente foram sendo adicionados mapas $\widehat{\mathbf{R}}^{(i)}$, um de cada vez, e para cada mapa adicionado gerado um atlas $\overline{\Sigma}_n$ e uma diferença \mathbf{D}_n ($\mathbf{D}_n = \overline{\Sigma}_n - \overline{\Sigma}_{n-1}$), para a qual foram determinados os valores médio (μ_n) e desvio padrão (σ_n).

Tal como pode ser visto na figura 3.61, com o aumento do número de mapas tanto a média como o desvio padrão da diferença diminuem segundo uma exponencial, pelo que fica demonstrado que o número de mapas utilizados é

3.3 Tomografia por coerência óptica

suficiente e que a adição de novos mapas não trará qualquer alteração significativa à forma do mapa Σ obtido com base nos 27 olhos seleccionados.

Deste modo, o *RT-Atlas* aqui estabelecido (Σ) é representativo da população saudável do ponto de vista da espessura retiniana, transportando por isso as características (formas) principais da população utilizada. É assim possível ser utilizado como referência para o qual quaisquer medidas de espessura da retina efectuadas por um qualquer processo quantitativo podem ser registadas e deste modo colocadas em coordenadas maculares, desde que as formas principais (características) da espessura retiniana estejam preservadas. Tal verifica-se no caso de edema macular pré-clínico, onde o mapeamento das alterações iniciais tem um papel fundamental no seguimento desta patologia.

Para a obtenção de uma definição matemática do *RT-Atlas* (Σ) e considerando a suavidade das superfícies em causa para as condições de aplicabilidade definidas, optou-se pela utilização de uma *Thin-Plate Spline* [CJ00] tal como definida no Apêndice B.

Definiu-se deste modo uma função $\chi()$ (B-2) que passa por todos os pontos de controlo definidos por Σ e que apresenta a menor energia de torção. A definição desta função permite determinar o valor de Σ para qualquer $\mathbf{p} = [x, y]^T$ no espaço definido pelo *RT-Atlas*, por interpolação, o que significa puderem realizar-se medidas ao longo de um qualquer percurso em Σ e assim simular um varrimento em modo *B* do *OCT* neste atlas.

Este facto torna possível a comparação de um qualquer varrimento em modo *B* do *OCT*, efectuado numa retina humana, com um varrimento virtual efectuado no *RT-Atlas*.

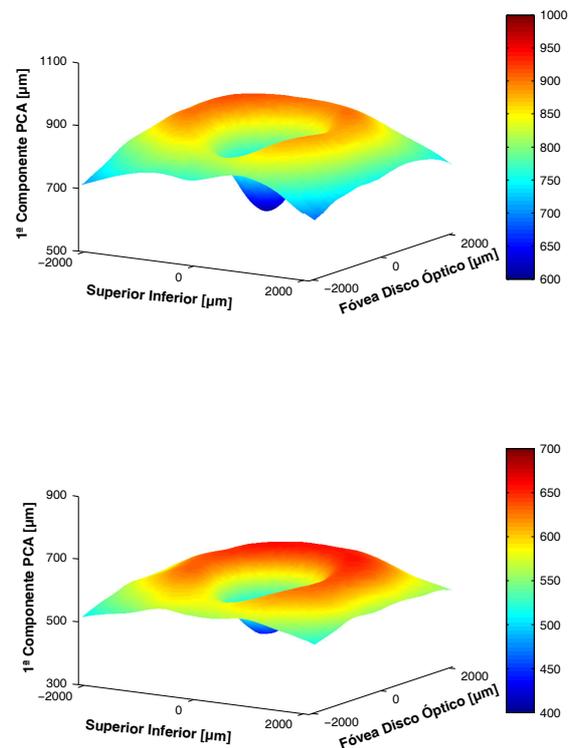


Figura 3.60: *RT-Atlas* de duas populações: 18 olhos de 12 voluntários (média±DP: $51,3 \pm 3,5$ anos) e 9 olhos de 5 voluntários (média±DP: $59,3 \pm 3,0$ anos), respectivamente os mapas superior e inferior. Notar a diferença nas escalas utilizadas devido ao número de casos considerados e para facilidade de comparação.

3.3 Tomografia por coerência óptica

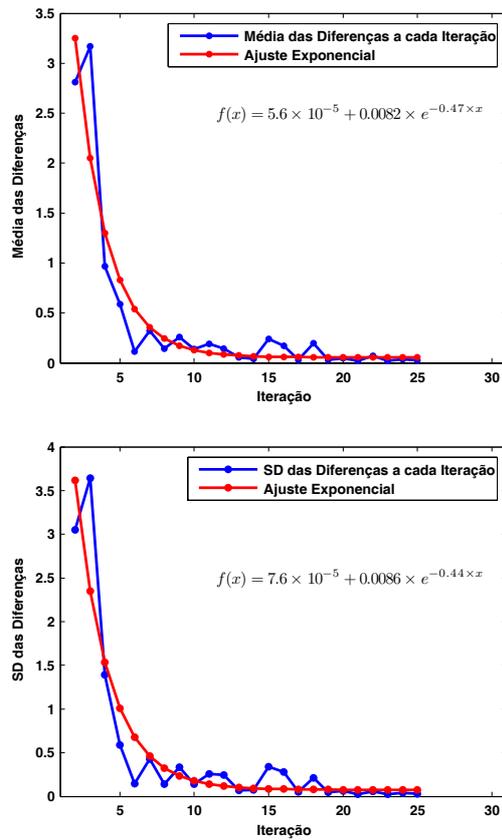


Figura 3.61: A influência do número de amostras na determinação do *RT-Atlas* é claramente demonstrada neste dois gráficos, na diminuição exponencial da diferença média e desvio padrão, donde qualquer número superior a 10 mapas normais pode ser considerado suficiente.

O registo dos varrimentos do tomógrafo para o RT-Atlas

Na secção anterior foi determinada a função $\chi()$ que permite obter o valor de Σ (definido em coordenadas maculares) para um qualquer ponto $\mathbf{p} = [x, y]^T$ nesse mesmo sistema de coordenadas. Pretende-se agora estimar a localização no mesmo sistema de coordenadas de um qualquer varrimento efectuado pelo *OCT* numa retina humana.

Deve começar por definir-se a realização de um varrimento virtual de Σ , o qual consiste em obter valores de $\chi()$ em pontos p_i que definem um percurso no espaço *RT-Atlas*.

Sejam $\mathbf{p}_r^{(i)}$ e $\mathbf{p}_c^{(j)}$ os vectores cujos componentes correspondem à avaliação de $\chi()$ ao longo de uma recta e ao longo de um círculo, respectivamente.

Estes vectores equivalem assim a um varrimento efectuado pelo *OCT* numa retina humana, em modo *B*, respectivamente ao longo de uma recta e ao longo de um círculo. Torna-se deste modo possível comparar varrimentos virtuais, realizados no espaço *RT-Atlas* usando Σ , com varrimentos reais, realizados pelo *OCT* em retinas humanas.

Nesta secção irá proceder-se ao registo de varrimentos radiais efectuados pelo *OCT* para coordenadas maculares e, no final, obter o mapa correspondente de espessura da retina. Na secção seguinte, tratar-se-á de efectuar o registo de varrimentos circulares neste mapa de modo a obter o registo de todos os varrimentos efectuados, o que permitirá obter um mapa de espessura baseado numa maior densidade de medidas e por isso com uma resolução superior.

Em ambos os casos será inicialmente determinado um registo global para o respectivo conjunto de varrimentos efectuados em cada um dos protocolos utilizados, seguido de ajustes individuais em torno dos respectivos registos globais.

Em função do exposto, pretende agora determinar-se a localização em coordenadas maculares do conjunto de medições efectuadas pelo *OCT* utilizando o *Fast Macular Protocol*, protocolo este que consiste em 6 varrimentos radiais realizados consecutivamente e no intervalo de tempo total de 1,92 s.

A realização deste conjunto de varrimentos neste intervalo de tempo, e de modo consecutivo, permite assumir que existe uma coerência para a localização dos respectivos varrimentos entre si, tanto no seu posicionamento global como na respectiva rotação. Será assim possível estimar a localização e rotação deste conjunto (como um todo) determinando os parâmetros de posicionamento e de

3.3 Tomografia por coerência óptica

rotação, respectivamente $[x, y]^T$ e θ , que minimizam o erro quadrático médio entre as medições reais e as medições virtuais, realizadas em Σ por $\chi()$, seguindo o mesmo protocolo, i.e. ao longo de 6 segmentos de recta que se intersectam nos respectivos centros e que formam ângulos de $\pi/6$ rad entre si.

Antes do processo de optimização (quer nesta quer na secção seguinte), todos os varrimentos do OCT são filtrados por um filtro passa-baixo Gaussiano com uma frequência-de-corte de $0,132 \pi$ rad/amostra, de modo a prevenir a existência de mínimos locais. Independentemente deste processo, para a construção dos mapas de espessura apenas os valores reais (medidos) são utilizados.

A determinação dos parâmetros que permitem colocar o conjunto de medidas dos varrimentos radiais do OCT em coordenadas maculares, corresponde à minimização do erro quadrático médio (η_r) definido por

$$\eta_r = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N E \left\{ \lambda^{(i)} \odot \left(\left(\mathbf{o}_r^{(i)} - \mathbf{p}_r^{(i)} \right) \odot \left(\mathbf{o}_r^{(i)} - \mathbf{p}_r^{(i)} \right) \right) \right\}, \quad (3.70)$$

com $N = 6$ o número de varrimentos, $\mathbf{o}_r^{(i)}$ o vector cujas componentes correspondem aos valores filtrados do varrimento i e $\mathbf{p}_r^{(i)}$ o vector cujas componentes correspondem à avaliação de $\chi()$ ao longo de um segmento de recta. Na actual implementação, $\lambda^{(i)}$ é um vector cujas componentes têm um valor dado por uma Gaussiana em função da distância do ponto de avaliação de $\chi()$ à origem do sistema de coordenadas, favorecendo deste modo o melhor ajuste para a depressão foveal, o que está de acordo com a definição de aplicabilidade deste sistema.

Parametrizando a equação de uma recta pode definir-se $\mathbf{p}_r^{(i)}$ como

$$\mathbf{p}_r^{(i)} \equiv \chi([x(t), y(t)]) \quad (3.71)$$

com

$$\begin{cases} x(t) = x_r + t \cos(\alpha(i)) \\ y(t) = y_r + t \text{sen}(\alpha(i)) \\ \alpha(i) = \alpha_r^{(i)} + \theta_r \end{cases}, \quad (3.72)$$

onde $\alpha_r^{(i)}$ é o ângulo do varrimento i ($\{0, \pi/6, \pi/3, \pi/2, 4\pi/6, 5\pi/6\}$ rad).

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

Fazendo $t = k \Delta t, k \in \mathbb{Z}$, obtém-se $\mathbf{p}_r^{(i)}$ pela avaliação de $\chi()$ a intervalos espaçados de Δt (distância Euclidiana) independentemente da direcção do varrimento.

Pretende-se num primeiro passo estimar $\mathbf{w}_1 = [x_r, y_r, \theta_r]^T$ por um processo de optimização tal que

$$\hat{\mathbf{w}}_1 = \arg \min_{\mathbf{w}_1} \eta_r, \quad (3.73)$$

escolhendo como aproximação inicial $\mathbf{w}_1 = [0, 0, 0]^T$ e aplicando as restrições $|x_r| \leq \delta_1, |y_r| \leq \delta_1$ e $|\theta_r| \leq \delta_2$.

$\hat{\mathbf{w}}_1 = [\hat{x}_r, \hat{y}_r, \hat{\theta}_r]^T$ estabelece assim a posição e rotação globais em coordenadas maculares do conjunto de varrimentos que compõem o *Fast Macular Protocol*.

Para acomodar as diferenças entre Σ e as medições na retina pelo *OCT* é necessário considerar 3 novos parâmetros: uma componente *DC* (μ) que acomoda a diferença média, um factor de ganho (ν) que acomoda a diferença de amplitudes e, um factor de amostragem (τ) que acomoda a diferença entre as frequências de amostragem (resolução espacial na amostragem entre o *RTA* e o *OCT*).

Pretende agora estimar-se $\mathbf{w}_2 = [\mu, \nu, \tau]^T$, com $[0, 1, 1]^T$ como aproximação inicial, tal que

$$\hat{\mathbf{w}}_2 = \arg \min_{\mathbf{w}_2} \eta_r, \quad (3.74)$$

com

$$\mathbf{p}_r^{(i)} \equiv \nu \chi([x(\tau t), y(\tau t)]) + \mu \quad (3.75)$$

e

$$\begin{cases} x(t) = \hat{x}_r + t \cos(\alpha(i)) \\ y(t) = \hat{y}_r + t \text{sen}(\alpha(i)) \\ \alpha(i) = \alpha_r^{(i)} + \hat{\theta}_r \end{cases}, \quad (3.76)$$

sujeitos a $|\mu| \leq \delta_3, \delta_4 \leq \nu \leq \delta_5$ e $\delta_6 \leq \tau \leq \delta_7$.

Tendo estimado $\hat{\mathbf{w}}_1$ e $\hat{\mathbf{w}}_2$, e definido $\mathbf{p}_r^{(i)}$ como em (3.75), estimou-se o posicionamento global do conjunto de varrimentos, pelo que o passo seguinte é

3.3 Tomografia por coerência óptica

permitir que cada um dos N varrimentos que compõem o *Fast Macular Protocol* se ajustem em torno desta posição.

Isto equivale a realizar N otimizações individuais do tipo

$$\widehat{\mathbf{w}}_{3_i} = \arg \min_{\mathbf{w}_{3_i}} \eta_r, \quad (3.77)$$

com

$$\mathbf{p}_r^{(i)} \equiv \widehat{\nu} \chi([x(\widehat{\tau} t), y(\widehat{\tau} t)]) + \widehat{\mu} \quad (3.78)$$

e

$$\begin{cases} x(t) = \left(\widehat{x}_r + \Delta x_r^{(i)} \right) + t \cos(\alpha(i)) \\ y(t) = \left(\widehat{y}_r + \Delta y_r^{(i)} \right) + t \operatorname{sen}(\alpha(i)) \\ \alpha(i) = \left(\alpha_r^{(i)} + \Delta \alpha_r^{(i)} \right) + \widehat{\theta}_r \end{cases}, \quad (3.79)$$

sujeitos a $|\Delta x_r^{(i)}| \leq \delta_8$, $|\Delta y_r^{(i)}| \leq \delta_9$ e $|\Delta \theta_r^{(i)}| \leq \delta_{10}$.

Como resultado desta sequência de passos estimou-se \mathbf{w}_r dado por

$$\mathbf{w}_r = \left[x_r, y_r, \theta_r, \mu, \nu, \tau, \Delta x_r^{(1)}, \Delta y_r^{(1)}, \Delta \alpha_r^{(1)}, \dots, \dots, \Delta x_r^{(N)}, \Delta y_r^{(N)}, \Delta \alpha_r^{(N)} \right]^T, \quad (3.80)$$

resultando na possibilidade de obter um mapa de espessura da retina humana, em coordenadas maculares, baseado no *Fast Macular Protocol* do *OCT*. Relativamente ao mapa fornecido pelo *Stratus OCT*, este apresenta três vantagens significativas.

Em primeiro lugar, o sistema apresentado não assume como certo que todos os varrimentos se intersectem no mesmo ponto. Em segundo lugar, uma vez que os varrimentos do *OCT* são registado para o *RT-Atlas*, estes passam a possuir coordenadas maculares absolutas neste espaço (*RT-Atlas*) e desse modo, independentemente de erros de fixação, a fóvea estará centrada na origem do sistema de eixos. A terceira vantagem reside no facto da linha que liga o centro da fóvea ao centro do disco óptico ser agora sempre coincidente com o eixo dos x .

As vantagens acima enumeradas permitem, por si só, a obtenção de dados normativos de qualidade superior relativamente ao actual sistema, uma vez que corrigem quer a posição quer a rotação entre mapas.

A construção do mapa de espessura da retina, a partir dos registos anteriores, é conseguida com recurso à utilização de *TPS*, tal como já referido para a obtenção do *RT-Atlas*, definindo assim uma função $\zeta()$ (B-2) que passa por todos os pontos de controlo $[x, y, z]^T$, com z a espessura medida pelo *OCT* e $[x, y]^T$ as coordenadas maculares correspondentes e determinadas pelo processo acima descrito.

Combinação de conjuntos de varrimentos radiais e circulares na área macular

Enquanto na secção anterior se descreve o processo de registo dos varrimentos efectuados no modo *Fast Macular Protocol* para o espaço *RT-Atlas*, nesta secção, descreve-se o processo conducente ao aumento de resolução do mapa final da espessura da retina humana, com base em medidas efectuadas com o *Stratus OCT*. Deve chamar-se a atenção para o facto desta resolução ser uma resolução espacial (de mapeamento) e não uma resolução em termos da discriminação de estruturas ao longo dos varrimentos de modo *A*, a resolução intrínseca do sistema no que diz respeito à discriminação das várias estruturas da retina humana.

De modo semelhante ao que foi feito para o *Fast Macular Protocol*, serão agora utilizados dados provenientes dos varrimentos obtidos com o *Fast RNFL Protocol*. À semelhança do que ocorreu no processo anterior, vários passos de optimização serão dados considerando quer parâmetros globais, quer parâmetros locais, os primeiros considerados para o conjuntos total dos varrimentos e os segundos para cada um dos varrimentos individuais.

A escolha deste tipo de protocolo, o *Fast RNFL Protocol*, foi o mesmo que esteve na génese da escolha do protocolo utilizado na secção anterior, ou seja, todos os varrimentos efectuados no seu âmbito partilham de uma localização comum. Por outro lado, enquanto no caso do *Fast Macular Protocol* não foram consideradas as distorções provocadas pelos eventuais movimentos sacádicos, estes são agora considerados por dois motivos. Em primeiro, porque no registo

3.3 Tomografia por coerência óptica

anterior não é possível distinguir entre uma diferença devida a um movimento sacádico e uma diferença devida a uma alteração na retina. Por outro lado, no caso presente, está agora a proceder-se ao registo de dados provenientes da mesma instrumentação e para o mesmo objecto (retina), donde é expectável obter-se a mesma medição de espessura em diferentes varrimentos para uma mesma localização da mesma retina, considerando a realização intra-visita de ambos os protocolos.

Um dado importante consiste no facto de se estarem a considerar varrimentos radiais e circulares, que para além de aumentarem a densidade de medidas utilizadas para a construção do mapa final são normais entre si, o que significa que optimizam a distribuição de medidas de espessura na área de mapeamento e por conseguinte minimizam a interpolação no mapa final.

Enquanto os varrimentos do *Fast Macular Protocol* foram registados para o *RT-Atlas*, os varrimentos efectuados segundo o protocolo *Fast RNFL Protocol* aqui considerados serão registados para o mapa de espessuras da retina obtido pelo registo anterior (*Fast Macular Protocol*) e não para o *RT-Atlas*. No entanto, a terminologia relativamente ao espaço *RT-Atlas* será mantida já que o mapa considerado está definido neste espaço.

Tal como no *Fast Macular Protocol*, os varrimentos efectuados no *Fast RNFL Protocol* são objecto de filtragem passa-baixo (página 131).

O objectivo actual é agora o de estimar \mathbf{w}_4 o qual minimizará o erro quadrático médio para o conjunto de varrimentos efectuados pelo *Fast RNFL Protocol*. Pelas razões já apontadas para o caso do *Fast Macular Protocol*, também aqui será considerado como aproximação inicial o protocolo ter sido realizado centrado na fóvea.

Pretende-se assim estimar $\mathbf{w}_4 = [x_c, y_c, \theta_c]^T$ que minimize o erro η_c dado por

$$\eta_c = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M E \left\{ \left(\mathbf{o}_c^{(i)} - \mathbf{p}_c^{(i)} \right) \odot \left(\mathbf{o}_c^{(i)} - \mathbf{p}_c^{(i)} \right) \right\}, \quad (3.81)$$

onde $M = 5$ é o número de varrimentos circulares, $\mathbf{o}_c^{(i)}$ o vector cujas componentes correspondem aos valores filtrados do varrimento i e $\mathbf{p}_c^{(i)}$ o vector cujas componentes correspondem à avaliação de $\zeta(\cdot)$ ao longo de um círculo.

Deve realçar-se o facto do varrimento circular de $3400 \mu m$ de raio não ser

considerado, já que este corresponde a medidas efectuadas para além dos limites do mapa anterior de espessura da retina, mapa esse baseado em varrimentos radiais de $6000 \mu m$ de comprimento, o que estabelece a cobertura de uma área aproximadamente circular de $3000 \mu m$ de raio, logo inferior àquele definido pelo varrimento circular em causa.

À semelhança de (3.71),

$$\mathbf{p}_c^{(i)} \equiv \zeta([x(t), y(t)]) , \quad (3.82)$$

com

$$\begin{cases} x(t) = x_c + \rho_c^{(i)} \cos(t + \theta_c) \\ y(t) = y_c + \rho_c^{(i)} \text{sen}(t + \theta_c) \end{cases} , \quad (3.83)$$

onde $\rho_c^{(i)}$ é o raio correspondente do varrimento i e $t = k 2\pi/128, k \in \{0, \dots, 127\}$ uma vez que todos os varrimentos *Fast RNFL Protocol* são compostos por 128 varrimentos em modo *A*, independentemente do raio de cada um.

Relativamente a (3.71) há no entanto duas diferenças fundamentais. Primeiro, $\mathbf{p}_c^{(i)}$ corresponde agora a um varrimento circular e não rectilíneo e os vários varrimentos são considerados concêntricos e centrados em $[x_c, y_c]^T$ e, segundo, $\zeta()$ traduz o mapa *OCT* resultante do registo do *Fast Macular Protocol* e não Σ .

Deste modo pretende-se estimar $\mathbf{w}_4 = [x_c, y_c, \theta_c]^T$ tal que

$$\hat{\mathbf{w}}_4 = \arg \min_{\mathbf{w}_4} \eta_c , \quad (3.84)$$

escolhendo $[0, 0, 0]^T$ como aproximação inicial para \mathbf{w}_4 e aplicando as restrições $|x_c| \leq \gamma_1, |y_c| \leq \gamma_1$ e $|\theta_c| \leq \gamma_2$.

A necessidade de estimar \mathbf{w}_4 em vez de utilizar $\hat{\mathbf{w}}_1$ resulta do facto dos protocolos *Fast Macular Protocol* e *Fast RNFL Protocol* serem realizados em aquisições distintas (independentes) eliminando deste modo essa possibilidade.

Uma vez que estamos agora a registar medidas do *OCT* para um mapa obtido a partir de medidas do mesmo, não há a necessidade de calcular os parâmetros μ, ν e τ como no caso do *Fast Macular Protocol* (equações 3.74 – 3.75).

De seguida vamos deixar que cada um dos varrimentos circulares se ajuste em torno dos parâmetros estimados anteriormente para todo o conjunto. Significa

3.3 Tomografia por coerência óptica

isto que se vão proceder a M otimizações individuais onde, para cada varrimento é necessário estimar $\mathbf{w}_{5_i} = [\Delta x_c^{(i)}, \Delta y_c^{(i)}, \Delta \theta_c^{(i)}]^T$, com $i = \{1, \dots, M\}$ e sujeito a $|\Delta x_c^{(i)}| \leq \gamma_3$, $|\Delta y_c^{(i)}| \leq \gamma_3$ e $|\Delta \theta_c^{(i)}| \leq \gamma_4$, ou seja,

$$\widehat{\mathbf{w}}_{5_i} = \arg \min_{\mathbf{w}_{5_i}} \eta_c, \quad (3.85)$$

com $\mathbf{p}_c^{(i)}$ dado por (3.82) e

$$\begin{cases} x(t) = \left(\widehat{x}_c + \Delta x_c^{(i)} \right) + \rho_c^{(i)} \cos \left(t + \left(\widehat{\theta}_c + \Delta \theta_c^{(i)} \right) \right) \\ y(t) = \left(\widehat{y}_c + \Delta y_c^{(i)} \right) + \rho_c^{(i)} \text{sen} \left(t + \left(\widehat{\theta}_c + \Delta \theta_c^{(i)} \right) \right) \end{cases}. \quad (3.86)$$

Os passos até agora referidos, são homólogos aos dados para o registo dos dados provenientes do *Fast Macular Protocol*. No entanto, uma vez que vão ser consideradas deformações nos varrimentos devidas aos movimentos sacádicos, vão ser considerados graus de liberdade adicionais relativamente ao processo desenvolvido para o protocolo anterior.

Aqui, dois novos passos de registo vão ser considerados. O primeiro considera a transformação dos varrimentos circulares em varrimentos elípticos. Neste passo do processo de optimização pretende-se estimar $\mathbf{w}_6 = [r_x^{(i)}, r_y^{(i)}, \epsilon^{(i)}]^T$ sujeito a $\gamma_5 \leq r_x^{(i)} \leq \gamma_6$, $\gamma_5 \leq r_y^{(i)} \leq \gamma_6$ e $\gamma_7 \leq \epsilon^{(i)} \leq \gamma_8$.

No segundo passo, às elipses é permitida uma transformação de deformação com preservação de paralelismo de linhas (*shear*) e transformação de escala com factores de escala independentes para cada um dos eixos, o que consiste em estimar $\mathbf{w}_7 = [s_x^{(i)}, s_y^{(i)}, s_{hx}^{(i)}, s_{hy}^{(i)}]^T$ sujeito a $\gamma_9 \leq s_x^{(i)} \leq \gamma_{10}$, $\gamma_9 \leq s_y^{(i)} \leq \gamma_{10}$, $\gamma_{11} \leq s_{hx}^{(i)} \leq \gamma_{12}$ e $\gamma_{11} \leq s_{hy}^{(i)} \leq \gamma_{12}$.

A transformação de varrimentos circulares em elípticos corresponde a transformar (3.86) em

$$\begin{cases} x(t) = \left(\widehat{x}_c + \widehat{\Delta x}_c^{(i)} \right) + r_x^{(i)} \rho_c^{(i)} \cos \left(t + \left(\widehat{\theta}_c + \widehat{\Delta \theta}_c^{(i)} \right) \right) \\ y(t) = \left(\widehat{y}_c + \widehat{\Delta y}_c^{(i)} \right) + r_y^{(i)} \rho_c^{(i)} \text{sen} \left(t + \left(\widehat{\theta}_c + \widehat{\Delta \theta}_c^{(i)} \right) \right) \end{cases}. \quad (3.87)$$

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

Para permitir a rotação desta elipse de um ângulo $\epsilon^{(i)}$, cada ponto \mathbf{p}' de avaliação de $\zeta()$ é rodado em torno de $\left[\widehat{x}_c + \widehat{\Delta x}_c^{(i)}, \widehat{y}_c + \widehat{\Delta y}_c^{(i)} \right]^T$ obtendo-se \mathbf{p}'' , i.e.

$$\begin{bmatrix} x'' \\ y'' \\ 1 \end{bmatrix} = T^+ \begin{bmatrix} \cos(\epsilon^{(i)}) & -\text{sen}(\epsilon^{(i)}) & 0 \\ \text{sen}(\epsilon^{(i)}) & \cos(\epsilon^{(i)}) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} T^- \begin{bmatrix} x' \\ y' \\ 1 \end{bmatrix}, \quad (3.88)$$

com $\mathbf{p}' = [x', y']^T$ e $\mathbf{p}'' = [x'', y'']^T$, onde

$$T^- = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -\left(\widehat{x}_c + \widehat{\Delta x}_c^{(i)} \right) \\ 0 & 1 & -\left(\widehat{y}_c + \widehat{\Delta y}_c^{(i)} \right) \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.89)$$

e

$$T^+ = \begin{bmatrix} 1 & 0 & \widehat{x}_c + \widehat{\Delta x}_c^{(i)} \\ 0 & 1 & \widehat{y}_c + \widehat{\Delta y}_c^{(i)} \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}. \quad (3.90)$$

Este passo do processo consiste deste modo em estimar \mathbf{w}_6 tal que

$$\widehat{\mathbf{w}}_6 = \arg \min_{\mathbf{w}_6} \eta_c, \quad (3.91)$$

de acordo com as equações 3.87 a 3.90.

