



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Maria Alves Mateus

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA
ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLAGÉNIO A
PARTIR DE IMAGENS SHG

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Física, ramo Instrumentação, orientada pelo Professor Doutor António Miguel Lino Santos Morgado e pela Doutora Ana Batista e apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Alves Mateus

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA
ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLAGÉNIO A
PARTIR DE IMAGENS SHG

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Física, ramo Instrumentação, orientada pelo Professor Doutor António Miguel Lino Santos Morgado e pela Doutora Ana Batista e apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022

Agradecimentos

Um especial agradecimento pela paciência, apoio, motivação e orientação à minha coorientadora Dr. Ana Batista, sem a qual não teria conseguido concluir este projeto. Também gostaria de agradecer ao Professor António Miguel Morgado, que embora mais distante fisicamente, sempre se mostrou disponível para dar a sua opinião sobre o trabalho realizado assim como fazer sugestões pertinentes para o sucesso deste projeto. Um especial obrigado também ao Dr. Pedro Guimarães, que se mostrou sempre disponível para me ajudar e esclarecer as minhas dúvidas ao longo do desenvolvimento do projeto.

Um obrigada não chega para agradecer todo o apoio incondicional da minha Mãe, não só durante este ano como durante todo o meu percurso académico. Obrigada pelo carinho, pela eterna paciência e pelas chamadas infinitas, que tornaram esta luta um bocadinho mais fácil.

À minha irmã, a minha melhor amiga há 23 anos, da qual tenho muito orgulho e que apesar de mais nova sempre ter a capacidade de me ouvir e dizer a coisa certa só para me fazer sentir melhor.

Aos meus amigos, Adriana, Gui, Magda, Rafa, Ana Maria, Serdoura, Ana Costa, Pedro Carriço pelo apoio e companhia durante estes últimos anos. Um enorme obrigada por me terem proporcionado uma experiência académica como esta. Quero levar-vos para a vida.

Ao Goulão, que sem saber teve um papel muito importante ao longo deste ano. Obrigada por teres sido o meu porto seguro, mesmo estando longe.

Muito obrigado a todos.

Resumo

A distribuição fibrilar do colagénio presente no estroma corneano pode sofrer alterações como consequência de diferentes fatores, incluindo cirurgia, patologia ou dano externo. Por forma a auxiliar o diagnóstico precoce são necessárias ferramentas de análise quantitativa da organização do colagénio. Como as estruturas de colagénio são uma fonte eficiente de geração de segundo harmónico (SHG), a microscopia SHG demonstrou ser uma técnica robusta para avaliação destas alterações. No entanto, apesar do uso generalizado de microscopia SHG para avaliação da organização de estruturas de colagénio, a análise é na sua maioria qualitativa. Vários métodos quantitativos foram já implementados para a discriminação de tecidos normais e patológicos, contudo, estes métodos nunca foram objetivamente avaliados e comparados.

Estudou-se o desempenho de dois métodos quantitativos, o tensor de estrutura (ST) e a transformada de Fourier (FT) em avaliar o nível de organização estrutural do colagénio. Foram usadas imagens SHG geradas artificialmente e imagens SHG da córnea humana adquiridas em duas geometrias diferentes, transmissão e reflexão. Tendo em conta a organização complexa das estruturas de colagénio, foram considerados três fatores de desorganização principais na geração de imagens SHG artificiais: (i) a tortuosidade das fibras de colagénio, (ii) a complexidade lamelar, e (iii) o alinhamento das fibras intra-lamela. Cada fator foi avaliado de forma independente.

Os resultados mostraram que ambos os métodos têm a capacidade de discriminar padrões estruturais distintos com níveis de organização diferentes. No entanto, ambos os métodos revelaram-se mais eficientes quando a imagem contém uma única lamela e se varia apenas a tortuosidade das fibras. Na deteção do grau de organização em imagens SHG de transmissão e reflexão de córneas saudáveis, o apuramento dos métodos foi contraditório. Para imagens da mesma região, ambos os métodos identificaram níveis de organização distintos quando apenas imagens adquiridas em modo de transmissão ou reflexão foram consideradas. Porém, o método ST mostrou-se vantajoso neste ponto.

A comparação dos métodos estudados permitiu determinar as falhas ainda a colmatar na quantificação de imagens SHG da córnea.

Palavras-chave: SHG, fibras de colagénio, análise quantitativa, tensor de estrutura, transformada de Fourier.

Abstract

The fibrillar distribution of collagen within the corneal stroma can be altered by a variety of factors, including surgery, pathology or external damage. To improve the detection of these changes, and aid disease diagnosis, tools for quantitative analysis of collagen organization are needed. Since collagen structures are an efficient source of second harmonic generation (SHG), this imaging modality has proved to be a robust technique for evaluating these changes. However, despite its widespread use to assess the organization of collagen structures, the analysis is mostly qualitative. Several quantitative methods have already been implemented for the discrimination of normal and pathological tissues. Nevertheless, these methods have never been objectively evaluated and compared.

The performance of two quantitative methods, the structure tensor (ST) and the Fourier transform (FT) in assessing the level of structural organization of collagen, was investigated. Artificially generated SHG images and human cornea SHG images acquired in two different geometries, transmission and reflection, were used. Considering the complex organization of collagen structures, three main disorganization factors were considered in the generation of artificial SHG images: (i) the tortuosity of the collagen fibers, (ii) the lamellar complexity, and (iii) the intra-lamella fiber alignment. Each factor was evaluated independently.

The results showed that both metrics can discriminate distinct structural patterns with different levels of organization. Nevertheless, both methods proved to be more efficient in images with a single lamella when only the fiber tortuosity was changed to decrease the organization level. When considering the assessment of collagen degree of organization in healthy corneas SHG images acquired in transmission and reflection geometries, the methods produced contradictory results. Although the images were collected from the same spatial region, different levels of organization were identified when using only transmission or only reflection acquired SHG images. Nonetheless, ST analysis performed better.

The comparison of the methods studied allowed us to identify gaps that must be filled to achieve a reliable and reproducible metric to quantify the level of organization of collagen fibers from SHG images of the cornea.

Keywords: SHG, collagen fibers, quantitative analysis, structure tensor, Fourier transform.

Índice

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	9
ÍNDICE	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ACRÓNIMOS	19
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 MOTIVAÇÃO	21
1.2 CONTEXTO.....	22
1.3 OBJETIVOS.....	23
1.4 ANÁLISE DE REQUISITOS	24
1.5 ESTRUTURA DO DOCUMENTO.....	26
2. A CÓRNEA	27
2.1 EPITÉLIO.....	28
2.2 CAMADA DE BOWMAN.....	29
2.3 ESTROMA	29
2.4 MEMBRANA DE DESCHEMET	30
2.5 ENDOTÉLIO.....	31
3. PRINCÍPIOS DA MICROSCOPIA MULTIFOTÃO	33
3.1 IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA EXCITADA COM DOIS FOTÕES (2PE)	34
3.1.1 Fontes de contraste endógenas da córnea	35
3.2 GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO (SHG)	36
3.2.1 Equação de onda para SHG	37
3.2.2 Condição de correspondência de fase.....	40
3.2.3 Não centrossimetria	41
3.3 VANTAGENS DA MICROSCOPIA MULTIFOTÃO	42
4. ESTADO DA ARTE	45
4.1 SHG EM TECIDOS BIOLÓGICOS.....	45
4.2 MÉTODOS QUANTITATIVOS DE ANÁLISE DE IMAGEM SHG	47
5. MATERIAIS E MÉTODOS	51
5.1 AQUISIÇÃO DE IMAGEM SHG.....	51
5.1.1 Microscópio Multifotão	51
5.1.2 Comprimento de onda excitação	54
5.1.3 Correlação.....	58
5.2 ANÁLISE DE IMAGEM.....	58
5.2.1 Método de Tensor de Estrutura.....	59
5.2.2 Método de Transformada de Fourier.....	62
5.2.3 Análise Estatística.....	66

5.3	FANTOMAS.....	66
5.3.1	<i>Organização das fibras de colagénio por lamela</i>	67
5.3.2	<i>Complexidade lamelar</i>	68
5.3.3	<i>Variabilidade intra-lamelar</i>	69
5.4	AMOSTRAS.....	70
5.4.1	<i>Crosslinking (CXL)</i>	70
6.	RESULTADOS	73
6.1	MÉTODO ST.....	73
6.1.1	<i>Validação do método</i>	73
6.1.2	<i>Aplicação e Invariância à escala.....</i>	75
6.2	MÉTODO FT.....	78
6.2.1	<i>Validação do método</i>	78
6.2.2	<i>Aplicação e Invariância à escala.....</i>	80
6.3	IMAGENS SHG.....	83
6.3.1	<i>Método ST.....</i>	84
6.3.2	<i>Método FT.....</i>	86
7.	DISCUSSÃO.....	91
7.1	FANTOMAS.....	92
7.1.1	<i>Organização das fibras de colagénio por lamela - 1º fator.....</i>	92
7.1.2	<i>Complexidade lamelar - 2º fator</i>	93
7.1.3	<i>Variabilidade lamelar - 3º fator</i>	93
7.2	IMAGENS SHG.....	96
8.	CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	101
	REFERÊNCIAS.....	105
	APÊNDICE A.....	119
	CÓDIGOS MATLAB.....	119
	A.1 MÉTODO ST.....	119
	A.2 MÉTODO FT.....	120
	APÊNDICE B	123
	GLCM.....	123
	B.1 FANTOMAS.....	123
	B.2 IMAGENS SHG.....	125

Lista de Figuras

FIGURA 1: IMAGENS DE GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÓNICO (SHG) DO ESTROMA DE UMA CÓRNEA SUÍNA COM (A) GEOMETRIA DE REFLEXÃO E (B) GEOMETRIA DE TRANSMISSÃO. RETIRADO DE ^[16]	23
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DE CORTE TRANSVERSAL DA CÓRNEA HUMANA. RETIRADO E TRADUZIDO DE ^[20]	28
FIGURA 3: DIAGRAMAS DE <i>JABLONSKI</i> MOSTRANDO A DIFERENÇA ENTRE EXCITAÇÃO DE ÚNICO FOTÃO (1PE) E EXCITAÇÃO DE DOIS FOTÕES (2PE).....	35
FIGURA 4: DIAGRAMA DE NÍVEIS DE ENERGIA DA GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÓNICO. DOIS FOTÕES COM ENERGIA IGUAL A E SÃO CONVERTIDOS NUM ÚNICO FOTÃO COM ENERGIA $2E$. DEVE-SE NOTAR QUE OS NÍVEIS DE ENERGIA INTERMEDIÁRIOS CORRESPONDEM A ESTADOS VIRTUAIS. E – ENERGIA; h – CONSTANTE DE PLANCK; ν – FREQUÊNCIA; λ – COMPRIMENTO DE ONDA;.....	36
FIGURA 5: ESQUEMA DA GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÓNICO. d_{eff} É O COEFICIENTE NÃO LINEAR IGUAL A $\frac{1}{2}\chi^{(2)}$	39
FIGURA 6: EXEMPLO DE CENTROSSIMETRIA COM PONTO DE INVERSÃO. ADAPTADO DE ^[51]	41
FIGURA 7: ESQUEMA DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE DE ÚNICO FOTÃO (1PE) VERSUS DOIS FOTÕES (2PE). A VERMELHO ESTÁ REPRESENTADO A LUZ DE EXCITAÇÃO E A VERDE A DE EMISSÃO. ADAPTADO DE ^[63]	43
FIGURA 8: COMPARAÇÃO DAS <i>POINT SPREAD FUNCTIONS</i> DE 1PE E 2PE NA DIREÇÃO AXIAL. U É COORDENADA ÓTICA ADIMENSIONAL AO LONGO DA DIREÇÃO AXIAL. RETIRADO DE ^[64]	44
FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONFIGURAÇÃO INSTRUMENTAL DO MICROSCÓPIO DE VARRIMENTO DE LASER MULTIFOTÃO.....	52
FIGURA 10: SENSIBILIDADE DE DIFERENTES DETETORES E EFICIÊNCIA QUÂNTICA. RETIRADA DE ^[135]	53
FIGURA 11: ESPECTRO DE TRANSMISSÃO DOS FILTROS UTILIZADOS NA AQUISIÇÃO DE IMAGENS SHG COM COMPRIMENTO DE ONDA DE EXCITAÇÃO DE 1000 nm. (A) FILTRO PASSA BANDA 500-550 nm ET525/50M E (B) FILTRO PASSA-BANDA 570-610 nm, ET585/40M.....	53
FIGURA 12: IMAGENS DE REPRESENTATIVAS E RESPECTIVOS HISTOGRAMAS DE VOLUMES DE CORTES DE CÓRNEA MARCADOS, ADQUIRIDOS DA MESMA AMOSTRA E NA MESMA REGIÃO COM COMPRIMENTOS DE ONDA DE EXCITAÇÃO IGUAL 900 nm (ESQUERDA) E 1000 nm (DIREITA) EM DOIS CANAIS COM GAMAS APROPRIADAS À DETECÇÃO DE SINAIS DE GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÓNICO (SHG) E AUTOFLUORESCÊNCIA (AF). OS HISTOGRAMAS INDICAM O NÚMERO DE CONTAGENS POR NÍVEIS DE INTENSIDADE.....	55
FIGURA 13: ESPECTROS DE EMISSÃO DE MULTIFOTÃO NORMALIZADOS DA CAMADA DE CÉLULAS DO TECIDO FRESCO (LINHA PRETA), ESPÉCIME FIXADO EM FORMALINA (LINHA VERMELHA), CORTES HISTOLÓGICOS NÃO CORADOS E CORADOS (LINHAS AZUL E ROSA), OBTIDOS COM UM COMPRIMENTO DE ONDA DE EXCITAÇÃO DE 810NM. (A) EPITÉLIO E (B) ESTROMA. RETIRADO DE ^[139]	56
FIGURA 14: ESPECTRO DE ABSORÇÃO PARA HEMATOXILINA, EOSINA, ALEXA FLUOR 680 CONJUGADO COM OS ANTICORPOS DK ANTI-MS AF680 E MS ANTI-GT ZW800-1. RETIRADO DE ^[140]	57

FIGURA 15: SECÇÕES TRANSVERSAIS DE EXCITAÇÃO DE DOIS FOTÕES DOS ESPECTROS DE NADH (TRIÂNGULOS VERDES), NADPH (TRIÂNGULOS INVERTIDOS AZUIS), DE FAD (QUADRADOS PRETOS) E LIPDH (CÍRCULOS VERMELHOS; EIXO DIREITO). RETIRADO DE ^[41]	57
FIGURA 16: FANTOMA DE TESTE (ESQUERDA), VALORES PRÓPRIOS (CENTRO L_{min} E DIREITA L_{min}) DO FANTOMA DE TESTE. .	61
FIGURA 17: DA ESQUERDA PARA A DIREITA: MAPA DE GRAU DE ISOTROPIA (DOI-ST)), MAPA DE ORIENTAÇÃO PREFERENCIAL (OP) E HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DE OP.....	62
FIGURA 18: FLUXOGRAMA DA ANÁLISE DE FFT. (ESQUERDA) ESPETRO DE FOURIER E AS SECÇÕES RADIAIS. (DIREITA) GRÁFICO DE DA DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS PELAS SECÇÕES.	64
FIGURA 19: HISTOGRAMA POLAR DA DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DO ESPETRO DE FOURIER DE UM FANTOMA DE TESTE, À ESQUERDA COM N=50 E À DIREITA COM N=80.	64
FIGURA 20: OUTRA REPRESENTAÇÃO DO HISTOGRAMA POLAR DA DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS POSITIVAS DO ESPETRO DE FOURIER POR 50 SECÇÕES, DE UM FANTOMA DE TESTE.	65
FIGURA 21: AJUSTE ELÍPTICO AO HISTOGRAMA POLAR DA DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DO ESPETRO DE FOURIER, EM 50 SECÇÕES.	65
FIGURA 22: FANTOMAS GERADOS DE ACORDO COM O 1º FATOR DE DESORGANIZAÇÃO, (A) PRIMEIRO FANTOMA, (B) FANTOMA INTERMÉDIO E (C) ÚLTIMO FANTOMA.	68
FIGURA 23: FANTOMAS GERADOS DE ACORDO COM O 2º FATOR DE DESORGANIZAÇÃO, (A) PRIMEIRO FANTOMA COM UMA LAMELA, (B) FANTOMA INTERMÉDIO COM 10 LAMELAS E (C) ÚLTIMO FANTOMA COM 20 LAMELAS.	69
FIGURA 24: FANTOMAS GERADOS DE ACORDO COM O 3º FATOR DE DESORGANIZAÇÃO, (A) PRIMEIRO FANTOMA, (B) FANTOMA INTERMÉDIO E (C) ÚLTIMO FANTOMA.	70
FIGURA 25: CONFIGURAÇÃO ADAPTADA PARA IRRADIAÇÃO DA CórNEA COM LUZ UVA (A), COM <i>CLOSE-UP</i> DO PROCESSO DE IRRADIAÇÃO DA CórNEA (B).....	71
FIGURA 26: ESPETRO CALIBRADO DE EMISSÃO DA FONTE UV SEM FILTRO (A) E ESPETRO CALIBRADO DE EMISSÃO DA FONTE COM FILTRO (B).	72
FIGURA 27: SUPORTE ELABORADO PARA A AQUISIÇÃO SIMULTÂNEA DE IMAGENS SHG EM TRANSMISSÃO E REFLEXÃO, PARA CórNEAS HUMANAS INTEIRAS.....	72
FIGURA 28: DEPENDÊNCIA DO PARÂMETRO DOI-ST COM O AUMENTO DA DESORGANIZAÇÃO DE FANTOMAS, PARA TRÊS FATORES DIFERENTES DE DESORGANIZAÇÃO: (A) ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLAGÉNIO POR LAMELA, (B) COMPLEXIDADE LAMELAR E (C) VARIABILIDADE INTRA-LAMELAR. PARA CADA FATOR FORAM AVALIADOS 20 FANTOMAS.....	74
FIGURA 29: DEPENDÊNCIA DO PARÂMETRO SD-ST COM O AUMENTO DA DESORGANIZAÇÃO DE FANTOMAS, PARA TRÊS FATORES DE DESORGANIZAÇÃO: (A) ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLAGÉNIO POR LAMELA, (B) COMPLEXIDADE LAMELAR E (C) VARIABILIDADE INTRA-LAMELAR. PARA CADA FATOR FORAM AVALIADOS 20 FANTOMAS.....	74
FIGURA 30: RELAÇÃO LINEAR ENTRE O PARÂMETRO SD-ST E DOI-ST PARA 20 FANTOMAS GERADOS SEGUNDO TRÊS FATORES DIFERENTES DE DESORGANIZAÇÃO.....	75
FIGURA 31: MAPAS DE DOI-ST DOS FANTOMAS REPRESENTATIVOS DO CRITÉRIO DE DESORGANIZAÇÃO COM BASE NA ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS EM CADA LAMELA. AUMENTO DE DESORGANIZAÇÃO DE A PARA C. OS VALORES APRESENTADOS CORRESPONDEM AO VALOR MÉDIO DE DOI-ST AO LONGO DE IMAGEM. A VISUALIZAÇÃO DOS MAPAS DÁ UMA IDEIA DE COMO ESTES SE COMPORTAM COM O AUMENTO DA DESORGANIZAÇÃO.....	76

FIGURA 32: HISTOGRAMAS NORMALIZADOS DA DISTRIBUIÇÃO DA ORIENTAÇÃO DOS FANTOMAS REPRESENTATIVOS DO CRITÉRIO DE DESORGANIZAÇÃO COM BASE NA ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS EM CADA LAMELA. ESTÃO INCLUÍDOS OS VALORES SD-ST CORRESPONDENTES.....	77
FIGURA 33: DEPENDÊNCIA DOS VALORES DE DOI-ST MÉDIOS COM O TAMANHO DE REGIÕES DE INTERESSE (RDI) QUADRADAS DE 62, 152, 242, 332, 422 E 512 PIXELS. VALORES DE DOI-ST DE TRÊS FANTOMAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO PARA TRÊS CRITÉRIO DE DESORGANIZAÇÃO: (A) ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLAGÉNIO POR LAMELA, (B) COMPLEXIDADE LAMELAR E (C) VARIABILIDADE INTRA-LAMELAR.	78
FIGURA 34: DEPENDÊNCIA DOS VALORES DE SD-ST MÉDIOS COM O TAMANHO DE RDI QUADRADAS DE 62, 152, 242, 332, 422 E 512 PIXELS. VALORES DE SD-ST DE TRÊS FANTOMAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO PARA TRÊS CRITÉRIO DE DESORGANIZAÇÃO: (A) ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLAGÉNIO POR LAMELA, (B) COMPLEXIDADE LAMELAR E (C) VARIABILIDADE INTRA-LAMELAR.....	78
FIGURA 35: DEPENDÊNCIA DO PARÂMETRO AR-FT COM O AUMENTO DA DESORGANIZAÇÃO, PARA TRÊS FATORES DIFERENTES DE DESORGANIZAÇÃO DEFINIDOS. PARA CADA FATOR FORAM AVALIADOS 20 FANTOMAS.....	79
FIGURA 36: DEPENDÊNCIA DO PARÂMETRO SD-FT COM O AUMENTO DA DESORGANIZAÇÃO, PARA TRÊS FATORES DIFERENTES DE DESORGANIZAÇÃO DEFINIDOS. PARA CADA FATOR FORAM AVALIADOS 20 FANTOMAS.	79
FIGURA 37: RELAÇÃO LINEAR ENTRE O PARÂMETRO SD-FT E AR-FT PARA 20 FANTOMAS GERADOS SEGUNDO TRÊS FATORES DIFERENTES DE DESORGANIZAÇÃO.....	80
FIGURA 38: AJUSTE DA ELIPSE E RESPECTIVA ORIENTAÇÃO PREFERENCIAL DOS FANTOMAS A, B E C, REPRESENTATIVOS DO CRITÉRIO DE DESORGANIZAÇÃO COM BASE NA ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS EM CADA LAMELA.....	81
FIGURA 39: GRÁFICO DE BARRAS NORMALIZADO COM DESVIO PADRÃO DA VARIÁVEL RHO, DOS FANTOMAS A, B E C, REPRESENTATIVOS DO CRITÉRIO DE DESORGANIZAÇÃO COM BASE NA ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS EM CADA LAMELA.....	82
FIGURA 40: DEPENDÊNCIA DOS VALORES DE AR-FT COM O TAMANHO DE RDI QUADRADAS DE 62, 152, 242, 332, 422 E 512 PIXELS. VALORES DE AR-FT DE TRÊS FANTOMAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO PARA TRÊS CRITÉRIO DE DESORGANIZAÇÃO: (A) ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLAGÉNIO POR LAMELA, (B) COMPLEXIDADE LAMELAR E (C) VARIABILIDADE INTRA-LAMELAR.....	82
FIGURA 41: DEPENDÊNCIA DOS VALORES DE SD-FT COM O TAMANHO DE RDI QUADRADAS DE 62, 152, 242, 332, 422 E 512 PIXELS. VALORES DE SD-FT DE TRÊS FANTOMAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO PARA TRÊS CRITÉRIO DE DESORGANIZAÇÃO: (A) ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLAGÉNIO POR LAMELA, (B) COMPLEXIDADE LAMELAR E (C) VARIABILIDADE INTRA-LAMELAR.....	83
FIGURA 42: IMAGENS SHG UTILIZADAS COMO EXEMPLO PARA DEMONSTRAÇÃO DOS MÉTODOS. A E C SÃO IMAGENS ADQUIRIDAS NA GEOMETRIA DE TRANSMISSÃO E B E D SÃO AS IMAGENS CORRESPONDENTES ADQUIRIDAS NA GEOMETRIA DE REFLEXÃO.	84
FIGURA 43: MAPAS DE DOI-ST DAS IMAGENS EXEMPLO, IMAGENS A E C ADQUIRIDAS EM TRANSMISSÃO E B E D EM REFLEXÃO. OS VALORES APRESENTADOS CORRESPONDEM AO VALOR MÉDIO DE DOI-ST AO LONGO DE IMAGEM. A VISUALIZAÇÃO DOS MAPAS DÁ UMA IDEIA DE COMO ESTES SE COMPORTAM EM IMAGENS ADQUIRIDAS NAS DUAS GEOMETRIAS.	84
FIGURA 44: HISTOGRAMAS DE DISTRIBUIÇÃO DA ORIENTAÇÃO DAS IMAGENS EXEMPLO, CALCULADA PELO MÉTODO ST. ESTÃO INCLUÍDOS OS VALORES SD-ST CORRESPONDENTES.....	84

FIGURA 45: VARIAÇÃO DA MEDIANA \pm ERRO PADRÃO DA MEDIANA (E.P.M.) ENTRE OS VALORES DA ORIENTAÇÃO PREFERENCIAL, DETERMINADOS COM O MÉTODO ST, DE GRUPOS DE IMAGENS SHG ADQUIRIDAS EM TRANSMISSÃO (T) E EM REFLEXÃO (R). (A) CORTES DE CórNEA HUMANA E1 E (B) CORTES DE CórNEA HUMANA E2. REALIZADO O TESTE ESTATÍSTICO WILCOXON, $**p \leq 0.01$	85
FIGURA 46: VARIAÇÃO DA MEDIANA \pm (E.P.M.) ENTRE OS VALORES DE DOI-ST DE GRUPOS DE IMAGENS SHG ADQUIRIDAS EM TRANSMISSÃO (T) E EM REFLEXÃO (R). (A) CORTES DE CórNEA HUMANA E1 E (B) CORTES DE CórNEA HUMANA E2. REALIZADO O TESTE ESTATÍSTICO WILCOXON, $***p \leq 0.001$	86
FIGURA 47: GRÁFICO DE BARRAS COM DESVIO PADRÃO DA VARIÁVEL RHO, DAS IMAGENS SHG A, B, C E D, RESPECTIVAMENTE.....	87
FIGURA 48: VARIAÇÃO DA MEDIANA \pm (E.P.M.) ENTRE OS VALORES DA ORIENTAÇÃO PREFERENCIAL, DETERMINADOS COM O MÉTODO FT, DE GRUPOS DE IMAGENS SHG ADQUIRIDAS EM TRANSMISSÃO (T) E EM REFLEXÃO (R). (A) CORTES DE CórNEA HUMANA E1 E (B) CORTES DE CórNEA HUMANA E2. REALIZADO O TESTE ESTATÍSTICO WILCOXON, $**p \leq 0.01$	87
FIGURA 49: VARIAÇÃO DA MEDIANA \pm (E.P.M.) ENTRE OS VALORES DE AR-FT DE GRUPOS DE IMAGENS SHG ADQUIRIDAS EM TRANSMISSÃO (T) E EM REFLEXÃO (R). (A) CORTES DE CórNEA HUMANA E1 E (B) CORTES DE CórNEA HUMANA E2. REALIZADO O TESTE ESTATÍSTICO WILCOXON, $*p \leq 0.05$ E $***p \leq 0.001$	88
FIGURA 50: IMAGENS SHG DETETADAS EM TRANSMISSÃO (T) E REFLEXÃO (R) DE UM CORTE DE CórNEA HUMANA NÃO PATOLÓGICO MARCADO COM EOSINA E HEMATOXILINA E A REPRESENTAÇÃO DOS DOIS PARÂMETROS DOI-ST E AR-FT, DOS MÉTODOS TENSOR DE ESTRUTURA E TRANSFORMADA DE FOURIER, RESPECTIVAMENTE.	89
FIGURA 51: CORRELAÇÃO EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA (EM PIXELS) DE FANTOMAS REPRESENTATIVOS DO CRITÉRIO DE DESORGANIZAÇÃO COM BASE NA ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLAGÉNIO POR LAMELA, NAS DIREÇÕES HORIZONTAL (0°), DIAGONAL (45°) E VERTICAL (90°).....	124
FIGURA 52: CORRELAÇÃO EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA (EM PIXELS) DE FANTOMAS REPRESENTATIVOS DO CRITÉRIO DE DESORGANIZAÇÃO COM BASE NA COMPLEXIDADE LAMELAR, NAS DIREÇÕES HORIZONTAL (0°), DIAGONAL (45°) E VERTICAL (90°).	124
FIGURA 53: CORRELAÇÃO EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA (EM PIXELS) DE FANTOMAS REPRESENTATIVOS DO CRITÉRIO DE DESORGANIZAÇÃO COM BASE NA VARIABILIDADE INTRA-LAMELAR, NAS DIREÇÕES HORIZONTAL (0°), DIAGONAL (45°) E VERTICAL (90°).	125
FIGURA 54: CORRELAÇÃO EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA (EM PIXELS) DE IMAGENS SHG ADQUIRIDAS EM TRANSMISSÃO E EM REFLEXÃO, NAS DIREÇÕES HORIZONTAL (0°), DIAGONAL (45°) E VERTICAL (90°).....	126

Lista de Tabelas

TABELA 1: REQUISITOS FUNCIONAIS E NÃO FUNCIONAIS NECESSÁRIOS PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO.	25
TABELA 2: VALORES DE AR-FT DOS FANTOMAS A, B E C REPRESENTADOS NA FIGURA 22, REPRESENTATIVOS DO CRITÉRIO DE DESORGANIZAÇÃO COM BASE NA ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS EM CADA LAMELA.	81
TABELA 3: VALORES AR-FT DE QUATRO IMAGENS SHG REPRESENTATIVAS..	86

Lista de Acrónimos

1PE	<i>Excitação de único fóton</i>
2D	<i>Bidimensional</i>
2PE	<i>Excitação de dois fótons</i>
3D	<i>Tridimensional</i>
3PE	<i>Excitação de três fótons</i>
AF	<i>Autofluorescência</i>
AGEs	<i>Advanced glycation end-products</i>
AR-FT	<i>Razão de aspecto do método FT</i>
BiG	<i>LSM Binary GaAsP</i>
CARS	<i>Espectroscopia coerente anti-Stokes Raman</i>
CXL	<i>Crosslinking de colagénio corneano</i>
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DoI-ST	<i>Grau de Isotropia</i>
DTF	<i>Transformada Discreta de Fourier</i>
FAD	<i>Flavina Adenina Dinucleotídeo</i>
FFT	<i>Transformada Rápida de Fourier</i>
Flavinas	<i>Mononucleotídeo flavina (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD)</i>
fs	<i>Femtosegundos</i>
FT	<i>Transformada de Fourier</i>
FWHM	<i>Largura a meia altura</i>
GaAsP	<i>Gallium Arsenide Phosphide</i>
GLCM	<i>Matriz de coocorrência de nível de cinzento</i>
H&E	<i>Hematoxilina e Eosina</i>
LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i>
MPM	<i>Microscopia Multifóton</i>
NA	<i>Abertura numérica</i>
NAD(P)H	<i>NADH e NADPH</i>
NADH	<i>Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo</i>
NADPH	<i>Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato</i>

NDD	<i>Non-descanned detector</i>
NIR	<i>Infravermelho Próximo</i>
OP	<i>Orientação Preferencial</i>
PCC	<i>Pearson Correlation Coefficient</i>
R	<i>Grupos de imagens SHG adquiridas em reflexão</i>
SD-FT	<i>Desvio padrão do método FT</i>
SD-ST	<i>Desvio padrão do método ST</i>
SHG	<i>Geração de Segundo Harmónico</i>
SNR	<i>Razão sinal ruído</i>
SRS	<i>Espectroscopia Raman estimulada</i>
T	<i>Grupos de imagens SHG adquiridas em transmissão</i>
THG	<i>Geração de Terceiro Harmónico</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
UVA	<i>Ultravioleta A</i>

I. Introdução

I.1 Motivação

A diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crónica que, de acordo com a Federação Internacional de Diabetes, a DM afeta uma grande percentagem da população portuguesa (9,1%) e mundial (10,5%) com idades entre 20-79 anos ^[1]. As suas complicações são extensas e diversas, incluindo problemas visuais, que prejudicam a qualidade de vida do paciente e podem levar a mortes prematuras. A maneira mais eficaz e económica de reduzir e até prevenir determinadas complicações de patologias como a DM, consiste no diagnóstico precoce associado ao controlo regular dos fatores de risco ^[1]. Portanto, é essencial ter à disposição métodos eficientes que possibilitem a deteção de indícios de doenças que afetam a organização estrutural do colagénio, e que permitam esclarecer ainda melhor os seus mecanismos.

Uma característica da DM é a acumulação de AGEs (*Advanced glycation end-product*)^[2]. AGEs são modificações de proteínas ou lípidos que se tornam glicados na presença de açúcares^[3]. Acredita-se que estes componentes estejam relacionados com o desenvolvimento e progressão da doença. A acumulação de AGEs dentro do tecido pode ser quantificado, usando microscopia multifotão (MPM) ^[4] com base na autofluorescência do tecido (AF) e nos sinais de geração de segundo harmónico (SHG). Além disso, os AGEs promovem o *crosslinking* ^[5] (reticulação) de proteínas, nomeadamente o *crosslinking* de colagénio, que pode ser avaliado por imagem de SHG^[6]. Deste modo, a MPM é uma abordagem eficiente para a avaliação de complicações de doenças que promovam alterações estruturais do colagénio.

A MPM é uma técnica não invasiva de microscopia muito utilizada na área da imagiologia biológica^[7]. Esta técnica de imagem é baseada na interação não linear da luz com a matéria. Embora a fluorescência proveniente da interação não linear de dois fotões (2PE) seja, por norma, o sinal mais utilizado em aplicações biológicas, o SHG também é utilizado para a

construção de imagens [8,9]. O sinal SHG gera o contraste intrínseco a partir da interação da luz com estruturas não-centrossimétricas. Pelo que, a imagem SHG está bem estabelecida para avaliação da estrutura das fibras de colagénio da córnea [6,10]. Além disso, apresenta vantagens em relação a 2PE, como a redução do dano e degradação, induzidos pela luz, das imagens, por não envolver perda de energia envolvida no processo [11].

Os métodos de análise de imagens SHG são muitas vezes qualitativos, fornecendo informação visual de como as fibras de colagénio estão organizadas [12,13]. Ao implementar técnicas de processamento de imagem, estas podem fornecer um valor mais quantitativo dessa organização. Diferentes abordagens têm sido utilizadas para obter informações quantitativas, porém os resultados das várias métricas não são comparáveis entre estudos. Por isso, é ainda necessária uma métrica padrão que permita recuperar quantitativamente a orientação das fibras de colagénio de imagens SHG detetadas em reflexão. As aplicações clínicas de uma métrica deste tipo, poderão auxiliar no diagnóstico e rastreamento de patologias relacionadas com distúrbios do colagénio da córnea, como a DM.

1.2 Contexto

Este trabalho foi realizado no âmbito de uma linha de investigação já existente do Grupo de Instrumentação do CIBIT (*Coimbra Institute for Biomedical Imaging and Translational Research*) na área da imagiologia da córnea.

A organização estrutural do colagénio é influenciada por diferentes fatores, como por exemplo patologias. Por sua vez, o colagénio possui suscetibilidade não linear bastante elevada devido à sua não centrossimetria, tornando-se uma fonte de SHG. Como resultado, os sinais SHG fornecem uma ferramenta eficaz para a imagem da estrutura do tecido. Por isso é tão importante existir um método quantitativo para retirar essa informação das imagens adquiridas.

Tendo este grupo experiência em imagiologia da córnea e microscopia multifotão, surgiu a oportunidade de realizar um estudo com esta técnica, com o intuito de desenvolver um método métrico para quantificar imagens SHG de forma generalizada. Este trabalho tem

em vista o melhoramento e evolução da análise de imagens SHG de diversos tecidos. Isso poderá futuramente, facilitar a comparação de resultados entre diferentes estudos.

1.3 Objetivos

O objetivo inicial deste trabalho era desenvolver um método de avaliação da organização das fibras de colagénio dentro do estroma, camada mais espessa da córnea. Esta métrica seria desenvolvida por meio do desenvolvimento de um algoritmo a partir de imagens de SHG de córneas humanas, adquiridas em duas geometrias diferentes, em reflexão e em transmissão (*backward e forward*).

A geração de segundo harmónico é um fenómeno coerente não linear, resultante da interação da luz com estruturas moleculares não centrossimétricas, como o colagénio [14,15]. Algumas vantagens na aquisição de SHG, é que pode ser obtido com lasers de Titânio-Safira em qualquer comprimento de onda de 760 a 1200 nm e, as propriedades intrínsecas do tecido biológico podem ser estudadas sem que a amostra sofra danos induzidos pela luz [12]. Devido às características intrínsecas dos sinais SHG, os sinais de reflexão e transmissão detetados produzem imagens consideravelmente diferentes. Como se pode observar na Figura 1, o sinal SHG detetado em modo de reflexão (Figura 1 (a)) é difuso, enquanto no sinal transmitido (Figura 1(b)) é possível visualizar diretamente as fibras de colagénio presentes no estroma corneano.

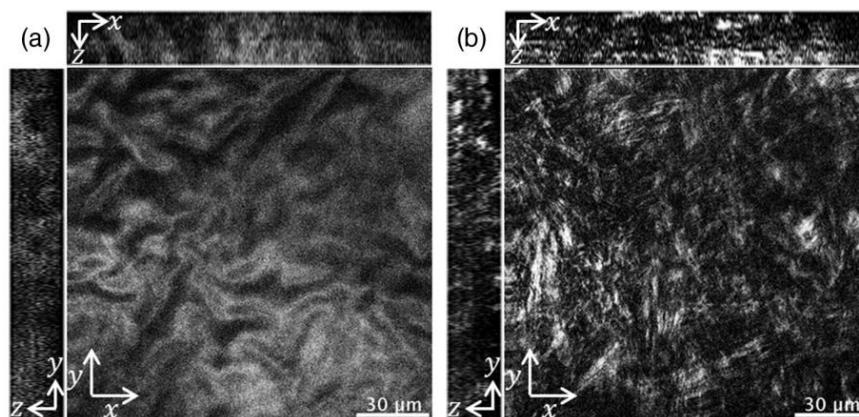


Figura 1: Imagens de geração de segundo harmónico (SHG) do estroma de uma córnea suína com (a) geometria de reflexão e (b) geometria de transmissão. Retirado de [16].

No entanto, as informações sobre a organização do colagénio estão embutidas em ambas. Sendo a aquisição de imagens SHG *in vivo* apenas possível em modo de reflexão, pretendia-se desenvolver um algoritmo capaz de retirar informação sobre a orientação das fibras de colagénio usando apenas essas imagens. As imagens adquiridas em modo de transmissão seriam utilizadas como *ground-truth*. O desempenho do algoritmo iria ser testado em amostras corneanas com diferentes níveis de organização estrutural (isto é, com alterações na orientação e/ou organização das fibras de colagénio), para, futuramente, o algoritmo desenvolvido ter a capacidade de discriminar o nível da organização de amostras com diversas alterações estruturais.

No decorrer da atividade experimental deste projeto, deparámo-nos com diversos problemas técnicos com o sistema de microscopia multifotão da Universidade de Coimbra, que forçaram uma alteração nos objetivos iniciais do projeto. Uma avaria em ambas as fontes de laser do sistema, que persistiu durante grande parte do decorrer do projeto, impediu a aquisição de grandes volumes de imagens SHG de córneas humanas, impossibilitando o desenvolvimento do algoritmo proposto. Face a esta complicação, iniciámos o presente trabalho, a implementação e comparação do desempenho de diferentes métodos quantitativos descritos na literatura: um método quantitativo baseado na Transformada de Fourier e o método Tensor de Estrutura, desenvolvido por Ávila *et. al*^[17]. A avaliação do desempenho de cada método foi efetuada em imagens geradas digitalmente com diferentes níveis de organização, que doravante serão denominados de fantasmas, e em imagens SHG de cortes de córneas humanas.

1.4 Análise de Requisitos

Durante o desenvolvimento deste projeto foi necessário ter alguns requisitos em consideração para atingir os objetivos propostos. Na Tabela 1 são apresentados todos os requisitos deste projeto. Os requisitos funcionais descrevem a finalidade do projeto e os não funcionais descrevem como o projeto deve ser desenvolvido. Portanto, para este projeto tem-se apenas um requisito funcional, que vai de encontro ao objetivo do projeto, a implementação de dois métodos quantitativos, ao analisar imagens digitalmente geradas

e imagens SHG das fibras de colagénio presentes no estroma corneano, e posterior comparação.

Como requisitos não funcionais teve-se de reunir as condições adequadas para a aquisição simultânea de imagens em duas configurações diferentes, transmissão e reflexão. O sistema deve ser otimizado com vista os seguintes requisitos: (i) filtros na gama espectral adequada para detetar SHG e bloquear o sinal de fluorescência; (ii) comprimento de onda de excitação desejado estável durante todo o processo de aquisição; (iii) campo de visão igual para a aquisição das imagens nas duas configurações; (iv) resolução axial e lateral das imagens idêntica nas duas configurações; (v) ponto focal coincidente da aquisição dos sinais nas duas configurações; (vi) razão sinal ruído (SNR) independente da profundidade, aumentando progressivamente a intensidade do laser. Por fim, é essencial desenvolver um suporte para a amostra que permita a aquisição de imagens em ambas as configurações e, um *software* capaz de ler as imagens adquiridas e recolher informação sobre a orientação das fibras de colagénio.

Tabela 1: Requisitos funcionais e não funcionais necessários para o desenvolvimento do projeto.

Funcionais	Não funcionais
Implementação de métricas quantitativas, já existentes na literatura, da orientação das fibras de colagénio do estroma corneano. Validação e comparação das métricas a partir da análise de imagens digitalmente geradas e imagens SHG.	Filtros espectrais para SHG, tipo: Passa banda; gama espectral: dos 700 aos 1000 nm; Transmitância mínima na banda passante: 45 %; transmitância máxima na banda de rejeição: 85 %
	Comprimento de onda de excitação desejado Imagens SHG transmissão e reflexão com igual campo de visão Plano focal coincidente para imagens SHG transmissão e reflexão Resolução lateral e axial idêntica para ambas as direções de observação SNR independente da profundidade na amostra Suporte para córneas humanas excisadas que permita a transmissão de luz <i>Software</i> que leia as imagens obtidas, compare as imagens transmissão e reflexão e retire informação da orientação das fibras

1.5 Estrutura do Documento

Esta dissertação inicia com uma contextualização teórica sobre o tema estudado, constituída pelos capítulos 2, 3 e 4. Nestes capítulos são apresentados conceitos fundamentais e o estado da arte relativo à análise quantitativa de imagens SHG.

No capítulo 5 é descrito detalhadamente o equipamento de aquisição de imagem utilizado, bem como a sua otimização para o desenvolvimento deste projeto. No fim é feita uma descrição dos métodos utilizados na análise de imagem.

No capítulo 6 são apresentados os resultados obtidos com as diferentes metodologias aplicadas, tanto às imagens simuladas como às imagens adquiridas de córneas humanas.

Posteriormente, no capítulo 7, são discutidos de forma pormenorizada e objetiva todos os resultados dos estudos realizados.

Por fim, as conclusões são apresentadas no capítulo 8, onde são revistos os aspetos discutidos no capítulo anterior. Deixam-se sugestões para trabalhos futuros.

Em Apêndice, é possível consultar os códigos utilizados neste projeto, bem como resultados preliminares de um dos trabalhos propostos para o futuro.

2. A Córnea

A córnea é um tecido transparente e avascular situado na parte externa anterior do olho, contíguo com a esclera. É responsável pela refração e transmissão da luz que entra no olho^[18-20]. O seu poder de refração é de 40 a 44 dioptrias (cerca de dois terços do poder de refração total do olho) ^[18,19,21]. A sua transparência, para que é condição necessária a organização regular do tecido, é obrigatória para a transmissão eficaz da luz para a retina^[18,19,22]. Estruturalmente, tem aproximadamente 0,5 *mm* de espessura no centro, aumentando esta gradualmente em direção à periferia, onde pode chegar a 0,7 *mm* ^[18,19]. A curvatura da superfície não é constante, sendo maior no centro e menor na periferia, portanto é descrita como esférica^[18]. Histologicamente, é composta por cinco camadas (). Estas são, da anterior para posterior: o epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e o endotélio.

A superfície anterior da córnea está envolvida pelo filme lacrimal e, posteriormente, pelo humor aquoso. O filme lacrimal tem como principal função proteger a córnea da desidratação^[18,19]. Além da sua função como lubrificante, é também uma fonte de fatores reguladores necessários para a manutenção e regeneração epitelial ^[19]. Assim sendo, a córnea também desempenha o papel de sistema de defesa do olho.

Neste capítulo, é discutida a anatomia da córnea, e em mais detalhe a sua organização estrutural.