As transformações de deformação e escala correspondem a transformar cada $\mathbf{p}'' = [x'', y'']^T$ em $\mathbf{p}''' = [x''', y''']^T$ por

$$\begin{bmatrix} x''' \\ y''' \\ 1 \end{bmatrix} = T^+ \begin{bmatrix} s_x^{(i)} & s_{hx}^{(i)} & 0 \\ s_{hy}^{(i)} & s_y^{(i)} & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} T^- \begin{bmatrix} x'' \\ y'' \\ 1 \end{bmatrix}, \quad (3.92)$$

onde T^- e T^+ são, respectivamente, (3.89) e (3.90), e $[x'', y'', 1]^T$ como em (3.88).

3.3 Tomografia por coerência óptica

Esta otimização final corresponde em estimar \mathbf{w}_7 tal que

$$\widehat{\mathbf{w}}_7 = \arg \min_{\mathbf{w}_7} \eta_c, \quad (3.93)$$

sujeito às restrições já mencionadas.

Os passos dados para o registo dos varrimentos *Fast RNFL Protocol* em $\zeta()$ estimam \mathbf{w}_c do tipo

$$\mathbf{w}_c = \left[x_c, y_c, \theta_c, \Delta x_c^{(1)}, \Delta y_c^{(1)}, \Delta \theta_c^{(1)}, \dots, \Delta x_c^{(M)}, \Delta y_c^{(M)}, \Delta \theta_c^{(M)}, \right. \\ \left. r_x^{(1)}, r_y^{(1)}, \epsilon^{(1)}, \dots, r_x^{(M)}, r_y^{(M)}, \epsilon^{(M)}, \right. \\ \left. s_x^{(1)}, s_y^{(1)}, s_{hx}^{(1)}, s_{hy}^{(1)}, \dots, s_x^{(M)}, s_y^{(M)}, s_{hx}^{(M)}, s_{hy}^{(M)} \right]^T. \quad (3.94)$$

Todos os passos dados para o registo dos protocolos *Fast Macular Protocol* e *Fast RNFL Protocol* estimam o parâmetro global \mathbf{w} , de 71×1 , do tipo

$$\mathbf{w} = \left[x_r, y_r, \theta_r, \Delta x_r^{(1)}, \Delta y_r^{(1)}, \Delta \alpha_r^{(1)}, \dots, \Delta x_r^{(N)}, \Delta y_r^{(N)}, \Delta \alpha_r^{(N)}, \right. \\ \left. x_c, y_c, \theta_c, \Delta x_c^{(1)}, \Delta y_c^{(1)}, \Delta \theta_c^{(1)}, \dots, \Delta x_c^{(M)}, \Delta y_c^{(M)}, \Delta \theta_c^{(M)}, \right. \\ \left. r_x^{(1)}, r_y^{(1)}, \epsilon^{(1)}, \dots, r_x^{(M)}, r_y^{(M)}, \epsilon^{(M)}, \right. \\ \left. s_x^{(1)}, s_y^{(1)}, s_{hx}^{(1)}, s_{hy}^{(1)}, \dots, s_x^{(M)}, s_y^{(M)}, s_{hx}^{(M)}, s_{hy}^{(M)} \right]^T. \quad (3.95)$$

Mapeamento da espessura da mácula

Com a estimação de um total de 74 parâmetros, com recurso ao processo acima descrito, dos quais 71 compõem o vector \mathbf{w} (3.95), é possível determinar a posição de cada uma das medidas efectuadas pelo *OCT* em coordenadas maculares tal como definidas pelo *RT-Atlas*.

O número de amostras (medidas de espessura da retina) que podem ser agora utilizadas para a construção do mapa final da espessura da retina aumenta de 768 (6×128) para 1408 (11×128), o que corresponde a um aumento superior a 80% relativamente ao mapa original. No entanto, mais importante que apenas

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

o número de amostras é a sua distribuição na área coberta pelo mapa, o que foi conseguido em virtude da escolha dos protocolos utilizados.

Tendo agora a localização e valor de espessura para cada uma das leituras efectuadas, pode determinar-se a função que interpola estes valores recorrendo novamente à *TPS*, que à semelhança do que foi feito para o estabelecimento do *RT-Atlas*, apresenta a menor energia de torção (B-1). Deste modo o mapa final é construído com recurso a (B-2), após determinação do novo conjunto de coeficientes para esta equação com recurso à totalidade das medidas registadas.

A demonstração do desempenho do sistema desenvolvido e da sua capacidade em registar os dados medidos pelo *Stratus OCT* para o *RT-Atlas*, pode ser efectuada fazendo aquisições consecutivas e provocando em cada uma delas um deslocamento relativamente às anteriores, simulando deste modo erros de fixação.

Para esta demonstração, um voluntário saudável, o que reduz a probabilidade de ocorrência de erros de determinação dos interfaces da retina (*membrana limitante interna e epitélio pigmentado da retina*), foi consecutivamente analisado com o *OCT* num total de 3 varrimentos com o *Fast Macular Protocol* e 3 varrimentos com o *Fast RNFL Protocol*.

Estes dados permitem obter 3 mapas com a fusão de dados provenientes de cada um dos protocolos. Este processo foi efectuado primeiro considerando que todos os dados foram obtidos centrados na fóvea e em segundo com recurso ao processo de registo desenvolvido. Os respectivos resultados podem ser vistos na figura 3.62.

Para melhor aferir os resultados mostrados na figura 3.62, são mostrados os mapas que resultam da média e desvio padrão desta sequência para cada um dos casos, registados vs. não-registados (figura 3.63).

A figura 3.64 mostra o histograma do desvio padrão da sequência dos mapas da figura 3.63 onde é visível o menor desvio padrão para os mapas registados, bem como a sua maior concentração em torno da respectiva média.

3.3 Tomografia por coerência óptica

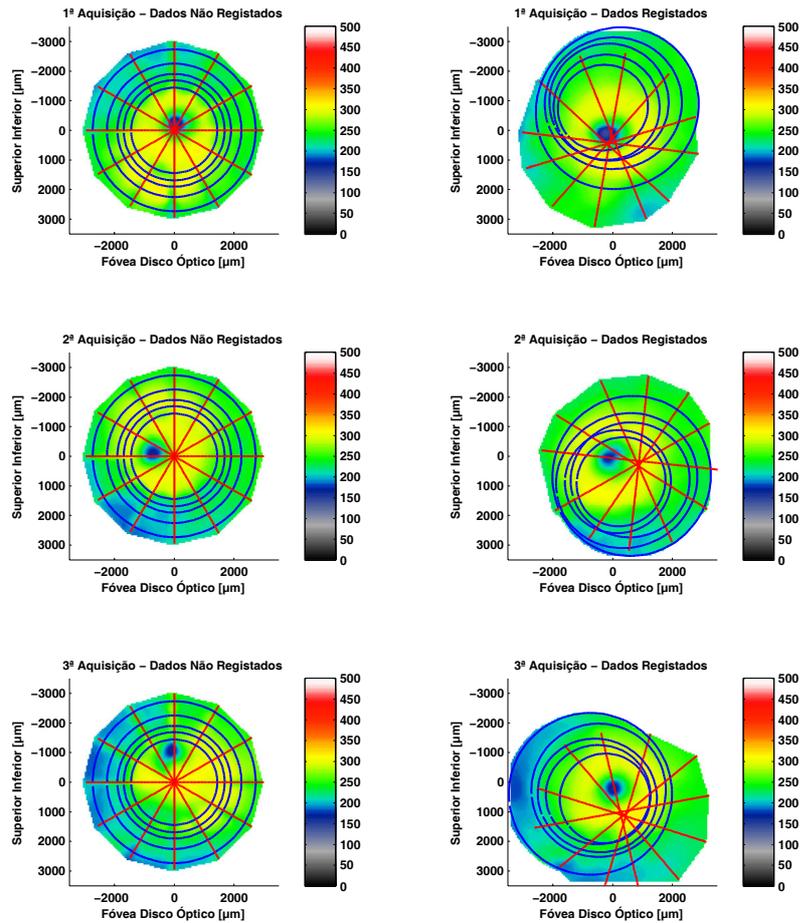


Figura 3.62: Na coluna da esquerda são mostrados os resultados não considerando qualquer registro, enquanto na coluna da direita é mostrado o resultado com base nos mesmos dados mas considerando o processo de registro. Deve notar-se a diferença da posição da depressão foveal relativamente ao sistema de eixos para ambos os casos.

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

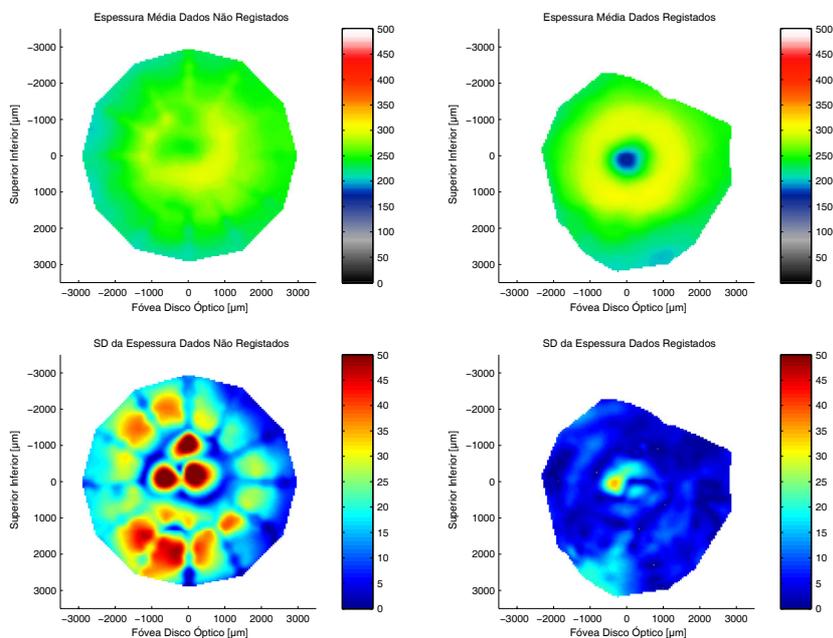


Figura 3.63: Na coluna da esquerda é mostrada a média e o desvio padrão para os mapas não registrados e na direita para os mapas registrados.

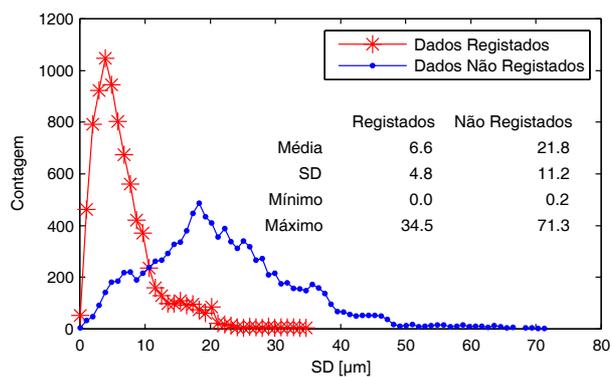


Figura 3.64: O gráfico mostra a distribuição do desvio padrão das diferenças de espessura determinadas para uma sequência de 3 aquisições comparando os valores obtidos com e sem recurso ao processo de registro.

Resultados

O sistema apresentado permite obter o registo de varrimentos em modo *B* efectuados pelo *Stratus OCT*, sem contudo fazer qualquer uso de referências morfológicas do fundo ocular. Este processo baseia-se num atlas da espessura da mácula humana estabelecido com base numa população saudável e especificamente seleccionada para este efeito.

Os resultados obtidos e mostrados de seguida, permitem aferir a vantagem introduzida por este método num sistema disponível à escala global e onde os dados obtidos para a patologia alvo deste processo, o edema macular sub-clínico, tem uma importância considerável para a investigação clínica em curso, a qual pretende determinar as causas do mesmo.

O sistema desenvolvido e aqui apresentado foi testado em 12 olhos de 6 voluntários saudáveis, com idades entre os 21 e os 40 anos (média±DP: 28,0 ± 6,69 anos), num grupo de 18 olhos de 9 doentes com retinopatia diabética (diabetes Mellitus tipo 2) com idades entre os 55 e os 70 anos (média±DP: 62,1 ± 5,16 anos) e num grupo de 26 olhos de 14 de doentes com degenerescência macular relacionada com a idade com idades entre os 56 e os 84 anos (média±DP: 75,4 ± 7,17 anos).

Na aferição dos resultados obtidos foram usadas duas métricas, uma quantitativa e uma qualitativa.

A métrica quantitativa foi definida pela média e desvio padrão da diferença entre as medidas de espessura da retina na intersecção dos vários varrimentos, diferenças essas que podem provir de dois factores distintos. O primeiro desses factores é devido a erros no próprio processo de registo, resultando na comparação de espessuras de duas localizações distintas da retina. O segundo, é devido à determinação incorrecta dos interfaces que determinam a espessura da retina para cada localização. Estas duas fontes potenciais de erro podem inclusive coexistir numa mesma intersecção.

Por outro lado, a avaliação qualitativa do mapa final toma em consideração a existência de alterações abruptas e localizadas, bem como a patologia em causa e a coerência com o próprio mapa de espessura. Ainda que este parâmetro pudesse ser medido pela energia de torção (B-1), valores relativamente elevados podem ser encontrados para patologias como a degenerescência macular relacionada com a idade comparativamente a mapas de indivíduos saudáveis ou com edema

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

macular sub-clínico, resultando apenas da própria condição patológica da retina e não de erros de registo e/ou medição da espessura.

Deste modo, os mapas de espessura da retina obtidos com o sistema desenvolvido foram classificados numa das seguintes classes: "mau", "insuficiente", "suficiente" e "bom". Os mapas que receberam a classificação de "mau" foram aqueles onde se verificaram alterações abruptas devidas a erros de registo e/ou determinação incorrecta da espessura pelo *OCT*, após inspecção da segmentação das estruturas retinianas. Os mapas classificados com "insuficiente" foram aqueles para os quais o mapa final apresenta uma maior suavidade e cujas diferenças na intersecção dos vários varrimentos são inferiores aos classificados como "maus". Os mapas classificados como "bons" foram aqueles para os quais a diferença entre espessuras na intersecção dos varrimentos está dentro do padrão normal (limite estabelecido a partir da população de voluntários saudáveis), sendo os restantes mapas classificados como "suficientes".

A figura 3.65 mostra o *RT-Atlas* em que o ponto $(0,0)$ no plano XY representa a origem do sistema de coordenadas maculares, correspondendo à localização do centro da fóvea e em que o eixo vertical (Z) é a "espessura" resultante da primeira componente do *PCA* e portanto correspondente ao maior valor próprio, o que significa representar o eixo ao longo da maior dispersão dos dados. Deve realçar-se o facto desta superfície representar a forma média da espessura da retina de uma população saudável e não o valor médio da espessura dessa mesma população, como facilmente se pode verificar pela escala correspondente.

Este *RT-Atlas*, um modelo estatístico definido por 6720 pontos (localização e respectiva "espessura"), permite o registo dos varrimentos do *OCT* sem necessidade de recurso a quaisquer referências fotográficas do fundo ocular, que a existirem teriam de ser obtidas simultaneamente com os varrimentos. A função *Thin-Plate Spline* $\chi()$ (B-2) definida por estes pontos passa por cada um deles e é definida por um total de 13443 parâmetros.

Do mesmo modo, cada um dos mapas de espessura da retina obtidos com o processo aqui descrito são definidos por uma função *Thin-Plate Spline* determinada por 2819 parâmetros.

Para cada um dos mapas de espessura da retina obtidos nestes testes foram calculadas as médias e os desvios padrão para as diferenças na intersecção dos

3.3 Tomografia por coerência óptica

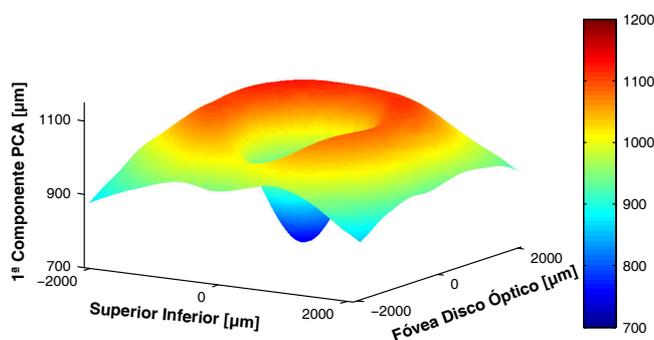


Figura 3.65: Superfície 3D do *RT-Atlas* (modelo estatístico da espessura macular de uma população saudável) em coordenadas maculares. Este atlas representa a forma padrão da espessura da mácula e não os valores médios dessa mesma população.

vários varrimentos. A média e o desvio padrão obtidos para o grupo dos voluntários (12 olhos), antes e após o registo através do *RT-Atlas* é de 5,93/1,60 μm e 4,17/1,06 μm , respectivamente, o que mostra o valor acrescentado do processo de registo, com uma redução de 30% na média e 34% no desvio padrão. Este corresponde, no entanto, ao cenário mais desfavorável para a análise deste processo, já que se baseia em dados obtidos num grupo de voluntários saudáveis e cooperantes.

Os mapas obtidos pela técnica desenvolvida para o grupo dos voluntários e para os grupos dos doentes com RD e DMI foram avaliados quer quantitativa quer qualitativamente (Tabela 3.5), com os mapas do grupo dos voluntários a obter as melhores classificações quantitativas e qualitativas e com os mapas do grupo DMI a obter as piores classificações em ambos os classificadores.

Para cada um dos mapas dos 44 olhos dos doentes estudados, a média da diferença de espessura na intersecção dos varrimentos antes e após o registo foi calculada, tendo havido uma redução de 24/28% (média/desvio padrão) devido ao processo de registo. Estas reduções são ainda mais significativas para o grupo

Capítulo 3. Desenvolvimento de Novos Métodos

Tabela 3.5: Média/desvio padrão da diferença média de espessura na intersecção dos varrimentos efectuado pelo *Stratus OCT* por classificação e por grupo. Deve notar-se o decréscimo geral dos valores apresentados do grupo de voluntários saudáveis para o grupo de doentes com DMI, e o aumento dos mesmos do grupo classificado com "bom" para os grupo classificado com "mau" (RD - Retinopatia diabética; DMI - Degenerescência macular relacionada com a idade).

	Mau	Insuficiente	Suficiente	Bom	Média por Grupo
Voluntários			4,61/1,22 (N=4)	3,95/0,89 (N=8)	4,17/1,06 (N=12)
Doentes com RD		8,78/2,55 (N=2)	6,12/1,54 (N=6)	4,50/0,94 (N=10)	5,51/1,98 (N=18)
Doentes com DMI	23,67/18,46 (N=11)	9,64/2,59 (N=13)	8,89/3,70 (N=2)		15,52/14,05 (N=26)
Média por Classificação	23,67/18,46 (N=11)	9,52/2,60 (N=15)	6,08/2,45 (N=12)	4,25/0,96 (N=18)	

de doentes com RD (com 35/43%), sendo de 26/25% para o grupo de doentes com DMI.

Todos os mapas de espessura da retina do grupo dos voluntários obtiveram uma classificação de "suficiente" ou "bom". Por outro lado, a técnica teve um desempenho modesto para o grupo de doentes com DMI, com apenas 2 dos 26 mapas a obterem uma classificação de "suficiente" (7,7%), e nenhum a obter a classificação de "bom". No entanto, a maioria dos doentes com RD (55,5%) obteve uma classificação de "bom" com uma diferença média de apenas 1/2 μm para a população dos voluntários, e apenas 11,1% obteve uma classificação de "insuficiente", o que indica a utilidade deste sistema para o mapeamento detalhado do edema macular para doentes com RD.

As figuras 3.66 a 3.69 mostram casos representativos da aplicação da técnica de processamento aqui desenvolvida.

O gráfico 3D da figura 3.66 mostra o aumento de resolução do mapa de espessura obtido a partir de medições efectuadas pelo *Stratus OCT* para um olho direito de um voluntário saudável com 30 anos. O aspecto a realçar é a suavidade do mapa resultante e a boa fixação do indivíduo demonstrada pela concentricidade dos varrimentos circulares. A média/desvio padrão das diferenças na intersecção dos varrimentos é de 3,44/2,99 μm e este mapa foi classificado como "bom".

A figura 3.67 mostra um gráfico 3D semelhante ao anterior, do mapa do olho esquerdo de um indivíduo com 69 anos de idade, com retinopatia diabética não-

3.3 Tomografia por coerência óptica

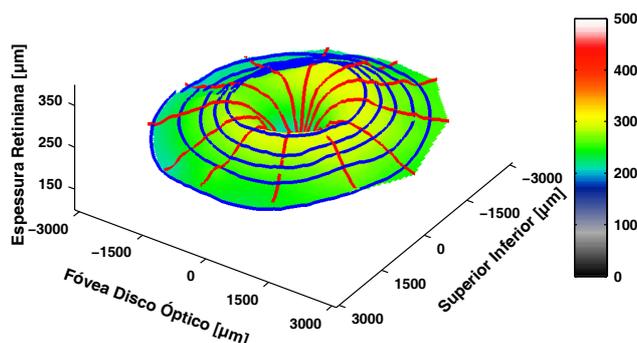


Figura 3.66: Mapa de espessura da mácula do olho direito um de voluntário saudável com 30 anos. De salientar a excelente sobreposição de todos os varrimentos, radiais e circulares, a suavidade da superfície resultante e a concentricidade dos varrimentos circulares. Este mapa obteve uma classificação de bom.

proliferativa (*NPDR*). Os aspectos a realçar neste caso, são a excelente definição do edema macular localizado e o facto dos varrimentos circulares se intersectarem entre si. Ainda que tal pudesse ser considerado um erro de registo, deve notar-se a suavidade da superfície resultante e a boa concordância entre os valores da espessura da retina nas intersecções dos varrimentos, quando comparada com a que resultaria se se considerassem estes como perfeitamente concêntricos. Este mapa obteve uma classificação de "bom" e apresenta diferenças de espessura nas intersecções dos varrimentos de $4,76 \mu m$ e $4,12 \mu m$, respectivamente para a média e para o desvio padrão.

As figuras 3.68 e 3.69 (página 150) são ambas de doentes com DMI. O gráfico 3D mostrado na figura 3.68, correspondente ao olho direito de um doente com 56 anos, mostra uma superfície irregular para além do facto de apresentar um aumento drástico na diferença de espessuras para as intersecções entre varrimentos ($12,59 \mu m$ e $18,42 \mu m$, respectivamente média e desvio padrão). Este mapa obteve uma classificação de "suficiente".

Um mapa com classificação de "mau", do olho esquerdo de um doente de 78 anos, é mostrado na figura 3.69 (página 150), com uma média e desvio

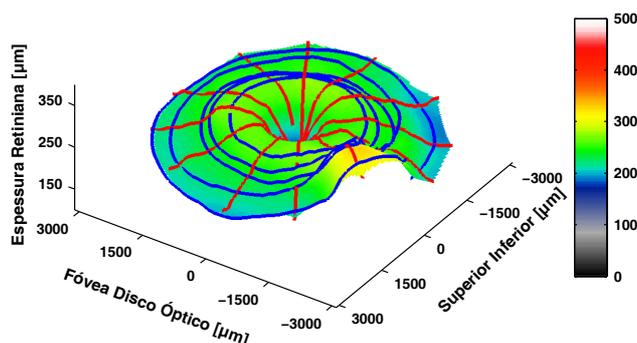


Figura 3.67: Mapa de espessura da mácula do olho esquerdo de doente com retinopatia diabética não proliferativa. Deve notar-se a clara definição do edema na área peri-temporal inferior. De notar ainda o cruzamento dos varrimentos circulares e a respectiva concordância em termos de valores de espessura. Este mapa obteve uma classificação de bom.

padrão para as diferenças nas intersecções dos varrimentos de $18,73 \mu m$ e $24,50 \mu m$, respectivamente. É possível observar duas proeminências resultantes das elevadas diferenças na medida da espessura da retina em áreas relativamente pequenas.

Um passo adicional foi ainda incluído neste trabalho de modo a permitir a integração de varrimentos circulares obtidos de forma independente, ao contrário do que sucede no *Fast RNFL Protocol*, no seguimento do manual de procedimentos operacional definido para o *OCT* no âmbito do projecto Europeu *EVI-GENORET*. Neste protocolo são adquiridos os 6 varrimentos radiais (*Fast Macular Protocol*) e 3 varrimentos circulares, cada um dos quais obtido de forma autónoma. Deste modo, a integração destas fontes de informação segue um processo similar ao anteriormente descrito excepto no caso do registo global para os varrimentos circulares, o que significa que o passo correspondente a \hat{w}_4 (3.84) não é realizado, à custa de maiores graus de liberdade para os parâmetros γ_3 e γ_4 para a estimação de w_{5_i} . O resultado da aplicação desta técnica a um voluntário saudável de 30 anos pode ser visto na figura 3.70, o qual obteve uma classificação

3.3 Tomografia por coerência óptica

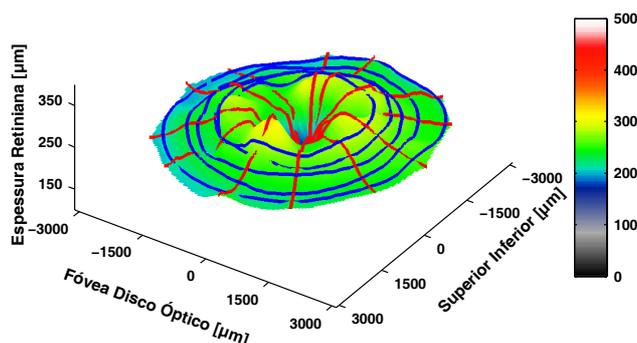


Figura 3.68: Mapa de espessura da mácula do olho direito de doente com degenerescência macular relacionada com a idade com 56 anos. Este mapa obteve uma classificação de suficiente.

de "bom", com uma diferença entre medidas de espessura de $5,16 \mu m$ e $4,23 \mu m$, respectivamente para a média e desvio padrão. Ainda que apresente um valor mais elevado para a média, deve notar-se que embora este mapa resulte de aplicação de um protocolo de aquisição distinto dos anteriores, e para os quais todo o processo foi desenvolvido, o valor obtido está dentro de 1 desvio padrão para a distribuição obtida no grupo de voluntário saudáveis.

Para a aferição e quantificação do edema macular, com recurso a esta técnica, foi criado um mapa composto por 121 áreas, todas elas correspondendo a uma área do fundo ocular igual a $1/9$ do disco óptico ($0,196 mm^2$), centrado na fóvea e cuja área central (com $500 \mu m$ de diâmetro) foi sub-dividida em 4 quadrantes devido à importância da mesma e pelo facto daqui haver uma maior densidade de medidas, obtendo-se assim um mapa de 124 áreas que em virtude do processo de registo podem ser comparadas entre olhos distintos e independentemente de serem esquerdos ou direitos.

Foi utilizada uma população saudável num total de 52 voluntários, dos quais 39 resultam de uma cooperação com o *Academic Medical Center, Department of Ophthalmology, Amsterdam*, o que permitiu estabelecer para cada uma das 124 áreas a média e o desvio padrão correspondente, pelo que cada exame realizado

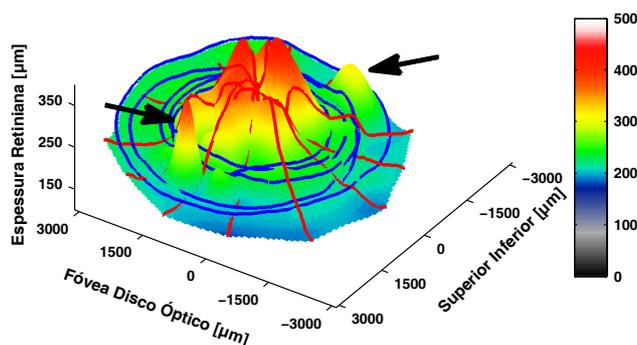


Figura 3.69: Mapa de espessura da mácula do olho esquerdo de doente com degenerescência macular relacionada com a idade com 78 anos. As setas indicam duas proeminências resultado das diferenças entre as medidas de espessura em áreas relativamente pequenas. Este mapa obteve uma classificação de mau.

pode ser comparado com esta base de dados normativa e assim determinar estatisticamente o desvio relativamente à população de referência e construir o respectivo mapa probabilístico.