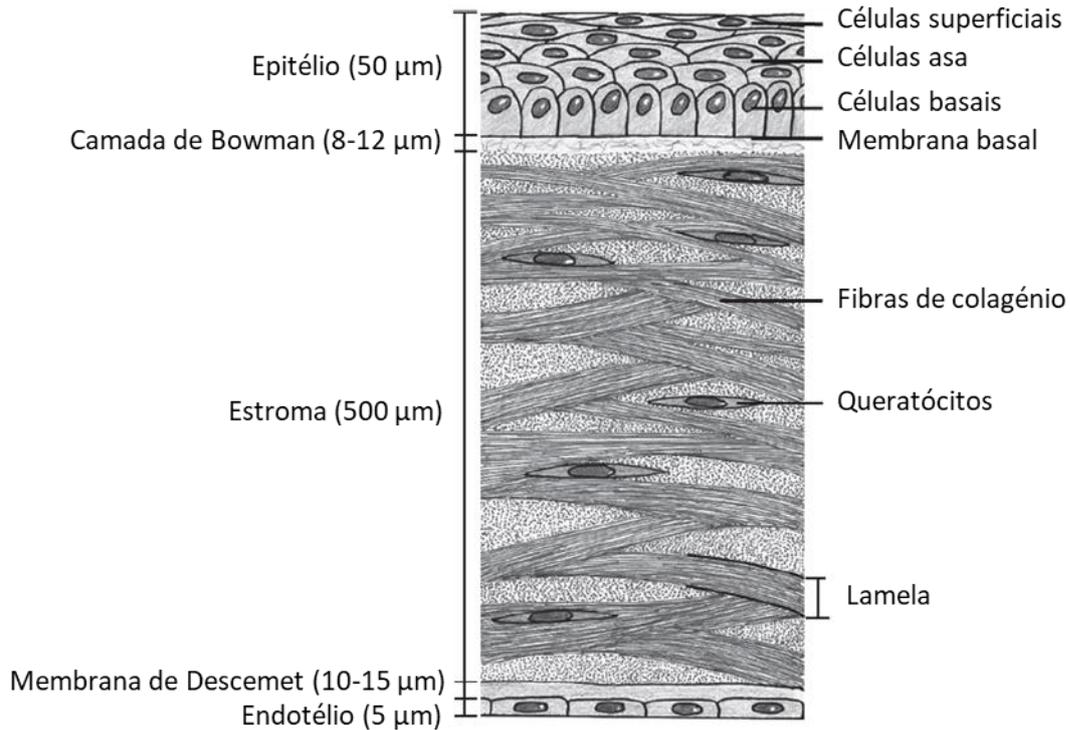


Figura 2: Representação de corte transversal da córnea humana. Retirado e traduzido de [20].

2.1 Epitélio

O epitélio é a camada mais externa da córnea e contribui para o sistema de defesa da superfície ocular. A sua espessura é aproximadamente de $50\ \mu\text{m}$ e representa cerca de 10% da espessura total da córnea em humanos [18,19]. As células epiteliais têm diferentes níveis de diferenciação e, de acordo com a progressão da sua diferenciação, podem ser classificadas como células superficiais, células basais e células em asa. Isto é possível porque as células basais têm atividade mitótica e diferenciam-se progressivamente em células em asa e superficiais [19,23]. As células superficiais constituem as camadas superficiais do epitélio e, em conjunto com o filme lacrimal têm a função importante de manter a superfície da córnea relativamente lisa e desta forma minimizar a dispersão da luz. O arranjo regular das células superficiais e o preenchimento das pequenas irregularidades entre elas pelo filme lacrimal, produz uma dispersão insignificante [19]. As camadas médias são compostas por células em asa, que têm superfícies anteriores convexas e superfícies posteriores côncavas que se ajustam às células basais [18,19]. O

epitélio está conectado posteriormente à membrana basal, através das células basais^[19,21]. Esta camada contribui para o sistema de defesa da superfície ocular e, a manutenção da superfície da córnea depende da substituição das células de superfície^[19,21].

2.2 Camada de Bowman

A camada de Bowman reside imediatamente antes do estroma. A transição para o estroma ocorre gradualmente por meio do aumento da organização das fibras de colagénio. Por esta razão é por vezes considerada como uma fração condensada acelular mais anterior do estroma^[24]. Tem aproximadamente 8 a 14 μm de espessura^[19] e é constituída por fibras de colagénio, principalmente colagénio tipo I e tipo II, dispostas aleatoriamente. Estas fibras têm um diâmetro entre 20 e 30 nm , que é menor que o diâmetro das fibras de colagénio existentes no estroma^[18,19,24]. Pode fornecer rigidez biomecânica e forma à córnea^[19]. A camada de Bowman não se regenera após uma lesão e pode formar cicatrizes^[18,24]. Atualmente, sabe-se que um grande número de mamíferos não possuem camada de Bowman, ainda assim apresentam uma estrutura epitelial bem organizada. A função fisiológica desta camada é ainda desconhecida^[18].

2.3 Estroma

O estroma é a camada intermédia da córnea, tem aproximadamente 500 μm de espessura, o que representa aproximadamente 90% da espessura total da córnea^[18,19]. As suas propriedades estruturais contribuem para a resistência física, estabilidade de forma e transparência da córnea^[18]. É constituído por colagénio, queratócitos e outros componentes da matriz extracelular^[18,19,23]. O colagénio é o maior constituinte da córnea. Está organizado em fibras, que por sua vez são conjuntos de fibrilas com diâmetros uniformes entre 22.5 e 35 nm ^[25], principalmente de colagénio tipo I e em menor quantidade de tipo III, V e VI^[19]. As fibras de colagénio estão dispostas paralelamente entre

si e em relação à superfície, formando camadas finas planas chamadas de lamelas ^[19,21]. No olho humano existem cerca de 200 a 250 lamelas distribuídas por todo o estroma ^[26]. Uma característica particular encontrada do estroma, é a variação da organização lamelar com a profundidade no tecido. As camadas mais profundas são mais organizadas, onde as lamelas são mais espessas e menos entrelaçadas do que nas camadas superficiais ^[19,26].

Os queratócitos (fibroblastos da córnea) são células achatadas que residem entre as lamelas e ocasionalmente dentro delas. São responsáveis pela síntese de colagénio e outros componentes da matriz extracelular^[19] e portanto, têm um papel importante na manutenção do estroma e na cicatrização de feridas^[18,19].

A organização uniforme e a regeneração contínua das fibras de colagénio é essencial para a transparência da córnea ^[18]. O arranjo de fibras bem organizado reduz a dispersão da luz e contribui para a transparência e resistência mecânica da córnea ^[24]. A manutenção do espaçamento regular entre os componentes do estroma é feita por moléculas carregadas negativamente e hidrofílicas, incluídas na matriz extracelular ^[19]. Estas moléculas ligam-se à água, mantendo o teor em água necessário para garantir o arranjo organizado^[18,19,23]. É necessário que tanto o espaçamento entre as fibras de colagénio e as lamelas ^[27] como o diâmetro médio das fibras seja menor que a metade do comprimento de onda da luz visível, para garantir a transparência da córnea^[25]. A disposição regular resulta em interferência destrutiva da luz dispersa, reduzindo a dispersão e aumentando a transmissão^[18,19,23].

Apesar de a esclera ser também na maioria constituída por fibras de colagénio, esta não é transparente devido à pouca organização das mesmas. Aliás, na periferia, onde o estroma é contíguo à esclera, as lamelas de colagénio estão mais desorganizadas e o tecido perde transparência ^[18,19].

2.4 Membrana de Descemet

A membrana de Descemet tem aproximadamente 8 a 10 μm de espessura^[21] e é essencialmente composta por colagénio tipo IV e VII. Embora não existam fibras elásticas na membrana de Descemet, as fibras de colagénio apresentam uma organização de tal

forma que esta camada apresenta propriedades elásticas ^[19]. Estruturalmente pode ser dividida em duas subcamadas. A subcamada situada imediatamente a seguir ao estroma é formada durante o desenvolvimento embrionário, e pode desempenhar um papel de aderência entre esta camada e o estroma^[19]. Enquanto a segunda subcamada é produzida continuamente devido à constante deposição do colagénio sintetizado pelas células endoteliais, aumentando gradualmente a sua espessura desde a nascença até à fase adulta em humanos. Por este motivo, também é considerada como a membrana basal do endotélio ^[18,21].

2.5 Endotélio

A camada mais interna da córnea é composta por uma única camada de células que têm uma espessura média de 5 μm . As células endoteliais apresentam uma estrutura poliédrica, com organização altamente regular descrita como mosaico endotelial.

Uma das funções mais importantes do endotélio é manter um estado relativo de desidratação/hidratação da córnea por meio de um mecanismo de transporte ativo ^[18,19]. As células endoteliais não se regeneram. Portanto, no caso de perda de células endoteliais, que ocorre durante o envelhecimento^[19], as restantes células movem-se e expandem-se para preencher os espaços vazios entre elas ^[18,19]. Tendo em conta a dimensão da superfície posterior da córnea, é necessária uma densidade mínima de células endoteliais (de 400 a 700 *células/mm²*) para cobrir a superfície e manter a função endotelial adequada^[19].

3. Princípios da Microscopia Multifotão

A MPM ou microscopia não linear é uma classe ampla de abordagens de aquisição de imagem^[8,28]. Inclui microscopia de excitação de dois fótons (2PE) e de excitação de três fótons (3PE), microscopia de geração de segundo harmónico (SHG) e de geração de terceiro harmónico (THG), bem como espectroscopia coerente anti-Stokes Raman (CARS) e espectroscopia Raman estimulada (SRS). Todas estas abordagens oferecem vantagens semelhantes em termos de seccionamento ótico inerente^[28].

Ao longo dos últimos anos, a relevância de imagem de dois fótons nos campos biológico e médico tem vindo a aumentar^[8]. A base desta modalidade de imagem é a interação quase simultânea e não linear de dois fótons com uma determinada molécula. Quando essa interação ocorre, os fótons podem ser absorvidos, levando à excitação molecular com posterior relaxamento via emissão de fluorescência, ou pode ser induzida uma polarização de segunda ordem no campo elétrico levando a SHG^[8,9].

A imagem SHG requer altas densidades de fótons, assim como a 2PE, portanto, os requisitos de laser para ambas as imagens são semelhantes. A diferença está em como o sinal é gerado. Na fluorescência, dois fótons são absorvidos e, em seguida, outro é reemitido. Por outro lado, para SHG os fótons não são absorvidos, mas interagem com a amostra via espalhamento (*scattering*). Os fótons incidentes são espalhados (*scattered*) simultaneamente e convertem a sua energia num único fóton com o dobro da energia, ou metade do comprimento de onda dos fótons incidentes^[28]. Estes processos partilham algumas características, mas ao contrário do 2PE, não há perda de energia envolvida no processo SHG, o que reduz a degradação da amostra durante a aquisição das imagens^[11,28].

3.1 Imagem de fluorescência excitada com dois fótons (2PE)

A excitação multifotão é uma técnica de imagem de seccionamento ótico em que a excitação de um fluoróforo é confinada ao plano focal ^[9]. Tal ocorre porque a 2PE é proporcional ao quadrado da densidade dos fótons, fornecendo o efeito de seccionamento ótico^[9,29]. Em amostras mais espessas, também são absorvidos fótons noutros planos, mas sem a geração de fluorescência. A incidência desses eventos diminui fortemente acima e abaixo do plano focal, não havendo necessidade de introduzir um *pinhole* de bloqueio, como na microscopia de fluorescência confocal ^[29]. Assim, a excitação com mais que um fóton evita problemas associados às perdas de sinal devido ao uso de *pinholes*^[9,30] e, todo o sinal gerado pela amostra pode contribuir para a aquisição da imagem.

A fluorescência ocorre quando uma molécula emite radiação ao transitar de um estado excitado para o estado fundamental após excitação (Figura 3). Pode ocorrer quando um único fóton, cuja energia seja maior que a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado, é absorvido por uma molécula fluorescente, fluoróforo ^[28,31]. A absorção de um único fóton de excitação (1PE) leva a molécula a transitar para um estado excitado, e ao voltar ao seu estado fundamental emite fótons com um comprimento de onda menor que o comprimento de onda de excitação^[28]. A excitação também é possível através da absorção quase simultânea de dois fótons com metade da energia, ou seja, de comprimento de onda maior, na faixa espectral do infravermelho ^[31] (Figura 3). Tal como na 1PE, este processo só ocorre se a energia dos dois fótons, no total, for maior do que a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado^[32]. Quando um único laser é usado, os dois fótons têm comprimento de onda idêntico e a técnica é chamada de microscopia de fluorescência de 2PE ^[31]. Para várias moléculas os espectros de absorção de luz de 2PE são semelhantes aos espectros de absorção de 1PE, mas com o dobro do comprimento de onda^[33].

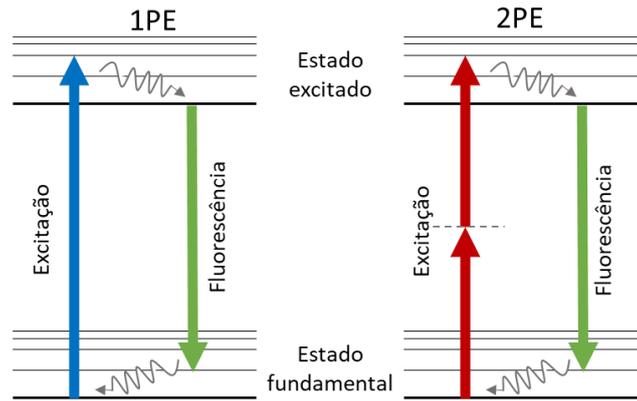


Figura 3: Diagramas de *Jablonski* mostrando a diferença entre excitação de único fóton (1PE) e excitação de dois fótons (2PE).

3.1.1 Fontes de contraste endógenas da córnea

A morfologia da córnea pode ser estudada de forma não invasiva e sem marcação usando imagem de dois fótons. O colagénio é a proteína intrínseca mais comum do corpo humano, incluindo a córnea^[18,34]. Moléculas de colagénio individuais podem formar ligações cruzadas covalentes umas com as outras para formar estruturas quaternárias – fibrilas, que se podem juntar em fibras^[34,35]. Como mencionado anteriormente, no estroma da córnea, as fibras de colagénio são ainda organizadas em lamelas. O colagénio apresenta ainda fluorescência intrínseca que pode ser usada como fonte endógena de contraste para avaliar a camada de Bowman, o estroma e a membrana de Descemet. Para 1PE, tem um máximo de excitação em torno de 340 nm ^[36,37]. No entanto, com excitação não linear pode ser excitado numa faixa ampla de comprimentos de onda, entre 500 e 1700 nm ^[38]. O máximo de emissão espectral do colagénio depende do comprimento de onda de excitação^[39].

Para além da capacidade que o colagénio tem em gerar AF e fornecer informações relevantes sobre a córnea, tem também o potencial de gerar sinal SHG. Usando imagens SHG, a orientação e o grau geral de organização do estroma da córnea podem ser avaliados. Esta propriedade da imagem SHG está intrinsecamente relacionada com a dependência da eficiência SHG com a polarização da luz e a orientação da amostra^[40].

Apesar de o colagénio ser uma fonte de sinais AF e SHG, que permitem avaliar a morfologia

e estrutura do estroma, existem outras fontes endógenas de contraste que para além da morfologia também possibilitam avaliar o metabolismo da córnea de forma não invasiva, usando 2PE. As coenzimas auto fluorescentes NAD(P)H (nicotinamida adenina dinucleotídeo e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), bem como flavinas (mononucleotídeo flavina e flavina adenina dinucleotídeo), estão envolvidos em várias etapas do metabolismo celular. Através dos espectros de excitação e emissão do fluoróforo, pode-se determinar os comprimentos de onda ideais para excitação seletiva e deteção de cada fluoróforo endógeno^[41].

3.2 Geração de Segundo Harmónico (SHG)

O desenvolvimento de lasers de rubi, tornou possível a produção de feixes de luz monocromáticos e, com isso a possibilidade de explorar a produção de harmónicos óticos^[42]. Assim Franken *et al.* ^[42] demonstraram pela primeira vez em 1961 o sinal SHG em materiais transparentes, utilizando a não linearidade na suscetibilidade elétrica de cristais. O efeito do SHG foi observado como produção de luz ultravioleta (UV)^[42], após a interação simultânea de dois fótons com um cristal quartzo cristalino. O SHG é um processo coerente não linear, em que dois fótons do infravermelho próximo (NIR) são dispersos e convertem a sua energia num único fóton com o dobro da energia (ou metade do comprimento de onda) dos fótons incidentes, conforme mostrado na Figura 4 ^[43,44].

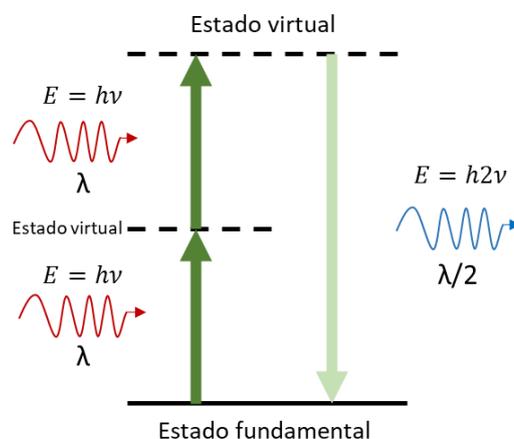


Figura 4: Diagrama de níveis de energia da geração de segundo harmónico. Dois fótons com energia igual a E são convertidos num único fóton com energia $2E$. Deve-se notar que os níveis de energia intermediários

correspondem a estados virtuais. E – energia; h – constante de Planck; ν – frequência; λ – comprimento de onda;

Para entender a origem do sinal SHG é necessário observar a resposta ótica do sistema quando lhe é aplicado um campo elétrico \vec{E} . A resposta é chamada de momento de dipolo por unidade de volume, ou polarização \vec{P} [45-47]. Quando este processo é linear, a polarização induzida depende linearmente da intensidade do campo elétrico, e a relação pode ser descrita como

$$P = \varepsilon_0 \chi^{(1)} E \quad (3.1)$$

onde ε_0 é a permissividade no vácuo e $\chi^{(1)}$ é a suscetibilidade linear. É possível explicar as propriedades óticas lineares como um oscilador harmónico clássico. Fazendo a analogia entre a massa suspensa numa mola e o átomo envolvido pela nuvem eletrónica, a força aplicada a um oscilador harmónico para esticar a mola será equivalente ao campo elétrico aplicado, formando uma nuvem de eletrões deslocada [47]. Em ótica não linear, a resposta ótica muitas vezes pode ser descrita generalizando a Eq. (3.1) expressando a polarização P como uma série de potências da intensidade do campo E , como

$$P = \varepsilon_0 (\chi^{(1)} E + \chi^{(2)} E^2 + \chi^{(3)} E^3 + \dots). \quad (3.2)$$

$\chi^{(1)}$ representa a suscetibilidade linear e $\chi^{(2)}$ e $\chi^{(3)}$ as suscetibilidades não lineares de segunda e terceira ordem, respetivamente. A polarização de segunda ordem do campo elétrico é o termo não linear de primeira ordem que dá origem ao sinal SHG [47].

3.2.1 Equação de onda para SHG

Para determinar a equação que descreve a propagação do sinal SHG através de um material, é necessário recorrer às equações de Maxwell:

$$\nabla \cdot D = \rho \quad (3.3)$$

$$\nabla \cdot B = 0 \quad (3.4)$$

$$\nabla \times E = -\frac{\partial B}{\partial t} \quad (3.5)$$

$$\nabla \times H = -\frac{\partial D}{\partial t} + J \quad (3.6)$$

onde D é a densidade do fluxo elétrico, B é a densidade do fluxo magnético e H é o campo magnético. ρ e J são a carga e a corrente livres, respetivamente. Assumindo um meio sem cargas ($\rho = 0$) e correntes livres ($J = 0$) e não magnético, onde $B = \mu_0 H$ é a relação entre a densidade do fluxo magnético e o campo magnético, com μ_0 é a permeabilidade magnética no vácuo, a equação de onda em ótica não linear pode ser descrita como:

$$\nabla \times (\nabla \times E) = -\mu_0 \frac{\partial^2 D}{\partial t^2} = 0. \quad (3.7)$$

Com a velocidade da luz no vácuo igual a $c = \frac{1}{\sqrt{\mu_0 \epsilon_0}}$ e a relação da densidade do fluxo elétrico com os campos, $D = \epsilon_0 E + P$, tem-se:

$$\nabla^2 E - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 P}{\partial t^2} \quad (3.8)$$

Para simplificação, aplicou-se a identidade de cálculo vetorial, $\nabla^2 E = \nabla(\nabla \cdot E) - \nabla \times (\nabla \times E)$, em que $\nabla \cdot E = 0$. Separando P em termos lineares, $P^{(1)}$, e não lineares, $P^{(2)}$, a equação (3.10) fica

$$\nabla^2 E - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \left(\frac{\partial^2 P^{(1)}}{\partial t^2} + \frac{\partial^2 P^{(2)}}{\partial t^2} \right). \quad (3.9)$$

Considerando-se o caso de um material isotrópico, que possui as mesmas propriedades físicas independentemente da direção de propagação, pode-se expressar a relação entre $D^{(1)}$ e E como:

$$D^{(1)} = \epsilon_0 \epsilon_r E + P^{(1)} \quad (3.10)$$

em que ϵ_r é a permeabilidade relativa, que toma o valor de n^2 , sendo n o índice de refração do meio. Assim, a equação (3.9) torna-se

$$\nabla^2 E - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2 P^{(2)}}{\partial t^2} \quad (3.11)$$

Esta é a equação de onda não linear^[47].

Para a geração de segundo harmónico, o campo elétrico no espaço e no tempo pode ser

considerado como:

$$E_2(z, t) = A_2 e^{-i(k_2 z - 2\omega t)}. \quad (3.12)$$

onde A_2 é a amplitude do campo elétrico e é constante, z é a direção de propagação, k_2 é a componente em z do vetor de onda^[47]. O fator 2 representa a onda com velocidade angular de 2ω (Figura 5).

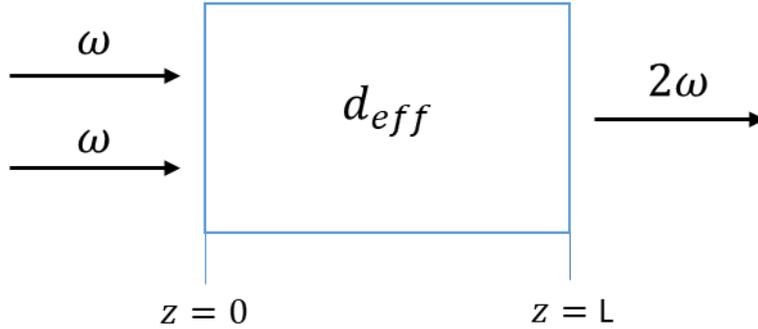


Figura 5: Esquema da Geração de Segundo Harmônico. d_{eff} é o coeficiente não linear igual a $\frac{1}{2}\chi^{(2)}$.

O termo de origem não linear para SHG pode ser escrita como

$$P_2(z, t) = P^{(2)} e^{-i2\omega t}. \quad (3.13)$$

onde $P^{(2)}$ é igual a

$$P^{(2)} = \varepsilon_0 \chi^{(2)} E^2 = 2 \varepsilon_0 d_{eff} E^2 = 2 \varepsilon_0 d_{eff} A_2^2 e^{-i2k_1 z} \quad (3.14)$$

d_{eff} é o coeficiente não linear igual a $\frac{1}{2}\chi^{(2)}$. Aplicando as equações (3.12) e (3.13) à equação de onda não linear e simplificando, obtém-se

$$\left[\frac{\partial^2 A_2}{\partial z^2} + 2ik_2 \frac{\partial A_2}{\partial z} - k_2^2 A_2 + \frac{n_2^2 (2\omega)^2 A_2}{c^2} \right] e^{-i(k_2 z - 2\omega t)} = \frac{-2(2\omega)^2}{c^2} A_1^2 e^{-i(2k_1 z - 2\omega t)}. \quad (3.15)$$

O terceiro e quarto termo cancelam-se e como geralmente é permitido desprezar o primeiro termo do lado esquerdo desta equação, através da aproximação de variação lenta de amplitude:

$$\left| \frac{\partial^2 A_2}{\partial z^2} \right| \ll \left| k_2 \frac{\partial A_2}{\partial z} \right| \quad (3.16)$$

a equação pode ser simplificada para:

$$\frac{\partial A_2}{\partial z} = \frac{id_{eff}(2\omega)^2}{k_2 c^2} A_1^2 e^{-iz(2k_1 - k_2)}. \quad (3.17)$$

3.2.2 Condição de correspondência de fase

Da equação (3.17) temos a quantidade

$$\Delta k = 2k_1 - k_2 \quad (3.18)$$

que é conhecida como a correspondência de fase ou de momento^[47,48]. Observa-se que, para o caso especial,

$$\Delta k = 0 \quad (3.19)$$

a amplitude A_2 da onda resultante aumenta linearmente com z e, conseqüentemente, a sua intensidade aumenta quadraticamente com z , atingindo o seu máximo. Esta condição é conhecida como condição de correspondência de fase perfeita e, implica que os índices dos meios sejam iguais, $n_2 = n_1$. Quando esta condição é satisfeita, a onda gerada mantém uma relação de fase fixa em relação à polarização não linear e é capaz de extrair energia de forma mais eficiente das ondas incidentes. Do ponto de vista microscópico, os dipolos atômicos individuais, que constituem o sistema material, ficam em fase para que o campo emitido por cada dipolo seja adicionado coerentemente na direção de transmissão. A potência total irradiada pelo conjunto de dipolos atômicos aumenta como o quadrado do número de átomos que interagem^[47].

A correspondência de fase perfeita é um caso especial e na maioria dos materiais, incluindo tecidos biológicas, o índice de refração varia para diferentes comprimentos de onda^[49]. Nestes casos, chama-se de condição de correspondência de fase relaxada. Portanto, quando a condição 3.20 não é satisfeita, a intensidade da radiação emitida é menor do que quando é satisfeita. A amplitude do campo resultante é dada integrando a equação (3.17) de $z=0$ a $z=L$,

$$A_2(L) = \frac{id_{eff}(2\omega)^2}{k_2 c^2} A_1^2 \int_0^L e^{-i\Delta k z} dz = \frac{id_{eff}(2\omega)^2}{k_2 c^2} A_1^2 \left(\frac{e^{-i\Delta k L} - 1}{i\Delta k} \right). \quad (3.20)$$

A intensidade da onda de saída é dada pela magnitude do vetor de *Poynting* médio no tempo,

$$I = 2n\varepsilon_0c|A|^2 \quad (3.21)$$

assim, a intensidade da onda SHG, pode ser expressa como

$$I_2 = 2n_2\varepsilon_0c \left| \frac{id_{eff}(2\omega)^2}{k_2c^2} A_1^2 \left(\frac{e^{-i\Delta kL} - 1}{i2\Delta k} \right) \right|^2 = \frac{2n_2\varepsilon_0cd_{eff}^2(2\omega)^4 A_1^4}{k_2^2c^2} L^2 \text{sinc}^2 \left(\frac{\Delta kL}{2} \right) \quad (3.22)$$

Se $L = L_{coh} = \frac{2\pi}{\Delta k}$ ocorre o caso de correspondência de *quasi*-fase. Em que L_{coh} indica o comprimento máximo da intensidade SHG para ocorrer interferência construtiva. Quando a amostra tem um arranjo periódico igual a L_{coh} , o sinal SHG é construtivo ao longo da direção de propagação^[50].

3.2.3 Não centrossimetria

Como já mencionado, a estrutura não-centrossimétrica do colagénio é essencial para gerar sinal SHG. Centrossimetria refere-se a uma estrutura com um ponto de inversão, tal como mostrado na Figura 6. Assim, não-centrossimetria é definida como não tendo ponto de inversão.

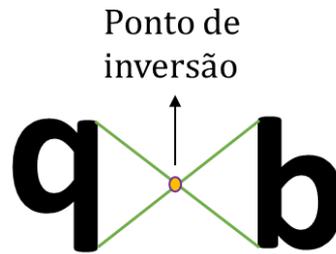


Figura 6: Exemplo de centrossimetria com ponto de inversão. Adaptado de^[51].

Para um material não-centrossimétrico, cada elemento da suscetibilidade não linear de segunda ordem, $\chi^{(2)}$, será nulo e não é gerado sinal SHG. Isto pode ser explicado alterando o sinal do campo elétrico aplicado para a polarização de segunda ordem,

$$P^{(2)} = \varepsilon_0\chi^{(2)}E^2 = \varepsilon_0\chi^{(2)}(-E^2) = -P^{(2)} \quad (3.23)$$

então para que esta equação seja verdadeira, ou seja, para que a polarização induzida seja semelhante, a suscetibilidade não linear de segunda ordem terá de ser nula, $\chi^{(2)} = 0$ ^[52].

SHG é um processo coerente, ou seja, a onda de segundo harmónico propaga-se na direcção de transmissão para corresponder à direcção de propagação da luz de excitação. Somente nesta situação, as ondas permanecerão em fase [40,53,54]. No entanto, em certos tecidos biológicos, os sinais SHG detetados na direcção de reflexão também podem ser detetados. A origem dos sinais detetados na direcção de reflexão tem sido associada à dispersão de sinais SHG na direcção de transmissão[40]. Também foi demonstrado que a dispersão e aleatoriedade inerente de tecidos biológicos resulta em correspondência de fase imperfeita (relaxada), o que leva à geração de componentes para frente e para trás de sinais de segundo harmónico[55,56]. A direcção do sinal SHG depende também do diâmetro e densidade de empacotamento das fibrilas de colagénio. Uma diminuição no diâmetro da fibrila leva a uma mudança do ângulo de emissão de SHG da direcção de transmissão para a direcção de reflexão [57].

3.3 Vantagens da Microscopia Multifotão

Na imagem de fluorescência, a excitação multifotão tem várias vantagens sobre 1PE. Devido aos comprimentos de onda de excitação na faixa NIR, utilizados na imagem multifotão, a profundidade de penetração é maior. Num comprimento de onda de excitação UV ou visível, os coeficientes de absorção e dispersão são elevados. Portanto, a densidade de excitação diminui rapidamente com o aumento da profundidade no tecido. No comprimento de onda NIR a absorção e a dispersão da luz são reduzidas. Sendo o coeficiente de dispersão menor do que no UV, é possível excitar camadas mais profundas do tecido[58-60]. Além disso, como a MPM tem a capacidade inerente de seccionamento ótico, o processo 1PE excita a fluorescência num cone duplo completo através da amostra, enquanto o processo de multifotão excita apenas um pequeno volume ao redor do foco[60] (Figura 7). Portanto, a excitação ocorre apenas dentro do volume focal limitado onde a densidade de fótons é maior, proporcionando assim o seccionamento ótico tridimensional[29,61]. O seccionamento ótico vem do facto de em multifotão existir uma dependência quadrática com a intensidade de excitação. Para 2PE, a distribuição da luz no ponto focal de uma objetiva, com abertura numérica de $NA = n \sin \alpha$, é

$$I(u, v) = \left| 2 \int_0^1 J_0(v\rho) e^{-i\frac{1}{2}u\rho^2} d\rho \right|^2 \quad (3.24)$$

onde J_0 é a função de Bessel de 0ª ordem, ρ é a coordenada radial no plano da pupila, $u = 4k \sin^2 \frac{\alpha}{2} z$ e $v = k \sin \alpha r$ são as coordenadas axiais e radiais adimensionais, respetivamente, normalizadas para o número de onda $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ [29]. A resposta do sistema a uma fonte pontual (*Point Spread Function*), que representa a geometria do volume de excitação, para 1PE tem um perfil igual a $I(u, v)$, enquanto a PSF de 2PE é uma função quadrática do perfil de excitação, $I^2(u/2, v/2)$. Pela Figura 8, observa-se que a resposta do sistema a 2PE tem uma largura a meia altura superior à observada para 1PE, devido ao comprimento de onda mais longo utilizado. Contudo, a PSF de 2PE é confinada axialmente portanto, a excitação ocorre apenas dentro do volume focal limitado onde a densidade de fótons é maior, dando origem ao seccionamento ótico. A resposta axial para 1PE apresenta algumas irregularidades laterais de intensidade, que darão origem a excitação fora do plano focal [29,62]. O dano e degradação induzidas pela luz são confinados ao volume focal e, portanto, reduzidos quando ocorre excitação de dois fótons [29,59,60].

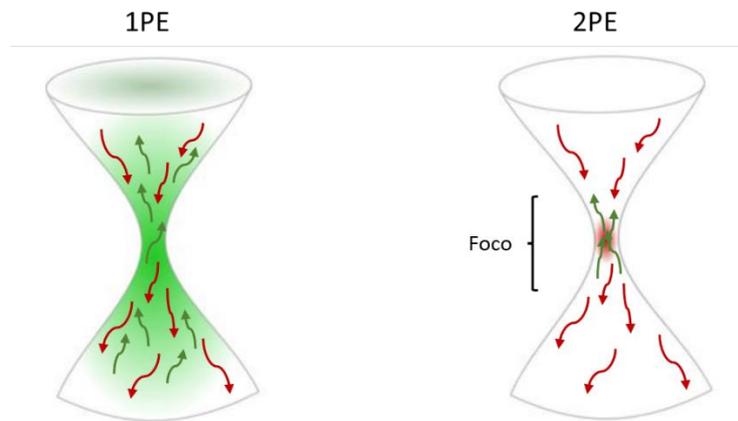


Figura 7: Esquema de emissão de fluorescência de único fóton (1PE) versus dois fótons (2PE). A vermelho está representado a luz de excitação e a verde a de emissão. Adaptado de [63]

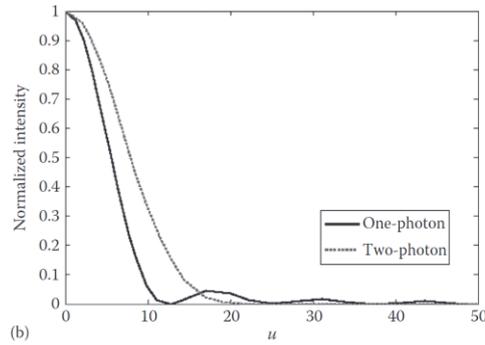


Figura 8: Comparação das *Point Spread Functions* de 1PE e 2PE na direção axial. u é coordenada ótica adimensional ao longo da direção axial. Retirado de [64].

Para garantir o confinamento temporal dos fótons e a sua elevada densidade no ponto de excitação inerente à MPM, são utilizando lasers ultracurtos e objetivas com abertura numérica elevada. A intensidade do sinal SHG por pulso de laser é proporcional a:

$$I_{SHG} \propto \left[\frac{p}{a\tau} \right]^2 \tau (\chi^{(2)})^2 a \quad (3.25)$$

onde p é a energia do pulso, a a área de foco e τ a largura do pulso [14]. O sinal SHG é proporcional ao quadrado da intensidade, $\left[\frac{p}{a\tau} \right]^2$, portanto o segundo harmónico só será gerado dentro da área de foco e, é inversamente proporcional à duração do pulso do laser de excitação (τ) [64,65]. Assim sendo, um laser ultracurto será o mais indicado para garantir o confinamento temporal dos fótons. O tamanho mínimo do foco (s) de um laser em função do comprimento de onda (λ) é, de acordo com a fórmula de difração de Ernst Abbe, dado por

$$s = \frac{\lambda}{2NA}. \quad (3.26)$$

Logo atingem-se intensidades mais elevadas com objetivas de NA elevado [50,66].

4. Estado da Arte

4.1 SHG em tecidos biológicos

O colagénio foi identificado como a fonte de SHG mais eficiente em tecidos biológicos [67–69]. O colagénio é a proteína mais abundante no corpo de um vertebrado superior [10], o que torna esta fonte de SHG ainda mais apreciável para a imagiologia biológica. As imagens SHG do colagénio apresentam a estrutura geral do tecido, que pode ser fortemente afetada pelo efeito de diversas patologias[70]. Por exemplo, a microscopia SHG mostrou que em modelos tumorais, o colagénio apresenta uma estrutura anormal, o que leva a um melhor conhecimento da patologia em causa[71], podendo ajudar no diagnóstico e até mesmo na avaliação do tratamento.

O sinal SHG gerado por tecidos ricos em colagénio foi demonstrado pela primeira vez em 1971, por Fine e Hansen. [72] Como consequência, houve um aumento na investigação da microscopia ótica não linear, com o principal objetivo de adquirir imagens da estrutura de tecidos com o sinal SHG [73,74]. Em 1986, Freund *et al.*[75] adquiriram, pela primeira vez, imagens de fibras de colagénio no tendão da cauda de um rato, com o método SHG. Este foi o ponto de partida para que diversos grupos de investigação explorassem o SHG numa variedade de tecidos, que na sua composição contivessem colagénio. Estas imagens foram adquiridas com uma boa resolução lateral (~50 μm), mas havia potencial para melhorar. Em 1997 a prioridade na investigação de SHG em tecidos biológicos era a resolução espacial das imagens, com o objetivo de observar com maior precisão estruturas e alterações na organização dos tecidos[76]. Atualmente, é possível adquirir imagens três dimensões (3D) de fibras colagénio, em tecidos biológicos, com uma resolução lateral muito maior (~1 μm). Esta capacidade foi demonstrada pela primeira vez em 2002 por Campagnola *et al.* [77].

O uso de lasers pulsados na microscopia SHG, com pulsos curtos, resulta numa diminuição significativa da potência média requerida da radiação de excitação, o que torna a microscopia SHG um método não invasivo [67,78]. A microscopia SHG é, portanto, adequada

para estudos *in situ* e *in vivo* [79]. Foi demonstrado, que ao detetar o sinal de SHG com diferentes geometrias, transmissão e reflexão, se pode obter informações diferentes das propriedades estruturais das amostras. No entanto, na prática clínica apenas é possível a geometria de reflexão [80], o que permite projetar os estudos *in vivo* [79,81,82].

Utilizando um microscópio otimizado para a imagiologia SHG, Cox *et al.* [83] demonstraram que era possível aumentar a resolução e a sensibilidade do sinal SHG gerado por moléculas de colagénio. Conseguiram obter imagens 3D de SHG com elevada resolução, de amostras de endométrio humano, baseando-se na seletividade em profundidade do sinal SHG.

O SHG tem sido bastante utilizado para imagens de tecido animal [76]. Como já referido, a microscopia SHG é uma boa técnica para a aquisição de imagens da estrutura do colagénio [83], como a córnea [84,85], tendões [81,86] e artérias [87]. Tem sido utilizada também para investigar a orientação das fibras de colagénio e as suas alterações estruturais na derme humana [88,89], cicatrizes quelóides [90,91], fibrose [92,93], amostras termicamente degradadas [94–96], e também em tumores [71,97,98]. A microscopia SHG foi também aplicada com sucesso ao estudo de condições fisiológicas alteradas, de vários tipos de tecidos, incluindo músculo [99] e osso [100].

O trabalho que será realizado neste projeto, terá também como foco a aquisição de imagens SHG da córnea. Em 2016, a arquitetura das fibras de colagénio estromais de córneas suínas, foi avaliada por imagem SHG em ambas as direções, transmissão e reflexão. A possibilidade de avaliar a viabilidade de tecido corneano utilizado em transplantes usando SHG também já foi demonstrada [101]. O grau de organização das fibras de colagénio da córnea foi determinado para inferir sobre a transparência da córnea, o que normalmente é efetuado de forma subjetiva [101].

Outro exemplo da utilidade de imagens SHG da córnea é a visualização do estado do tecido após tratamento ou dano. O *crosslinking* do colagénio corneano (CXL) é um procedimento médico utilizado na prática clínica para fortalecer a estabilidade mecânica da córnea [102,103]. O resultado clínico é tipicamente avaliado várias semanas após o tratamento, mas uma avaliação precoce pode levar a uma otimização do mesmo [104]. Tal pode ser estudado com MPM, através das técnicas SHG e 2PE. Foi realizado um estudo *ex-vivo*, em 2019 [104], em córneas humanas, que demonstra que se pode avaliar de forma não invasiva, as alterações induzidas por CXL, com recurso também à microscopia SHG.

Atualmente, a microscopia SHG continua essencialmente direcionada para a investigação da orientação das fibras de colagénio, bem como das suas alterações estruturais em vários tecidos, em diferentes processos fisiológicos e patológicos [105]. O valor destes estudos aumenta se as imagens SHG forem também analisadas quantitativamente.

4.2 Métodos quantitativos de análise de imagem SHG

A caracterização da estrutura e da organização das fibras de colagénio é importante para a estimativa das particularidades morfológicas dos tecidos em diferentes estados fisiológicos e patológicos. Ao longo dos últimos anos, a microscopia SHG provou ser uma ferramenta confiável para a visualização dessas alterações [80,105–108]. Porém, para quantificar objetivamente o estado da organização do colagénio, são necessárias ferramentas de análise quantitativa [105]. O sucesso da microscopia SHG, na investigação biomédica, depende da quantificação da organização do colagénio [109].

Alguns dos métodos usados para quantificar a organização do colagénio, a partir de imagens SHG, são a análise de Helmholtz [99], a transformada de Fourier 2D [94,110], análise fractal [111], análise de textura de imagens SHG usando estatísticas de primeira ordem [112] e estatísticas de segunda ordem (por exemplo, matriz de coocorrência de nível de cinzento (GLCM) [112–114]), a transformada *wavelet* [115], o tensor de estrutura [116] e a avaliação de anisotropia em microscopia SHG resolvida por polarização [117].

Os métodos que se destacam para a quantificação de imagens SHG, são os métodos baseados na transformada de Fourier (FT) e no tensor de estrutura (ST). O método FT, por ser um dos métodos mais comuns e amplamente utilizados na caracterização da estrutura fibrilar do colagénio [118,119] e o ST por ser uma abordagem recente, mas com uma aplicação bem sucedida até agora [120,121].

No método FT, a distribuição da frequência numa imagem pode ser analisada para recuperar o padrão das direções das fibras na imagem [94]. A forma da distribuição dos dados apresenta, por norma, uma forma elíptica, permitindo o ajuste de uma elipse à distribuição espacial [94,111]. A razão entre o eixo mais curto e o mais longo da elipse,

denominada de razão de aspeto (AR), é calculada^[94] em que um valor de AR elevado indica que a imagem tem uma direção preferencial de orientação das fibras bem definida ^[111]. O método FT apresenta uma redução de desempenho em imagens que contêm fibras de colagénio entrelaçadas e/ou tortuosas. Para colmatar esse problema, foram desenvolvidas diferentes abordagens com base na transformada de Fourier. Estas baseiam-se na aplicação de processos de manipulação de imagem como, por exemplo, filtros passa-banda e equalização do histograma aplicados à imagem em análise^[122] e filtros gaussianos e passa-baixo aplicados diretamente à imagem como pré-processamento^[123]. Foram testados em imagens SHG de fibras de colagénio na córnea e obtiveram resultados bastante promissores ^[122,123]. Este método já foi utilizado para avaliar as diferenças entre imagens de córneas humanas não patológicas e imagens de córneas diagnosticadas com diferentes patologias^[124].

Na década de 90, o conhecimento na área de segmentação de imagens tornou-se bastante popular e começaram a surgir algumas técnicas na literatura no campo de segmentação com base em texturas^[125,126]. No entanto, estas técnicas apresentavam bastante redundância nos dados obtidos, o que levou à procura de modos de melhorar os resultados. Foi então que se recorreu ao conhecimento de tensor de estrutura para discriminar texturas^[127]. O tensor de estrutura tornou-se uma ferramenta muito útil para estudar e caracterizar estruturas para estimar orientações dominantes ^[128,129]. Com isto começou a ser aplicado à análise de distribuições biológicas e, modelação de tecidos à base de colagénio ^[130,131]. Mas só em 2015 se desenvolveu um método baseado no tensor de estrutura, que calcula parâmetros de isotropia de imagens SHG à base de colagénio de tecidos oculares. Demonstrou ter várias vantagens como técnica alternativa para quantificação da organização do colagénio, por ser um procedimento aplicado diretamente à imagem sem necessidade de pré-processamento ou filtragem, como no método FT ^[116]. Este método já foi aplicado com sucesso na avaliação de alterações estruturais de córneas de coelhos após queimaduras químicas, com o intuito de se observar a regeneração das fibras de colagénio ^[132]. Foi também utilizado para avaliar a qualidade de imagens SHG de córneas humanas e bovinas saudáveis adquiridas com diferentes comprimentos de onda de excitação^[133], bem como para discriminar córneas humanas saudáveis e patológicas ^[134].