A figura 3.71 mostra um mapa com os valores médios e desvios padrão para cada uma das 124 áreas a partir da população usada para a base de dados normativos, enquanto as figuras 3.72 e 3.73 (página 154) mostram, respectivamente, um exemplo de um mapa de 124 áreas de um voluntário saudável de 26 anos e de um doente com retinopatia diabética de 69 anos (valores de espessura e desvios da base normativa).

3.3 Tomografia por coerência óptica

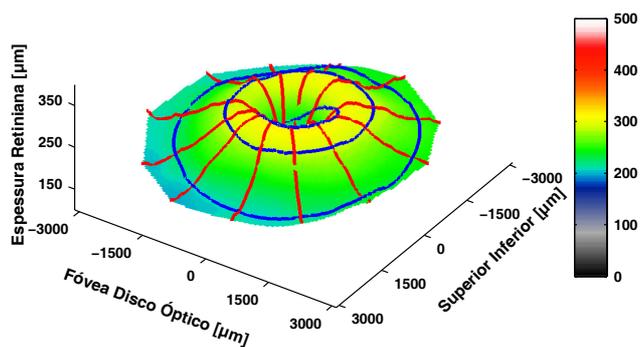


Figura 3.70: Mapa de espessura da mácula do olho direito um voluntário saudável com 30 anos seguindo o protocolo definido no projecto europeu EVI-GENORET do qual fazem parte os 6 varrimentos radiais mas apenas 3 circulares, sendo que estes são obtidos de modo independente.

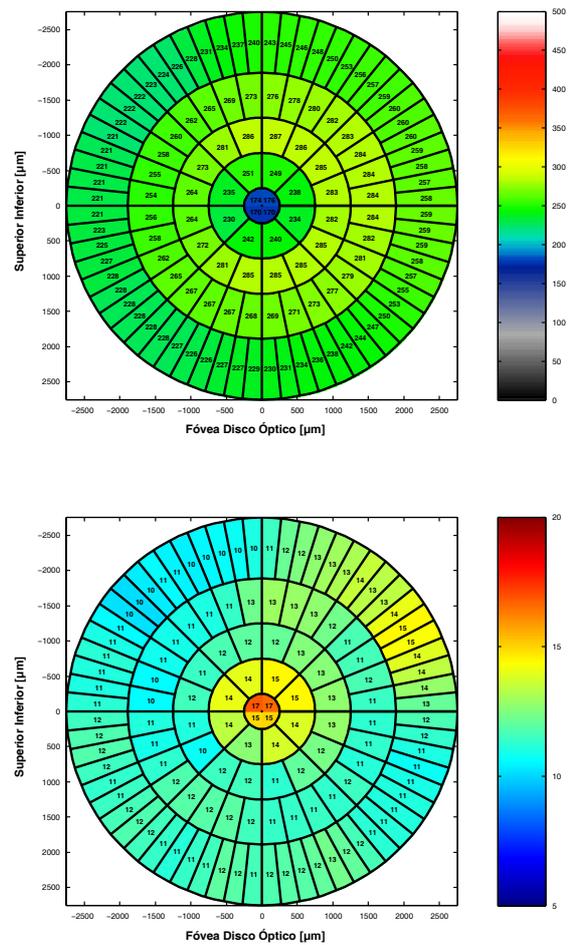


Figura 3.71: Mapa de valores médios de uma população padrão (topo – em μm) e respectivos desvios padrão (em baixo – em μm).

3.3 Tomografia por coerência óptica

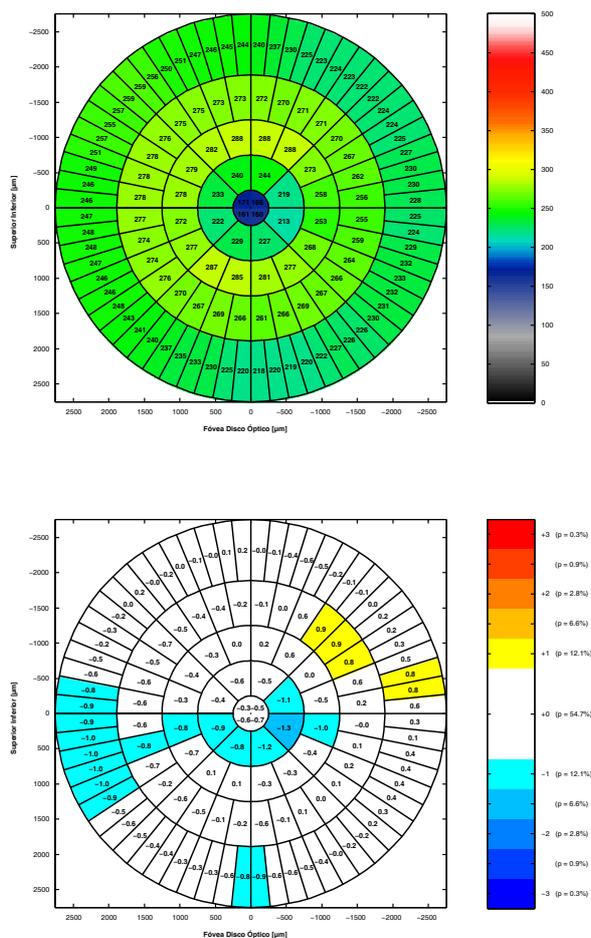


Figura 3.72: Mapas OCT de 124 áreas de um voluntário saudável. Valores de espessura em μm (topo) e diferença para a média (em baixo) em desvios padrão e em probabilidade do valor ser considerado normal.

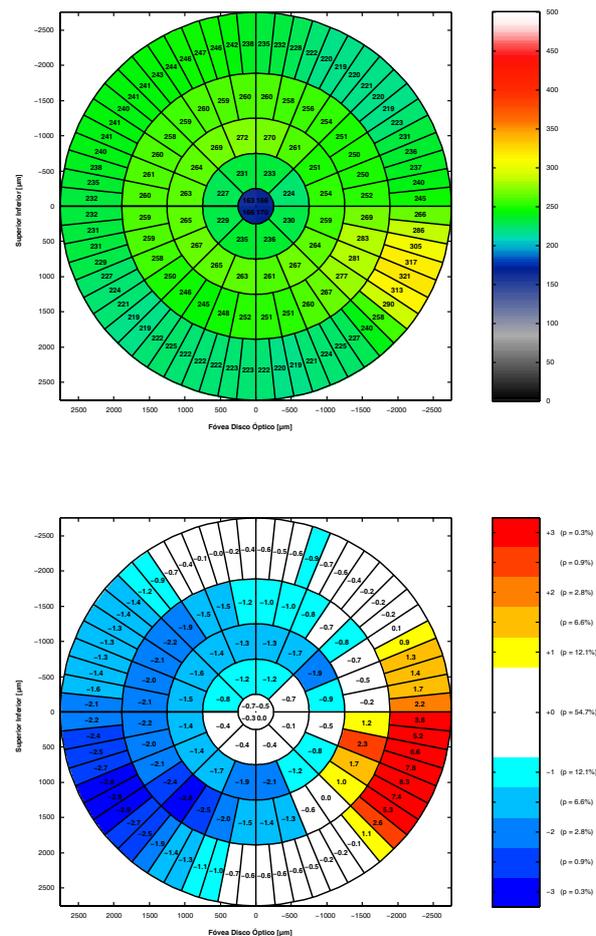


Figura 3.73: Mapas *OCT* de 124 áreas de doente com retinopatia diabética e edema macular localizado. Valores de espessura em μm (topo) e diferença para a média (em baixo) em desvios padrão e em probabilidade do valor ser considerado normal.

Capítulo 4

Combinação das Diferentes Metodologias – Mapeamento Multimodal

4.1 O co-registo multimodal

Existe uma variedade de técnicas e ferramentas de diagnóstico para o exame da mácula humana, algumas das quais foram referidas ou alvo de desenvolvimento neste trabalho.

Cada uma destas, e de outras, técnicas oferece uma visão e informação fragmentada, no sentido de que apenas é capaz de traduzir parte de um todo. A necessidade de co-registo multimodal resulta por isso do facto de alterações numa mesma retina serem traduzidas de modo distinto por cada uma das técnicas, seja o mapeamento do edema macular ou o mapeamento da permeabilidade da barreira hemato-retiniana, entre outras, o que significa que apenas integrando os vários fragmentos de informação é possível obter uma perspectiva mais abrangente dos efeitos dessas alterações.

Ainda que o objectivo principal seja o entendimento das causas e não a simples evidência dos seus efeitos, essas só poderão ser conhecidas se estivermos na posse do mais vasto conjunto de informação e não apenas de visões parciais de uma realidade claramente complexa.

O co-registo multimodal surge assim como a ferramenta básica que permite colocar em perspectiva informações distintas, pelo que, se se pretender obter uma visão integrada das alterações associadas a uma determinada patologia, será seguramente fundamental obter informações complementares e proceder à respectiva integração num referencial único.

O papel do co-registo multimodal é assim o de colocar num mesmo referencial cada uma das várias modalidades, permitindo por isso o estabelecimento de correlações globais e regionais anteriormente não disponíveis senão por inspecção visual.

Se a necessidade de obtenção de um co-registo multimodal parece assim óbvia, tal como em [LBACV99, BLCV02], a sua utilidade, que resulta da informação obtida ser superior à soma das partes, foi já demonstrada em [LBCV00, LBACV01, LBF⁺04].

O co-registo até aqui obtido ao longo deste trabalho tem sido realizado entre imagens de uma mesma modalidade através da identificação de marcas anatómicas comuns, tais como a intersecção e/ou bifurcações de vasos da rede vascular, i.e. o co-registo tem sido baseado em pontos fiduciais intrínsecos à própria retina.

4.1 O co-registo multimodal

Este processo pode na realidade ocorrer entre modalidades distintas com base nos mesmos princípios. Do que foi exposto na secção 3.1.3, e no que diz respeito à rede vascular, poderá ser aplicado o mesmo processo para a detecção dos pontos característicos de uma imagem angiográfica após administração da substância de contraste, aplicando exactamente os mesmos processos (da secção mencionada) ao negativo da imagem obtida.

Uma vez determinada a matriz de transformação, esta poderá ser aplicada à imagem angiográfica original, pelo que estamos perante um co-registo multimodal em que as modalidades envolvidas traduzem realidades bastante distintas de uma mesma retina.

Outros processos de co-registo multimodal necessitam no entanto ser considerados. Podemos por exemplo considerar a necessidade de co-registar o mapa do edema macular (a partir de medidas do *OCT*) de uma particular retina com o respectivo mapa da função da barreira hemato-retiniana. Não há entre estas modalidades quaisquer pontos de contacto. O mapa do edema macular traduz a alteração da espessura da retina para um padrão normal, por um lado, e por outro, o mapa da função da barreira hemato-retiniana indica-nos a distribuição da permeabilidade da mesma à fluoresceína, não havendo quaisquer informações morfológicas em qualquer um destes mapas, embora por razões distintas.

Aqui temos naturalmente de recorrer a uma modalidade que possa fazer de ponto de contacto entre as anteriores.

Consideremos uma retinografia. Esta modalidade permite-nos estimar as localizações da fóvea e do centro do disco óptico, as quais serviram de base ao estabelecimento do *RT-Atlas* para o qual são registados os varrimentos do *OCT* e em cujas coordenadas são definidos os mapas de edema macular. É deste modo possível estimar uma transformação que coloque a imagem retinográfica em coordenada maculares.

Por outro lado, é possível efectuar o registo entre uma angiografia e a retinografia, pelo que resulta possível o registo entre o mapa da função da barreira hemato-retiniana e a retinografia. Daqui se conclui da possibilidade de efectivamente registar duas modalidades sem referências comuns entre si.

Fazendo uso de uma linguagem formal, pode estimar-se uma transformação $\mathbf{T}^{(a)}$ que coloca uma retinografia de uma particular retina em coordenadas maculares (CM), pelo que, sendo \mathbf{R} a retinografia, se obtém,

Capítulo 4. Comb. Dif. Metod. – Mapeamento Multimodal

$$\mathbf{R}^{(\text{CM})} = \phi \left(\mathbf{T}^{(a)}, \mathbf{R} \right), \quad (4.1)$$

onde $\mathbf{R}^{(\text{CM})}$ contém a fóvea em $(0, 0)$ e o disco óptico sobre o semi-eixo positivo de x , ou seja, no mesmo sistema de coordenadas em que se encontra o mapa do edema macular como obtido na secção 3.3.¹

Existe também uma relação entre a imagem de referência do fundo ocular (\mathbf{B}_{ref}) e o mapa da função da barreira hemato-retiniana (\mathbf{B}_{bhr}) dada por

$$\mathbf{B}_{bhr} \doteq \phi \left(\mathbf{I}, \mathbf{B}_{ref} \right), \quad (4.2)$$

com \mathbf{I} a matriz identidade.

Uma transformação $\mathbf{T}^{(b)}$ pode também ser obtida de modo a co-registar a referência do fundo ocular (\mathbf{B}_{ref}) com a retinografia \mathbf{R} , pelo que

$$\mathbf{B}_{ref}^{(\text{R})} = \phi \left(\mathbf{T}^{(b)}, \mathbf{B}_{ref} \right). \quad (4.3)$$

Daqui resulta a possibilidade de obter

$$\mathbf{B}_{ref}^{(\text{CM})} = \phi \left(\mathbf{T}^{(b)} \mathbf{T}^{(a)}, \mathbf{B}_{ref} \right), \quad (4.4)$$

ou ainda

$$\mathbf{B}_{bhr}^{(\text{CM})} = \phi \left(\mathbf{T}^{(b)} \mathbf{T}^{(a)} \mathbf{I}, \mathbf{B}_{bhr} \right), \quad (4.5)$$

com $\mathbf{B}_{bhr}^{(\text{CM})}$ o mapa da função da barreira hemato-retiniana em coordenada maculares, pelo que as matrizes de transformação podem ser concatenadas fazendo

$$\mathbf{T}^{(c)} = \mathbf{T}^{(b)} \mathbf{T}^{(a)}, \quad (4.6)$$

uma vez que \mathbf{I} é a matriz identidade.

$\mathbf{T}^{(c)}$ é assim a matriz de transformação correspondente ao co-registo pretendido entre o mapa da função da barreira hemato-retiniana e o mapa do edema macular.

¹A função $\phi()$ implementa o processo de mapeamento directo seguido de um processo de interpolação bi-cúbica dos dados. No caso de imagens multi-espectrais, o processo é repetido para cada um dos canais.

4.1 O co-registo multimodal

Do exposto resulta a possibilidade de co-registo multimodal entre duas modalidades complementares e sem referências anatómicas comuns. Deve salientar-se no entanto que a cada um dos passos anteriores está associado um erro de co-registo, pelo que o erro final será sempre superior a qualquer um dos anteriores, o que advém do produto das matrizes de transformação individuais (4.6).

Por outro lado, deve também notar-se a diferença entre as resoluções intrínsecas entre cada uma das modalidades, pelo que os erros de registo são aceitáveis em função da informação adicional que o mesmo fornece.

No actual estado de desenvolvimento, os mapas obtidos para o edema macular são definidos por áreas correspondentes a 1/9 da área de um disco óptico. Para a fóvea a resolução é maior, 1/36 da área de um disco óptico, o que se traduz numa área de $49078 \mu m^2$. Ainda assim, tal corresponde a uma relação entre resoluções das modalidades consideradas de 2:1, uma vez que a resolução do mapa da função da barreira hemato-retiniana é estimado em cerca de $100 \mu m$.

4.2 A necessidade de modelos deformáveis

Tal como exemplificado na secção anterior, há a necessidade de desenvolver processos de co-registo capazes de lidarem com os mapas da função da barreira hemato-retiniana desenvolvidos na secção 3.2.1. Como também demonstrado, uma das necessidades prende-se com o co-registo destes mapas com uma referência global do fundo ocular, sendo a retinografia a modalidade de eleição por permitir a obtenção da informação morfológica necessária ao mesmo tempo que é a técnica menos invasiva, mais difundida e a de maior facilidade de obtenção.

Deve de novo chamar-se a atenção para o interesse de todas as técnicas aqui focadas serem realizadas na área macular, motivo pelo qual os processos seguidos têm como base esta premissa.

Assim sendo, pretende obter-se o processo que realiza o co-registo de um mapa da função da barreira hemato-retiniana (\mathbf{B}_{bhr}) com uma retinografia (\mathbf{R}).

Foi já definida a relação entre \mathbf{B}_{bhr} e a respectiva referência do fundo ocular (\mathbf{B}_{ref}) na equação 4.2, pelo que se fará referência a \mathbf{B}_{bhr} ou a \mathbf{B}_{ref} em função do contexto, sem perda de generalidade para o processo de co-registo em causa.

Pretende deste modo determinar-se uma transformação \mathbf{T} que efectue o co-registo de \mathbf{B}_{bhr} e \mathbf{R} , mais especificamente que permita colocar \mathbf{B}_{bhr} em coordenadas de imagem de \mathbf{R} , i.e.

$$\mathbf{B}_{bhr}^{(\mathbf{R})} = \phi(\mathbf{T}, \mathbf{B}_{bhr}) . \quad (4.7)$$

Relativamente à informação disponível, as retinografias de interesse para os processos aqui considerados correspondem ao campo 2 do protocolo *ETDRS* (centradas na fóvea), com um ângulo superior ou igual a 40° , e contém essencialmente informação morfológica do fundo ocular.

Por outro lado, a imagem correspondente à referência do fundo ocular da função da barreira hemato-retiniana contém uma informação do processo dinâmico da circulação sanguínea, embora seja possível extrair algum conteúdo morfológico a partir desses dados, nomeadamente estimar a localização da fóvea e proceder à detecção da rede vascular, ainda que a presença de áreas hiper- ou hipofluorescentes adicionem um grau de dificuldade a este processo.

Os mapas funcionais que nos interessam co-registar com uma qualquer retinografia da retina correspondente, bem como as respectivas referências do

4.2 A necessidade de modelos deformáveis

fundo ocular (\mathbf{B}_{ref}), foram já mostrados em secções anteriores, e.g. figura 3.32.

Dessas referências, bem como de exemplos de retinografias já mostradas, e.g. figura 3.6 (página 35), resulta clara a diferença não só ao nível do conteúdo da informação, mas também a diferença na área do fundo ocular abrangida por cada uma das modalidades, correspondendo a área representada por \mathbf{B}_{ref} a um ângulo inferior ou igual a 20° .

Resulta daqui, e das condições de operação pretendidas para ambas as modalidades, que a única referência global comum seja a fóvea. Existe contudo uma parte da rede vascular comum a ambas as modalidades, sendo no entanto de salientar a notória diferença ao nível do detalhe da rede vascular capturada por cada uma delas.

Pelo exposto, resulta que a abordagem à realização do co-registo seguirá um trajecto semelhante ao realizado na secção 3.1.3, com a obtenção de um co-registo rígido inicial.

Obtém-se assim uma aproximação, inicial, dada por

$$\mathbf{B}_{ref}^{(r)} = \phi \left(\mathbf{T}^{(r)}, \mathbf{B}_{ref} \right), \quad (4.8)$$

com $\mathbf{T}^{(r)}$ a transformação rígida a qual permite colocar \mathbf{B}_{ref} no espaço imagem de \mathbf{R} .

A figura 4.1 mostra a retinografia para a qual se pretende co-registar a referência de um dado mapa da função da barreira hemato-retiniana (figura 4.2).

O processo de co-registo da rede vascular, em coordenadas polares, e seguindo o processo detalhado na secção 3.1.3, é mostrado na figura 4.3 (página 166). Deve notar-se a diferença de detalhe na rede vascular, representada a verde para a retinografia e a vermelho para a angiografia, e ainda o facto desta última mostrar o resultado da interpolação bi-cúbica com factor 2 da imagem original (para efeitos de visualização).

O resultado deste processo de co-registo (rígido) pode ser visto na figura 4.4 (página 167).

Resulta claro o facto de haver ainda necessidade de introdução de melhorias no processo de co-registo, não devendo no entanto de deixar de se considerar a diferença de detalhe entre as imagens, nem do tipo de informação transportado por cada uma delas.

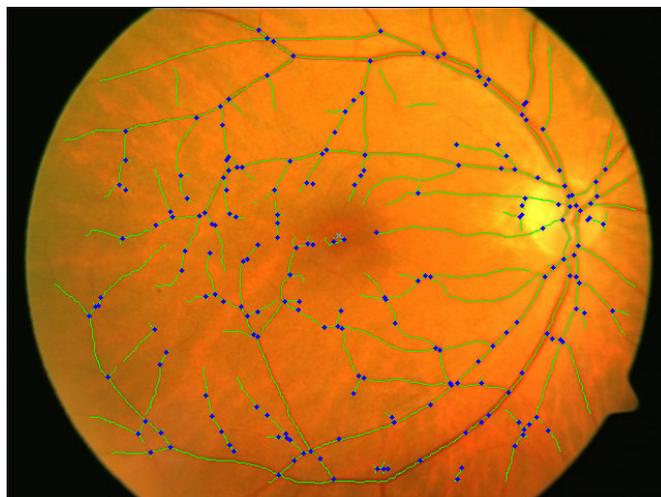


Figura 4.1: Retinografia com a rede vascular mostrada a verde e os pontos candidatos a cruzamentos e bifurcações a azul.

Deve ainda chamar-se a atenção para a presença de áreas hiperfluorescentes junto à fóvea, as quais têm influência na determinação da localização da fóvea na aproximação inicial.

Da análise do resultado pode observar-se a não uniformidade no erro obtido, o que deixa antever a necessidade de se considerar um modelo que não o agora utilizado. Isto está aliás em consonância com as considerações efectuadas na secção 3.1.1 onde foi justificada a necessidade de obtenção de um co-registo não rígido em função da curvatura de *Gauss* para a superfície da retina vs. a representação num plano.

Tal como já efectuado no processo descrito em 3.1.3, também aqui vai ser determinada uma matriz de transformação projectiva de modo a obter-se o co-registo multimodal projectivo, o qual é esperado fornecer uma solução com uma exactidão superior à obtida com o modelo rígido.

Deste modo vai determinar-se a matriz de transformação em função dos pontos característicos disponíveis em ambas as imagens. Deve salientar-se a diferença no número e distribuição destes pontos (figuras 4.1 e 4.2).

Obtém-se assim uma matriz de transformação projectiva $\mathbf{T}^{(p)}$ (4.9) pelas equações 3.20 a 3.23, a qual permite obter $\mathbf{B}_{ref}^{(p)}$ por (4.9).

4.2 A necessidade de modelos deformáveis

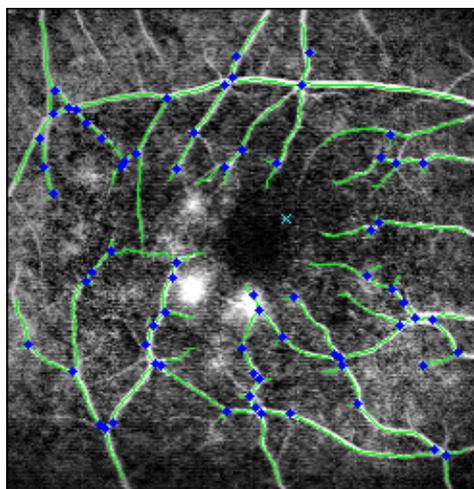


Figura 4.2: A angiografia fluoresceínica mostrada constitui a referência do fundo ocular de um particular mapa da função da barreira hemato-retiniana obtida com o *HRA*. É mostrada a rede vascular a verde e os pontos candidatos a cruzamentos e bifurcações a azul.

$$\mathbf{B}_{ref}^{(p)} = \phi \left(\mathbf{T}^{(p)}, \mathbf{B}_{ref} \right). \quad (4.9)$$

A figura 4.5 (página 167) mostra um exemplo do resultado da aplicação deste processo.

Da análise deste resultado é possível verificar a melhoria do co-registo obtido. O facto do mesmo se apresentar com uma exactidão inferior aos obtidos entre imagens retinográficas, deve-se em parte ao facto de estarmos aqui na presença de menos pontos de controlo para a determinação da matriz de transformação, por um lado, e por outro devido à natureza da própria imagem de referência obtida com o *HRA*.

Existe contudo um outro factor a ter em conta.

Ao contrário das retinografias, ou de quaisquer outras modalidades que façam uso de um sistema de aquisição *CCD*, sejam mono- ou multiespectrais, a modalidade aqui considerada é adquirida com recurso a um sistema de varrimento *laser*, o qual já foi amplamente detalhado na secção 3.2.1.

Tal como aí especificado, a imagem obtida não corresponde a uma vulgar imagem fotográfica, mas é antes construída pixel-a-pixel. Dado o tempo de

Capítulo 4. Comb. Dif. Metod. – Mapeamento Multimodal

aquisição anunciado e a inevitabilidade da ocorrência dos movimentos sacádicos, estamos claramente na presença de uma imagem que, para além da distorção devida à curvatura do fundo ocular, tem ainda deformações locais devido às sacadas, as quais não podem ser corrigidas por quaisquer dos processos até agora utilizados uma vez que estas implicam o co-registo local (deformável) ao contrário do processo anterior que apenas corrige deformações globais.

Este aspecto necessita agora de ser considerado para a prossecução do co-registo pretendido.

Considerando um bloco de imagem $\mathbf{W}_{B_{ref}}^{(p)}(x_0, y_0)$ de tamanho $(N + 1) \times (N + 1)$ da imagem $\mathbf{B}_{ref}^{(p)}$ (4.9) centrado em (x_0, y_0) , vai considerar-se um bloco $\mathbf{W}_R(x_0, y_0)$ de tamanho $(M + 1) \times (M + 1)$, com $M > N$, também centrado em (x_0, y_0) e determinar-se a melhor correlação entre ambos segundo uma determinada métrica.

Resulta daqui a determinação de um deslocamento $(\Delta x, \Delta y)$ a qual indica que o bloco $\mathbf{W}_{B_{ref}}^{(p)}(x_0, y_0)$ representa de facto a posição $\mathbf{R}(x_0 + \Delta x, y_0 + \Delta y)$ e não $\mathbf{R}(x_0, y_0)$, pelo que deverá sofrer a translação correspondente.

Considerando o tipo de imagens em análise, a métrica que melhor resultados permitiu obter foi a *partitioned intensity uniformity (PIU)*, proposta em [HB01].

Esta métrica considera uma imagem \mathbf{A} com N níveis de intensidade. Considerando apenas os píxeis com valores num dado nível, determina o quociente entre o desvio padrão e a média dos píxeis correspondentes da imagem \mathbf{B} em função da transformação que promove o respectivo co-registo. Daqui resulta que a maiores semelhanças resultam menores valores de *PIU*, o qual é definido por

$$PIU_B = \sum_a \frac{n_a \sigma_B(a)}{N \mu_B(a)}, \quad (4.10)$$

com

$$\begin{cases} n_a = \sum_{\Omega_b^T} 1 \\ \mu_B(a) = \frac{1}{n_a} \sum_{\Omega_b^T} B^T(x_A) \\ \sigma_B(a) = \frac{1}{n_a} \sum_{\Omega_b^T} (B^T(x_A) - \mu_B(a))^2 \end{cases}, \quad (4.11)$$

onde Ω_b^T significa a projecção do domínio de b (imagem \mathbf{B}) em Ω_a (domínio da imagem \mathbf{A}) e \mathbf{B}^T a transformação de \mathbf{B} por T .

4.2 A necessidade de modelos deformáveis

Da determinação das translações $(\Delta x, \Delta y)$ para o bloco $\mathbf{W}_{B_{ref}}^{(p)}(x_0, y_0)$, resulta uma matriz de deslocamentos em x e em y . Contudo o peso computacional do processo leva a que a avaliação se faça apenas em píxeis numa grelha com espaçamento Δ_{xy} .

Os deslocamentos $(\Delta x, \Delta y)$ para os restantes píxeis são obtidos por interpolação (*TPS*) como no exemplo na mostrado linha superior da figura 4.6 (página 168). O resultado combinado da transformação projectiva e da deformação local é mostrada na mesma figura (linha inferior).

Aplicado ao caso em análise, o resultado deste processo pode ser visualizado na deformação de uma grelha regular, em \mathbf{B}_{ref} , que em \mathbf{R} toma o aspecto mostrado na figura 4.7 (página 169).

A comparação entre os três tipos de co-registo aqui abordados é agora possível observando a imagem 4.8 (página 170).

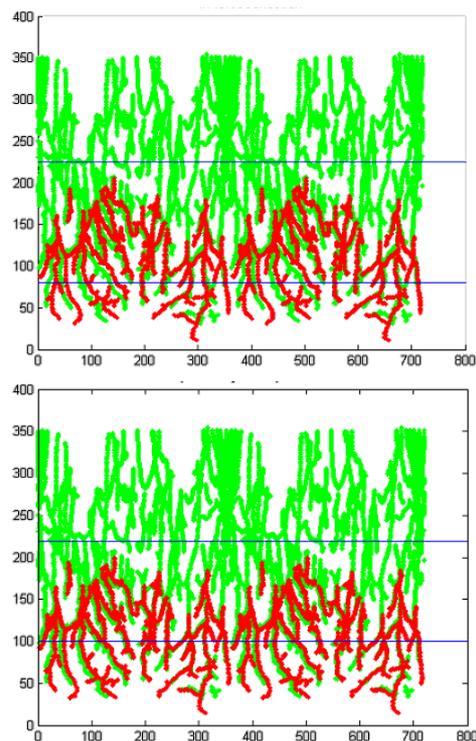


Figura 4.3: A figura superior mostra duas redes vasculares antes da correcção da localização da origem do eixos e a figura inferior mostra a resultado dessa mesma correcção. São ainda mostrado os limites para as distâncias às respectivas origens, sendo o limite inferior obrigatório em função da distorção elevada para pequenas distâncias à origem dos eixos. O eixo horizontal representa o ângulo de 0 a 4π (0° a 720°) de modo a permitir a utilização de janelas para correlação-cruzada em torno da origem (0 e 2π).

4.2 A necessidade de modelos deformáveis

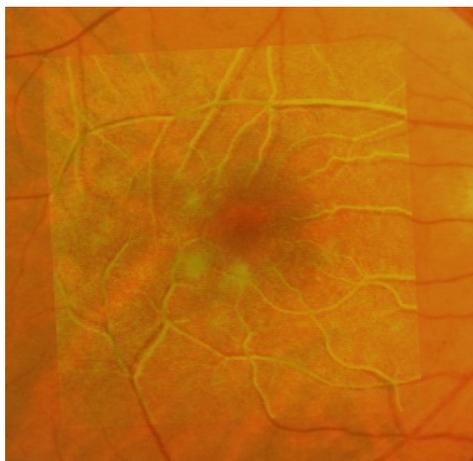


Figura 4.4: A figura mostra o resultado do co-registo rígido entre uma angiografia fluoresceínica obtida com o *HRA* e uma retinografia. Apenas a parte comum é mostrada para efeitos de visualização.



Figura 4.5: A figura mostra o resultado do co-registo projectivo entre uma angiografia fluoresceínica obtida com o *HRA* e uma retinografia. Apenas a parte comum é mostrada para efeitos de visualização.

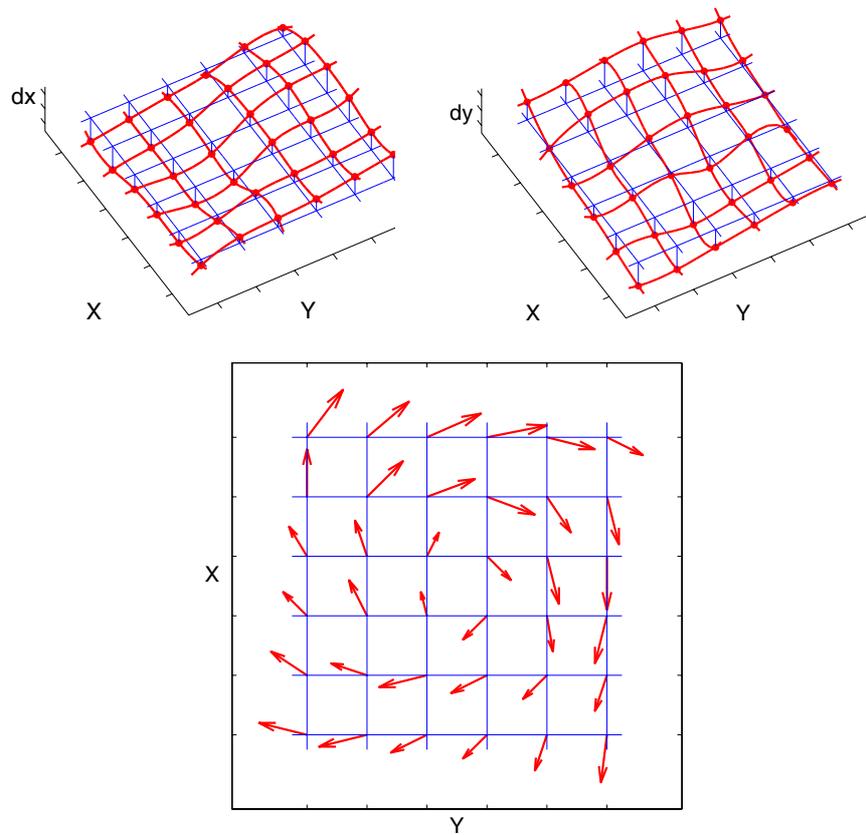


Figura 4.6: As imagens mostram o processo de interpolação dos deslocamentos locais (linha superior, esquerda e direita). Na imagem inferior é mostrado o resultado acumulado da transformação projectiva e dos deslocamentos locais.

4.2 A necessidade de modelos deformáveis

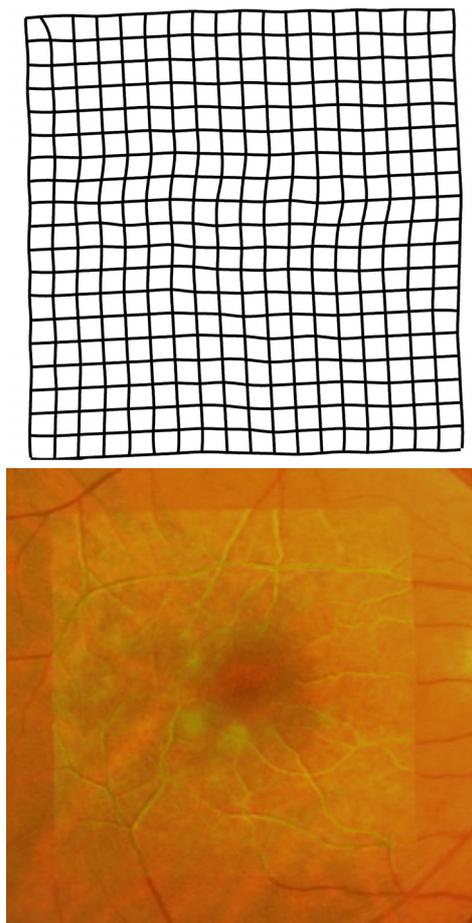


Figura 4.7: Na imagem superior é mostrado o efeito do co-registo deformável aplicado a uma grelha regular. Na imagem inferior é mostrado o resultado do co-registo aplicado à angiografia fluoresceínica obtida com o *HRA* na retinografia de referência. Apenas a parte comum é mostrada para efeitos de visualização.

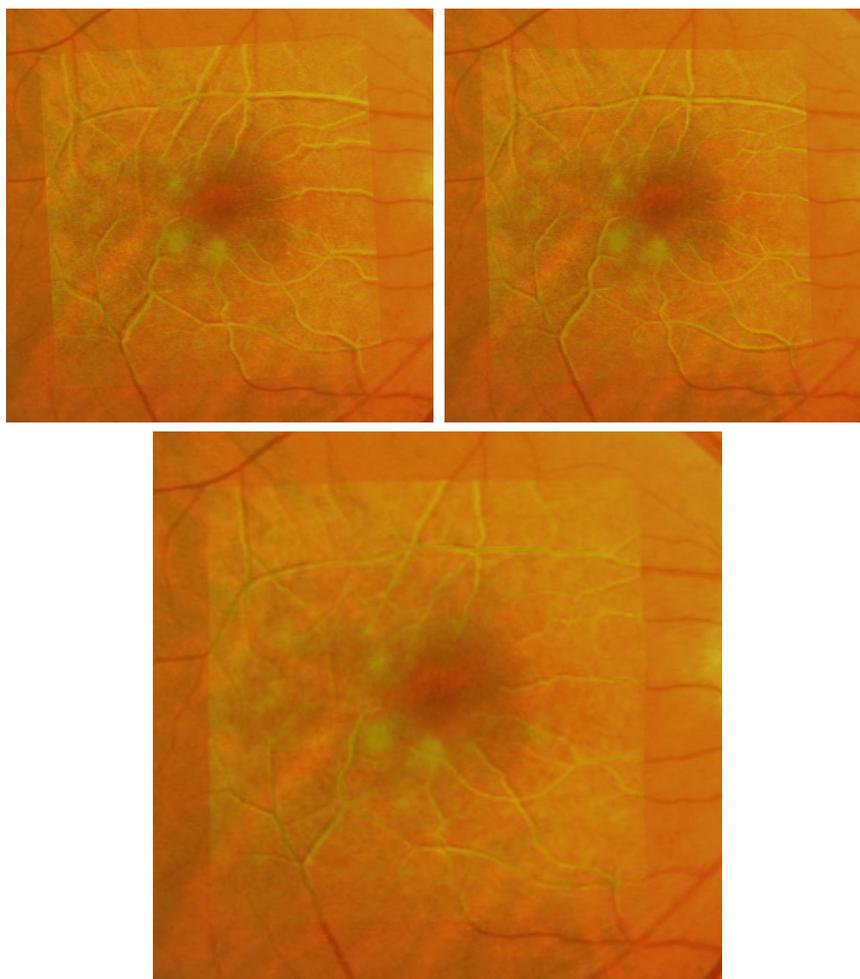


Figura 4.8: Nesta figura são mostrados os resultados do co-registo multimodal do tipo rígido e projectivo, na linha superior à esquerda e à direita, respectivamente, e o resultado considerando deformações locais, em destaque na linha inferior. Deve notar-se o efeito da extrapolação pela existência de um maior erro de registo junto aos limites da imagem, o qual é devido ao tamanho dos blocos utilizados na determinação dos deslocamentos locais.

4.3 Primeiros resultados

Do anteriormente exposto, verifica-se a possibilidade de obtenção de um co-registo entre uma modalidade de imagem funcional e uma modalidade de imagem essencialmente morfológica. Verificou-se a obtenção de um melhor registo considerando transformações do tipo projectivo relativamente ao co-registo rígido, bem como do co-registo deformável relativamente ao co-registo projectivo.

Para a demonstração destes resultados, foram considerados retinografias e mapas da função da barreira hemato-retiniana de 13 olhos e foram analisados os resultados dos registos rígido, projectivo e deformável segundo 3 métricas, o coeficiente de correlação de Pearson, a média do quadrado das diferenças e a métrica *PIU* (4.11), os quais se encontram na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Comparação de resultados entre os processos de co-registo rígido (Ríg.), projectivo (Proj.) e deformável (Def.) segundo as métricas de similaridade CCP (coeficiente de correlação de Pearson), MQD (média do quadrado das diferenças) e *PIU* (*partitioned intensity uniformity*).

	CCP			MQD			<i>PIU</i>		
	Ríg.	Proj.	Def.	Ríg.	Proj.	Def.	Ríg.	Proj.	Def.
Média	0,311	0,409	0,487	$5,53 \times 10^{-3}$	$5,40 \times 10^{-3}$	$5,07 \times 10^{-3}$	0,131	0,127	0,113
DP	0,118	0,103	0,084	$2,20 \times 10^{-3}$	$2,19 \times 10^{-3}$	$2,30 \times 10^{-3}$	0,010	0,010	0,010

Uma sequência do processo de co-registo deformável pode ser acompanhada no exemplo seguinte, do qual se mostra a retinografia já com o centro dos vasos assinalados a verde e os pontos de cruzamento/bifurcações a azul (figura 4.9).

A figura 4.10 mostra o resultado do co-registo rígido (4.8) em formato de *tabuleiro de xadrez*, onde é notória a diferença de detalhes da retinografia para a angiografia fluoresceínica, referência do fundo ocular do mapa da função da barreira hemato-retiniana.

A aplicação da transformação correspondente ao co-registo deformável pode ser vista na figura 4.11, a qual resulta da determinação das translações determinadas para cada bloco de imagem após (4.9). Na figura da esquerda é mostrado o deslocamento necessário aplicar (setas a amarelo) a um conjunto de pontos sendo perceptível a rotação global do conjunto. Na figura da direita é possível observar o efeito da transformação aplicada a uma grelha regular, onde as deformações locais são visíveis pela deformação das rectas que definem a grelha na imagem



Figura 4.9: Retinografia com o centro dos vasos assinalados a verde e os pontos candidatos a cruzamentos/bifurcações assinalados a azul.

original.

A aplicação da transformação determinada para a referência do fundo ocular ao mapa da função da barreira hemato-retiniana, é mostrado na figura 4.12 na forma de *tabuleiro de xadrez*.

O resultado da transformação anterior pode agora ser observado na figura 4.13, aplicado à referência do fundo ocular, à esquerda, e ao mapa da função da barreira hemato-retiniana à direita (por aplicação de (4.2)).

O resultado final pode ser observado na figura 4.14.

Destes processos, é possível obter o resultado mostrado na figura 4.15, onde é possível observar (em perspectiva) o co-registo entre um mapa da espessura macular (obtido pelos processos desenvolvidos na secção 3.3) e o mapa da função da barreira hemato-retiniana (obtido pelos processos desenvolvidos na secção 3.2.1). A retinografia serviu para o estabelecimento da relação entre as modalidades anteriores, as quais não partilham referências comuns que permitam o seu co-registo directo.

O mesmo resultado pode ser observado em projecção 2D, como na figura 4.16 (página 176).

4.3 Primeiros resultados

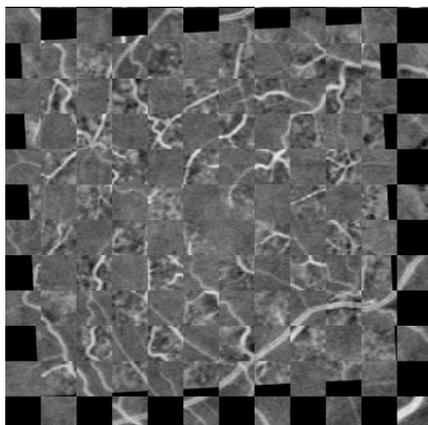


Figura 4.10: Resultado do co-registo rígido entre uma retinografia e a angiografia fluoresceínica referênciada do fundo ocular do mapa da função da barreira hemato-retiniana. É visível a diferença de detalhes entre ambas as modalidades e a necessidade de melhorar o processo.

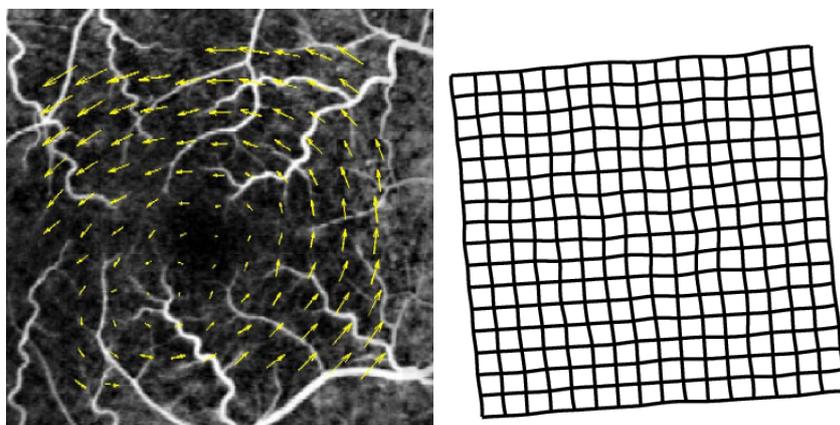


Figura 4.11: Na figura da esquerda é possível observar o deslocamento necessário em vários pontos para a obtenção do co-registo deformável para o caso em análise (setas a amarelo). Na imagem da direita, pode observar-se o resultado da aplicação da transformação deformável a uma grelha regular.

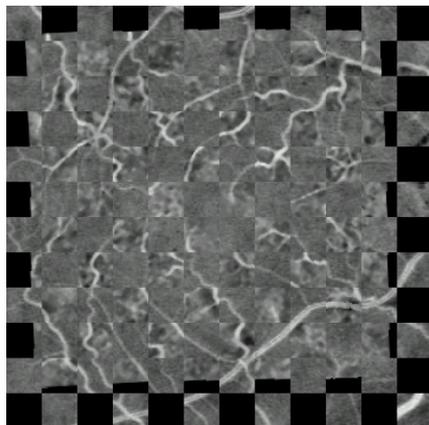


Figura 4.12: Resultado do co-registo deformável (em formato de *tabuleiro de xadrez* para visualização da exactidão do processo).

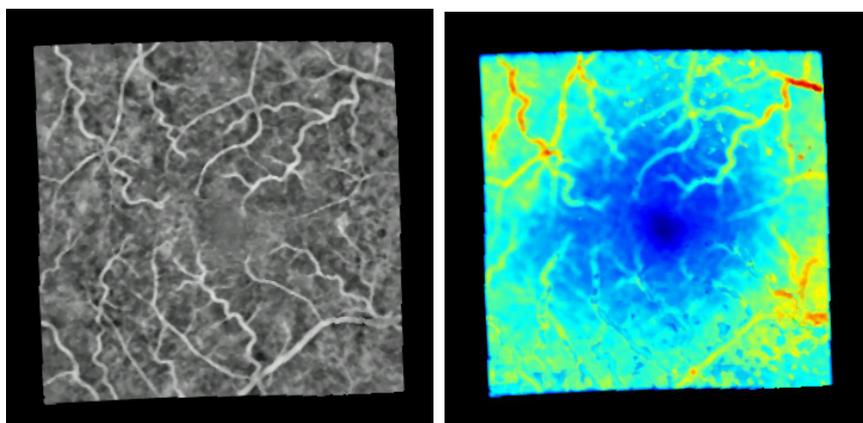


Figura 4.13: Na figura é mostrado o resultado do co-registo deformável para a referência do fundo ocular e para o mapa da função da barreira hemato-retiniana, respectivamente à esquerda e à direita.

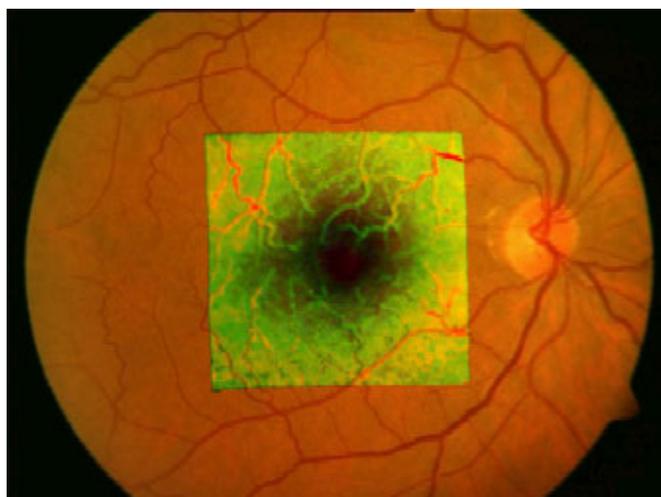


Figura 4.14: Resultado final do processo que permite a obtenção do co-registo entre uma retinografia e o mapa da função da barreira hemato-retiniana.

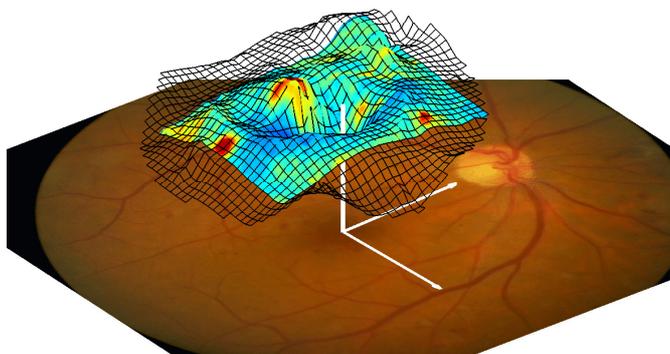


Figura 4.15: Resultado de um co-registo multimodal entre um mapa de espessura macular, um mapa da função da barreira hemato-retiniana e uma retinografia de um mesmo olho.

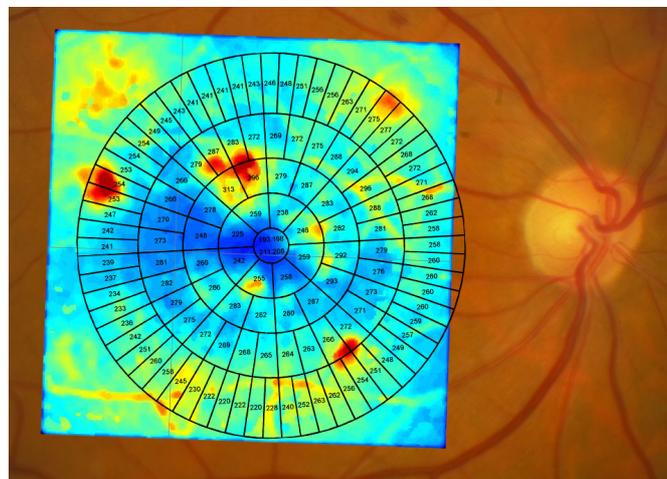


Figura 4.16: Resultado de um co-registo multimodal entre um mapa de espessura macular, um mapa da função da barreira hemato-retiniana e uma retinografia de um mesmo olho, sendo possível correlacionar os valores de espessura com o derrame de fluoresceína para o vítreo e localizar ambas as alterações no fundo ocular. Apenas uma parte da retinografia é mostrada para melhor visualização.

4.4 Perspectivas para o futuro

Os processos abordados neste capítulo estabelecem apenas o ponto de partida para uma área que irá seguramente ter um papel preponderante em desenvolvimentos num futuro próximo.

Foram aqui estabelecidos os princípios fundamentais e demonstrada a necessidade da aplicação de co-registos reformáveis para uma das técnicas desenvolvidas ao longo da realização deste trabalho. É aliás de registar o facto de um sistema recentemente tornado disponível para testes num número reduzido de locais, ao abrigo do *Early Access Program*, o sistema *Cirrus OCT*, englobar já uma abordagem de co-registo multimodal, ainda que incipiente. No entanto, embora os testes por nós realizados indiquem o deficiente funcionamento mesmo nos casos mais simples, o sistema continua a não considerar o co-registo deformável e nem sequer o co-registo projectivo.

Ainda assim, o facto de um sistema com as características inovadoras do sistema mencionado considerar tal necessidade, representa já um passo importante no reconhecimento da vantagem de poderem correlacionar-se diversas fontes de informação.

O caminho a seguir parece assim ser aquele trilhado ao longo deste trabalho com a integração de um cada vez maior número de fontes de informação, considerando no entanto a necessidade de obtenção de um co-registo o mais exacto possível em função das modalidades consideradas.

Devemos no entanto salientar as dificuldades inerentes a todos estes processos, desde as diferenças de resolução intrínsecas de cada uma das modalidades, ao facto de cada uma delas traduzir um aspecto distinto, ainda que de uma mesma entidade. Mesmo nos casos aparentemente mais simples, tal como o co-registo de uma retinografia e de uma angiografia fluoresceínica, devem ter-se em consideração as diferenças entre as marcas anatómicas utilizadas, as quais traduzem realidades distintas.

Todos estes aspectos necessitam de ser conhecidos e só em posse destes conhecimentos podemos tomar as decisões mais acertadas para cada um dos casos, o que mais uma vez reforça a ideia de que a transposição, para esta área, de processos com bons resultados noutras áreas, não garante por si só os resultados pretendidos.

Discussão

Discussão

Ao longo desta dissertação foram abordados diversos desenvolvimentos efectuados em áreas que se podem categorizar em quatro tópicos:

1. O desenvolvimento de ferramentas para a obtenção de novos dados a partir de métodos existentes;
2. O desenvolvimento de novas metodologias de imagem funcional;
3. O desenvolvimento do processo de quantificação de fluorescência;
4. O desenvolvimento de processos de co-registo multimodal.

Um aspecto fundamental regulou o decurso de todos os trabalhos, a necessidade de criação de métodos com aplicação em ambiente de investigação clínica, e eventualmente em ambiente de prática clínica diária.

No primeiro dos quatro pontos enquadram-se os processos abordados nas secções 3.1.1 e 3.1.2, respectivamente a obtenção de novos indicadores de progressão da retinopatia diabética por contagem de microaneurismas e detecção de alterações maculares em sequências temporais de retinografias.

Relativamente ao primeiro aspecto, deve realçar-se que o processo aqui descrito não considera a detecção automática de microaneurismas, processos estes que têm merecido a atenção de diversos grupos e resultado em publicações tais como [FUC⁺98, MCN99, KBMC01, LCK01, HA02, GCO⁺03, LGG⁺03, LGL⁺03, NGS⁺04, FPG⁺06].

O trabalho de [NGS⁺04] visa a detecção de microaneurismas em retinografias mas não efectua a sua análise ao longo do tempo, pelo que não são extraídos os parâmetros necessários à avaliação da progressão das alterações da rede vascular indicadas pela formação de novos microaneurismas.

Por outro lado, em [HI96] foram utilizadas angiografias fluoresceínicas de 60°, as quais foram projectadas sobre uma mesa digitalizadora sobre a qual foram assinalados os microaneurismas de forma manual. O “co-registo” foi deste modo “obtido” pela projecção da imagem e utilizando dois pontos de controlo não especificados. Este estudo incidiu sobre 24 doentes diabéticos do tipo 1.

Em [GCO⁺03] foram utilizados dois grupos de doentes. Do primeiro grupo fizeram parte 10 doentes diabéticos do tipo 1 e foram utilizadas duas angiografias fluoresceínicas espaçadas de 1 ano, as quais, após digitalização, foram submetidas a marcação manual e automática para comparação entre estes dois métodos.

Do segundo grupo fizeram parte 11 doentes diabéticos do tipo 1 e 14 do tipo 2, dos quais foram obtidas 3 imagens digitais com intervalos de 1 ano entre si. Neste segundo grupo, apenas o processo de detecção automático de microaneurismas foi utilizado para a determinação dos parâmetros taxa de formação e taxa de desaparecimento de microaneurismas.

Relativamente a este trabalho, o aqui desenvolvido, além do facto de não considerar a detecção automática dos microaneurismas, utiliza imagens distintas, embora a diferença principal, do ponto de vista do processo, seja o método de co-registo utilizado. Aqui optou-se por um co-registo projectivo ao invés de um co-registo que considera apenas a translação, rotação e factor de escala, valores estimados a partir da correlação-cruzada entre imagens (segundo [COM⁺97], a referência 9 de [GCO⁺03]).

Ainda relativamente ao primeiro ponto, existem várias abordagens para a determinação automática de alterações do fundo ocular, tais como as abordadas em [LGG⁺03, LGL⁺03, NGS⁺04]. Estas são contudo abordagens distintas daquela aqui seguida, a qual visa a determinação das alterações ocorridas ao longo de um intervalo de tempo relativamente a um estado inicial do mesmo fundo ocular e não a sua classificação ou alterações relativamente a um qualquer padrão.

Mais recentemente, já no decurso de 2007, foi publicado um trabalho o qual é em tudo semelhante ao aqui desenvolvido [NICR⁺07]. Os dados apresentados referem-se contudo à comparação de duas imagens, embora o processo possa naturalmente ser expandido para uma maior sequência de imagens. Estes desenvolvimentos demonstram claramente a necessidade destes processos e que esta é uma área cuja actividade científica envolve diversos grupos.

No que diz respeito ao ponto dois, tratado na secção 3.2.1, não são conhecidos processos alternativos ao aqui desenvolvido para a determinação do derrame de fluoresceína da circulação sanguínea para o humor vítreo para além dos mencionados na respectiva secção, os quais incluem as abordagens efectuadas com recurso ao *Coherent Fluorotron Master* ou ao sistema anteriormente desenvolvido por este mesmo grupo de investigação, o qual se encontra descrito em [LBSCV99] e cujos resultados se encontram profusamente divulgados tal como em [BIS⁺99, BLDCV02, LBSCV99, LBCV00, LBACV01, LBF⁺04, CVB05, CV06], para citar apenas os mais relevantes.