5. Materiais e Métodos

5.1 Aquisição de Imagem SHG

Neste trabalho, foi utilizado um microscópio multifotão personalizado para aquisição de imagens SHG da córnea em 3D. O sistema foi usado na aquisição simultânea de sinal SHG em duas configurações, transmissão e reflexão. Nesta seção, é descrita a configuração de instrumentação do sistema.

5.1.1 Microscópio Multifotão

A configuração experimental está representada na Figura 9. O sistema consiste num microscópio multifotão e confocal (Zeiss LSM 710 NLO) equipado com dois lasers infravermelhos, com bloqueio de modos longitudinais, de Titânio-Safira (Spectra-Physics MaiTai DeepSee, California, USA). Estas fontes têm um comprimento de onda ajustável entre 690 e 1040 *nm* com uma potência média de saída superior a 2,4 *W*. Nos 800 *nm* emitem pulsos com largura de banda <70 *fs*, a uma frequência de 80 *MHz*, com potências de pico superiores a 425 *kW*. O feixe de laser é guiado através de espelhos até um atenuador para controlar a potência, depois até um expensor para expandi-lo e um scanner galvanométrico para alterar a sua posição focal lateralmente. Um espelho é então utilizado para direcionar o feixe até à objetiva do microscópio para focar a amostra. Neste sistema, foi utilizada uma objetiva de imersão em óleo 40x NA 1.4 com uma distância de trabalho de 130 μm .

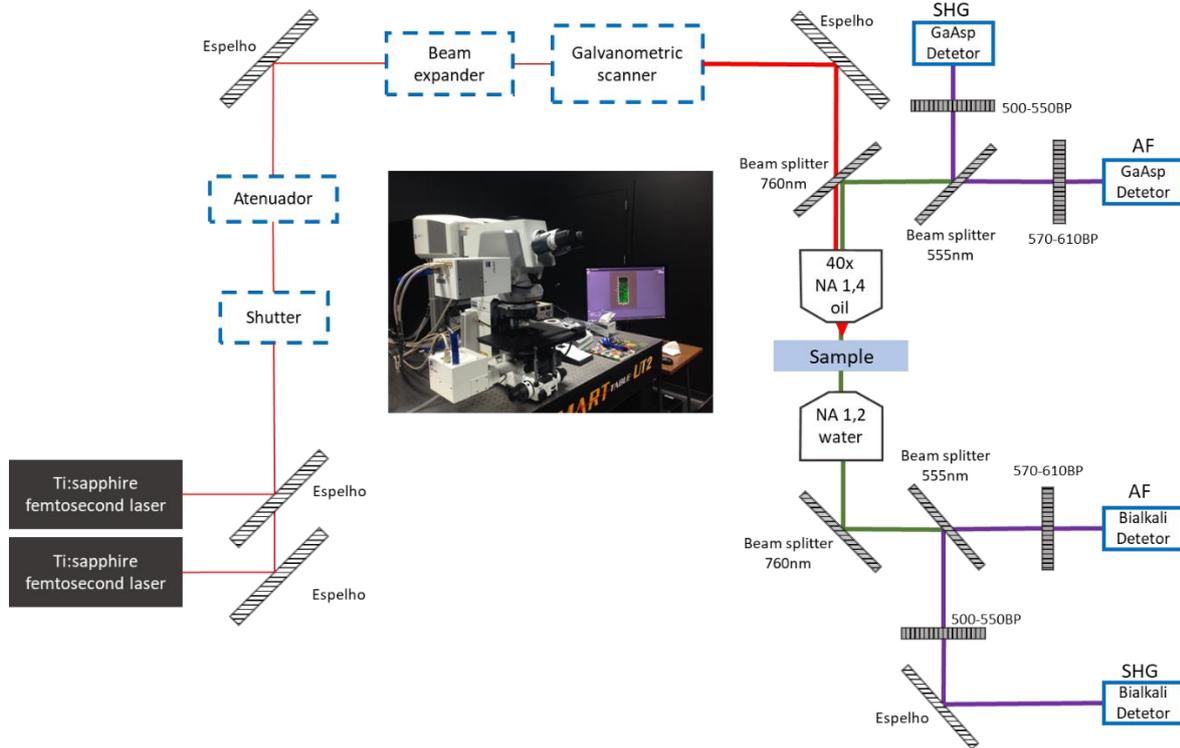


Figura 9: Representação esquemática da configuração instrumental do microscópio de varrimento de laser multifotão.

Os sinais provenientes da amostra após a excitação com um comprimento de onda de 1000 nm (mais informação sobre esta escolha na secção seguinte), percorrem dois caminhos em geometrias diferentes, reflexão e transmissão. Em reflexão, os sinais são guiados através da mesma objetiva e detetados por um módulo LSM (*Laser Scanning Microscope*) binary GaAsP (BiG) NDD (*non descanned detector*) com uma eficiência quântica (η) inferior a 45% (Figura 10). Em transmissão, atravessam um condensador de imersão em água, com NA de 1.2, que opera como uma objetiva quando combinado com o detetor Fotomultiplicador Bialcalino LSM NDD de único canal, com uma eficiência quântica (η) perto de 10% (Figura 9). Nos dois caminhos, o sinal é dividido por um divisor de feixe, com um comprimento de onda de corte nos 555 nm e, posteriormente os sinais SHG são filtrados por um filtro passa-banda de 500-550 nm (ET525/50m, Chroma Technology Corp, Vermont) e os sinais AF restringidos por um filtro passa-banda 570-610 nm (ET585/40m, Chroma Technology Corp, Vermont). Os filtros SHG foram escolhidos para isolar a imagem não linear do estroma corneano, gerado a metade do comprimento de onda de excitação.

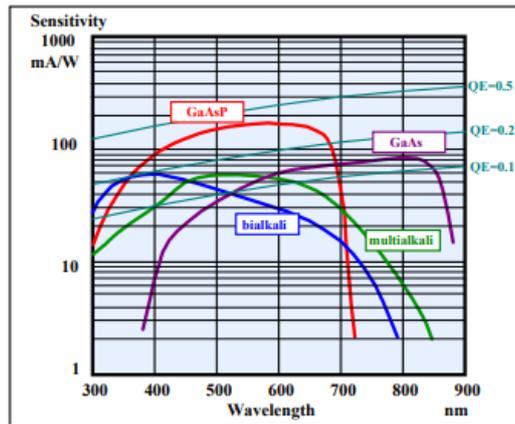


Figura 10: Sensibilidade de diferentes detetores e eficiência quântica. Retirada de [135].

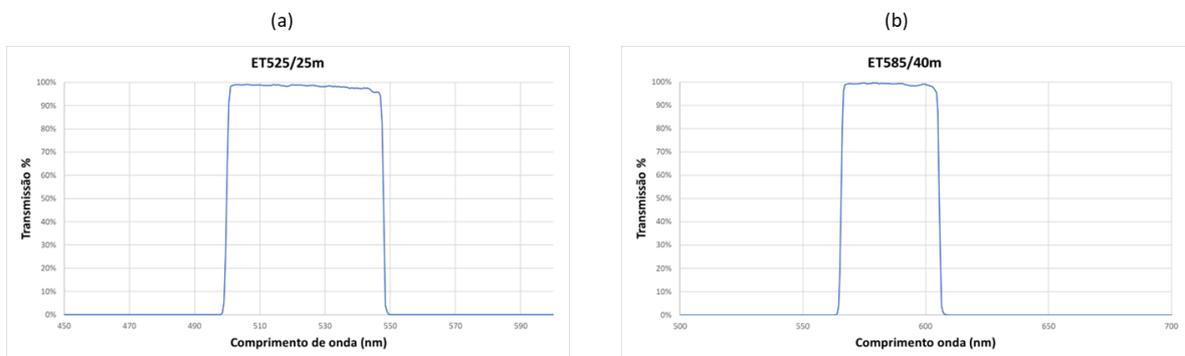


Figura 11: Espectro de transmissão dos filtros utilizados na aquisição de imagens SHG com comprimento de onda de excitação de 1000 nm. (a) Filtro passa banda 500-550 nm ET525/50m e (b) filtro passa-banda 570-610 nm, ET585/40m.

O tempo de aquisição para imagens SHG, com 1024×1024 pixels, foi de 7,4s, correspondendo a um tempo de permanência de pixel de 0,028 ms/pixel. Além disso, um motor de passo do eixo Z foi usado para adquirir volumes de imagens XY em profundidades sucessivas. Para a maioria das amostras, conseguiu-se fazer o varrimento de toda a amostra com potências de laser entre 0,21 e 0,39 mW e com bom contraste de imagem.

Com [136]

$$r_{x,y} = \frac{0,46\lambda}{NA} \quad (5.1)$$

$$r_z = \frac{1,4n\lambda}{NA^2} \quad (5.2)$$

resoluções teóricas laterais de 0,33 μm e axiais de 1,08 μm foram determinadas. Para determinar a resolução espacial do sistema real, foram utilizadas microsferas fluorescentes de 0,1 μm (Fluorescent Microspheres Sampler Kit, TetraSpeck™, Thermo Fisher Scientific,

Massachusetts, EUA). As microesferas foram inseridas num fantoma de 10% de agarose, de forma a possibilitar a aquisição de imagens 3D. A largura a meia altura (FWHM) do sinal de intensidade da fluorescência das microesferas, na direção x, y e z foi de $0,92 \pm 0,15 \mu m$, $1,17 \pm 0,24 \mu m$ e $1,06 \pm 0,27 \mu m$, respetivamente. A resolução axial na prática foi menor que a teórica, é importante referir que a aquisição das imagens das microesferas teve alguns problemas e não foi possível repetir a medição da resolução devido a avaria do sistema.

5.1.2 Comprimento de onda excitação

Foi relatado por Hall *et. al*^[137] que a excitação ideal para SHG encontra-se no intervalo de 800 a 900 nm. Os autores concluíram que o ganho na intensidade do sinal medido com comprimentos de onda mais longos devido à dispersão reduzida, é vencido pela diminuição na eficiência de conversão de SHG. Sendo a conversão o rácio entre o sinal de saída útil e a excitação de entrada^[137]. A dependência do sinal SHG com o comprimento de onda foi também estudada por Bueno *et. al*^[133] em tecidos oculares. As conclusões a que chegaram foram semelhantes, embora um comprimento de onda mais longo permita uma penetração mais profunda no tecido e seja esperada uma imagem SHG com melhor resolução do que com comprimentos de onda menores, a geração de sinais SHG é menos eficiente^[133]. No entanto, é possível detetar sinal SHG com lasers Titânio-Safira em qualquer comprimento de onda de 800 a 1200 nm^[138].

Desde o início do projeto que se encontrou algumas adversidades técnicas relacionadas com o sistema multifotão. Como mencionado acima, o sistema utilizado encontra-se equipado com dois lasers NIR, com comprimentos de onda sintonizáveis entre 690 e 1040 nm. Contudo, a gama de emissão de ambos os lasers está limitada, sendo que um dos lasers é sintonizável entre 690 e 800 nm, e o outro entre 855 e 1040 nm. Embora ambos os lasers tenham tido problemas técnicos durante a grande maioria do tempo de execução deste projeto, foi possível resolver temporariamente os problemas associados com o laser destinado à sintonização de comprimentos de onda superiores (855 e 1040 nm). Isto permitiu a sua utilização durante um curto intervalo de tempo. Contudo, tendo em conta a gama de emissão deste laser, foram necessários ajustes ao protocolo experimental, uma

vez que a excitação da amostra e a detecção dos sinais nos comprimentos de onda pretendidos não era possível. Foram escolhidos filtros adequados para a aquisição de imagens SHG com comprimento de onda de excitação igual a 1000 nm (Figura 11).

Com base nas especificações possíveis do sistema, isto é, os comprimentos de onda de excitação possíveis de utilização e as gamas de detecção disponíveis, duas soluções foram identificadas: (1) comprimento de onda excitação de 900 nm com detecção de sinais SHG entre 450 e 490 nm; (2) comprimento de onda excitação de 1000 nm com detecção de sinais SHG entre 500 e 550 nm. Ambas as opções foram testadas para a aquisição de sinais SHG em cortes de córnea humana marcadas com Hematoxilina e Eosina (H&E). Volumes da mesma amostra foram adquiridos, em geometria de reflexão, usando ambas as configurações, enquanto mantendo as restantes condições experimentais iguais. A Figura 12 mostra os resultados obtidos.

Portanto, para a escolha do protocolo a usar, teve-se em conta vários fatores: (a) a influência dos corantes no sinal SHG; (b) a influência da autofluorescência dos fluoróforos endógenos presentes córnea; e (c) a possibilidade de aquisição simultânea de imagens em transmissão e reflexão.

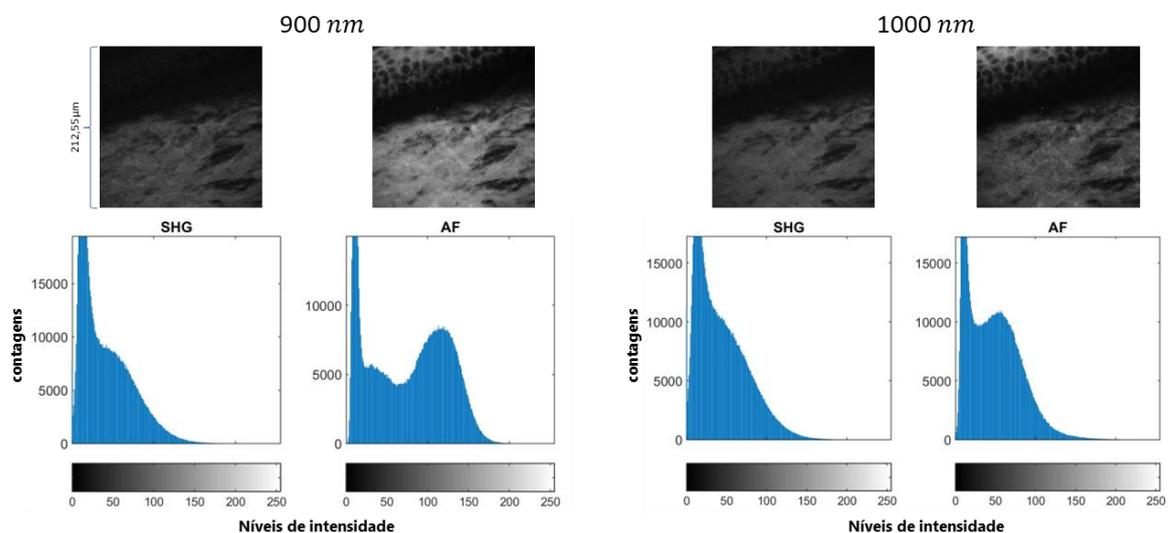


Figura 12: Imagens de representativas e respetivos histogramas de volumes de cortes de córnea marcados, adquiridos da mesma amostra e na mesma região com comprimentos de onda de excitação igual 900 nm (esquerda) e 1000 nm (direita) em dois canais com gamas apropriadas à detecção de sinais de geração de segundo harmónico (SHG) e autofluorescência (AF). Os histogramas indicam o número de contagens por níveis de intensidade.

Verificou-se de imediato nas imagens (Figura 12), que usando um comprimento de onda de excitação de 1000 *nm*, a intensidade do sinal detetado no canal SHG aumentava, sendo visível a zona do epitélio da córnea. Nos espectros de emissão de cortes histológicos do epitélio esofágico e do estroma subjacente marcados com H&E (Figura 13 (a) e (b), curva rosa), para uma excitação de 810 *nm*, observa-se uma emissão semelhante de H&E nos dois tecidos. O que indica a possível interferência da fluorescência proveniente de H&E no sinal SHG.

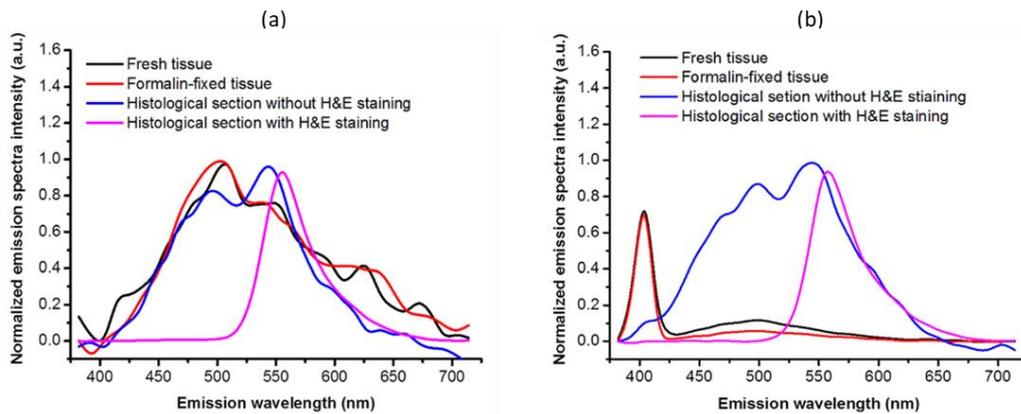


Figura 13: Espectros de emissão de multifotão normalizados da camada de células do tecido fresco (linha preta), espécime fixado em formalina (linha vermelha), cortes histológicos não corados e corados (linhas azul e rosa), obtidos com um comprimento de onda de excitação de 810nm. (a) Epitélio e (b) Estroma. Retirado de ^[139].

Como explicado na secção 3.1, a 2PE refere-se à absorção simultânea de dois fótons por uma única molécula fluorescente, cuja soma das energias dos fótons é maior que a energia de transição molecular do estado fundamental para o estado excitado. Com isto, para excitar uma molécula com dois fótons, estes necessitam de ter aproximadamente metade da energia (e o dobro do comprimento de onda) que um único fóton necessita para excitar a mesma molécula. Na Figura 14 estão representados os espectros de absorção linear, dos corantes hematoxilina e eosina. Sendo os comprimentos de onda de excitação em questão 900 e 1000 *nm*, significa que dois fótons com estes comprimentos de onda têm aproximadamente a mesma energia que um único fóton de 450 *nm* e 500 *nm*, respetivamente. Pela observação dos espectros de absorção dos corantes, conclui-se que, durante a aquisição das imagens, também se estava a excitar os corantes presentes na amostra. Portanto, para ambos os comprimentos de onda de excitação em análise, pode-se concluir que o sinal de AF dos corantes estava a influenciar os sinais detetados em ambos

os canais.

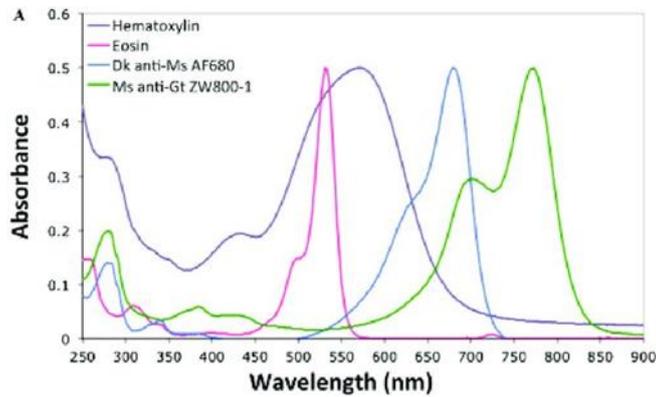


Figura 14: Espectro de absorção para hematoxilina, eosina, Alexa Fluor 680 conjugado com os anticorpos Dk anti-Ms AF680 e Ms anti-Gt ZW800-1. Retirado de^[140].

Como já referido na secção 3.2.1, a autofluorescência da córnea tem origem em fluoróforos endógenos como NAD(P)H e flavinas ^[141].

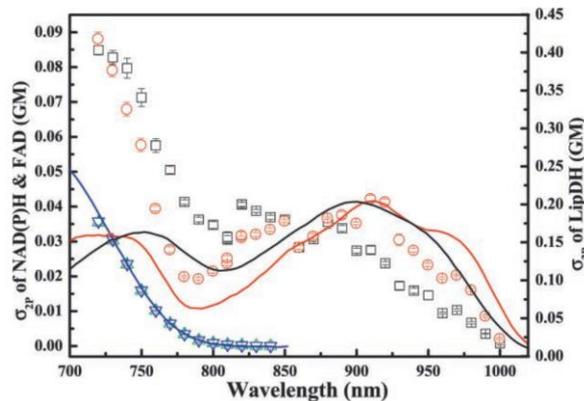


Figura 15: Secções transversais de excitação de dois fótons dos espectros de NADH (triângulos verdes), NADPH (triângulos invertidos azuis), de FAD (quadrados pretos) e LipDH (círculos vermelhos; eixo direito). Retirado de^[41].

As secções transversais, representadas na Figura 15, foram determinados na faixa de comprimento de onda de 720-1000 nm ^[41]. Após a análise destes espectros, concluiu-se que o fluoróforo NAD(P)H não é excitável em nenhum dos comprimentos de onda de excitação em questão e, que o FAD tem uma excitação predominante para comprimentos de onda de excitação de 900 nm . Portanto, torna-se mais vantajoso utilizar 1000 nm .

Outra vantagem de usar 1000 nm é que a aquisição simultânea de sinais em geometria de reflexão e de transmissão não seria possível. Sendo esta uma particularidade importante deste projeto, escolheu-se trabalhar com o comprimento de onda de excitação 1000 nm ,

apesar de para comprimentos de onda mais longos o sinal SHG perder intensidade.

5.1.3 Correlação

Procedeu-se à análise de correlação entre as imagens adquiridas nas duas geometrias, de forma a verificar que as imagens foram adquiridas do simultaneamente do mesmo plano focal. O coeficiente de correlação de Pearson (PCC) ^[142] mede o grau de correlação linear da intensidade pixel a pixel entre duas imagens. Este coeficiente está normalizado para variar entre -1 e 1, onde $PCC = 1$ indica que duas imagens são perfeitamente correlacionadas linearmente, $PCC = 0$ indica que as imagens não se correlacionam linearmente e $PCC = -1$ indica que as imagens são perfeitamente anti correlacionadas ^[142].

Adquiriu-se um volume de imagens nas duas geometrias, e calculou-se o coeficiente de correlação. A média dos valores obtidos de 23 pares de imagens foi de 0.6856 ± 0.0816 , indicando que as imagens se correlacionam em 68,56%. Portanto verifica-se que as imagens estão a ser adquiridas do mesmo plano focal nas duas geometrias.

5.2 Análise de Imagem

Seguidamente, dois métodos foram implementados para a avaliação da organização estrutural das fibras de colagénio do estroma corneano: um a partir da análise de tensores de estrutura e outro a partir da análise de transformada de Fourier.