O terceiro ponto (secção 3.2.2) merece consideração especial por não serem

Discussão

conhecidas quaisquer alternativas à solução proposta, embora este seja um problema conhecido e considerado de grande interesse a sua resolução. Como exemplo pode considerar-se o trabalho [CWM⁺07]. No entanto a tentativa de *solução* utilizada não faz mais do que considerar um conjunto de factores de normalização e a conversão para uma escala de pseudo-cor, a qual não traduz qualquer processo de calibração.

No que diz respeito ao quarto ponto (tratado no capítulo 4), esta é uma área de grande actividade em diversas área da medicina, embora seja recente a sua aplicação na área aqui considerada, a oftalmologia, o que é notório pela falta de referências disponíveis.

Os passos aqui dados mostram a vantagem de uma correlação entre modalidades complementares de diagnóstico e alguns dos problemas que devem ser considerados na sua resolução. Este é contudo apenas o início de um longo caminho ainda a percorrer.

Tendo a consciência de que muito mais haveria para dizer acerca de qualquer um dos tópicos abordados, optou-se pela descrição do que realmente foi aqui desenvolvido, limitando por isso, genericamente, as referências aos trabalhos que contribuíram para o aqui apresentado. Não foi por esse motivo feita uma descrição exaustiva da diversa bibliografia existente, e.g. análise e co-registo de imagem.

Todos os processos demonstrados ao longo do trabalho foram alvo de comunicações científicas em congressos da especialidade, bem como da publicação em livros de congresso ou alvo de publicações em jornais da especialidade.

Outros encontram-se ainda em fase de publicação. Um caso deve merecer consideração relativamente à divulgação (reduzida) já efectuada, o desenvolvimento do processo da quantificação de fluorescência. Neste caso particular, o qual envolve a patente do processo, foi necessário divulgar até agora o estritamente necessário em comunicação científicas orientadas para a aplicação. À data da elaboração deste texto, foi submetida a aplicação para a patente nos EUA¹, pelo que é de esperar que sejam a partir de agora obtidas publicações relacionadas com este assunto.

A lista que se segue ilustra as principais divulgações/publicações relacio-

¹No intervalo de tempo que ocorreu entre a submissão desta dissertação e a sua formatação final, foi publicada a patente internacional pela *World Intellectual Property Organization (International Bureau)*, em 5 de Junho de 2008, com a referência *International Publication Number WO 2008/067525 A2*.

nadas com cada um dos tópicos abordados e desenvolvidos no trabalho aqui apresentado.

Merece no entanto uma chamada de atenção especial o facto de todos os processos aqui desenvolvidos e encontrarem em utilização no dia-a-dia do Centro de Novas Tecnologias para a Medicina (CNTM) da AIBILI, quer em estudos de cooperação com o Centro de Ensaios Clínicos (CEC) também da AIBILI, quer em estudos de projectos científicos nacionais e internacionais (com financiamentos da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia e da União Europeia, respectivamente), quer ainda em ensaios clínicos em curso.

Para além destes aspectos, foram ainda estabelecidas cooperações internacionais para a utilização de algumas das ferramentas desenvolvidas. Outros processos encontram-se em fase de avaliação comercial, quer em cooperação com empresas nacionais quer no eventual estabelecimento de sociedades para esse efeito.

Lista de publicações no âmbito do trabalho desenvolvido:

1. Bernardes R., Lobo C., Cunha-Vaz J.: Multimodal Macula Mapping. A New Approach to Study Diseases of the Macula. *Surv. Ophthalmol.* 2002, 47:580-589.
2. Bernardes R., Lobo C., Dias J., Cunha-Vaz J.: New instrumentation for blood-retinal barrier permeability analysis. The 2nd European Medical & Biological Engineering Conference (EMBEC'02), Viena, Áustria, 4-8 de Dezembro de 2002, Proc Volume 2, 994-995, IFMBE, ISBN: 3-901351-62-0, ISSN: 1680-0737.
3. Cunha-Vaz J., Bernardes R.: Multimodal Macula Mapping. Characterization of phenotypes of diabetic retinopathy. *Proceedings of 5th International Symposium on Ocular Pharmacology and Therapeutics.* Monaco, 2004, 15-19, ISBN 88-7587-100-0.
4. Bernardes R., Dias J., Cunha-Vaz J.: Mapping the human blood-retinal barrier function. *IEEE Trans Biomed Eng* 2005, 52 (1): 106-116.
5. Bernardes R., Baptista P., Dias J., Cunha-Vaz J.: Multimodal Functional and Morphological Nonrigid Image Registration. *IEEE International Conference on Image Processing (ICIP-05)*, Génova, Itália, 11-14 de Setembro de 2005, 1133-1136, ISBN 0-7803-9135-7.

Discussão

6. Baptista P., Bernardes R., Ferreira J., Dias J., Cunha-Vaz J.: Multimodal macula mapping: study for rigid, perspective and deformable image registration. The 3rd European Medical and Biological Engineering Conference (EMBEC'05), Praga, República Checa, 20-25 de Novembro de 2005, ISSN: 1727-1983.
7. Bernardes R., Ferreira J., Baptista P., Sebastião A., Dias J., Cunha-Vaz J.: Distortion free registration between multifocal ERG and retinal leakage analyzer. The 3rd European Medical and Biological Engineering Conference (EMBEC'05), Praga, República Checa, 20-25 de Novembro de 2005, ISSN: 1727-1983.
8. Ferreira J., Bernardes R., Baptista P., Cunha-Vaz J.: Earmarking retinal changes in a sequence of digital color fundus photographs. The 3rd European Medical and Biological Engineering Conference (EMBEC'05), Praga, República Checa, 20-25 de Novembro de 2005, ISSN: 1727-1983.
9. Bernardes R.: Retinal Leakage Analysis. European Vitreoretinal Update 2006. 6th EURETINA Congress, Lisboa, Portugal, 18-21 de Maio de 2006, 5:14-5:15.
10. Bernardes R., Santos T., Cunha-Vaz J.: Increased Resolution Macular Thickness Mapping by OCT. Proceedings of the 28th IEEE EMBS Annual International Conference, Nova Iorque, EUA, 30 de Agosto-3 de Setembro de 2006, 4710-4713, ISBN 14244-0033-3.
11. Bernardes R., Santos T., Cunha-Vaz J.: Increased-Resolution OCT Thickness Mapping of the Human Macula: A Statistically Based Registration. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2008, 49:2046-2052.

Patente:²

1. Schwartz A., Bernardes R., Franke S., and Morgado A.: Method and apparatus for measuring quantity of a fluorochrome in a biological environment. *World Intellectual Property Organization (International Bureau)*. **WO 2008/067525 A2**, 5 de Junho de 2008.

²Na versão submetida desta dissertação constava a submissão desta mesma patente com a seguinte referência: Schwartz A., Bernardes R., Franke S., and Morgado A.: Method and apparatus for measuring quantity of a fluorochrome in a biological environment. United States Patent Appl. Serial No. 11/946,933, 30 de Novembro de 2007. Ver apêndices C e D.

Lista de divulgações científica em congressos acerca dos métodos desenvolvidos:

1. Bernardes R., Lobo C., Cunha-Vaz J.: Development of new methodologies for multimodal macula mapping. ISOPP - 4th International symposium on Ocular Pharmacology & Pharmaceutics, Março de 2002, Sevilha, Espanha.
2. Bernardes R., Lobo C., Cunha-Vaz J.: Retinal leakage analyzer. New developments in instrumentation and data processing. ARVO Annual Meeting, 5-10 de Maio de 2002, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
3. Bernardes R., Lobo C., Dias J., Cunha-Vaz J.: New instrumentation for blood-retinal barrier permeability analysis. EMBEC - 2nd European Medical & Biological Engineering Conference, 4-8 de Dezembro de 2002, Viena, Áustria.
4. Bernardes R., Lobo C., Dias J., Cunha-Vaz J.: New instrumentation for blood-retinal permeability analysis. CAFIA - 3rd International Workshop on Computer Assisted Fundus Image Analysis, 28 a 30 de Março de 2003, Turin, Itália.
5. Bernardes R.: Medicine multimodal imaging innovation - 7^o Seminário Biomedicina, 16 de Abril de 2003, Coimbra, Portugal.
6. Bernardes R., Lobo C., Cunha-Vaz J.: Multimodal macula mapping. ISIE - Inaugural meeting of the International Society for Imaging in the Eye, 2-3 de Maio de 2003, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
7. Bernardes R., Lobo C., Dias J., Cunha-Vaz J.: Mapping human blood-retinal barrier function. ISIE - Inaugural meeting of the International Society for Imaging in the Eye, 2-3 de Maio de 2003, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
8. Duarte L., Lobo C., Bernardes R., Soares M., Figueira J., Faria de Abreu J., Cunha-Vaz J.: Macular maps of fluorescein leakage during a 3-year follow-up in patients type 2 diabetes mellitus and mild nonproliferative retinopathy. ARVO Annual Meeting, 4-9 de Maio de 2003, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
9. Bernardes R.: Development of new diagnosis tools (instrumentation/ methodologies). XIII Jornadas Internacionais de Oftalmologia, Hospitais da Universidade de Coimbra, 4-5 de Julho de 2003, Coimbra, Portugal.
10. Bernardes R., Cunha-Vaz J.: Mapping Macular Function. XXI Congress of the ESCRS Meeting, 6 de Setembro de 2003, Munique, Alemanha.
11. Cunha-Vaz J., Bernardes R., Monteiro R.: Retinal thickness mapping using optical coherence tomograph. Strategies for improved measurements. 7th Michaelson Symposium, 21-24 de Setembro de 2003, Paris, França.

Discussão

12. Cunha-Vaz J., Bernardes R.: Multimodal Macula Mapping: a new approach to study diseases of the macula. 7th Michaelson Symposium, 21-24 de Setembro de 2003, Paris, França.
13. Nunes S., Monteiro R., Bernardes R., Torrent-Solans T., Duarte L., Cunha-Vaz J.: Computer-assisted microaneurysms counting on Digitized retinographies. EVER, 8-11 de Outubro de 2003, Alicante, Espanha.
14. Bernardes R.: Multimodal Imaging. 2nd International University Program on the Role of Ischemia in Eye Diseases. "Retinal Degeneration and Ischemia", 14-15 de Fevereiro de 2004, Coimbra, Portugal.
15. Bernardes R., Duarte L., Torrent-Solans T., Almeida E., Cunha-Vaz J.: Red Dots Counting in Color Fundus Photography of the Type 2 Diabetes Patients. ISOPT, 14 de Março de 2004, Monte Carlo, Mónaco.
16. Cunha-Vaz J., Bernardes R.: Multimodal Macula Mapping: Characterization of different phenotypes of diabetic retinopathy. ISOPT, 14 de Março de 2004, Monte Carlo, Mónaco.
17. Bernardes R., Dias J., Cunha-Vaz J.: OCT B-Scans Geometric Registration Using an Energy Minimization Method. ISIE - 2nd Annual Meeting, 23-24 de Abril de 2004, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
18. Torrent-Solans T., Duarte L., Monteiro R., Almeida E., Bernardes R., Cunha-Vaz J.: Red dots counting on digitalized fundus images of mild nonproliferative retinopathy in Diabetes type 2. ARVO Annual Meeting, 25-29 de Abril de 2004, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
19. Bernardes R.: Multimodal Macular Mapping. Dia do Centro de Oftalmologia, 1 de Julho de 2004, Coimbra, Portugal.
20. Nunes S., Monteiro R., Bernardes R., Torrent-Solans T., Duarte L., Cunha-Vaz J.: Computer assisted microaneurysms counting on digitized retinographies. Dia do Centro de Oftalmologia, 1 de Julho de 2004, Coimbra, Portugal.
21. Bernardes R., Varandas J., Lobo C., Cunha-Vaz J.: Improved Resolution Retinal Thickness Mapping Using the Stratus OCT. EVER, 24-27 de Setembro de 2004, Vilamoura, Portugal.
22. Bernardes R., Silva R.: Multimodal macula mapping in ARMD. EVER, 24-27 de Setembro de 2004, Vilamoura, Portugal.

23. Varandas J., Bernardes R., Cunha-Vaz J.: Abnormal Leakage Mapping Using the Retinal Leakage Analyzer. EVER, 24-27 de Setembro de 2004, Vilamoura, Portugal.
24. Bernardes R., Nunes S., Varandas J., Lobo C., Cunha-Vaz J.: Detailed Retinal Thickness Mapping Using the Stratus OCT. IV Congresso de Investigação em Medicina, Pedagogia e Ciência, 17-18 de Novembro de 2004, Coimbra, Portugal.
25. Bernardes R., Duarte L., Torrent-Solans T., Almeida E., Cunha-Vaz J.: Red Dots Counting in Color Fundus Photography of Type 2 Diabetes Patients. IV Congresso de Investigação em Medicina, Pedagogia e Ciência, 17-18 de Novembro de 2004, Coimbra, Portugal.
26. Tavares R., Fonseca P., Faria R., Torrent T., Silva R., Bernardes R., Faria de Abreu J., Cunha-Vaz J.: Mapeamento Macular Multimodal na DMRI. Congresso de Investigação em Medicina, Pedagogia e Ciência, 17-18 de Novembro de 2004, Coimbra, Portugal.
27. Bernardes R., Baptista P., Dias J., Cunha-Vaz J.: Registration of functional and morphological imaging modalities. ISIE - 3rd Annual Meeting, 29-30 de Abril de 2005, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
28. Bernardes R., Ferreira J., Baptista P., Cunha-Vaz J.: Earmarking retinal changes in a sequence of digital color fundus photographs. ISIE - 3rd Annual Meeting, 29-30 de Abril de 2005, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
29. Cunha-Vaz J., Lobo C., Silva R., Bernardes R.: New developments in macular imaging. 5th EURETINA, 19-21 de Maio de 2005, Barcelona, Espanha.
30. Baptista P., Bernardes R., Dias J., Cunha-Vaz J.: Automatic Establishment of Macular Coordinates. EASDec, 15th Meeting of the EASD Eye Complications Study Group, 27-29 de Maio de 2005, Coimbra, Portugal.
31. Bernardes R., Baptista P., Dias J., Cunha-Vaz J.: Multimodal Functional and Morphological Nonrigid Image Registration. ICIP'05, 11-14 de Setembro de 2005, Génova, Itália.
32. Cunha-Vaz J., Silva R., Bernardes R., Baptista P., Ferreira J.: Imaging Diagnosis - New Aspects. EVER, 5-8 Outubro de 2005, Vilamoura, Portugal.
33. Ferreira J., Bernardes R., Baptista P., Cunha-Vaz J.: Implementing a Colour-Coded Scheme for Earmarking Retinal Changes in a Sequence of Digital Colour Fundus Photographs. EVER, 5-8 Outubro de 2005, Vilamoura, Portugal.

Discussão

34. Baptista P., Bernardes R., Ferreira J., Dias J., Cunha-Vaz J.: Multimodal macula mapping: study for rigid, perspective and deformable image registration. EMBEC 2005, 20-25 de Novembro de 2005, Praga, República Checa.
35. Bernardes R., Ferreira F., Baptista P., Sebastião A., Dias J., Cunha-Vaz J.: Functional and morphological retinal data fusion. EMBEC 2005, 20-25 de Novembro de 2005, Praga, República Checa.
36. Ferreira J., Bernardes R., Baptista P., Cunha-Vaz J.: Earmarking retinal changes in a sequence of digital color fundus photographs. EMBEC 2005, 20-25 de Novembro de 2005, Praga, República Checa.
37. Bernardes R., Santos T., Baptista P., Cunha-Vaz J.: Establishment of a retinal thickness atlas. ISIE, Annual Meeting, 27-28 de Abril de 2006, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
38. Baptista P., Santos T., Bernardes R., Cunha-Vaz J.: Increased OCT mapping resolution by merging line and circle scan types. ARVO, Annual Meeting, 30 de Abril-4 de Maio de 2006, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
39. Bernardes R., Baptista P., Ferreira J., Duarte L., Cunha-Vaz J.: Earmarking retinal changes on a color fundus photograph time-sequence. ARVO, Annual Meeting, 30 de Abril-4 de Maio de 2006, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
40. Bernardes R.: Directions for Imaging Development. XVI Jornadas Internacionais de Oftalmologia, 23-24 de Junho de 2006, Coimbra, Portugal.
41. Bernardes R., Santos T., Cunha-Vaz J.: Increased Resolution OCT Mapping. EMBC 2006, 28th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 30 de Agosto-3 de Setembro de 2006, Nova Iorque, EUA.
42. Baptista P., Santos T., Nunes S., Bernardes R., Cunha-Vaz J.: Establishment of a normative database by registration of RTA maps into the RT-Atlas. EVER, 4-7 de Outubro de 2006, Vilamoura, Portugal.
43. Bernardes R., Santos T., Cunha-Vaz J.: Establishment of a Retinal Thickness Atlas (RT-Atlas). EVER, 4-7 de Outubro de 2006, Vilamoura, Portugal.
44. Baptista P., Ferreira J., Bernardes R., Dias J., Cunha-Vaz J.: Multimodal Macula Mapping by Deformable Image Registration. ComplIMAGE, International Symposium on Computational Modelling of Objects Represented in Images: Fundamentals Methods and Applications, 20-21 de Outubro de 2006, Coimbra, Portugal.

45. Baptista P., Bernardes R., Ferreira J., Dias J., Cunha-Vaz J.: Multimodal macula mapping: study for rigid, perspective and non-rigid image registration. V Congresso de Investigação em Medicina, 23-24 de Novembro de 2006, Coimbra Portugal.
46. Bernardes R., Baptista P., Dias J., Cunha-Vaz J.: Multimodal functional and morphological nonrigid image registration. V Congresso de Investigação em Medicina, 23-24 de Novembro de 2006, Coimbra Portugal.
47. Bernardes R., Morgado A., Baptista P., Schwartz A., Verdugo-Gazdik M., Carter W., Cunha-Vaz J.: Instrumentation Adaptation for Quantitative Fluorescein Angiograms. ARVO, Annual Meeting, 06 de Maio-10 de Maio de 2007, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
48. Rosa A., Baptista P., Santos A., Soares M., Bernardes R., Schwartz A., Verdugo-Gazdik M., Carter W., Cunha-Vaz J.: Quantitative Fluorescein Angiograms. ARVO, Annual Meeting, 06 de Maio-10 de Maio de 2007, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
49. Schwartz A., Marques C., Abreu G., Bernardes R., Jolin L., Snow E., Wang L., Gaigalas A., Verdugo-Gazdik M., Carter W., Cunha-Vaz J.: Quantitative Characteristics of Fluorescein for Fluorescence Angiograms. ARVO, Annual Meeting, 06 de Maio-10 de Maio de 2007, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.
50. Bernardes R.: Novas Técnicas de Imagem do Fundo Ocular. Jornadas Internacionais de Oftalmologia, Hospitais da Universidade de Coimbra, 29 a 30 de Junho de 2007, Coimbra, Portugal.
51. Bernardes R.: Instrumentation adaptation for quantitative fluorescein angiograms. EVER, 3 a 6 de Outubro de 2007, Portoroz, Eslovénia.
52. Van Dijk H., Kok P., Abramoff M., Schlingemann R., Bernardes R., Verbraak F.: The sensitivity of the OCT in the diagnosis of clinically significant macular edema. EVER, 3 a 6 de Outubro de 2007, Portoroz, Eslovénia.

Para terminar, deve referir-se que nenhum dos processos aqui referidos se encontra encerrado do ponto de vista do desenvolvimento e que todos eles são alvo de intervenção de modo a melhorar o respectivo desempenho, pelo que este é um processo dinâmico em curso e não um processo encerrado.

Conclusões

Conclusões

Em função dos desenvolvimentos efectuados no decorrer do trabalho aqui apresentado, devem realçar-se os seguintes resultados:

- Contabilização de microaneurismas considerando a sua localização no fundo ocular, o que traduz uma realidade distinta daquela comumente utilizada. Este processo, baseado na marcação manual dos microaneurismas, faz uso do co-registo da imagem do fundo ocular para comparar as sucessivas marcações de microaneurismas efectuadas para um mesmo olho, o que permite obter os seguintes indicadores:
 - número acumulado: número total de microaneurismas identificados numa sequência temporal;
 - taxa de formação: número de novos microaneurismas por unidade de tempo;
 - taxa de desaparecimento: número de microaneurismas deixados de detectar por unidade de tempo;
 - tempo de vida: distribuição do intervalo de tempo entre a primeira e a última detecção de um microaneurisma numa dada sequência;
 - factor de qualidade: número de falhas de identificação de um particular microaneurisma num dado intervalo de tempo;
- Identificação de alterações do fundo ocular, relativamente a um estado inicial do mesmo, numa sequência temporal de retinografias, considerando a sua importância relativa por análise de componentes principais da sequência das alterações;
- Desenvolvimento de processos de co-registo considerando as características particulares do fundo ocular;
- Desenvolvimento de um processo de imagem funcional da barreira hemato-retiniana, a qual permite mapear o derrame de fluoresceína da circulação sanguínea para o humor vítreo, *in vivo*, e com base numa aquisição única;
- Desenvolvimento de um processo de quantificação de fluorescência, o qual permite a aquisição simultânea de imagens do fundo ocular e de uma célula de calibração, permitindo a recuperação dos parâmetros de funcionamento do sistema de aquisição de imagem;
- Desenvolvimento de célula de calibração para análise de fluorescência tendo em consideração as eficiências quânticas da fluorescência da fluoresceína para cada um dos meios oculares;

- Desenvolvimento de um atlas da espessura da retina humana para a área macular;
- Desenvolvimento de um processo de aumento da resolução do mapeamento do edema macular com base em medidas de espessura realizadas com o *Stratus OCT*;
- Determinação de mapas probabilísticos de edema macular relativamente a uma população padrão;
- Demonstração da necessidade de modelos deformáveis para o co-registo de imagens do fundo ocular obtidas com sistemas de varrimento;
- Obtenção de co-registo deformável entre modalidades morfológicas e funcionais;
- Definição de um sistema de coordenadas maculares;
- Obtenção de co-registo multimodal entre o mapeamento do edema macular e o mapa da função da barreira hemato-retiniana, ambos aqui desenvolvidos.

Este trabalho foi desenvolvido no decorrer de vários projectos dos quais se devem destacar:

- Fundação para a Ciência e a Tecnologia
 - POCTI/1999/CBO/35866 - Estudo prospectivo das alterações iniciais da microcirculação retiniana na diabetes utilizando novas metodologias de imagem multimodal;
 - POCTI/2002/CBO/43061- Caracterização dos mecanismos de resolução do edema macular após fotocoagulação por laser;
 - POSI/SRI/45151/2002 - Registo de imagens médicas multi-modais para diagnóstico no olho humano;
 - POSC/EEA-SRI/60716/2004 - Imagiologia estrutura-função para quantificação fenotípica da degenerescência da retina.
- Financiamento da União Europeia
 - EVIGeM – European Virtual Institute of Geometry Measurements;
 - EVI-GENORET – Functional Genomics of the Retina in Health and Disease.

Conclusões

- Investigação por contrato
 - Pfizer Global: Fluorescein Quantitation;
 - Pfizer Global: CNV Markers – Characterization of early markers of choroidal neovascularization in fellow eyes of patients with AMD and CNV in one eye. Two-year follow-up.

Tal como reportado ao longo desta dissertação, foram desenvolvidos processos diversos os quais se podem enquadrar em níveis distintos.

Dos desenvolvimentos efectuados foram obtidos novos conhecimentos acerca da evolução e progressão da retinopatia diabética, os quais levaram ao desenvolvimento de um processo de fenotipagem de doentes com esta patologia. Conforme proposto em [CVB05] e em diversas outras publicações/comunicações, o processo de fenotipagem encontra-se em fase de avaliação num número relativamente elevado de doentes (400) no estudo em curso no projecto PDT/SAU-OSM/72635/2007 (FCT).

Também a obtenção de um sistema de calibração automático para a normalização de angiografias fluoresceínicas representa um passo importante ao permitir a comparação quantitativa das mesmas, mesmo que obtidas em condições distintas.

Finalmente, mas de não menor importância, foram adquiridos conhecimentos e experiência no co-registo multimodal, os quais irão certamente ter impacto no conhecimento de diversas patologias num futuro relativamente próximo, sendo no entanto necessário melhorar e expandir os processos utilizados, já que os que aqui se encontram reportados podem apenas ser considerados como pontos de partida.

Apêndice A

Apêndice A

A análise de componentes principais (*PCA*) é uma técnica estatística com um largo espectro de aplicações, e.g. compressão de imagem, e é frequentemente utilizada para a detecção de padrões em dados de múltiplas dimensões.

Esta técnica permite identificar uma transformação do sistema de eixos, onde os dados se encontram inicialmente representados, de forma a que os novos eixos fiquem alinhados com as direcções de maior dispersão dos dados. Se aplicado a uma matriz de covariância, este processo permite obter um novo sistema de eixos ortogonais em que os dados se encontram descorrelacionados entre si [PB99].

Esta transformação é determinada calculando uma matriz \mathbf{V} (A-3) composta pelos *vectores próprios* da matriz de covariância \mathbf{C} dos dados em análise.

Considerando que para este trabalho interessa obter esta análise para um conjunto de mapas 2D, estes podem ser tornados vectores pela concatenação das respectivas colunas num vector único.

Seja $\mathbf{R}^{(i)}$ uma matriz de dimensão $M \times N$. Por um processo de concatenação de colunas podemos obter um vector $\mathbf{r}^{(i)}$ de dimensão $(MN) \times 1$. A matriz de covariância \mathbf{C} relativa a K mapas (matrizes) $\mathbf{R}^{(i)}$ pode ser assim determinada por

$$c_{ij} = E \left\{ (\mathbf{r}^{(i)} - \bar{\mathbf{r}}^{(i)})^T (\mathbf{r}^{(j)} - \bar{\mathbf{r}}^{(j)}) \right\}, \quad (\text{A-1})$$

onde c_{ij} é o elemento (i, j) de \mathbf{C} e que corresponde à covariância entre os mapas $\mathbf{R}^{(i)}$ e $\mathbf{R}^{(j)}$, com $\bar{\mathbf{r}}^{(m)} = E \{ \mathbf{r}^{(m)} \}$, $m = \{i, j\}$.

Os *vectores próprios* e *valores próprios* de \mathbf{C} , respectivamente \mathbf{v} e λ , correspondem à solução não trivial de

$$\mathbf{C} \mathbf{v} = \lambda \mathbf{v}, \quad (\text{A-2})$$

de onde resulta que a matriz de transformação \mathbf{V} é dada por

$$\mathbf{V} = \begin{bmatrix} v_{11} & \cdots & v_{1K} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ v_{K1} & \cdots & v_{KK} \end{bmatrix}. \quad (\text{A-3})$$

O vector $[v_{i1}, v_{i2}, \dots, v_{iK}]$, obtido a partir dos elementos da linha i de \mathbf{V} , é o vector transposto do *vector próprio* $\mathbf{v}^{(i)}$, o qual corresponde ao *valor próprio* $\lambda^{(i)}$, com $\lambda^{(1)} \geq \lambda^{(2)} \dots \geq \lambda^{(K)} \geq 0$.

Análise de componentes principais

Pode assim determinar-se qualquer uma das K componentes *PCA* por,

$$\mathbf{P}^{(n)} = \sum_{i=1}^K v_i^{(n)} \mathbf{R}^{(i)}, \quad (\text{A-4})$$

com $n = \{1, \dots, K\}$ e ao qual corresponde uma variância $\sqrt{\lambda^{(n)}}$.

Apêndice B

Apêndice B

Uma *Thin-Plate Spline (TPS)* é uma função que passa por todos os pontos de controlo e que simultaneamente apresenta a menor energia de torção [CJ00].

Sendo $\chi()$ uma função definida em \mathbb{R}^2 , a energia de torção desta função é dada por

$$\epsilon = \iint_{\mathbb{R}^2} \left(\left(\frac{\partial^2 \chi}{\partial x^2} \right)^2 + 2 \left(\frac{\partial^2 \chi}{\partial x \partial y} \right)^2 + \left(\frac{\partial^2 \chi}{\partial y^2} \right)^2 \right). \quad (\text{B-1})$$

A função que minimiza ϵ , ao mesmo tempo que passa por todos os pontos de controlo $[x_i, y_i, z_i]^T$, é definida por

$$\chi(\mathbf{p}) = \sum_{i=1}^K w_i \phi(\mathbf{p} - \mathbf{p}_i) + a_0 + a_x x + a_y y, \quad (\text{B-2})$$

onde $\mathbf{p}_i = [x_i, y_i]^T$ ($i = \{1, \dots, K\}$) são as abcissas dos pontos de controlo, $\mathbf{p} = [x, y]^T$ são as coordenadas do ponto onde se pretende avaliar $\chi()$ e w_i , a_0 , a_x , e a_y são parâmetros a determinar em função dos pontos de controlo.

A função base da TPS ($\phi()$) é definida por

$$\phi(\rho) = \begin{cases} 0 & , \rho = 0 \\ \rho^2 \log(\rho) & , \rho \neq 0 \end{cases}, \quad (\text{B-3})$$

com ρ a norma- L_2 (distância Euclidiana).

Construindo as matrizes $\mathbf{T}_{K \times K}$, $\mathbf{S}_{K \times 3}$, $\mathbf{M}_{(K+3) \times (K+3)}$ e o vector $\mathbf{h}_{(K+3) \times 1}$ (equações B-4 a B-7) determina-se $\mathbf{c}_{(K+3) \times 1}$ (B-8) e por conseguinte todos os parâmetros necessários à definição da função $\chi()$.

As matrizes \mathbf{T} , \mathbf{S} , \mathbf{M} e o vector \mathbf{h} são definidas por

$$\mathbf{T} = \begin{bmatrix} 0 & \phi(\rho_{1,2}) & \cdots & \phi(\rho_{1,K}) \\ \phi(\rho_{2,1}) & 0 & & \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ \phi(\rho_{K,1}) & \phi(\rho_{K,2}) & \cdots & 0 \end{bmatrix}, \quad (\text{B-4})$$

com $\rho_{i,j}$ a distância Euclidiana entre as abcissas dos pontos de controlo i e j ($\rho_{i,j} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2}$) e $\phi()$ como em (B-3),

$$\mathbf{S} = \begin{bmatrix} 1 & x_1 & y_1 \\ 1 & x_2 & y_2 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & x_K & y_K \end{bmatrix}, \quad (\text{B-5})$$

$$\mathbf{M} = \begin{bmatrix} \mathbf{T} & \mathbf{S} \\ \mathbf{S}^T & 0 \end{bmatrix}, \quad (\text{B-6})$$

$$\mathbf{h} = [z_1, z_2, \dots, z_K, 0, 0, 0]^T. \quad (\text{B-7})$$

O vector \mathbf{c} é dado por

$$\mathbf{c} = \mathbf{M}^{-1} \mathbf{h}, \quad (\text{B-8})$$

(desde que \mathbf{M}^{-1} exista), e é constituído por

$$\mathbf{c} = [w_1, w_2, \dots, w_K, a_0, a_x, a_y]^T, \quad (\text{B-9})$$

ficando assim definidos todos os coeficientes da função $\chi()$ (B-2).

Definindo \mathbf{w} como sendo constituído pelos primeiros K elementos de \mathbf{c} , i.e. $\mathbf{w} = [w_1, w_2, \dots, w_K]^T$, ϵ , a energia de torção de $\chi()$, é dada por

$$\epsilon = \mathbf{w}^T \mathbf{T} \mathbf{w}. \quad (\text{B-10})$$

Apêndice C

Apêndice C

Neste apêndice transcreve-se o texto original da submissão para a patente definitiva (U.S. 11/946,993) [SBFM07] de 30 de Novembro de 2007, na sequência do registo provisório U.S. No. 60/867,933 de 30 de Novembro de 2006.

METHOD AND APPARATUS FOR MEASURING QUANTITY OF A FLUOROCHROME IN A BIOLOGICAL ENVIRONMENT

[0001] The present application claims the filing benefit of U.S. Provisional Application Serial No. 60/867,933, filed November 30, 2006, the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety.

Field of the Invention

[0002] The present invention relates to a system and method for quantitative analysis of optical imaging data, particularly fluorescence imaging such as that generated via angiography, by providing for standardization of fluorescence data.

Background of the Invention

[0003] Vascular and degenerative disorders of the retina and posterior segment of the eye include age-related macular degeneration (AMD), diabetic retinopathy, glaucoma, hypertensive retinopathy and vascular occlusions.

[0004] AMD is a common eye disease causing deterioration of the macula, the central area of the retina, a paper-thin tissue at the back of the eye where light-sensitive cells send visual signals to the brain. Sharp, clear “straight ahead” vision is processed by the macula. Damage to the macula results in the development of blind spots and blurred or distorted vision.

[0005] There are two types of AMD, usually referred to as “wet” and “dry” AMD. Dry AMD is the most common form, developing slowly and causing gradual loss of central vision. Wet AMD results from new blood vessels growing behind the retina, causing bleeding, scarring and loss of sight. Wet AMD can develop quickly but may be responsive to treatment in the early stages. AMD usually affects individuals older than 50 years of age and is the major cause of visual impairment in the United States.

[0006] For nearly four decades, ophthalmologists have relied on imagebased techniques, such as fluorescein angiography which utilizes a specialized fundus camera to capture rapid-sequence photographs of the retinal vasculature following an intravenous injection of a fluorescent reagent, for example, fluorescein or indocyanin green. Image-based techniques have also relied on not only exogenous fluorophores, but also, *in vivo* auto-fluorescence. Currently, fluorescein angiography is an important tool for clinical diagnosis

and for the develop and monitoring of a treatment plan for retinal disorders, including, but not limited to, AMD, diabetic retinopathy, hypertensive retinopathy and vascular occlusions.

[0007] Even though fluorescein angiography facilitates in vivo observation of retinal circulation and is used for management of AMD and other retinal disorders, currently fluorescein angiography provides only a subjective image-based diagnostic tool and has not been used to provide quantitative data because there is no fluorescent standard available to calibrate ophthalmoscopic instruments. There is a need for a device and method useful to reliably and quantitatively measure fluorescence during angiography to effectively diagnose and monitor treatment of vascular and degenerative disorders of the retina and posterior segment of the eye.

Summary of the Invention

[0008] In one aspect the invention comprises one or more fluorescence standard solutions of a fluorochrome providing substantially the same spectral and intensity properties as the fluorochrome in the tissues of the eye (serum, vitreous humor, corneal tissue, etc.). In another aspect, the invention comprises a device for containing one or more fluorescence standard solutions. In another aspect, the invention comprises the use of one or more fluorescence standard solutions to quantitatively measure the fluorescence of at least one or more tissues of the eye by comparing the fluorescence data collected from the eye with the fluorescence data of the standard solution(s).

[0009] Unless otherwise defined herein, scientific and technical terms used in connection with the present invention have the meanings commonly understood by those of ordinary skill in the art. Further, unless otherwise required by context, singular terms include pluralities and plural terms include singular.

[0010] The term “focal axis” as used herein refers to an axis originating at the eye and extending toward an object of intended visual recognition.

[0011] The term “fluorochrome” as used herein refers to any fluorescing compound endogenous or exogenous to the eye. Examples of endogenous and exogenous fluorochromes are described below.

[0012] The term “fluorescence behavior” as used herein refers to a phenomenon whereby the fluorescence emitted by a given fluorochrome is determined by the environment in which the fluorochrome is present (e.g. quantum efficiency).

[0013] The term “fluorescence data” as used herein refers to fluorescence emissions from the eye and/or fluorescence standard solution. Such data includes, but is not limited to, fluorescence images of the eye and/or standard solution contained within a containment device.

[0014] The abbreviations used herein have their usual meaning in the art. For clarity, the meanings of certain abbreviations are as follows: “AMD” means age-related macular degeneration; “ICG” means indocyanin green; “SLO” means scanning laser ophthalmoscope; “PBS” means phosphate buffered saline; “BSA” means bovine serum albumin; and “HA”

Apêndice C

means hyaluronic acid.

[0015] The above and other objects and advantages of the present invention shall be made apparent from the accompanying drawings and the description thereof.

Brief Description of the Drawings

[0016] The accompanying drawings, which are incorporated in and constitute a part of this specification, illustrate embodiments of the invention and, together with a general description of the invention provided above, and the detailed description of the embodiments provided below, serve to explain the principles of the invention.

[0017] FIG. 1 is a view of the upper surface of a standard cell according to one embodiment of the invention.

[0018] FIG. 2 is a view of the upper surface of a standard cell according to another embodiment of the invention.

[0019] FIG. 3 is a schematic diagram showing a system for capturing fluorescence data according to one embodiment of the present invention.

[0020] FIG. 4 is a schematic diagram showing a system for capturing fluorescence data according to another embodiment of the invention.

[0021] FIG. 5 is a schematic diagram showing a system for capturing fluorescence data according to yet another embodiment of the invention.

[0022] FIG. 6 is a schematic drawing showing an alternative adaptor for capturing fluorescence data from a standard cell.

[0023] FIG. 7 is an isometric cross-section of the adaptor of FIG. 6.

[0024] FIG. 8 is an example of a calibration plot showing the concentration of fluorescein (ng/ml) in serum vs. instrument reading.

Detailed Description of the Invention

Fluorescence Standard Solutions

[0025] Fluorescence standard solutions are prepared using any fluorochrome that allows the benefits of the present invention to be achieved. The fluorochrome can be naturally occurring or synthetic and can be endogenous or exogenous to the eye of the subject. Examples of endogenous fluorochromes are known in the art and include, without limitation, corneal fluorophores, crystalline lens fluorophores, vitreous fluorophores, lipofuscin and melanin. Endogenous fluorochromes are described by F. Docchio in *Introduction to Ocular Fluorometry*, chapter 4 "A review of endogenous ocular fluorophores" (European Concerted Action on Ocular Fluorometry – EUROEYE, 1997), incorporated herein in entirety. Exogenous fluorochromes include, without limitation, fluorescein free acid ("fluorescein"), fluorescein glucuronide, ICG and hematoporphyrin and derivatives thereof. Exogenous fluorophores are described by F. Docchio in *Introduction to Ocular Fluorometry*, chapter 5 "A review of exogenous ocular fluorophores" (European Concerted Action on Ocular Fluorometry – EUROEYE, 1997), incorporated herein in entirety.

[0026] In order to determine the suitability of a fluorochrome for use as a standard in fluorescence angiography, it is recommended to determine the reduction of fluorescence intensity of the selected fluorochrome caused by biological fluids. To do this, a selected fluorochrome is dissolved in an aqueous solution to make a first set of standards. Examples of aqueous solutions useful for dissolving the fluorochrome include, without limitation, deionized water, saline, or a buffered saline solution such as PBS, TRIS-buffered saline or any other buffer compatible with the purpose of the present invention.

[0027] A second set of standard solutions are prepared in a relevant biological fluid including, without limitation, serum or vitreous humor so that reduction of fluorescence intensity of the selected fluorochrome in the biological fluid can be determined. The same fluorochrome used to make the first set of standard solutions is added to serum, for example, human serum, or vitreous humor, for example, human vitreous humor.

[0028] The first and second sets of standard solutions are used to determine the reduction of fluorescence intensity for a particular fluorochrome caused by an environment comprising a biologic fluid. The reduction of fluorescence intensity for a particular fluorochrome is determined by first measuring the fluorescence intensities of the selected fluorochrome in the first set of standard solutions (those prepared in aqueous solution) and comparing the fluorescence intensities to fluorescence intensities of the fluorochrome in the second set of standard solutions (those prepared in biological fluids). For example, the fluorescence intensity of a fluorochrome at one or more concentrations in PBS at pH 7.4 is measured and compared to the fluorescence intensity of the same fluorochrome at the same concentrations in serum and/or vitreous humor and/or other biological fluid. Fluorescence intensities are measured and compared using an appropriate instrument, for example, a spectrofluorometer such as a Spex Fluoromax™ (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ). A standard curve or linear plot of the fluorescence intensity measurements of each of a set of concentrations in a first set of standard solutions (in aqueous solution) is established and compared to a standard curve or linear plot of fluorescence intensity measurements of each of a set of concentrations in a second set of standard solutions (in biological fluid) to determine the degree of increase or reduction of fluorescence intensity of a given fluorochrome. When the effect of a biological fluid environment on the reduction of fluorescence intensity for the fluorochrome of choice is determined, a working standard solution is prepared for use in connection with fluorescence angiography of patients.

[0029] A working set of standard solutions is prepared using a synthetic solution that mimics a biological fluid. For example, a commercially available synthetic human serum (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) or 1% BSA in PBS at pH 7.4 is suitable. Also, PBS at pH 5.5 or hyaluronic acid ("HA") in PBS is useful to mimic vitreous humor. For example, 0.1 – 5.0% HA, w/v, in PBS serves as a synthetic substitute for vitreous humor. Optionally, gelatin is added to the working standard solutions, for example, in the range of about 1 – 3% gelatin (w/v). The working standard solutions are contained within a standard cell

Apêndice C

device, described below, during use.

Standard Cell

[0030] Referring to FIG. 1, a standard cell **10** is used to contain one or more working standard solutions in one or more channels **12**. In the embodiment shown in FIG. 1, ten channels **12** are shown, but the cell **10** may comprise 1 to 100 or more channels **12** depending upon the size of the cell **10** and the channels **12**. The channels **12** are arranged and shaped so as to be impacted by an energy source, such as light, directed at the cell **10**. A dotted line indicates the circular area of impact **14**. As shown in FIG. 1, some the channels **12** may be curved so as to be included within the area of impact **14**. However, any alternative configuration of channels **12** is possible as long as a portion of each channel **12** is within the area of impact **14**.

[0031] The standard cell **10** as shown in FIG. 1 is formed by any manner known in the art from a material that is substantially transparent to the spectral range of light used to excite the particular fluorochrome used. For example, a plate or slide **16**, typically glass or plastic polymer, may be etched, milled or molded to form one or more channels **12**. In use, a cover, such as a coverslip (not shown), may be placed over the channels **12** to seal the channels and contain the working standard solutions. The cover may be removably or permanently positioned on the standard cell **10**. Also, the cover may be placed on the cell **10** prior to addition of the standard solutions with the channels **12** filling by capillary action or it may be positioned after the channels **12** are filled.

[0032] In another embodiment, shown in FIG. 2, a standard cell **10** comprises a plate or slide **16** having attached thereto one or more compartments **13** comprising capillary tubes or cuvettes attached to the plate or slide **16** by any method, including adhesive attachment or welding. In use, the channels **13** contain working standard solutions.

System for Angiography

[0033] FIGS. 3 – 5 show various schematic drawings of systems useful for simultaneous collection of fluorescence data from the standard cell and a patient's eye during angiography as contemplated by the invention. Referring to FIG. 3, the system includes an instrument **18** that emits a beam of energy, such as a light beam, and collects fluorescence data; a common instrument for such use is a scanning laser ophthalmoscope (SLO) **18**, known in the art, for example, a Heidelberg Retina Angiograph 2 (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). Such example is not intended to be limiting. The invention contemplates other SLO instruments and other instruments used for fluorescence measurements performed on biological fluids and is not limited to any particular instrument or even to angiography.

[0034] The instrument **18** contains a light source **20** for transmission of excitation light **22** to an eye **24** of a subject patient (injected intravenously with a clinical grade fluorochrome as is known in the art) over a focal axis **26**. A dichroic mirror **28** reflects emission light from

the eye **24** or from a standard cell **10** to a detector axis **30**.

[0035] An adaptor apparatus **32** includes a beam splitter **34** for splitting the excitation light **22** between the focal axis **26** directed to the eye **24** and a standardization axis **36** directed to the standard cell **10**. Excitation light **22** reflected along the standardization axis **36** passes through an adaptor lens **38** to focus the light onto the standard cell **10**.

[0036] The excitation light **22** produces fluorescence emissions from the eye **24** and the standard cell **10**. Emissions from the eye **24** are directed to a detector **40** within the SLO **18**, or separately contained, by the dichroic mirror **28**. Emissions from the standard cell **10** are directed to the detector **40** via both the beam splitter **34** of the adaptor apparatus **32** and the dichroic mirror **28** of the instrument **18**. The detector **40** is used to quantitatively determine the amount of fluorescence emitted from the eye by comparison of the emissions from the eye **24** with emissions from standard solutions contained in the standard cell **10**.

[0037] FIG. 4 is a schematic representation of a system similar to that of FIG. 3 but with additional features. For example, a pinhole device **42** may be provided along the focal axis **26** to facilitate focusing of the excitation light **22** on the eye **24**. The pinhole device **42** is preferably positioned between the excitation light **22** and the dichroic mirror **28**. Also shown in FIG. 4 is an optical fiber bundle **44** for receiving light directed along the standardization axis **36** to a second lens **46** for focusing light on a standard cell **10**. Likewise, the optical fiber bundle **44** can direct emissions from the standard cell **10** to the beam splitter **34**. Use of an optical fiber bundle **44** permits the standard cell **10** to be positioned in an area away from the patient, reducing the size of the apparatus situated near the patient and decreasing the risk of damage to the standard cell **10**. Optionally, an XY scanner **48**, as is known in the art, may be included in the system, shown in FIG. 4 positioned between the dichroic mirror¹ **28** and the beam splitter **34**.

[0038] FIG. 5 show yet another embodiment in schematic form for simultaneous collection of fluorescence data during angiography. The features are as described above with several additional features. An XY scanner **48** as is known in the art may be placed downstream of the beam splitter **34** along the focal axis **26**. An adaptor XY splitter **50** may be placed in the standardization axis **36**. A synchronization connection **52** may connect the XY scanner **48** and the XY splitter **50** as is known in the art.

[0039] FIG. 6 is a schematic drawing of a system useful for measuring fluorescence data from a standard cell using the same instrument settings as those used to collect fluorescence data from a patient's eye. In this embodiment, an adaptor apparatus **132** is fitted over the eyepiece of the instrument **118**, thereby replacing the patient's eye. As shown in FIG. 7, the adaptor apparatus **132** comprises an open end **154** for fitting over the eyepiece of the instrument **118** (not shown in FIG. 7), a closed end **156** and sidewall **158** enclosing the space between the open end **154** and closed end **156**. In between the open end **154** and closed end **156** enclosed within the sidewall **158** is a lens **160** that approximates or mimics the lens of an eye. Between the lens **160** and closed end **156** is a

¹No texto original está "mirroee" onde deveria estar "mirror".

Apêndice C

slot **162** in the sidewall **158** for placement of a standard cell **110** perpendicular to the path of excitation light **122** transmitted by light source **120** the instrument **118**, as shown in FIG. 6. The adaptor apparatus **132** containing a standard cell **110** is used after fluorescence image data is collected for a patient's eye wherein another set of fluorescence image data for the standard cell **110** is collected using the exact instrument settings as those used for the patient. The adaptor apparatus **132** may be made from metal, such as aluminum, or plastic polymers, or other suitable material capable of being shaped to fit over the eyepiece of the instrument **118**.

Examples

Determination of reduction of fluorescence intensity of fluorescein caused by biological fluids

[0040] A fluorochrome, fluorescein, was selected as a candidate for use in the standardization system and methods of the present invention. To determine its suitability for such use, a set of standards was prepared by dissolving fluorescein (Acros Organics, Fair Lawn, NJ) in PBS at pH 7.4 and 25° C in each of the following concentrations expressed as nanograms (fluorescein) per ml (PBS): 0, 100, 200, 400, 800. This set of standards is referred to as the "aqueous standards."

[0041] Another set of standards was prepared by dissolving fluorescein in human vitreous humor at 25° C in each of the following concentrations (ng/ml): 0, 100, 200, 400, 800. This set of standards is referred to as "vitreous humor standards."

[0042] Another set of biological fluid standards was prepared by dissolving fluorescein in human serum at 25° C in the following concentrations (ng/ml): 0, 300, 600, 1200, 2400. This set of standards is referred to as "serum standards."

[0043] The fluorescence intensities of each of the aqueous standards described above were determined using a spectrofluorometer, as is commonly practiced in the art, and a plot of fluorescence intensity versus concentration was created. Fluorescence intensities of each of the vitreous humor standards and of each of the serum standards were likewise determined and fluorescence intensities versus concentration for each of the serum standard and vitreous humor standard were plotted.

[0044] Comparison of fluorescence intensities of the serum standards to the plot created for the aqueous (PBS) solutions showed no shift in spectral position or change in spectral shape. The reduction in fluorescence intensities of the serum standards was about 82% compared to the fluorescence intensities of the aqueous standards. Comparison of fluorescence intensities of the vitreous humor standards to the plot created for the aqueous solutions showed no shift in spectral position or change in spectral shape. The reduction in fluorescence intensities of the vitreous humor standards was about 5% compared to the fluorescence intensities of the aqueous standards.

[0045] When testing other fluorochromes, in general, the shift in spectral position or change in spectral shape should be no greater than about 10% and preferably, less than

5%. The reduction in fluorescence intensity is corrected by adjusting the concentration of the fluorochrome in the working solution.

[0046] As a further example, indocyanin green (ICG) was tested for suitability as fluorescence standard. ICG (Acros Organics, Fair Lawn, NJ) was dissolved in PBS, pH 7.4, with 0.1% Tween 20 at 25° C to make the aqueous standards. Fluorescence of a series of 1:2 dilutions were made with a spectrofluorometer beginning with a maximum concentration of 100ng/ml down to a “blank” comprising PBS, pH 7.4, with 0.1% Tween with essentially no ICG (only trace amounts).

[0047] Since ICG is not completely soluble when mixed directly with serum or vitreous humor, ICG was first dissolved in PBS, pH 7.4, containing 0.1% Tween 20 at a higher concentration (≥ 1000 ng/ml) and then mixed with bovine vitreous humor for one set of biological fluid standards, or with human serum, for another set of biological fluid standards. When mixed in this way, ICG was observed to remain in solution in serum and in vitreous humor and to maintain its spectra and quantum yield as compared to ICG in PBS with 0.1% Tween 20. Further, the emission intensity of ICG was found to be stable across a pH range of 5 – 10.

Preparation of standard cell with working standard solutions

[0048] Due to variability and rather poor shelf life of biological fluids, sets of working standard solutions were prepared using either PBS at pH 5.5 to mimic human serum and/or PBS at pH 7.3 to mimic human vitreous humor. For example, fluorescein was dissolved in PBS at pH 5.6 in the following concentrations: 0, 300, 600, 1200 and 2400 ng/ml, to serve as working standard solutions to mimic human serum standards. Fluorescein was added to PBS at pH 7.3 containing 1.0% hyaluronic acid (HA) in the following concentrations: 0, 100, 200, 400 and 800 ng/ml, to serve as working standard solutions to mimic human vitreous humor. HA may be used in a range from about 0.1% to 5% (w/v) in PBS at pH 7.3 to mimic vitreous humor.

[0049] To prepare a standard cell, gelatin in a concentration of from 1 – 3% is added to the working solutions and heated to about 50° C or other temperature sufficient to dissolve the gelatin, and the working solutions are loaded into the channels **12** or compartments **13** of a standard cell **10** via capillary action or other means, such that different known concentrations of fluorescein in working standard solution are contained in separate channels **12** or compartments **13**. Allowing the gelatin to solidify prevents formation of bubbles in the working standard solutions in the standard cell **10**. Optionally, after the working standards are loaded into the standard cell **10**, the ends of the channels **12** or compartments **13** may be sealed, for example, with epoxy or other non-fluorescent sealant that does not leach into the working standard solutions.

Apêndice C

Acquiring fluorescence intensity images from an eye and from working standards

[0050] Use of a SLO instrument is according to manufacturer's instructions. Typically, as an example for use in simultaneous collection of data from a patient's eye and from working standards in a standard cell **10** as shown in FIGS. 3 – 5, the gain and focus of the SLO instrument **18** was adjusted to the retinal plane of the eye **24** such that the fluorescent image of the retina was optimal for digital fluorescence images in the range from image 23 through 30. The adaptor lens **38** was adjusted on the standard cell **10** such that the fluorescence data for the standard cell **10** comprised about digital images 3 through 8.

[0051] A subject patient is injected in an arm vein with clinical grade fluorescein (Novartis AG, Basel, Switzerland) and fluorescence data (images) collected approximately 10 minutes after i.v. injection. For example, about 32 digital fluorescence images were collected at a focal spacing of approximately 300 microns within about 2 seconds of time using a SLO instrument. The data from the eye **24** of the subject and the standard cell **10** was taken simultaneously. Alternatively, as shown in FIG. 6, after fluorescence data is collected from the eye, fluorescence data is then from the standard cell **110** as contained within an adaptor apparatus **132** fitted over the eyepiece of the SLO instrument using identical instrument settings for each.

Analyzing fluorescence data from the patient and standards

[0052] In the example of simultaneous collection of data, optimal data from the working standards was generally about the 5th image of digital data collected and optimal data from the patient was typically about the 23rd image of digital data. The average intensity of each of the channels **12** or compartments **13** in the standard cell **10**, whether containing working standards prepared from the serum mimic or from the vitreous humor mimic, was determined using an area 15 x 15 pixel in size. The values of the fluorescence measurements of the set of working standard solutions were plotted by linear regression in ng/ml and served as calibration plots. The blank standard is used to determine the detection threshold. Point locations or areas on the patient's optimal image were measured and intensities were determined by comparison against the appropriate calibration plot. For measurements made from point locations or areas of the patient's eye comprising blood vessels, comparisons were made to the calibration plot for the serum mimic working standard. For measurements from the "open area" (not within a blood vessel) of the eye, comparisons were made to the calibration plot for vitreous humor working standard solutions.

[0053] Calibration plots for the blood and vitreous humor compartments of the eye were determined by linear regression of the corresponding standard data. These calibration plots were used to calculate instrument performance parameters. An exemplary calibration plot is depicted in FIG. 8 for measurements taken within a blood vessel of a patient's eye and the serum mimic working standard solutions. As is standard in the art, linear regression is calculated and plotted on a log-log graph to create a calibration plot. The

data points are represented in FIG. 8 as solid dots and boxes are used to represent the regressed values on the calibration plot. A qualitative estimate of linearity of the instrument was determined by calculating the average residual percent; average residual percent is calculated by determining the percent each of the data points is not on the regressed line and then calculating their absolute average. Preferably, an algorithm contained within computer software is used to convert an instrument's intensity reading in ng/ml using the calibration regression plot.

Producing a Quantitative Color Image

[0054] Optionally, fluorescence intensity data from a patient may be "translated" or converted to a color image record. An exemplary way to produce a color image is to assign specific colors to specific concentrations of fluorochrome as determined by the fluorescence intensity calibration plot generated from the set of working standards. For example, 0 ng/ml could be expressed as blue, 100 ng/ml as green, 200 ng/ml as yellow, etc. for the full range of the calibration plot, with all points in between represented by appropriate transitional colors. The instrument settings used to generate the patient's fluorescence intensity data must be the same as those used to generate the fluorescence intensity data collected from the working standards. The concentration represented by each pixel of a patient's fluorescence image is then "assigned" its corresponding color and a color image is constructed to represent a quantitative image of the tissue examined. Such quantitative color images provide an easy means for comparing images collected over time from the same patient or for comparing images collected from multiple subjects.

[0055] While specific embodiments of the subject invention have been discussed, the description included herein is intended to be illustrative and not limited. Variation of the invention will be apparent to those skilled in the art and the invention should be interpreted to include a full scope of equivalents.

What is claimed is:

1. A device comprising:
 - a. a first plate having one or more channels;
 - b. a calibration reagent comprising a fluorochrome in aqueous solution contained in said one or more channels; and
 - c. a second plate covering said one or more channels, wherein at least the second plate, and optionally the first plate, is transparent to a spectral range of light capable of exciting the fluorochrome.
2. The device of claim 1 wherein at least one of said first and second transparent plates comprises glass, quartz, or a plastic polymer.
3. The device of claim 1 wherein said aqueous solution is phosphate buffered saline.