Para demonstrar a viabilidade dos métodos em avaliar eficientemente a organização das fibras de colagénio dentro do estroma, foram geradas imagens fantasmas usando MATLAB (The MathWorks, Inc., Massachusetts, EUA). Nesta secção serão utilizados os fantasmas para demonstrar a aplicação de cada método, a eficácia dos métodos será apresentada e discutida nos capítulos seguintes. Neste estudo, os métodos aplicados aos fantasmas e às imagens SHG do estroma foram avaliados usando o MATLAB.

5.2.1 Método de Tensor de Estrutura

O tensor de estrutura, também conhecido como matriz de segundo momento ou operador de interesse de Förstner, é uma representação matricial das informações das derivadas parciais de uma imagem^[143]. Na área de processamento de imagem tem diversas aplicações tal como análise de textura^[144], filtragem anisotrópica^[145] e deteção de movimento^[146]. O seu objetivo é a estimativa de orientação e a análise local da estrutura. Baseia-se na integração de dados de uma vizinhança local^[143].

Para uma imagem $I(x, y)$, a alteração provocada por um deslocamento $(\Delta x, \Delta y)$ pode ser descrita como^[147]

$$r = \sum_{(x,y)} w(x, y) [I(x + \Delta x, y + \Delta y) - I(x, y)]^2 \quad (5.3)$$

onde w é uma janela de suavização, como por exemplo uma janela gaussiana. Aplicando a expansão de Taylor de primeira ordem $I(x + \Delta x, y + \Delta y) = I(x, y) + I_x \Delta x + I_y \Delta y + O(\Delta x^2, \Delta y^2)$, a variação r pode ser descrita como

$$r = \sum_{(x,y)} w(x, y) [I_x \Delta x + I_y \Delta y + O(\Delta x^2, \Delta y^2)]^2 \quad (5.4)$$

onde I_x e I_y são as derivadas parciais da imagem, componentes horizontal e vertical do vetor gradiente

$$\nabla(I(x, y)) = [I_x, I_y]. \quad (5.5)$$

onde $I_x = \frac{\partial I}{\partial x}$ e $I_y = \frac{\partial I}{\partial y}$. Este vetor aponta na direção da qual a taxa de variação de $I(x, y)$ é máxima^[148]. Simplificando a variação r como

$$r = [\Delta x, \Delta y] S [\Delta x, \Delta y]^T \quad (5.6)$$

tem-se que S é o tensor de estrutura e pode ser definido como

$$S = \begin{bmatrix} \sum_{(x,y)} w(x, y) I_x^2 & \sum_{(x,y)} w(x, y) I_x I_y \\ \sum_{(x,y)} w(x, y) I_x I_y & \sum_{(x,y)} w(x, y) I_y^2 \end{bmatrix}. \quad (5.7)$$

S é uma matriz semi-definida positiva e pode ser decomposta da seguinte forma

$$S = [e_1 \quad e_2] \begin{bmatrix} \mu_1 & 0 \\ 0 & \mu_2 \end{bmatrix} [e_1 \quad e_2]^T \quad (5.8)$$

onde μ_1 e μ_2 são os valores próprios não negativos e e_1 e e_2 são os vetores próprios correspondentes. Os valores próprios descrevem as informações de estrutura da imagem. Quando tomam o valor de zero, não existe variação da intensidade, então está presente uma região plana da imagem. Se $\mu_1 \gg \mu_2$, existe uma variação rápida de intensidade, então a região pertence a uma fronteira e, se μ_1 e $\mu_2 \gg 0$ pertence a um canto da imagem.

Para um pixel da imagem, a matriz tensor é definida como

$$J = \begin{bmatrix} I_x^2 & I_x I_y \\ I_x I_y & I_y^2 \end{bmatrix} = \nabla I \cdot \nabla I^T \quad (5.9)$$

onde $\nabla I = [I_x, I_y]^T$ é o operador gradiente e \cdot é o produto interno ^[147].

O método estudado baseia-se na métrica desenvolvida por Ávila *et. al*^[17]. Os elementos do tensor de estrutura correspondem às derivadas parciais ao longo das direções dos eixos x e y de uma imagem, contendo informações sobre a orientação e isotropia em cada pixel. Esta métrica fornece informações quantitativas sobre a orientação preferencial (OP) das fibras através do cálculo de três parâmetros: o grau de isotropia (DOI-ST), o histograma de OP e a dispersão estrutural (SD-ST), definida como o desvio padrão do histograma da distribuição de OP.

O primeiro passo deste método é o cálculo das derivadas parciais da imagem, I_x e I_y . Para tal, filtrou-se a imagem com um kernel gaussiano 2D de suavização. Através da convolução do filtro com a imagem, obtém-se as derivadas parciais que correspondem aos elementos do vetor gradiente. A convolução faz com que o kernel deslize um certo passo ao mesmo tempo com a altura e a largura da imagem, fazendo uma soma ponderada entre os valores do kernel e a região de sobreposição da imagem. Esta técnica é a que se utiliza para aplicar diferenças finitas na imagem calculando assim as primeiras derivadas parciais nas duas direções.

Multiplicando ponto a ponto as derivadas da imagem filtrada encontram-se os elementos I_x^2 , I_y^2 e I_{xy} da matriz tensora. Aplicando um segundo kernel gaussiano, G2, com a função de controlar a integração da informação da vizinhança de cada pixel, obtém-se o tensor de

estrutura é definido como

$$T = \begin{bmatrix} G_2 I_x^2 & G_2 I_{xy} \\ G_2 I_{xy} & G_2 I_y^2 \end{bmatrix}. \quad (5.10)$$

Com o tensor de estrutura calculado para todos os pixels da imagem, calcula-se o parâmetro OP da seguinte forma:

$$OP = \frac{1}{2} \tan^{-1} \left(\frac{2I_{xy}}{I_y^2 - I_x^2} \right). \quad (5.11)$$

Este parâmetro define a orientação preferencial, e o seu desvio padrão é definido como a dispersão estrutural das fibras de colagénio presentes na imagem (SD-ST). A classificação de Ávila *et. al*^[17] é: SD-ST varia entre 0° e 20° quando a imagem apresenta uma estrutura organizada e OP bem definido, entre 20° e 40° quando a estrutura é parcialmente organizada e valores acima de 40° quando a estrutura é desorganizada.

Foi proposto por Ávila *et. al*^[17] que o contraste dos valores próprios poderia ser avaliado como uma medida da quantidade de simetria linear da distribuição espacial das fibras, dando origem ao parâmetro chamado de grau de isotropia

$$DoI-ST = \left(\frac{L_{max} - L_{min}}{L_{max} + L_{min}} \right)^2. \quad (5.12)$$

Fazendo a decomposição do tensor de estrutura de cada pixel, obtém-se os valores próprios (L_{min} e L_{max}) e os vetores próprios correspondentes (Figura 16).

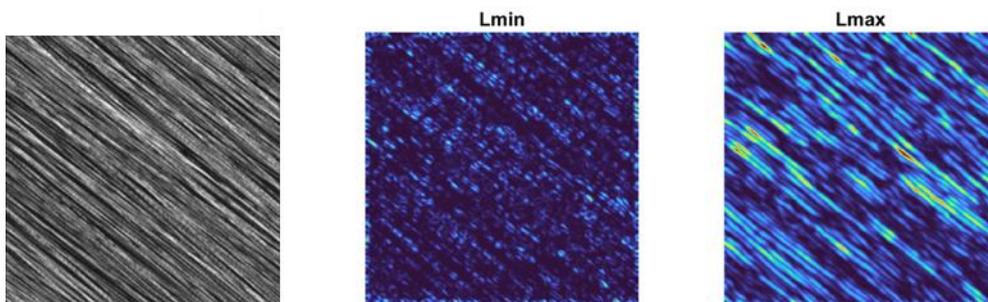


Figura 16: Fantoma de teste (esquerda), valores próprios (centro L_{min} e direita L_{max}) do fantoma de teste.

Isotropia é a propriedade que caracteriza os pixels que possuem as mesmas propriedades físicas, neste caso intensidade, independentemente da direção considerada. DoI-ST varia entre 0 (estrutura não organizada e ausência de OP) e 1 (estrutura linear e OP bem

definida). Para este parâmetro Ávila *et. al*^[17] também definiram limiares para níveis de organização diferentes: $\text{DoI-ST} > 0,70$ a distribuição é bem organizada, $0,2 \leq \text{DoI-ST} < 0,70$ indica uma distribuição de colagénio parcialmente organizada e $\text{DoI-ST} < 0,20$ é uma distribuição desorganizada. A Figura 17 mostra o mapa de DoI-ST, o mapa de OP e respetivo histograma do fantoma de teste.

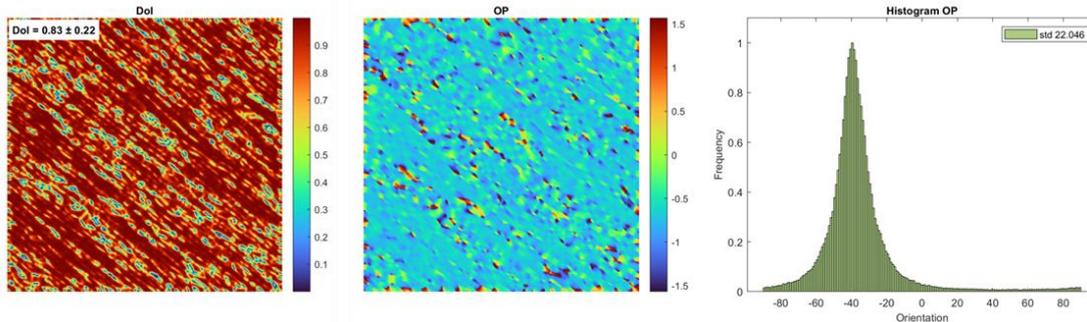


Figura 17: Da esquerda para a direita: mapa de grau de isotropia (DoI-ST)), mapa de orientação preferencial (OP) e histograma da distribuição de OP.

5.2.2 Método de Transformada de Fourier

A transformada de Fourier é amplamente utilizada em análise de processamento de imagem, como reconstrução de imagens, métodos de filtragem, ou análise de texturas. Como estamos a trabalhar apenas com imagens digitais, restringe-se esta discussão à Transformada Discreta de Fourier (DFT). A DFT é a transformada de Fourier amostrada e, portanto, não contém todas as frequências que formam uma imagem, mas apenas um conjunto de amostras que é grande o suficiente para descrever completamente a imagem do domínio espacial^[149]. O número de frequências corresponde ao número de pixels na imagem do domínio espacial, ou seja, a imagem no domínio espacial e de Fourier são do mesmo tamanho^[150]. As frequências indicam a taxa à qual as intensidades dos pixels mudam no domínio espacial. Em imagens de tecidos fibrosos, ao analisar as variações abruptas de intensidade ao longo da imagem, como os limites da fibra, é possível encontrar a orientação da mesma^[119].

A DFT é obtida na prática usando um algoritmo de transformada rápida de Fourier (FFT), uma extensão da transformada de Fourier^[151]. Em geral, a transformada de Fourier contém termos complexos e é habitual para fins de exibição trabalhar com a magnitude da

transformada, chamada de espectro de Fourier ou espectro de frequência ^[150]. Para uma imagem de entrada $f(x,y)$ de tamanho $M \times N$ pixels, onde M e N são as dimensões de linha e coluna da imagem, a DFT 2D pode ser expressa como ^[149,152]

$$F(u, v) = \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) \exp \left[-i2\pi \left(\frac{ux}{M} + \frac{vy}{N} \right) \right] \quad (5.13)$$

onde $u = 1, 2, \dots, M-1$ e $v = 1, 2, \dots, N-1$.

O primeiro passo do método é calcular o espectro de Fourier da imagem segundo a equação 5.13. Após o cálculo do espectro de Fourier, foi necessária a transformação *log* da magnitude desta, de forma a compactar o intervalo dinâmico, para questões de visualização ^[150]. Como as intensidades podem variar de magnitudes, este passo é importante para se observar também as amplitudes de componentes de frequências mais baixas. As baixas frequências da transformada estão relacionadas com componentes de intensidade que variam lentamente na imagem, mas também a ruído de *background*. Por outro lado, as altas frequências podem estar relacionadas com ruído por representarem rápidas transições de intensidade ^[149]. Portanto, aplicou-se um filtro passa-banda cuja implementação se baseou na subtração de um filtro passa-baixo gaussiano com desvio padrão menor por outro com um desvio padrão maior. O alinhamento das fibras manifesta-se como uma distribuição elíptica das frequências centrais do espectro de Fourier. O perfil elíptico está relacionado com um grau de maior alinhamento (Figura 18). Em detalhe, o espectro apresenta valores mais elevados ao longo da direção ortogonal à direção das fibras, daí o seu comportamento elíptico ^[153]. Portanto, o valor dos desvios padrão dos dois filtros foi escolhido consoante a representação dos dados, de forma que fosse observável o perfil elíptico do espectro com pouco ruído.

Para a análise do espectro de Fourier foi utilizada uma abordagem de seccionamento do espectro específica. Definiu-se uma região circular contendo apenas o centro do espectro, dividiu-se a região em secções radiais e somou-se as frequências de cada uma destas secções. Resumindo, agrupou-se pontos do espectro radialmente segundo uma classe, *theta*, em várias secções e a adicionou-se as frequências de cada secção (Figura 18). Portanto, após calcular o arco tangente das coordenadas da imagem e de obter o ângulo em cada pixel (variável *theta*), dividiu-se a imagem em N secções segundo *theta* (variável *theta_sections*).

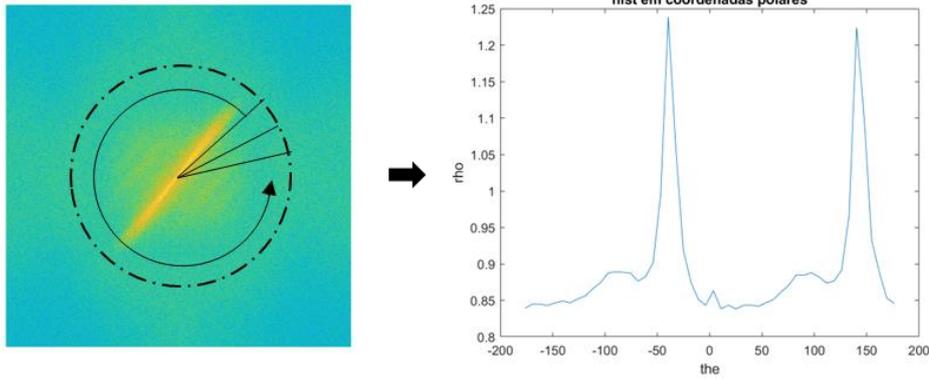


Figura 18: Fluxograma da análise de FFT. (esquerda) Espectro de Fourier e as secções radiais. (direita) Gráfico da distribuição das frequências pelas secções.

O número de secções é equivalente ao número de pontos apresentados no histograma. Por isso, para determinar em quantas frações era adequado dividir o espectro, teve-se em conta a representação gráfica dos dados (Figura 19 e Figura 20). Escolheu-se dividir o espectro em 50 secções. Por fim, para se obter as coordenadas para a representação gráfica, fez-se percorrer todas as secções da imagem, atribuindo a *rho* o valor da média da quantidade de ângulos de uma específica secção e a *the* a média dos ângulos dessa mesma secção (Figura 18). O desvio padrão do histograma (SD-FT) corresponde ao desvio padrão da variável *rho*.

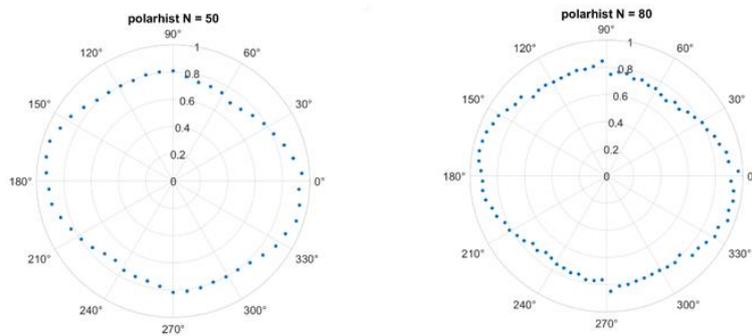


Figura 19: Histograma polar da distribuição das frequências do espectro de Fourier de um fantoma de teste, à esquerda com N=50 e à direita com N=80.

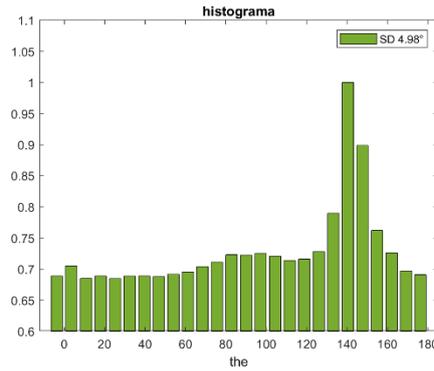


Figura 20: Representação do histograma polar da distribuição das frequências positivas do espectro de Fourier por 50 secções, de um fantoma de teste.

Para encontrar a orientação preferencial da imagem fez-se um ajuste a uma elipse. Apesar de existirem diversas abordagens para o ajuste elíptico, considerou-se mais adequado uma abordagem com base na equação geral para qualquer secção canónica [154]

$$Ax^2 + Bxy + Cy^2 + Dx + Ey + F = 0, \quad \begin{cases} \text{se } B^2 - 4AC < 0 \text{ é um círculo ou elipse} \\ \text{se } B^2 - 4AC = 0 \text{ é uma parábola} \\ \text{se } B^2 - 4AC > 0 \text{ é uma hipérbole} \end{cases} \quad (5.14)$$

Uma vez que esta equação é linear nos seus parâmetros A, B, C, D, E e F, tem uma solução linear de mínimos quadrados [155]. Portanto, o objetivo é através de um ajuste de mínimos quadrados e da equação cónica obter a equação canónica da elipse. Com recurso à função [156] obteve-se ajustes semelhantes ao representado na Figura 21, e a respetiva orientação, que corresponde à orientação do eixo da elipse com maior comprimento.

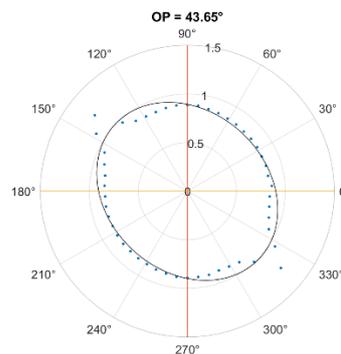


Figura 21: Ajuste elíptico ao histograma polar da distribuição das frequências do espectro de Fourier, em 50 secções.

Além da orientação das fibras na imagem, o ajuste da elipse ao histograma polar da distribuição das frequências pelas secções providência o parâmetro razão de aspeto

$$AR-FT = \frac{L_{eixo\ maior}}{L_{eixo\ menor}} \quad (5.15)$$

razão entre o comprimento do eixo menor da elipse pelo comprimento do eixo maior. Este parâmetro apenas assume valores superiores a 1. Para valores próximos de 1, indica uma estrutura pouco organizada e, para valores mais afastados de 1, uma estrutura organizada com uma orientação bem definida.

5.2.3 Análise Estatística

Alterações estatisticamente significativas para a correlação entre os valores das orientações preferenciais e dos parâmetros calculados pelos métodos, foram avaliadas primeiramente com o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Como os dados não seguiram uma distribuição gaussiana, foi utilizado o teste não paramétrico, teste de *Wilcoxon*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para valores de p inferiores a 0,05.

5.3 Fantomas

As fibras de colagénio presentes no estroma podem apresentar variados padrões de organização, portanto houve a necessidade de definir critérios distintos, de acordo com as diferentes organizações encontradas na literatura.

Uma imagem aleatória é gerada usando uma distribuição aleatória caracterizada por vários parâmetros. Estes parâmetros estão divididos para controlar seis aspetos importantes: (i) as lamelas de fibras de colagénio (*patches*), (ii) a probabilidade, amplitude e frequência da tortuosidade das fibras em cada lamela, (iii) a atenuação da tortuosidade, (iv) variação e densidade das fibras por lamela, (v) o ruído de fundo adicionado e (vi) a variação com que lamelas diferentes, com características diferentes, aparecem na imagem. Para simular as estruturas fibrilares, são inseridos valores aleatórios de intensidade dos pixels, numa direção aleatória constante ao longo da lamela. As tortuosidades são simuladas

introduzindo funções trigonométricas que são controladas pelos parâmetros de entrada referidos acima. O software utilizado foi desenvolvido em colaboração com o CIBIT/ICNAS¹. Tem-se que o estroma é composto por lamelas estreitas de fibras de colagénio alinhadas em orientações aleatórias. No entanto, em cada lamela as fibras de colagénio podem apresentar um alinhamento diferente entre si^[157]. Com isto, o primeiro fator foi definido como a organização das fibras de colagénio por lamela e o segundo como a complexidade lamelar. O terceiro e último fator foi determinado como a variabilidade intra-lamelar, algo que se observa em tecidos biológicos mais desorganizados^[158]. Gerou-se 20 fantasmas de acordo com cada fator, com um aumento progressivo de desorganização.

5.3.1 Organização das fibras de colagénio por lamela

O primeiro fator foi definido como a variação do alinhamento entre fibras de colagénio numa lamela. Começou-se por definir um padrão organizado (Figura 22(a)), onde o alinhamento das fibras na lamela é paralelo e estas não apresentam ondulações (tortuosidades). O aumento da desorganização deste padrão estrutural baseou-se na introdução de tortuosidades em cada fibra da lamela e no conjunto das fibras. Para introduzir as tortuosidades definiu-se um fator que se fez variar linearmente e, se multiplicou pelos parâmetros responsáveis pela probabilidade, amplitude e frequência das tortuosidades. Os parâmetros que controlam a atenuação das tortuosidades foram mantidos a zero. Os restantes parâmetros permaneceram inalterados. Na Figura 22 estão representados exemplos das imagens geradas, (a) a primeira, (b) uma imagem intermédia e (c) a última imagem gerada. Na Figura 22(b) tem-se o exemplo de uma estrutura onde as fibras apresentam tortuosidades individuais e, na Figura 22(c) o exemplo em que, para além da tortuosidade de cada fibra, também está presente uma tortuosidade aplicada a todas as fibras. Portanto, ao aumentar o fator de multiplicação, aumenta-se gradualmente a frequência e amplitude tanto das tortuosidades individuais das fibras como da tortuosidade do conjunto de fibras.