Apêndice C

4. The device of claim 1 wherein said first plate has at least two channels and the aqueous solution in at least two channels contains a different concentration of the fluorochrome.
5. The device of claim 1 wherein said aqueous solution comprises phosphate buffered saline at pH 5.5 and optionally containing gelatin at a concentration of between 1 – 3% (w/v).
6. The device of claim 1 wherein said aqueous solution comprises phosphate buffered saline at pH 7.3 and further comprises hyaluronic acid at a concentration of between 0.1 – 5%.
7. The device of claim 1 wherein said fluorochrome is one of: fluorescein, fluorescein glucuronide, indocyanin green, lipofuscin, melanin, hematoporphyrin, corneal fluorophores, crystalline lens fluorophores and vitreous fluorophores.
8. A device comprising:
 - a. a plate having one or more capillary tubes attached to a surface of the plate; and
 - b. a calibration reagent comprising a fluorochrome in aqueous solution contained within said one or more capillary tubes, wherein said one or more capillary tubes is transparent to a spectral range of light capable of exciting the fluorochrome.
9. The device of claim 8 wherein the plate comprises glass, quartz or plastic polymer having one or more capillary tubes adhesively attached to the surface of the plate.
10. The device of claim 8 wherein said aqueous solution is phosphate buffered saline.
11. The device of claim 8 having at least two capillary tubes attached to the surface wherein the reagent contained within each of said two capillary tubes comprises a different concentration of fluorochrome.
12. The device of claim 8 wherein said aqueous solution comprises phosphate buffered saline at pH 5.5 and optionally containing gelatin at a concentration of between 1 – 3% (w/v).
13. The device of claim 8 wherein said aqueous solution comprises phosphate buffered saline at pH 7.3 and further comprises hyaluronic acid at a concentration of between 0.1 – 5%.
14. A method for quantitative measurement of fluorescence in one or more tissues of a human eye comprising:

- a. using an instrument capable of emitting a light wherein said light is divided by a beam splitter into a first beam directed into the eye and a second beam directed to the device of claim 1;
 - b. collecting fluorescence data from one or more tissues of the eye and from the device; and
 - c. determining the quantity of fluorochrome in said one or more tissues of the eye by comparing fluorescence data from one or more tissues of the eye with fluorescence data from the device.
15. The method of claim 14 wherein said one or more tissues is selected from: blood within blood vessels, vitreous humor, cornea, lens and retina.
16. A method for quantitative measurement of fluorescence in one or more tissues of a human eye comprising:
- a. using an instrument capable of emitting a light wherein said light is directed into the eye and collecting fluorescence data from one or more tissues of the eye;
 - b. replacing the eye with the device of claim 1 and collecting fluorescence data from the fluorochrome contained with said device; and
 - c. determining the quantity of fluorochrome in said one or more tissues of the eye by comparing the fluorescence data from one or more tissues of the eye with fluorescence data from the device.
17. The method of claim 16 wherein said one or more tissues is selected from: blood within blood vessels, vitreous humor, cornea, lens and retina.
18. A method for quantitative measurement of fluorescence in one or more tissues of a human eye comprising:
- a. using an instrument capable of emitting a light wherein said light is divided by a beam splitter into a first beam directed into the eye and a second beam directed to the device of claim 8;
 - b. collecting fluorescence data from one or more tissues of the eye and from the device; and
 - c. determining the quantity of fluorochrome in said one or more tissues of the eye by comparing fluorescence data from one or more tissues of the eye with fluorescence data from the device.

Apêndice C

19. The method of claim 18 wherein said one or more tissues is selected from: blood within blood vessels, vitreous humor, cornea, lens and retina.
20. A method for quantitative measurement of fluorescence in one or more tissues of a human eye comprising:
 - a. using an instrument capable of emitting a light wherein said light is directed into the eye and collecting fluorescence data from one or more tissues of the eye;
 - b. replacing the eye with the device of claim 8 and collecting fluorescence data from the fluorochrome contained with said device; and
 - c. determining the quantity of fluorochrome in said one or more tissues of the eye by comparing the fluorescence data from one or more tissues of the eye with fluorescence data from the device.
21. The method of claim 20 wherein said one or more tissues is selected from: blood within blood vessels, vitreous humor, cornea, lens and retina.
22. A method of preparing standard reagent comprising:
 - a. preparing a first set of solutions by dissolving a fluorochrome at each of two or more concentrations in phosphate buffered saline pH 7.4;
 - b. preparing a second set of solutions by dissolving the fluorochrome at each of two or more concentrations in serum;
 - c. measuring fluorescence intensities of the first set of solutions and preparing a first graph of fluorescence intensities versus concentration;
 - d. measuring fluorescence intensities of the second set of solutions and preparing a second graph of fluorescence intensities versus concentration;
 - e. comparing the first graph and second graph for shift in spectral position, change in spectral shape and change in fluorescence intensities; and
 - f. preparing a third set of solutions by dissolving the fluorochrome at each of two or more concentration in phosphate buffered saline at about pH 5.5 only if the shift in spectral position and change in spectral shape of the second set of solutions compared to the first set of solutions are less than 10%.
23. A method of preparing standard reagent comprising:
 - a. preparing a first set of solutions by dissolving a fluorochrome at each of two or more concentrations in phosphate buffered saline pH 7.4;

- b. preparing a second set of solutions by dissolving the fluorochrome at each of two or more concentrations in vitreous humor;
 - c. measuring fluorescence intensities of the first set of solutions and preparing a first graph of fluorescence intensities versus concentration;
 - d. measuring fluorescence intensities of the second set of solutions and preparing a second graph of fluorescence intensities versus concentration;
 - e. comparing the first graph and second graph for shift in spectral position, change in spectral shape and change in fluorescence intensities; and
 - f. preparing a third set of solutions by dissolving the fluorochrome at each of two or more concentration in phosphate buffered saline at about pH 7.3 containing hyaluronic acid in a range from about 0.1% - 5.0% (w/v) only if the shift in spectral position and change in spectral shape of the second set of solutions compared to the first set of solutions are less than 10%.
24. The method of claim 22 wherein gelatin in a concentration of about 1 – 3% (w/v) is added to the third set of solutions.
25. The method of claim 23 wherein gelatin in a concentration of about 1 – 3% (w/v) is added to the third set of solutions.

METHOD AND APPARATUS FOR MEASURING QUANTITY OF A FLUOROCHROME IN
A BIOLOGICAL ENVIRONMENT

ABSTRACT

A device containing one or more aqueous solutions comprising a fluorochrome in varying concentrations is used to quantitatively measure the fluorescence data collected from one or more tissues. Examples for making and using such a device during angiography to quantitatively measure the fluorescence data collected from a patient's eye is provided.

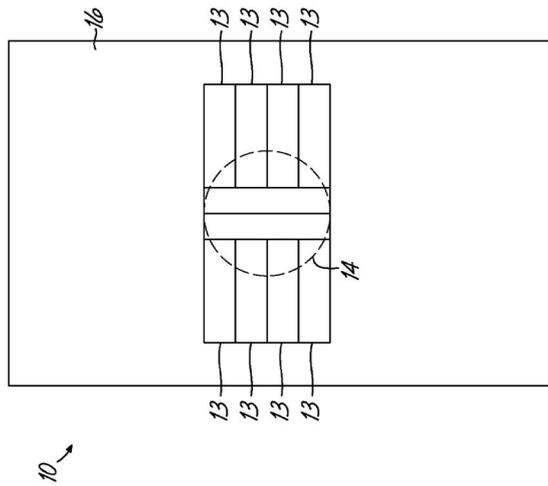


FIG. 1

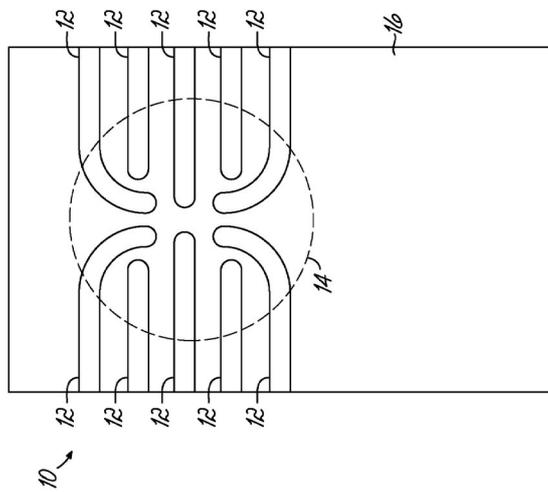


FIG. 2

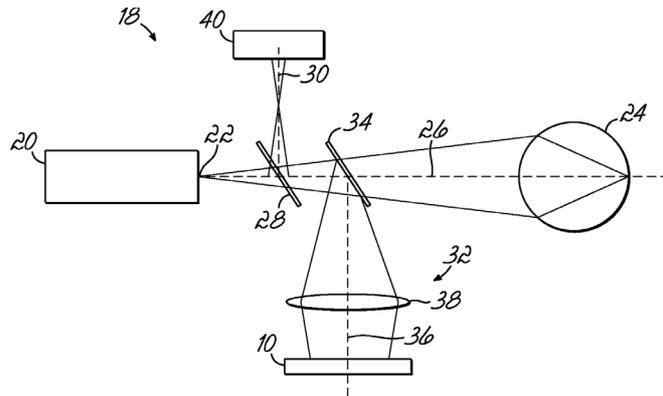


FIG. 3

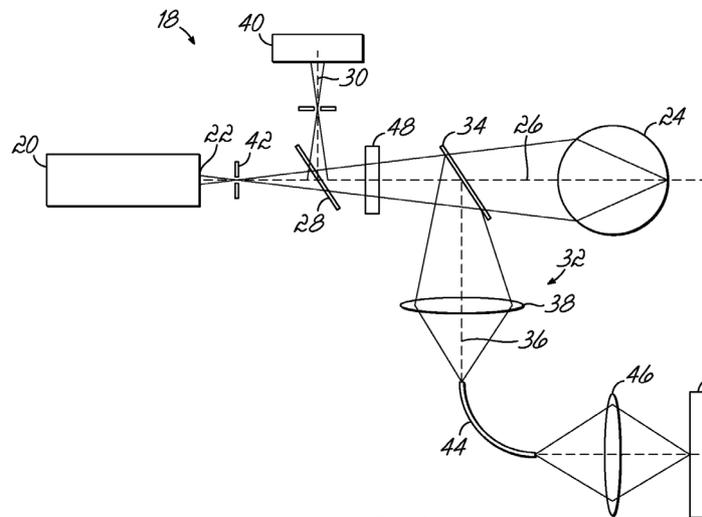


FIG. 4

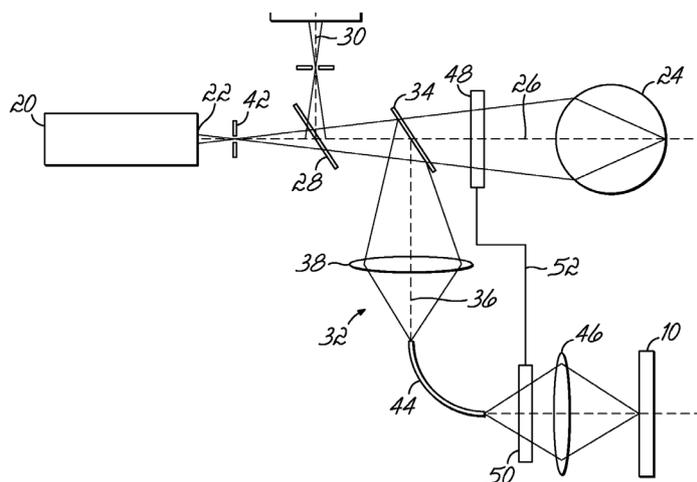


FIG. 5

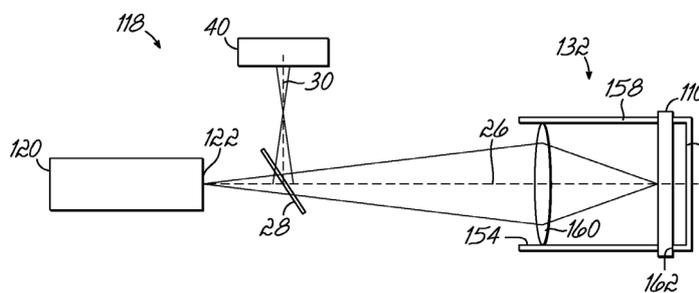


FIG. 6

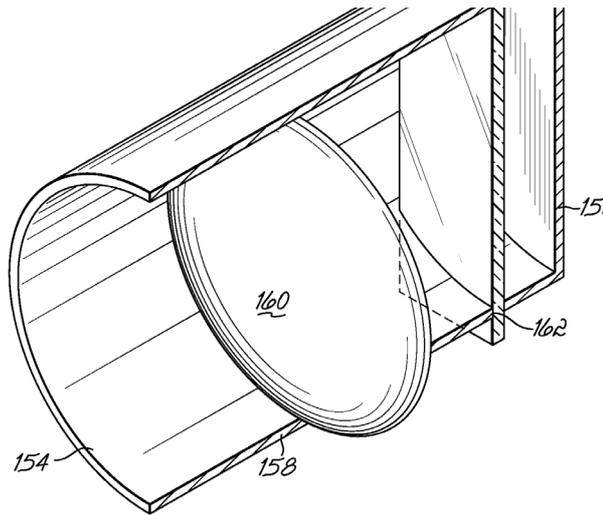


FIG. 7

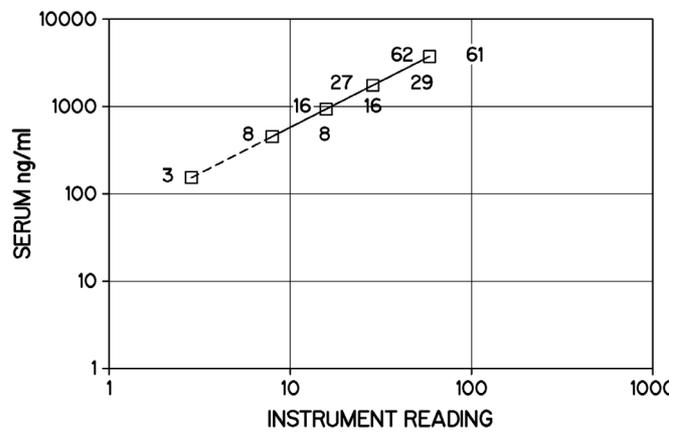


FIG. 8

Apêndice D

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
5 June 2008 (05.06.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/067525 A2

(51) International Patent Classification:
A61B 3/10 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/086056

(22) International Filing Date:
30 November 2007 (30.11.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/867,933 30 November 2006 (30.11.2006) US
11/946,993 29 November 2007 (29.11.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ERIE SCIENTIFIC COMPANY [US/US]; 20 Post Road, Portsmouth, NH 03801 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SCHWARTZ,

Abraham [US/US]; Parque De Loyola 1402 Sur, 50 Ave. Pinerio, San Juan, Puerto Rico 00918 (US). SANTOS BERNARDES, Rui Manuel Dias Cortesao dos [PT/PT]; Bairro das Flores, Rua E, n 40, Sao Martinho do Bispo, P-3040-140 Coimbra (PT). FRANCKE, Stuart [US/US]; 18 High Pine Road, York, ME 03909 (US). SANTOS MORGADO, Antonio Miguel, Lino [PT/PT]; Rua da Escola, 10, Casa da Misarela, P-3030-139 Coimbra (PT).

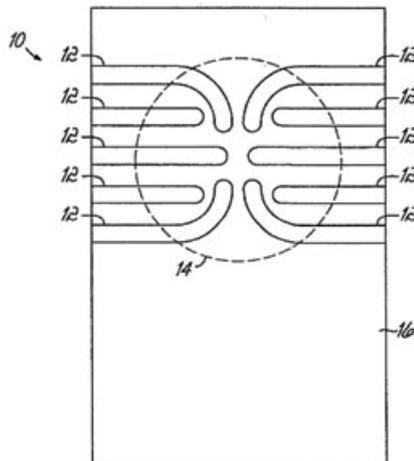
(74) Agents: BRINKMAN, David, H. et al.; WOOD, HERON & EVANS, L.L.P., 441 Vine Street, 2700 Carew Tower, Cincinnati, OH 45202 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PI, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR MEASURING QUANTITY OF A FLUOROCHROME IN A BIOLOGICAL ENVIRONMENT

WO 2008/067525 A2



(57) Abstract: A device (10) containing one or more aqueous solutions comprising a fluorochrome in varying concentrations is used to quantitatively measure the fluorescence data collected from one or more tissues. Examples for making and using such a device (10) during angiography to quantitatively measure the fluorescence data collected from a patient's eye is provided.

*World Intellectual Property Organization,
WO 2008/067525 A2, June 5, 2008*

WO 2008/067525 A2



TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) *Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available):* ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

Published:

— *without international search report and to be republished
upon receipt of that report*

Bibliografia

- [AGK⁺98] L. Aiello, T. Gardner, G. King, G. Blankenship, J. Cavallerano, F. Ferris III, and R. Klein. Diabetic retinopathy (technical review). *Diabetes Care*, 21(1):143–156, January 1998.
- [BCT⁺98] D. Becker, A. Can, J. Turner, H. Tanenbaum, and B. Roysam. Image processing algorithms for retinal montage synthesis, mapping, and real-time location determination. *IEEE Trans Biomed Eng*, 45(1):105–118, January 1998.
- [BDCV05] R. Bernardes, J. Dias, and J. Cunha-Vaz. Mapping the human blood-retinal barrier function. *IEEE Trans Biomed Eng*, 52(1):106–116, January 2005.
- [BIS⁺99] R. Bernardes, J. Isidoro, P. Simões, C. Lobo, and J. Cunha-Vaz. Measuring retinal fluorescein leakage into the human vitreous with a modified confocal scanning laser ophthalmoscope. In *Proceedings of the European Society of Engineering and Medicine*, volume 5, pages 181–182, 1999.
- [BLCV02] R. Bernardes, C. Lobo, and J. Cunha-Vaz. Multimodal macula mapping: A new approach to study diseases of the macula. *Surv Ophthalmol*, 47(6):580–589, November–December 2002.
- [BLDCV02] R. Bernardes, C. Lobo, J. Dias, and J. Cunha-Vaz. New instrumentation for blood-retinal barrier permeability analysis. In *Conference Series of the International Federation for Medical and Biological Engineering (IFMBE)*, volume 3, pages 351–362, 2002.
- [BMLCV03] R. Bernardes, R. Monteiro, C. Lobo, and J. Cunha-Vaz. Oct increased resolution retinal thickness mapping. *IOVS E-Abstract 4852, ARVO, Fort Lauderdale, May 4-8, 2003*.
- [BNV⁺04] R. Bernardes, S. Nunes, J. Varandas, C. Lobo, and J. Cunha-Vaz. Detailed retinal thickness mapping using the stratus oct. *IOVS E-Abstract 2368, ARVO, Fort Lauderdale, April 25-29, 2004*.
- [BSMM03] I. Bronshtein, K. Semendyayev, G. Musiol, and H. Muehlig. *Handbook of Mathematics*. Springer, 2003.

Bibliografia

- [BT02] B. Bouma and G. Tearney. *Handbook of Optical Coherence Tomography*. Marcel Dekker, 2002.
- [BY00] J. Berger and J. Yoken. Computer-assisted quantitation of choroidal neovascularization for clinical trials. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41(8):2286–2295, July 2000.
- [CAZ03] T. Ciulla, A. Amador, and B. Zinman. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Diabetes Care*, 26(9):2653–2664, September 2003.
- [CCK85] P. Chahal, P. Chowienzyk, and E. Kohner. Measurement of blood-retinal barrier permeability: A reproducibility study in normal eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 26:977–982, 1985.
- [CJ00] L. Costa and R. Cesar Jr. *Shape Analysis and Classification: Theory and Practice*. CRC Press, 2000.
- [COM⁺97] M. Cree, J. Olson, K. McHardy, P. Sharp, and J. Forrester. A fully automated comparative microaneurysm digital detection system. *Eye*, 11:622–628, 1997.
- [Cra70] J. Crank. *The Mathematics of Diffusion*. Oxford University Press, London, 1970.
- [CRH03] T. Ciulla, C. Regillo, and A. Harris. *Retina and Optic Nerve Imaging*. Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
- [CST⁺99] A. Can, H. Shen, J. Turner, H. Tanenbaum, and B. Roysam. Rapid automated tracing and feature extraction from retinal fundus images using direct exploratory algorithms. *IEEE Trans Inf Technol Biomed*, 3(2):125–138, June 1999.
- [CV85] J. Cunha-Vaz. A brief historical note on ocular fluorophotometry. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 222:168, 1985.
- [CV06] J. Cunha-Vaz. *Retinopatia Diabética*. MAC LINE, S.L., 2006.
- [CVACF75] J. Cunha-Vaz, J. Abreu, A. Campos, and G. Figo. Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *Br. J. Ophthalmol.*, 59:649–656, 1975.
- [CVB05] J. Cunha-Vaz and R. Bernardes. Nonproliferative retinopathy in diabetes type 2. initial stages and characterization of phenotypes. *Prog Retin Eye Res*, 24(3):355–377, May 2005.
- [CVBLA02] J. Cunha-Vaz, R. Bernardes, C. Lobo, and J. Abreu. Measurements of retinal thickness for evaluation of macular edema. *Contemporary Ophthalmology*, 1(25):1–6, December 2002.

Bibliografia

- [CVGVN79] J. Cunha-Vaz, M. Goldberg, C. Vygantas, and J. Noth. Early detection of retinal involvement in diabetes by vitreous fluorophotometry. *Ophthalmology*, 86:264–275, 1979.
- [CWM⁺07] U. Chakravarthy, A. Walsh, A. Muldrew, P. Updike, T. Barbour, and S. Sadda. Quantitative fluorescein angiographic analysis of choroidal neovascular membranes: Validation and correlation with visual function. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(1):349–354, January 2007.
- [DAUC07] M. Dewan, M. Arefin, M. Ullah, and O. Chae. Automatic extraction of features from retinal fundus image. In *Information and Communication Technology, ICICT*, pages 47–51, March 2007.
- [DB95] F. Docchio and L. Biancardi. Euroeye atlas of ocular fluorophores. Technical report, European Union Concerted Action Biomedical Engineering Ocular Fluorometry, Coimbra, Portugal, 1995.
- [DBLA89] P. Dalgaard, V. Barker, and H. Lund-Andersen. Vitreous fluorophotometry: Mathematical analysis of the effect of peripheral leakage on axial scans. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 30:1522–1526, 1989.
- [Die06] J. Diedrichsen. A spatially unbiased atlas template of the human cerebellum. *NeuroImage*, 33:127–138, August 2006.
- [Doc97] F. Docchio. *Introduction to Ocular Fluorometry*. EUROEYE, 1997.
- [DV05] M. Do and M. Vetterli. The contourlet transform: An efficient directional multiresolution image representation. *IEEE Trans Image Process*, 14(12):2091–2106, December 2005.
- [EHL⁺00] B. Ege, O. Hejlesen, O. Larsen, K. Møller, B. Jennings, D. Kerr, and D. Cavan. Screening for diabetic retinopathy using computer based image analysis and statistical classification. *Comput Methods Programs Biomed.*, 62(3):165–175, August 2000.
- [FGP⁺07] A. Fleming, K. Goatman, S. Philip, J. Olson, and P. Sharp. Automatic detection of retinal anatomy to assist diabetic retinopathy screening. *Phys. Med. Biol.*, 52:331–345, 2007.
- [FGR04] M. Foracchia, E. Grisan, and A. Ruggeri. Detection of optic disc in retinal images by means of a geometrical model of vessel structure. *IEEE Trans Med Imaging*, 23(10):1189–1195, October 2004.
- [FGR05] M. Foracchia, E. Grisan, and A. Ruggeri. Luminosity and contrast normalization in retinal images. *Medical Image Analysis*, 9:179–190, 2005.
- [FPG⁺06] A. Fleming, S. Philip, K. Goatman, J. Olson, and P. Sharp. Automated microaneurysm detection using local contrast normalization and local vessel detection. *IEEE Trans Med Imaging*, 25(9):1223–1232, September 2006.

Bibliografia

- [FUC⁺98] A. Frame, P. Undrill, M. Cree, J. Olson, K. McHardy, P. Sharp, and J. Forrester. A comparison of computer based classification methods applied to the detection of microaneurysms in ophthalmic fluorescein angiograms. *Comput. Biol. Med.*, 28(3):225–238, 1998.
- [GCO⁺03] K. Goatman, M. Cree, J. Olson, J. Forrester, and P. Sharp. Automated measurement of microaneurysm turnover. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44(12):5335–5341, December 2003.
- [GHP03] A. Green, N. Hirsch, and S. Pramming. The changing world demography of type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 19:3–7, 2003.
- [GRM⁺97] J. Gieser, M. Rusin, M. Mori, N. Blair, and M. Shahidi. Clinical assessment of the macula by retinal topography and thickness mapping. *Am. J. Ophthalmol.*, 124(5):648–660, November 1997.
- [Gro85] Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Photocoagulation for diabetic macular edema. early treatment diabetic retinopathy study report number 1. *Arch Ophthalmol*, 103:1796–1806, December 1985.
- [HA02] M. Hafez and S. Azeem. Using adaptive edge technique for detecting microaneurysms in fluorescein angiograms of the ocular fundus. In *IEEE MELECON 2002*, May 2002.
- [HB01] D. Hill and P. Batchelor. Registration methodology: Concepts and algorithms. In Joseph Hajnal, Derek Hill, and David Hawkes, editors, *Medical Image Registration*, The Biomedical Engineering Series, chapter 3, pages 39–70. CRC Press, 2001.
- [HI96] T. Hellstedt and I. Immonen. Disappearance and formation rates of microaneurysms in early diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*, 80(2):135–139, 1996.
- [HIS⁺95] M. Hee, J. Izatt, E. Swanson, D. Huang, J. Schuman, C. Lin, C. Puliafito, and J. Fujimoto. Optical coherence tomography of the human retina. *Arch. Ophthalmol.*, 113:325–332, March 1995.
- [HKG00] A. Hoover, V. Kouznetsova, and M. Goldbaum. Locating blood vessels in retinal images by piecewise threshold probing of a matched filter response. *IEEE Trans Med Imaging*, 19(3):203–210, March 2000.
- [HPD⁺98] M. Hee, C. Puliafito, J. Duker, E. Reichel, J. Coker, J. Wilkins, J. Schuman, E. Swanson, and J. Fujimoto. Topography of diabetic macular edema with optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 105:360–370, 1998.
- [HRJ05] G. Heitz, T. Rohlfing, and C. Maurer Jr. Statistical shape model generation using nonrigid deformation of a template mesh. In *Medical Imaging 2005: Image Processing*, volume 5747, pages 1411–1421. SPIE, 2005.

Bibliografia

- [HSL⁺91] D. Huang, E. Swanson, C. Lin, J. Schuman, W. Stinson, W. Chang, M. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. Puliafito, and et al. Optical coherence tomography. *Science*, 254(5035):1178–1181, November 1991.
- [HSO⁺00] J. Hipwell, F. Strachan, J. Olson, K. McHardy, P. Sharp, and J. Forrester. Automated detection of microaneurysms in digital red-free photographs: a diabetic retinopathy screening tool. *Diabetes UK. Diabetic Medicine*, 17(8):588–594, 2000.
- [IHS⁺94] J. Izatt, M. Hee, E. Swanson, C. Lin, D. Huang, J. Schuman, C. Puliafito, and J. Fujimoto. Micrometer-scale resolution imaging of the anterior eye in vivo with optical coherence tomography. *Arch. Ophthalmol.*, 112(12):1584–1589, December 1994.
- [IS99] M. Ibañez and A. Simó. Bayesian detection of the fovea in eye fundus angiographies. *Pattern Recognition Letters*, 20:229–240, 1999.
- [JDJG04] S. Joshi, B. Davis, M. Jomier, and G. Gerig. Unbiased diffeomorphic atlas construction for computational anatomy. *NeuroImage*, 23:S151–S160, 2004.
- [JFM⁺03] S. Jaume, M. Ferrant, B. Macq, L. Hoyte, J. Fielding, A. Schreyer, R. Kikinis, and S. Warfield. Tumor detection in the bladder wall with a measurement of abnormal thickness in ct scans. *IEEE Trans Biomed Eng*, 50(3):383–390, March 2003.
- [JM03] X. Jiang and D. Mojon. Adaptative local thresholding by verification-based multithreshold probing with application to vessel detection in retinal images. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, 25(1):131–137, January 2003.
- [KA81] E. Kohner and A. Alderson. Vitreous fluorophotometry. *Trans. Ophthal. Soc. U.K.*, 101:446–449, 1981.
- [KBMC01] M. Kamel, S. Belkassim, A. Mendonça, and A. Campilho. A neural network approach for the automatic detection of microaneurysms in retinal angiograms. In *Neural Networks IJCNN*, volume 4, pages 2695–2699, 2001.
- [Kin95] H. King. The epidemic of niddm: An epidemiological perspective. *Int. Diab. Fed. Bull*, 40(2):10–12, 1995.
- [KKM⁺84a] R. Klein, B. Klein, S. Moss, M. Davis, and D. DeMets. The wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. ii. prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch. Ophthalmol.*, 102:520–526, 1984.
- [KKM⁺84b] R. Klein, B. Klein, S. Moss, M. Davis, and D. DeMets. The wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. iii. prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch. Ophthalmol.*, 102:527–532, 1984.

Bibliografia

- [KKM⁺84c] R. Klein, B. Klein, S. Moss, M. Davis, and D. DeMets. The wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. iv. diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 91:1464–1474, 1984.
- [KKMC95a] R. Klein, B. Klein, S. Moss, and K. Cruickshanks. The wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. xiv. ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.*, 113(6):702–703, 1995.
- [KKMC95b] R. Klein, B. Klein, S. Moss, and K. Cruickshanks. The wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. xv. the long-term incidence of macular edema. *Ophthalmology*, 102(1):7–16, January 1995.
- [KLAM⁺81] B. Krogsaa, H. Lund-Andersen, J. Mehlsen, L. Sestoft, and J. Larsen. The blood-retinal barrier permeability in diabetic patients. *Acta Ophthalmol.*, 59:689–694, 1981.
- [KMMK95] R. Klein, S. Meuer, S. Moss, and B. Klein. Retinal microaneurysm counts and 10-year progression of diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.*, 113(11):1386–1391, 1995.
- [KONK92] L. Knudsen, T. Olsen, and F. Nielsen-Kudsk. Fluorescein and fluorescein glucuronide in plasma. *Acta Ophthalmol.*, 70:447–453, 1992.
- [LAKCL85] H. Lund-Andersen, B. Krogsaa, M. Cour, and J. Larsen. Quantitative vitreous fluorometry applying a mathematical model of the eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 26:689–710, 1985.
- [LAKJ82] H. Lund-Andersen, B. Krogsaa, and P. Jensen. Fluorescein in human plasma in vivo. *Acta Ophthalmol.*, 60:709–719, 1982.
- [LBACV99] C. Lobo, R. Bernardes, J. Abreu, and J. Cunha-Vaz. Novel imaging techniques for diabetic macular edema. *Doc Ophthalmol*, 97:341–347, 1999.
- [LBACV01] C. Lobo, R. Bernardes, J. Abreu, and J. Cunha-Vaz. One-year follow-up of blood-retinal barrier and retinal thickness alterations in patients with type 2 diabetes mellitus and mild nonproliferative retinopathy. *Arch. Ophthalmol.*, 119(10):1469–1474, October 2001.
- [LBCV00] C. Lobo, R. Bernardes, and J. Cunha-Vaz. Alterations of the blood-retinal barrier and retinal thickness in preclinical retinopathy in subjects with type 2 diabetes. *Arch Ophthalmol.*, 118(10):1364–1369, October 2000.
- [LBF⁺04] C. Lobo, R. Bernardes, J. Figueira, J. Abreu, and J. Cunha-Vaz. Three-year follow-up study of blood-retinal barrier and retinal thickness alterations in patients with type 2 diabetes mellitus and mild nonproliferative diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.*, 122:211–217, February 2004.

- [LBSCV99] C. Lobo, R. Bernardes, F. Santos, and J. Cunha-Vaz. Mapping retinal fluorescein leakage with confocal scanning laser fluorometry of the human vitreous. *Arch. Ophthalmol.*, 117(5):631–637, May 1999.
- [LC03] H. Li and O. Chutatape. A model-based approach for automated feature extraction in fundus images. In *IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV'03)*, 2003.
- [LCK01] G. Luo, O. Chutatape, and S. Krishnan. Abnormality detection in automated mass screening system of diabetic retinopathy. In *IEEE Symposium on Computer-Based Medical Systems*, 2001.
- [LDLA90] M. Larsen, P. Dalgaard, and H. Lund-Andersen. Differential spectrofluorometry in the human vitreous: Blood-retinal barrier permeability to fluorescein and fluorescein glucuronide. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 229:350–357, 1990.
- [LFS⁺04] C. Lobo, P. Faria, M. Soares, R. Bernardes, and J. Cunha-Vaz. Macular alterations after small-incision cataract surgery. *J. Cataract Refract. Surg.*, 30(4):752–760, April 2004.
- [LGG⁺03] N. Larsen, J. Godt, M. Grunkin, H. Lund-Andersen, and M. Larsen. Automated detection of diabetic retinopathy in a fundus photographic screening population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44(2):767–771, February 2003.
- [LGL⁺03] M. Larsen, J. Godt, N. Larsen, H. Lund-Andersen, A. Sjølie, E. Agardh, H. Kalm, M.I. Grunkin, and D. Owens. Automated detection of fundus photographic red lesions in diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44(2):761–766, February 2003.
- [LHS⁺04] J. Lowell, A. Hunter, D. Steel, A. Basu, R. Ryder, E. Fletcher, and L. Kennedy. Optic nerve head segmentation. *IEEE Trans Med Imaging*, 23(2):256–264, February 2004.
- [LSJR97] D. Landau, E. Schneidman, T. Jacobovitz, and Y. Rozenman. Quantitative in vivo retinal thickness measurements in healthy subjects. *Ophthalmology*, 104(4):639–642, April 1997.
- [MAMD04] G. Matsopoulos, P. Asvestas, N. Mouravliansky, and K. Delibasis. Multimodal registration of retinal images using self organizing maps. *IEEE Trans Med Imaging*, 23(12):1557–1563, December 2004.
- [Mas06] B. Masters. *Confocal Microscopy and Multiphoton Excitation Microscopy - The Genesis of Live Cell Imaging*. SPIE Press, 2006.
- [Mau63] D. Maurice. A new objective fluorophotometer. *Exp. Eye Res.*, 2:33, 1963.
- [MB86] J. McLaren and R. Brubaker. Measurement of fluorescein and fluorescein monoglucuronide in the living human eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 27:966–974, 1986.

Bibliografia

- [MC06] A. Mendonça and A. Campilho. Segmentation of retinal blood vessels by combining the detection of centerlines and morphological reconstruction. *IEEE Trans Med Imaging*, 25(9):1200–1213, September 2006.
- [MCN99] A. Mendonça, A. Campilho, and J. Nunes. Automatic segmentation of microaneurysms in retinal angiograms of diabetic patients. In *ICIAP, 10th International Conference on Image Analysis and Processing (ICIAP'99)*, page 728, 1999.
- [MLF⁺82] M. Mota, E. Leite, B. Fernandes, M. Abreu, and J. Cunha-Vaz. Cinética da fluoresceína no plasma. *Exp. Ophthalmol.*, 8:8–12, 1982.
- [MTWH82] M. Mainster, G. Timberlake, R. Webb, and G. Hughes. Scanning laser ophthalmoscopy - clinical applications. *American Academy of Ophthalmology*, 89(7):852–857, July 1982.
- [NA61] H. Novotny and D. Alvis. A method of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina. *Circulation - Journal of the American Heart Association*, 24:82–86, 1961.
- [NGS⁺04] M. Niemeijer, B. Ginneken, J. Staal, M. Suttorp-Schulten, and M. Abramoff. Automatic detection of red lesions in digital color fundus photographs. *IEEE Trans Med Imaging*, 24(5):584–592, May 2004.
- [NICR⁺07] H. Narasimha-Iyer, A. Can, B. Roysam, H. Tanenbaum, and A. Majerovics. Integrated analysis of vascular and nonvascular changes from color retinal fundus image sequences. *IEEE Trans Biomed Eng*, 54(8):1436–1445, August 2007.
- [NSB⁺00] R. Newsom, C. Sinthanayothin, J. Boyce, J. Casswell, and T. Williamson. Clinical evaluation of 'local contrast enhancement' for oral fluorescein angiograms. *Eye*, pages 318–323, 2000.
- [PB81] A. Palestine and R. Brubaker. Pharmacokinetics of fluorescein in the vitreous. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 21:524–549, 1981.
- [PB99] M. Petrou and P. Bosdogianni. *Image Processing - The Fundamentals*. John Wiley & Sons, 1999.
- [PBDK98] A. Pinz, S. Bernögger, P. Datlinger, and A. Kruger. Mapping the human retina. *IEEE Trans Med Imaging*, 17(4):606–619, August 1998.
- [PBL⁺02] I. Pires, R. Bernardes, C. Lobo, M. Soares, and J. Cunha-Vaz. Retinal thickness in eyes with mild nonproliferative retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. comparison of measurements obtained by retinal thickness analysis and optical coherence tomography. *Arch. Ophthalmol.*, 120:1301–1306, October 2002.

- [PHGK77] J. Pearson, D. Hines, S. Golosman, and C. Kuglin. Video-rate image correlation processor. In *Proceedings of SPIE: applications of Digital Image Processing*, volume 119, pages 197–205, 1977.
- [PKPS⁺98] T. Pedut-Kloizman, H. Pakter, J. Schuman, J. Schwartz, and M. Hee. Ophthalmic diagnosis using optical coherence tomography. *Ophthalmol. Clinics North America*, 11(3):465–486, September 1998.
- [PP05] P. Penfold and J. Provis. *Macular Degeneration*. Springer, 2005.
- [PSH⁺02] A. Polito, S. Shah, J. Haller, I. Zimmer-Galler, R. Zeimer, P. Campochiaro, and S. Vitale. Comparison between retinal thickness analyzer and optical coherence tomography for assessment of foveal thickness in eyes with macular disease. *Am. J. Ophthalmol.*, 134(2):240–251, 2002.
- [RCB97] L. Rangarajan, H. Chui, and F. Bookstein. The softassign procrustes matching algorithm. In James Duncan and Gene Gindi, editors, *Information Processing in Medical Imaging*, pages 29–42. Springer, 1997.
- [SBCW99] C. Sinthanayothin, J. Boyce, H. Cook, and T. Williamson. Automated localisation of the optic disc, fovea, and retinal blood vessels from digital colour fundus images. *Br J Ophthalmol*, 83:902–910, 1999.
- [SBFM07] A. Schwartz, R. Bernardes, S. Franke, and A. Morgado. Method and apparatus for measuring quantity of a fluorochrome in a biological environment. *United States Patent Appl. Serial No. 11/946,933*, November 30 2007.
- [SBT⁺99] J. Sunness, N. Bressler, Y. Tian, J. Alexander, and C. Applegate. Measuring geographic atrophy in advanced age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 40(8):1761–1769, July 1999.
- [SCF⁺06] A. Schwartz, W. Carter, S. Franke, R. Bernardes, and A. Morgado. Method and apparatus for measuring quantity of a fluorochrome in a biological environment. *U. S. Provisional Application Serial No. 60/867,933 (Patent)*, November 30 2006.
- [Sch99] J. Schmitt. Optical coherence tomography (oct): A review. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 5(4):1205–1215, 1999.
- [SHH86] D. Spalton, R. Hitchings, and P. Hunter. *Atlas d'ophtalmologie clinique*. MEDSI, 1986.
- [SL03] J. Suri and S. Laxminarayan. *Angiography and Plaque Imaging - Advanced Segmentation Techniques*. The Biomedical Engineering Series. CRC Press, 2003.
- [SLMLA01] B. Sander, M. Larsen, B. Moldow, and H. Lund-Andersen. Diabetic macular edema: Passive and active transport of fluorescein through the blood-retina barrier. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 42:433–438, 2001.

Bibliografia

- [SMA⁺07] A. Schwartz, C. Marques, G. Abreu, R. Bernardes, L. Jolin, E. Snow, L. Wang, A. Gaigalas, W. Carter, and J. Cunha-Vaz. Quantitative characteristics of fluorescein for fluorescence angiograms. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007 48: E-Abstract 157, 2007.
- [SOB⁺91] M. Shahidi, Y. Ogura, N. Blair, M. Rusin, and R. Zeimer. Retinal thickness analysis for quantitative assessment of diabetic macular edema. *Arch. Ophthalmol.*, 109:1115–1119, August 1991.
- [SPF04] J. Schuman, C. Puliafito, and J. Fujimoto. *Optical Coherence Tomography of Ocular Diseases*. SLACK Incorporated, 2004.
- [SPSF92] T. Spencer, R. Phillips, P. Sharp, and J. Forrester. Automated detection and quantification of microaneurysms in fluorescein angiograms. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 230:36–41, 1992.
- [SSL⁺02] C. Strom, B. Sander, N. Larsen, M. Larsen, and H. Lund-Andersen. Diabetic macular edema assessed with optical coherence tomography and stereo fundus photography. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43(1):241–245, January 2002.
- [Ste96] C. Steger. Extraction of curved lines from images. In *13th International Conference on Pattern Recognition*, volume II, pages 251–255, 1996.
- [STS05] D. Soerensen, J. Thomadsen, and B. Sander. A new standardized oct3 map with improved resolution. *IOVS E-Abstract 2574, ARVO, Fort Lauderdale, May 1-5, 2005*.
- [TCW01] H. Tek, D. Comaniciu, and J. Williams. Vessel detection by mean shift based ray propagation. In *IEEE Workshop on Mathematical Methods in Biomedical Image Analysis (MMBIA)*, pages 228–235. IEEE Computer Society, 2001.
- [TSB03] M. Tyler, P. Saine, and T. Bennett. *Practical Retinal Photography and Digital Imaging Techniques*. Butterworth Heinemann, 2003.
- [WBB89] Q. Wu, P. Bones, and R. Bates. Translational motion compensation for coronary angiograms sequences. *IEEE Trans Med Imaging*, 8(3):276–282, 1989.
- [Web84] R. Webb. Optics for laser rasters. *Applied Optics*, 23(20):3680–3683, October 1984.
- [WH81] R. Webb and G. Hughes. Scanning laser ophthalmoscope. *IEEE Trans Biomed Eng.* 28(7):488–492, July 1981.
- [WK70] S. Waltman and H. Kaufman. A new objective slit lamp fluorophotometer. *Invest Ophthalmol*, 9(4):247–249, April 1970.
- [WKKB79] S. Waltman, T. Krupin, C. Kilo, and B. Becker. Vitreous fluorophotometry in adult-onset diabetes mellitus. *Am. J. Ophthalmol.*, 88:342–345, 1979.

Bibliografia

- [WOK⁺78] S. Waltman, C. Oestrich, T. Krupin, S. Hanish, S. Ratzan, J. Santiago, and C. Kilo. Quantitative vitreous fluorophotometry: A sensitive technique for measuring early breakdown of the blood-retinal barrier in young diabetic patients. *Diabetes*, 27:85–87, 1978.
- [YKGC06] K. Yogesan, S. Kumar, L. Goldschmidt, and J. Cuadros. *Tele-ophthalmology*. Springer, 2006.
- [ZBCV83a] R. Zeimer, N. Blair, and J. Cunha-Vaz. Pharmacokinetic interpretation of vitreous fluorophotometry. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 24:1374–1381, 1983.
- [ZBCV83b] R. Zeimer, N. Blair, and J. Cunha-Vaz. Vitreous fluorophotometry for clinical research. ii. method of data acquisition and processing. *Arch. Ophthalmol.*, 101:1757–1761, 1983.
- [ZBCV83c] R. Zeimer, N. Blair, and J. Cunha-Vaz. Vitreous fluorophotometry for the clinical research. i. description and evaluation of a new fluorophotometer. *Arch. Ophthalmol.*, 101:1753–1756, 1983.
- [ZBRCV85] R. Zeimer, N. Blair, M. Rusin, and J. Cunha-Vaz. The performance of a new commercial ocular fluorophotometer in the clinical environment. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 222:222–223, 1985.
- [ZSM⁺96] R. Zeimer, M. Shahidi, M. Mori, S. Zou, and S. Asrani. A new method for rapid mapping of the retinal thickness at the posterior pole. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37(10):1994–2001, 1996.

Índice Remissivo

- Ácido hialurónico, 101
- Absorção, 13, 14, 79
- Aditividade, 68
- Administração intravenosa, 65
- AF, *ver* Angiografia fluoresceínica
- AMD, *ver* Degenerescência macular relacionada com a idade
- Análise de componentes principais, 35, 36, 43, 46, 122, 124, 125, 196
- conjunto de treino, 46
- Angiografia
- fluoresceínica, 6, 13, 14, 24, 25, 66, 76, 89, 90, 163, 167, 169, 171, 173, 177, 180, 194
- verde de indocianina, 89
- Árgon, *ver* Laser
- Atlas, 119, 124, 125, 143, 144, 157
- Atrofia geográfica, 3
- Aumento contraste local, 76
- Autofluorescência, 85
- Banco de filtros, 51
- direccionais, 51
- Barreira hemato-retiniana, 6, 15, 17, 18, 64, 65, 70, 77–79, 83–85, 96, 156–161, 163, 171–176, 192, 193
- Base de dados, 11
- Bayer, Johann von, 14
- Bayes, 44
- Beam splitter*, *ver* Divisor de feixe
- Bedell, A., 10
- Byte, 66, 109
- Córnea, 4
- Câmaras
- midriáticas, 10
- não-midriáticas, 10
- Calibração
- célula(s), 92, 95–107, 113–115, 192
- Catarata, 117
- CCD, 10, 13, 26, 34, 120, 121, 163
- Citometria de fluxo, 106
- Co-registo, 43
- deformável, 171
- multimodal, 48, 52, 156, 159
- projectivo, 52, 58, 171
- rígido, 26, 57–59, 61, 122, 161, 171
- sub-píxel, 124
- Coerência óptica, 117
- Coherent Fluorotron Master*, 17, 181
- Compressão digital
- com perdas, 11
- sem perdas, 11
- Contornos activos, 45
- Contoulet, *ver* Transformada
- Contraste, 11
- Coordenadas
- homogéneas, 59
- maculares, 121, 124, 127, 130, 133, 139, 158
- Correlação
- cruzada, 47, 53, 56, 58, 105, 166, 181
- de fase, 72
- Cortex visual primário, 7
- Covariância, 196

Índice Remissivo

- Cristalino, 4
- CSLO, *ver* Oftalmoscópio confocal de varrimento laser
- Curvatura
- Gauss*, 26
 - Gauss*, 162
 - média, 25
- DCCT, *ver* Diabetes Control and Complications Trial
- Decimação, 67
- Degenerescência macular relacionada idade, 3, 89, 117, 143, 145–147
- Densidade de corrente, 78
- Derivada(s), 69, 70
- direccional(is), 49
 - parcial(is), 49
- Desconvolução, 70, 77, 80, 81, 112
- Diabetes Control and Complications Trial*, 2
- Diabetes Mellitus, 64, 143
- tipo 1, 180
 - tipo 2, 2, 85, 143, 181
- Diabetic Retinopathy Study*, 2
- Diferenças finitas, 70
- Difusão, 74, 77, 78
- coeficiente, 78, 79
 - modelo físico, 83
- Dioptrias, 66
- Disco óptico, 4, 5, 43–45, 52, 121, 124, 133, 149, 157, 159
- Dispersão, 120
- Distância Euclidiana, 46, 132, 200
- Distribuição normal, 125
- Divisor de feixe, 20, 94, 96, 97, 103
- DMI, *ver* Degenerescência macular relacionada com a idade
- Dose administrada, 67, 79
- DPI, 26
- DRS, *ver* Diabetic Retinopathy Study
- Drusa, 3, 84, 85, 88
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Group*, 2
- Edema macular, 6, 18, 117, 146, 147, 149, 156
- cl clinicamente significativo, 3, 33
 - pré-clínico, 127
 - sub-clínico, 143, 144
- Eficiência quântica, 90, 92, 102, 112
- Ehrlich, Paul, 14
- Eigen-*
- disks*, 46
 - values*, *ver* Valores próprios
 - vectors*, *ver* Vectores próprios
- Elementos finitos, 79
- Elipse, 47
- EMCS, *ver* Edema macular clinicamente significativo
- Emissão, 13, 14, 66, 91, 97
- Energia de torção, 127, 140, 143, 200, 201
- Ensaio clínico, 11
- Epiluminescente, 94
- Epitélio pigmentado da retina, 20, 117, 120, 140
- Escala de cores falsa, 85
- Espectro
- emissão, 14
 - excitação, 14
- Espectrofluorímetro, 92, 102
- ETDRS, *ver* Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Group, 160
- EVI-GENORET, 148
- Excitação, 13, 66, 97
- FA, *ver* Angiografia fluoresceínica
- Fast
- Macular Protocol*, 120, 130, 132–137, 139, 140, 148
 - RNFL Protocol*, 120, 134–136, 139, 140, 148
- Fick
- primeira lei, 78
 - segunda lei, 78
- Filtro

- barreira, 66
- emissão, 14, 89
- excitação, 14, 89
- Gaussiano, 131
- mínimo, 50
- morfológico, 47, 50
- passa-baixo, 36, 50, 75, 131
- resposta finita, 75
- FIR*, ver Filtro de resposta finita
- Flash*, 10
- Fluoróforos
 - endógenos, 13
 - exógenos, 13, 14
- Fluorescência, 13, 14, 17, 66, 68, 70, 74, 75, 81, 84, 89, 91, 101, 102, 111
 - conversão, 105, 108, 114
 - padrões, 94
- Fluoresceína
 - derrame, 64, 83–85, 96
 - livre, 65
 - monoglucoronada, 14, 79
 - sódica, 13, 14, 17, 91, 93, 102
- Fluorofotometria, 13, 17, 64
- Fluorometria, ver Fluorofotometria
- Fotodíodos, 13
- Fotodetector, 20, 90, 96, 97, 109
- Fotografia estéreo, 10, 117, 118
- Fotografia estéreoscópica, ver Fotografia estéreo
- Fotomultiplicador, 13, 64
 - díodo, 64, 76
- Fotoreceptores, 5, 6
 - bastonetes, 5
 - cones, 5
- Fourier, ver Transformada
- Fóvea, 4, 43, 52, 124, 133, 157, 159
- Frequência
 - de-corte, 66, 75, 131
 - amostragem, 75, 132
 - aquisição, 67
 - relativa, 75
- Função
 - base (*TPS*), 200
 - degrau unitário, 69
 - Lorentz*, 69–71, 100, 121
 - resposta a impulso unitário, 68–70, 74, 75, 81
- FWHM*, 70
- Gama dinâmica, 29, 95
- Gauss*, ver Filtro
- Gaussiana, 47, 131
 - Laplaciano, 27, 46
 - modelo, 44
- Gradiente de concentração, 77
- GRIN*, 4
- Heidelberg Retina Angiograph*, ver *HRA*
- HeNe, ver Laser
- ThermoFisher Scientific*, 91
- Homogeneidade, 68
- Hough, ver Transformada
- HRA*, 64, 66, 68, 76, 81, 82, 94, 96, 97, 104–106, 113, 163, 167, 169
- Índice de refração, 4, 19, 20, 117
- Interferometria, 20
- Interpolação, 120, 124, 127, 135, 165
 - bi-cúbica, 161
 - spline*, 81
 - thin-plate spline*, 127, 144, 200
- Íris, 4
- Jackman, W., 10
- Janela de análise, 109
- Lâmpada-de-fenda, 17, 120
- Laser*
 - Árgon, 66, 84, 85
 - HeNe, 120
- LCE*, ver Aumento contraste local
- Leakage units*, ver Unidades de derrame
- Limiar de detecção, 109, 110

Índice Remissivo

- Linearidade, 68, 109
LIT, *ver* Sistema linear e invariante no tempo
LoG, *ver* Gaussiana/Laplaciano
LU, *ver* Unidades de derrame
- Mácula, 26, 117, 143, 156
Maiman, Theodore, 15
Manual de procedimentos operacional, 148
Matriz pseudo-inversa, 60
Maurice, David, 17
Membrana limitante interna, 20, 117, 120, 140
Micro-tampões, 101
Minsky, Marvin, 15
Modelo, *ver* Atlas
 espessura da retina, 119
 estatístico, 44
 fóvea, 45
 Gaussiano, 44
Moore-Penrose, *ver* Matriz pseudo-inversa
Movimentos sacádicos, 21, 72, 134, 137, 164
 involuntários, 67
 voluntários, 67
- Número de décadas, 109, 110
Neovascularização coroideia, 3, 89
Nipkow, Paul, 16
NIST, 91
NPDR, *ver* Retinopatia diabética não proliferativa
- OCT*, 5, 19, 20, 117, 120, 127, 144
 Manual de procedimentos operacional, 148
OCVL, *ver* Oftalmoscópio confocal de varrimento laser
Oftalmoscópio, 90, 93
 confocal de varrimento laser, 15, 16, 18, 64, 66, 94
Operador morfológico
 dilatação, 47
 erosão, 47
 fecho, 47
OphthiCal, 114
Otimização, 57, 107, 124, 131, 134, 137, 139
- Orifício confocal, 15, 16, 64, 66, 67, 76
- Padrão
 desvio, 44, 76, 125, 126, 140, 143, 144
 normal, 33, 118, 121, 157, 164
 população, 120
 solução, 91
PBS, 91, 92, 103
PCA, *ver* Análise de componentes principais
Pearson
 Coeficiente de correlação, 44, 46, 171
Perimetria, 16
Permeabilidade, 64, 65, 78, 80, 156, 157
pH, 14, 91, 92, 95
Pirâmide Laplaciana, 51
Plugin, 105
Polinómio de Taylor, 49
Pólo posterior, *ver* Segmento posterior
Pontos
 característicos, 58, 61, 157, 162
 fiduciais, 74, 156
Porto óptico, 96
Progressão geométrica, 95
Protótipo, 96, 97
Pseudo-cor, 20, 110, 182
PSF, *ver* Função de resposta a impulso unitário
Pupila, 4, 10, 69, 76, 90
 artificial, 69
- Radiação ultravioleta, 101
Radon, *ver* Transformada
RD, *ver* Retinopatia diabética
Red-free, 25
Rede vascular, 43
Reflexão, 14, 20, 66, 120
Relação sinal-ruído, 66, 67, 71
Retina, 2, 4
Retinografia, 10, 157, 171, 172
 sequência, 34
Retinopatia diabética, 2, 14, 15, 17, 18, 24, 32, 89, 117, 143, 145, 146, 150, 154,

- 180, 194
- não-proliferativa, 84, 85, 147
- RetMarker*, 34
- Rizzutti, A., 10
- RTA, 120, 121

- Sacadas, *ver* Movimentos sacádicos
- Segmento
 - anterior, 20
 - posterior, 17
- Sequências temporais, 33
- Shear*, *ver* Transformação
- Sistema linear e invariante no tempo, 68
 - aditividade, 68
 - homogeneidade, 68
 - linearidade, 68
- Snakes*, *ver* Contornos activos
- Softassign Procrustes*, 59
- SOP*, *ver* Manual de procedimentos operacional
- Stereoscopic viewers*, 118
- STSF, 103

- Taylor, *ver* Polinómio de Taylor
- TIFF*, 26
- Transformação
 - escala, 137
 - não rígida, 26
 - projectiva, 60, 162, 165
 - rígida, 48, 124, 161
 - Shear*, 137
- Transformada
 - Contoulet, 51
 - Fourier, 68, 72
 - Hough, 28, 45
 - Radon, 28
 - Wavelet, 51
- Transmitância, 90, 97, 101
- Transporte activo, 77, 79
- Tubos capilares, 101

- UKPDS*, *ver* *United Kingdom Prospective Diabetes Study*

- Ultrasons, 19, 117
- Unidade de derrame, 83
- United Kingdom Prospective Diabetes Study*, 2

- Vítreo
 - cavidade, 17, 74
 - humor, 17, 64, 83
- Valores próprios, 35, 49, 144, 196
- Vectores próprios, 49, 196

- Wavelet, *ver* Transformada
- Webster, J., 10

- Xanteno, 14