¹ CIBIT - *Coimbra Institute for Biomedical Imaging and Translational Research*, ICNAS - Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde

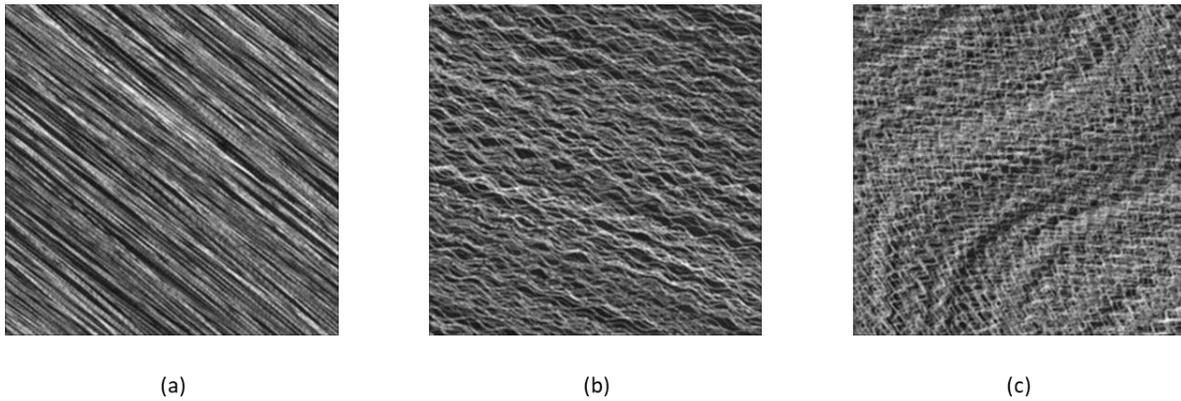


Figura 22: Fantomas gerados de acordo com o 1º fator de desorganização, (a) primeiro fantoma, (b) fantoma intermédio e (c) último fantoma.

5.3.2 Complexidade lamelar

Verificou-se que uma estrutura com maior complexidade lamelar (mais lamelas e com mais interseções entre elas) era uma estrutura mais desorganizada que uma estrutura lamelar simples. Por isso, para o segundo fator gerou-se imagens em que o aumento de desorganização se define como o aumento do número de lamelas e consequente aumento da sobreposição entre estas. Ao contrário do primeiro fator, não se introduziu qualquer tipo de tortuosidade, apenas se aumentou linearmente a quantidade de lamelas por imagem. É possível observar a evolução da desorganização na Figura 23. Começou-se por gerar uma imagem com uma lamela com fibras paralelas entre si e sem tortuosidade (estrutura organizada, Figura 23(a)), e aumentou-se gradualmente o número de lamelas até 20 (Figura 23(c)). Na Figura 23(b) está um exemplo de um fantoma intermédio (10 lamelas). Apenas se alterou no início o valor de todos os parâmetros responsáveis pelas tortuosidades para zero, que se manteve constante durante o processo. Os restantes parâmetros permaneceram inalterados.

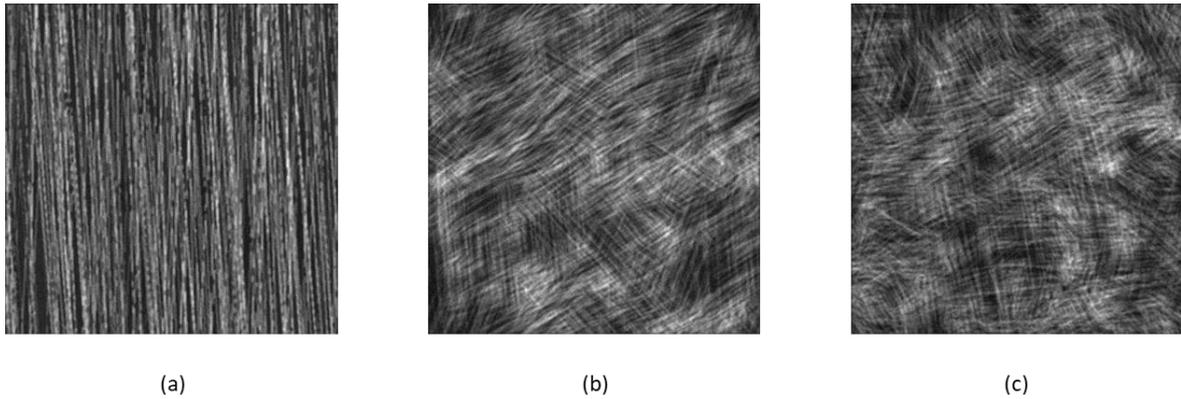


Figura 23: Fantomas gerados de acordo com o 2º fator de desorganização, (a) primeiro fantoma com uma lamela, (b) fantoma intermédio com 10 lamelas e (c) último fantoma com 20 lamelas.

5.3.3 Variabilidade intra-lamelar

Por último, foi considerado como fator a variabilidade da organização das fibras dentro de cada lamela. Por forma a simular um aumento da variabilidade intra-lamelar apenas se variou linearmente o parâmetro que controla a organização das fibras dentro da lamela. Ou seja, ao aumentar gradualmente este parâmetro foi possível simular o aumento da desorganização através do aumento da interseção das fibras sem tortuosidade em cada lamela. Para este caso geraram-se imagens com apenas duas lamelas. Na Figura 24(a) verifica-se que as fibras em cada lamela apresentam uma estrutura alinhada entre si (estrutura organizada). Já na imagem intermédia (Figura 24(b)), em que a variação da orientação das fibras em cada lamela é superior, identifica-se uma estrutura mais desorganizada. Na última imagem gerada (Figura 24(c)), em que se aplicou a variação mais elevada, observa-se que devido à sobreposição das fibras e interseção das lamelas as fibras perdem definição, apresentando um arranjo completamente desorganizado. Como o objetivo era gerar estruturas desorganizadas com base na interseção das fibras, não foi aplicada qualquer tipo de tortuosidade. Todos os parâmetros, para além dos referidos, permaneceram inalterados.

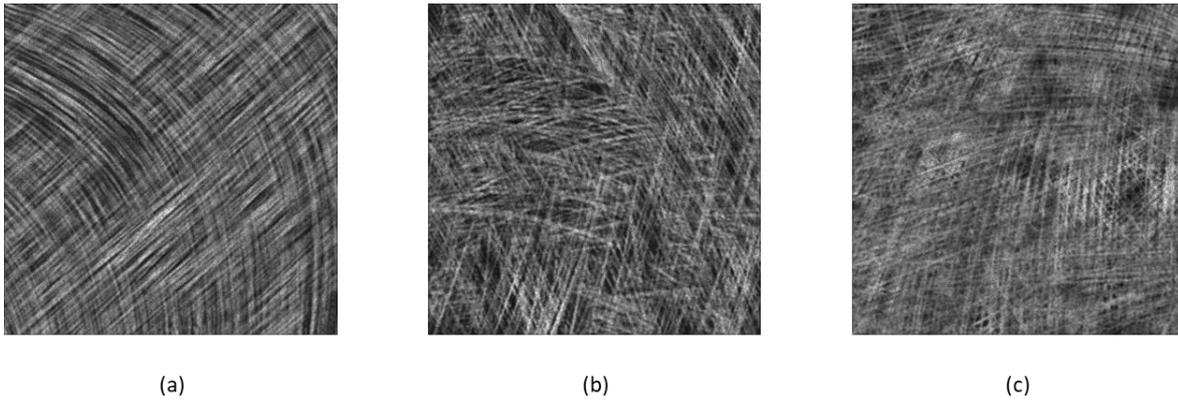


Figura 24: Fantomas gerados de acordo com o 3º fator de desorganização, (a) primeiro fantoma, (b) fantoma intermédio e (c) último fantoma.

5.4 Amostras

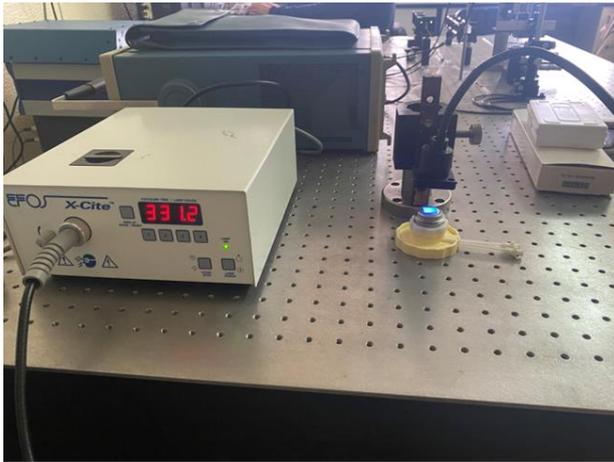
Tanto os cortes de córnea como as córneas intactas humanas foram fornecidas pelo Banco de Olhos do Centro de Responsabilidade Integrado de Oftalmologia, Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, Portugal. As amostras foram obtidas de doadores sem doenças na córnea e foram descartadas para transplante devido a problemas de viabilidade, como baixa contagem de células endoteliais. O estudo foi conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial para o uso científico de tecido humano.

5.4.1 Crosslinking (CXL)

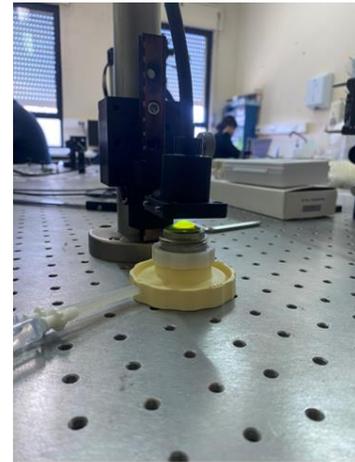
Pretendia-se utilizar diferentes amostras, com diferentes organizações estruturais das fibras de colagénio, de modo a analisar qualitativamente e quantitativamente as imagens SHG respetivas. Foi relatado que o uso de SHG tem a capacidade de detetar alterações na organização das fibras de colagénio induzidas pela reticulação do colagénio corneano^[157], um procedimento médico comum utilizado para o tratamento de *keratoconus*^[159].

O CXL foi realizado após remover o epitélio da córnea aplicando a solução de riboflavina a 0.1% (Vibex rapid™ Avedro, Inc., MA, USA) a cada 2 *min* durante 20 *min* e irradiando a

amostra com uma fonte de luz UVA por 10 *min*. A irradiação UVA foi realizada usando uma configuração CXL adaptada que consiste numa fonte de luz emitindo num comprimento de onda de 365 *nm* montada num suporte universal e num suporte de camara anterior artificial (Figura 25). Foi utilizada uma irradiância total de 12 *mW/cm²* correspondente a uma dose de energia de 7,2 *J/cm²*.



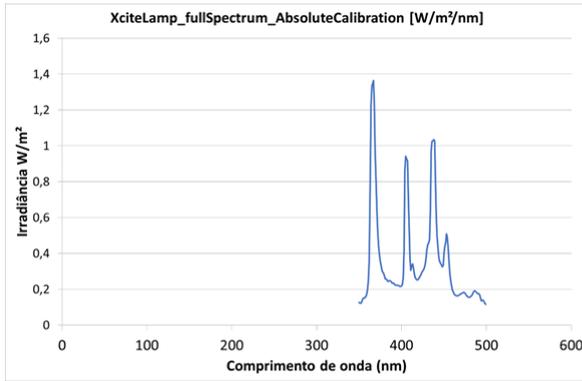
(a)



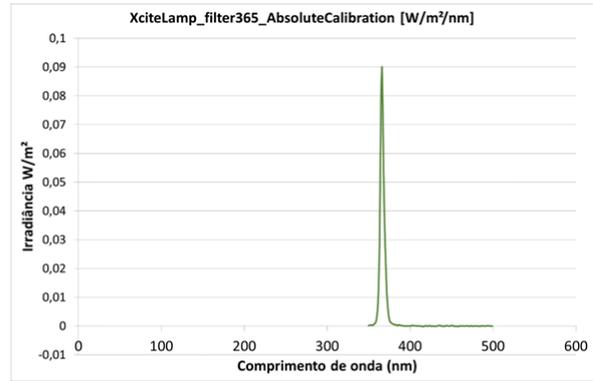
(b)

Figura 25: Configuração adaptada para irradiação da córnea com luz UVA (a), com *close-up* do processo de irradiação da córnea (b).

Procedeu-se à medição do espectro de emissão da fonte utilizada, com recurso a um espectrofotómetro, de modo a averiguar as alterações necessárias para cumprir os requisitos do procedimento. A fonte UV (EFOS X-Cite, EXFO Photonic Solutions Inc., Mississauga, Canada) utilizada tem uma gama espectral de 350 a 500 *nm*, como se pode observar pelo seu espectro de emissão na Figura 26(a). Foi, portanto, necessário adicionar um filtro passa-banda centrado em 365 *nm*. O espectro de emissão da fonte de luz com o filtro aplicado está representado na Figura 26(b), tem uma emissão máxima em 366 *nm* com uma largura a meia altura de $5,00 \pm 1,28$ *nm*.



(a)



(b)

Figura 26: Espectro calibrado de emissão da fonte UV sem filtro (a) e espectro calibrado de emissão da fonte com filtro (b).

Foi necessário projetar um suporte para as amostras que permitisse a aquisição simultânea de imagens SHG em transmissão e reflexão. Teve-se em conta o diâmetro padrão da córnea humana, a sua forma convexa e a altura máxima que poderia ter para encaixar no sistema de aquisição. O resultado foi um suporte circular oco, para permitir a passagem do sinal pela amostra, com umas patilhas imóveis de forma a manter a amostra imóvel durante a aquisição (Figura 27).



Figura 27: Suporte elaborado para a aquisição simultânea de imagens SHG em transmissão e reflexão, para córneas humanas inteiras.

6. Resultados

O principal objetivo do trabalho realizado foi implementar dois métodos quantitativos, já existentes na literatura, de modo a comparar o seu desempenho e a sua eficácia em avaliar fatores que levam ao aumento da desorganização das fibras de colagénio. E ainda comparar a sua eficiência em aferir a organização estrutural das fibras de colagénio no estroma corneano, em imagens SHG. Para isso, primeiro demonstrou-se a viabilidade dos diferentes métodos quando aplicados aos fatores de desorganização definidos. Em seguida, aplicou-se os métodos a três fantasmas representativos de cada fator, em que o nível de desorganização aumentava de forma sequencial, com o intuito de mostrar em detalhe a aplicabilidade dos métodos e averiguar a invariância à escala. Por fim, demonstrou-se o potencial de cada método em classificar o arranjo estrutural do colagénio de cortes de córneas humanas, em imagens SHG adquiridas em transmissão e reflexão.

6.1 Método ST

6.1.1 Validação do método

A validação do processo passou por observar o seu comportamento quando aplicado a imagens com diferentes níveis de organização. Para tal, aferiu-se a relação entre os parâmetros D_{ol-ST} e S_{D-ST} e o aumento da desorganização estrutural em 60 fantasmas, 20 de cada um dos três critérios de desorganização. As representações gráficas dos valores dos parâmetros em função da desorganização são apresentadas nas Figura 28 e Figura 29.

Como podemos ver nas figuras, os diferentes parâmetros têm desempenhos distintos dependendo do fator considerado para aumentar o nível de desorganização da estrutura de

colagénio. O parâmetro Dol-ST apresenta um claro decréscimo à medida que o nível de desorganização das imagens aumenta, quando se considera um aumento da tortuosidade das fibras (Figura 28(a)) e a complexidade lamelar (Figura 28(b)). Embora, se observe apenas um ligeiro decréscimo para o terceiro critério (Figura 28(c)), variabilidade intra-lamelar, existe uma dependência do grau de isotropia com o aumento da desorganização dos critérios analisados.

O parâmetro SD-ST também mostrou ser capaz de quantificar alterações causadas pelo aumento da tortuosidade (Figura 29(a)) das fibras e complexidade lamelar (Figura 29(b)). Contudo, este parâmetro falha quando se considera um aumento da variação do alinhamento das fibras dentro de cada lamela como fator de desorganização. Como visível na Figura 29(c), o parâmetro SD-ST não está linearmente relacionado com o aumento do nível de desorganização (Figura 28(c)).

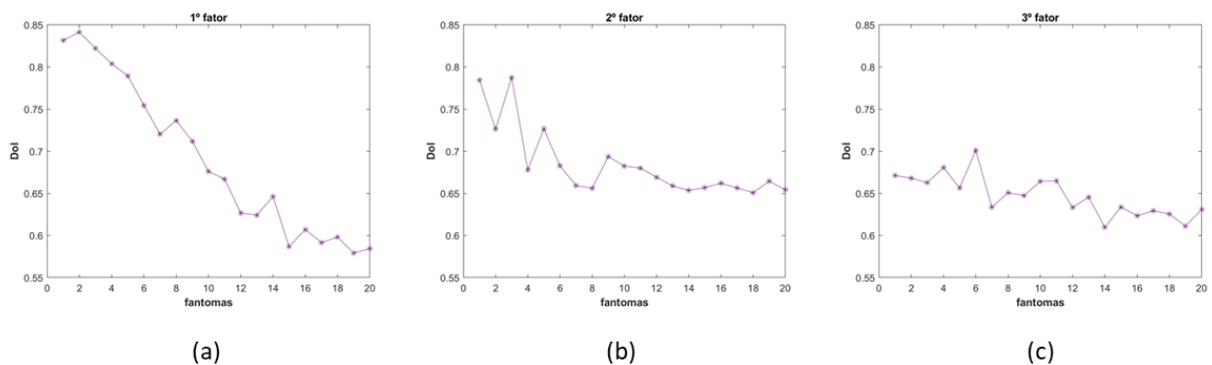


Figura 28: Dependência do parâmetro Dol-ST com o aumento da desorganização de fantomas, para três fatores diferentes de desorganização: (a) organização das fibras de colagénio por lamela, (b) complexidade lamelar e (c) variabilidade intra-lamelar. Para cada fator foram avaliados 20 fantomas.

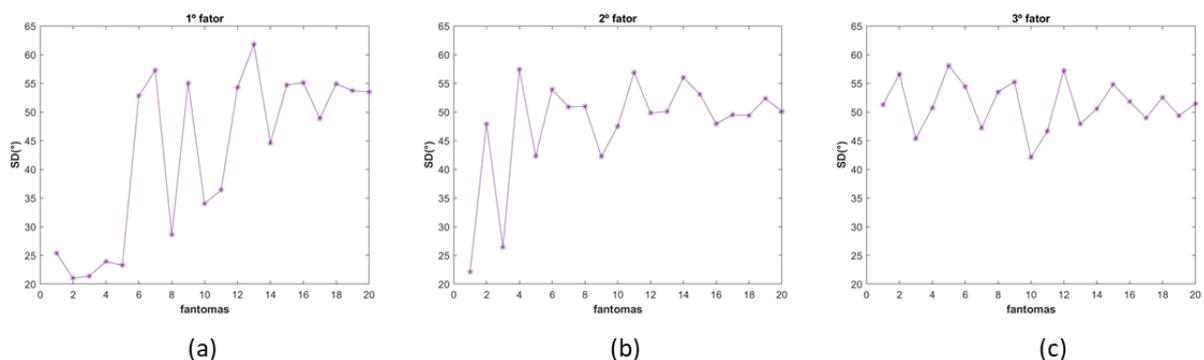


Figura 29: Dependência do parâmetro SD-ST com o aumento da desorganização de fantomas, para três fatores de desorganização: (a) organização das fibras de colagénio por lamela, (b) complexidade lamelar e (c) variabilidade intra-lamelar. Para cada fator foram avaliados 20 fantomas.

Pelos resultados anteriores, tem-se que o parâmetro DoI-ST diminui com o aumento da desorganização estrutural para os diferentes critérios de organização e, que o parâmetro SD-ST aumenta, excepto para o critério de variabilidade intra-lamelar. Com isto, verificou-se se existia uma correlação entre os dois parâmetros deste método. Como apresentado na Figura 30, observa-se uma relação aproximadamente linear entre DoI-ST e SD-ST para os dois primeiros critérios, enquanto que, como esperado, o mesmo não se verifica para o 3º fator de desorganização.

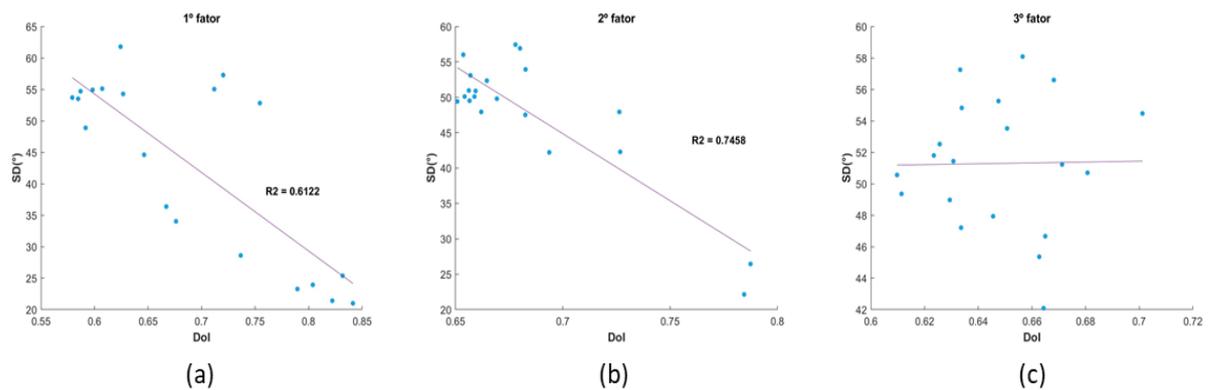


Figura 30: Relação linear entre o parâmetro SD-ST e DoI-ST para 20 fantomas gerados segundo três fatores diferentes de desorganização.

Em geral, estes resultados indicam que o método ST é capaz de identificar diferentes padrões estruturais e o aumento de desorganização destes. No entanto, não se mostra competente a detetar a orientação preferencial o critério de desorganização tem por base a variabilidade intra-lamelar.

6.1.2 Aplicação e Invariância à escala

A aplicabilidade dos métodos foi demonstrada em mais detalhe em três fantomas que exemplificam o aumento do nível de desorganização sequencial, gerados segundo o primeiro critério de desorganização, aumento da tortuosidade das fibras numa lamela. Estes fantomas estão representados na Figura 22 da secção 5.3.1.

Os mapas de DoI-ST e respetivos valores para os fantomas representativos são apresentados na Figura 31. Como esperado, o fantoma com maior nível de organização

(Figura 31(a)) é caracterizado por um elevado valor de Dol-ST quando comparado com os outros fantasmas analisados. Este fantoma apresenta estruturas alongadas alinhadas umas com as outras, numa única direção. De acordo com a classificação que Ávila *et. al*^[17] definiram, seu valor de Dol-ST indica que o fantoma possui uma estrutura bem organizada (>0.70). Como indicado pelos resultados anteriores, observa-se uma diminuição do valor de Dol-ST com o nível de organização. A Figura 32 apresenta os histogramas da distribuição de OP dos fantasmas. Tal como na Figura 31(a), o valor do desvio padrão do histograma OP indica que este apresenta uma estrutura arranjada ao longo de uma orientação preferencial bem definida, aproximadamente igual a -39° . Para o segundo fantoma, o histograma apresenta também pico relativamente acentuado, centrado aproximadamente em -25° . Para o último fantoma, o qual apresenta uma maior desorganização, o seu histograma OP apresenta-se mais homogéneo e com um valor SD-ST mais elevado que os anteriores. Apesar de os três fantasmas constituírem uma pequena amostra, estes resultados são concordantes com os resultados da secção anterior. Dol-ST diminui e SD-ST aumenta com o aumento da desorganização.

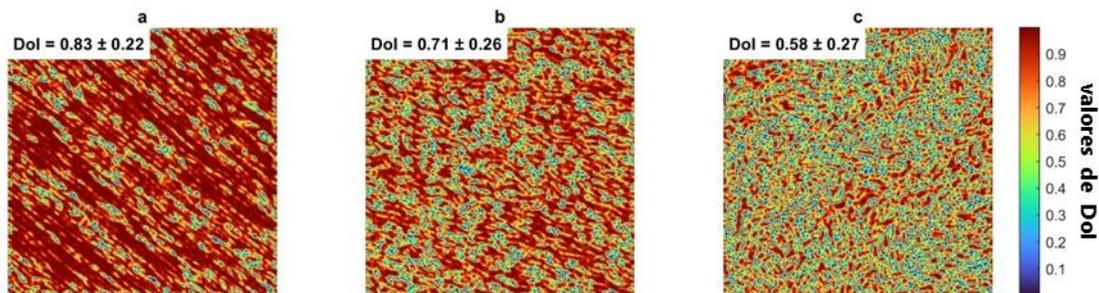


Figura 31: Mapas de Dol-ST dos fantasmas representativos do critério de desorganização com base na organização das fibras em cada lamela. Aumento de desorganização de *a* para *c*. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de Dol-ST ao longo de imagem. A visualização dos mapas dá uma ideia de como estes se comportam com o aumento da desorganização.

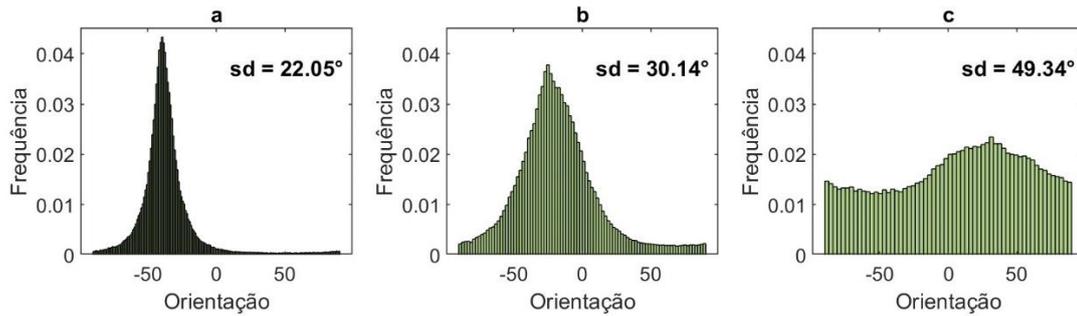


Figura 32: Histogramas normalizados da distribuição da orientação dos fantasmas representativos do critério de desorganização com base na organização das fibras em cada lamela. Estão incluídos os valores SD-ST correspondentes.

Para averiguar a invariância à escala, foram analisados três fantasmas representativos de cada um dos critérios de desorganização, representados nas Figura 22, Figura 23 e Figura 24.

Escolheram-se seis tamanhos diferentes para as regiões de interesse, desde 62x62 pixels até 512x512 pixels. Foi determinado um ponto na imagem e fez-se aumentar a região de interesse à volta desse ponto, de forma que a região da imagem fosse sempre a mesma, até ao tamanho total da imagem. A variação dos parâmetros DoI-ST e SD-ST com o aumento do tamanho da região de interesse e, a respetiva média, de cada trio de fantasmas representativos dos três critérios de desorganização encontra-se representado na Figura 33 e Figura 34, respetivamente. Para os primeiros fatores, os resultados de DoI-ST são semelhantes. Não se observa nenhum decréscimo ou aumento acentuado para a dependência com o tamanho das regiões de interesse, i.e., é invariante à escala (Figura 33(a) e (b)). Os resultados de SD-ST para o primeiro critério são concordantes com os de DoI-ST, mas para o segundo critério observa-se uma ligeira variação até regiões com tamanhos iguais a 332x332 pixels, em ambos os parâmetros. No entanto, apesar de DoI-ST apresentar um comportamento aproximadamente constante para o terceiro critério (Figura 33(c)), SD-ST apresenta um aumento linear para tamanhos iguais ou superiores que 152x152 pixels (Figura 34(c)).

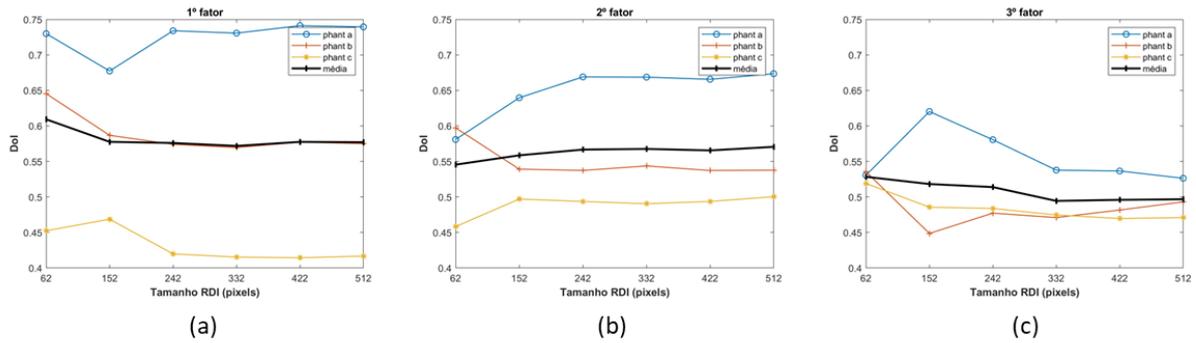


Figura 33: Dependência dos valores de Dol-ST médios com o tamanho de regiões de interesse (RDI) quadradas de 62, 152, 242, 332, 422 e 512 pixels. Valores de Dol-ST de três fantasmas com diferentes níveis de organização para três critério de desorganização: (a) organização das fibras de colagénio por lamela, (b) complexidade lamelar e (c) variabilidade intra-lamelar.

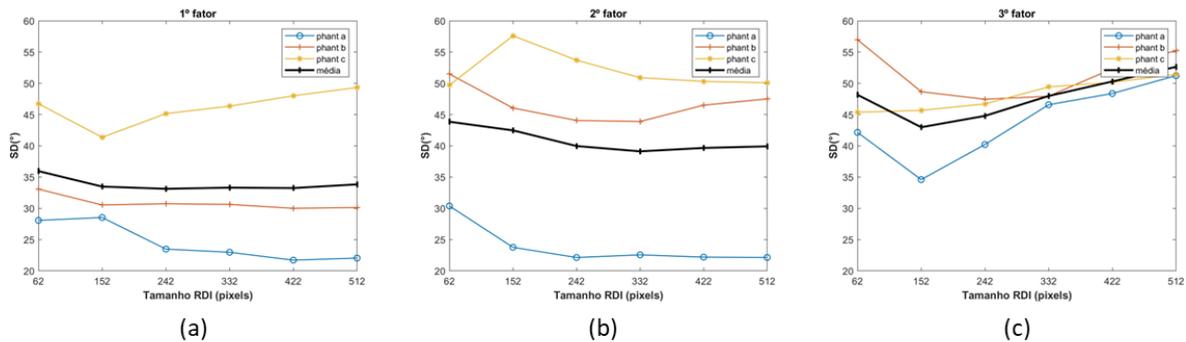


Figura 34: Dependência dos valores de SD-ST médios com o tamanho de RDI quadradas de 62, 152, 242, 332, 422 e 512 pixels. Valores de SD-ST de três fantasmas com diferentes níveis de organização para três critério de desorganização: (a) organização das fibras de colagénio por lamela, (b) complexidade lamelar e (c) variabilidade intra-lamelar.

6.2 Método FT

6.2.1 Validação do método

Em semelhança ao método anterior, avaliou-se para 60 fantasmas, 20 de cada fator de desorganização, a evolução do parâmetro AR-FT (Figura 35) e do parâmetro SD-FT (Figura 36). Em ambas as figuras, os gráficos revelam algumas discrepâncias, no entanto existe uma tendência decrescente, tanto no valor de AR-FT como no de SD-FT para os três critérios de

desorganização. O terceiro fator, desorganização com base na variabilidade da disposição das fibras por lamela, é o que apresenta uma maior variância de valores nas curvas de AR-FT e SD-FT (Figura 35(c) e Figura 36(c)). Ainda que se observe apenas um ligeiro decréscimo do parâmetro AR-FT com o terceiro critério, é possível verificar que o comportamento do método FT, perante padrões de desorganização diferentes e o aumento da desorganização destes, é de acordo com o esperado.

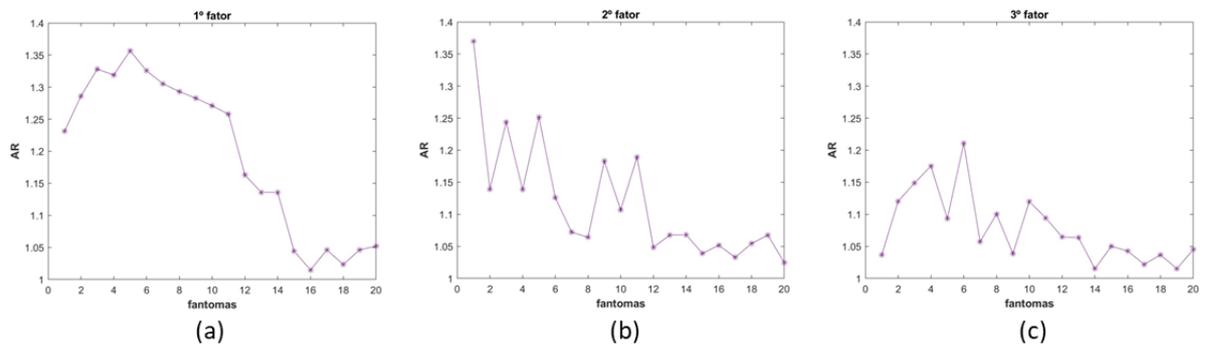


Figura 35: Dependência do parâmetro SD-FT com o aumento da desorganização, para três fatores diferentes de desorganização definidos. Para cada fator foram avaliados 20 fantomas.

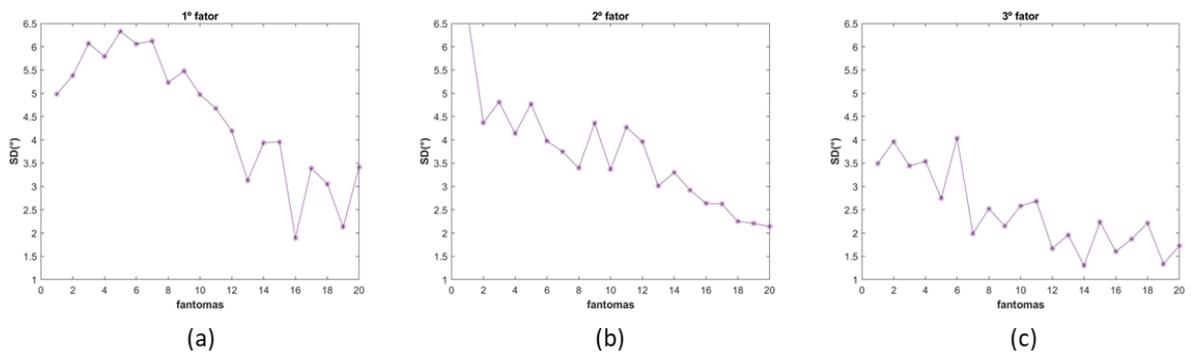


Figura 36: Dependência do parâmetro SD-FT com o aumento da desorganização, para três fatores diferentes de desorganização definidos. Para cada fator foram avaliados 20 fantomas.

Como se verifica a mesma tendência decrescente dos parâmetros AR-FT e SD-FT, averiguou-se a relação entre estes. Para os três critérios propostos, verificou-se uma relação de proporcionalidade direta entre AR-FT e SD-FT, ou seja, ambos variam igualmente à medida que a desorganização das fibras aumenta. Contudo, para o terceiro critério encontrou-se um valor de R-quadrado menor para a relação de AR-FT e SD-FT, o que era

esperado dado que os resultados anteriores (Figura 35 e Figura 36) apresentam uma maior oscilação entre valores para este critério.

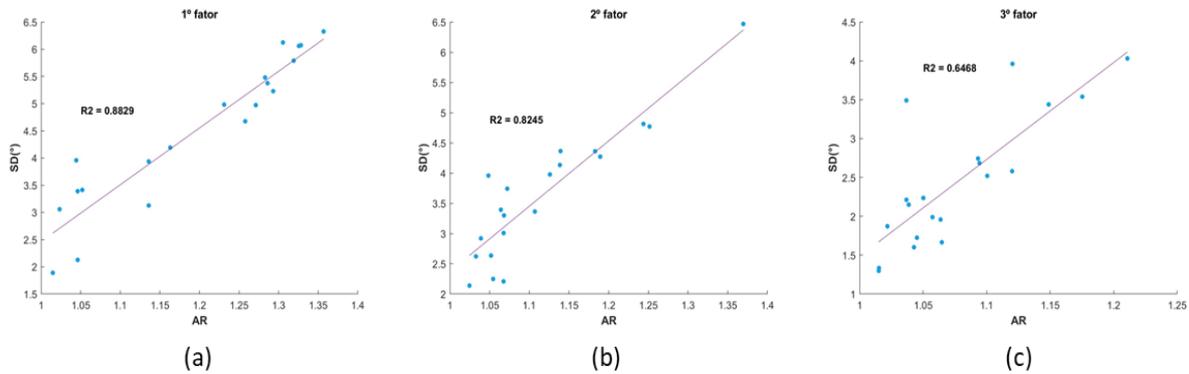


Figura 37: Relação linear entre o parâmetro SD-FT e AR-FT para 20 fantasmas gerados segundo três fatores diferentes de desorganização.

O método FT é capaz de identificar diferentes padrões estruturais e o aumento de desorganização destes.

6.2.2 Aplicação e Invariância à escala

A implementação do método FT foi igualmente demonstrada com mais pormenor, para os três fantasmas exemplo do primeiro critério de desorganização (Figura 22).

O ajuste da elipse ao espectro de amplitude de frequências de cada fantoma foi determinado, assim como a OP, e representado em gráficos polares (Figura 38). Como esperado, o ajuste apresenta uma forma elíptica mais bem definida quando a imagem contém um nível de desorganização baixo (Figura 38(a)) e, uma forma mais circular quando a desorganização é elevada (Figura 38(c)).

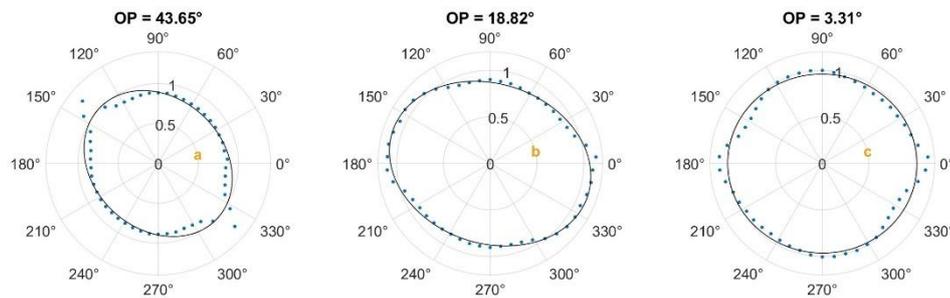


Figura 38: Ajuste da elipse e respetiva orientação preferencial dos fantasmas a, b e c, representativos do critério de desorganização com base na organização das fibras em cada lamela.

O parâmetro AR-FT foi calculado para ajuste e obteve-se os resultados apresentados na Tabela 2. Era esperado que, para um padrão mais organizado, o valor de AR-FT assumisse valores superiores a 1, e quanto mais organizado mais este valor seria superior a 1. Para um padrão não organizado, é esperado que AR-FT se aproxime de 1. Sendo o fantoma *a* aquele que contém a estrutura mais organizada de entres os 3, o seu ajuste elíptico deveria apresentar o valor de AR-FT mais elevado, mas tal não se sucede. No entanto, o fantoma Figura 22(c) apresenta um AR-FT próximo de 1 como expectável.

Tabela 2: Valores de AR-FT dos fantasmas a, b e c representados na Figura 22, representativos do critério de desorganização com base na organização das fibras em cada lamela.

AR-FT		
a. 1.2312	b. 1.2829	c. 1.0520

Na Figura 39 estão caracterizados os histogramas da parte positiva do espetro de Fourier. A representação da parte positiva é suficiente dado que o espetro é simétrico em relação à origem. Este histograma não contém informação direta acerca da orientação preferencial, como no método ST. No entanto é notório um aumento da homogeneidade nos histogramas de fantoma para fantoma. Outra informação presente, é o valor de SD-FT, que corresponde ao desvio padrão da variável *rho*. Como referido na secção 5.2.3, agrupou-se em secções os valores das frequências do espetro da imagem segundo *theta*, variável que representa todos os ângulos do espetro. A todas as secções corresponde um valor de *rho*, quantidade de ângulos dessa secção existente na imagem. Portanto, é a variável *rho*

que nos indica a orientação preferencial. Verifica-se que a variação de SD-FT não é linear com o aumento da desorganização.

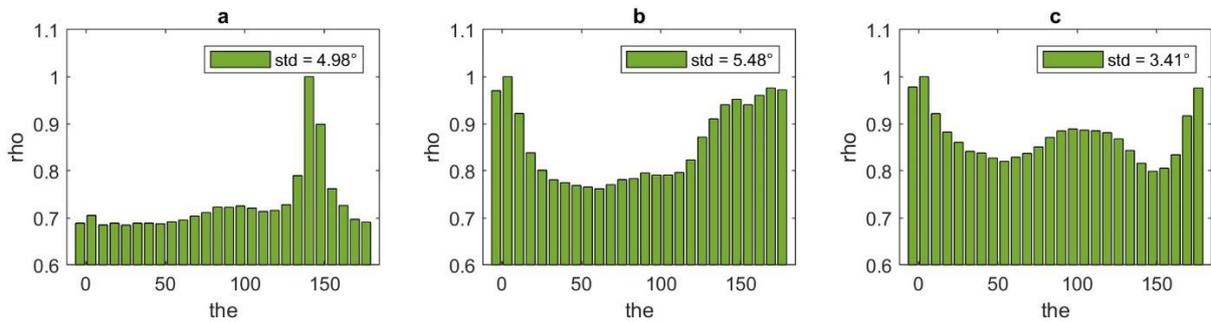


Figura 39: Gráfico de barras normalizado com desvio padrão da variável rho, dos fantasmas *a*, *b* e *c*, representativos do critério de desorganização com base na organização das fibras em cada lamela..

Em semelhança à análise com o método ST, averiguou-se a dependência dos parâmetros AR-FT e SD-FT com o tamanho da região de interesse em análise, utilizando a mesma prática descrita na secção 6.1.2 (Figura 40 e Figura 41). O parâmetro AR-FT revela um decréscimo com o aumento do tamanho da região, para os dois primeiros fatores. No entanto, para tamanhos iguais ou superiores a 242 pixels de lado, o comportamento de AR-FT evolui de forma aproximadamente constante. Para tamanhos inferiores o decréscimo é mais evidente. Para o terceiro critério, o decréscimo é evidente até 422x422 pixels. AR-FT é variante com a escala.

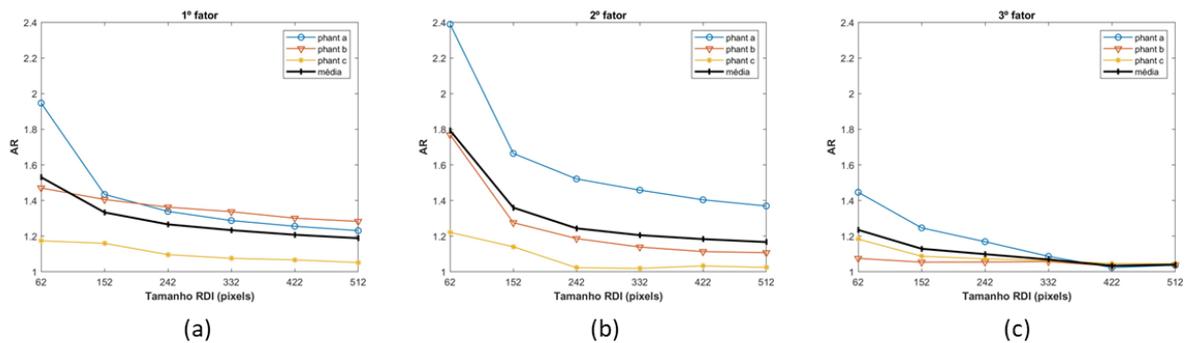


Figura 40: Dependência dos valores de AR-FT com o tamanho de RDI quadradas de 62, 152, 242, 332, 422 e 512 pixels. Valores de AR-FT de três fantasmas com diferentes níveis de organização para três critérios de desorganização: (a) organização das fibras de colagénio por lamela, (b) complexidade lamelar e (c) variabilidade intra-lamelar.

Enquanto para AR-FT se observou um comportamento semelhante, para os três fantasmas representativos dos três critérios, para SD-FT tal não acontece. Para o primeiro critério, o

comportamento de SD-FT para regiões entre 152x152 pixels e 332x332 pixels é aproximadamente constante, no entanto é visível um ligeiro decréscimo pelo que SD-FT é variante com a escala. As médias de SD-FT para os últimos dois critérios, apresentam um ligeiro decréscimo, mostrando-se variantes com a escala.

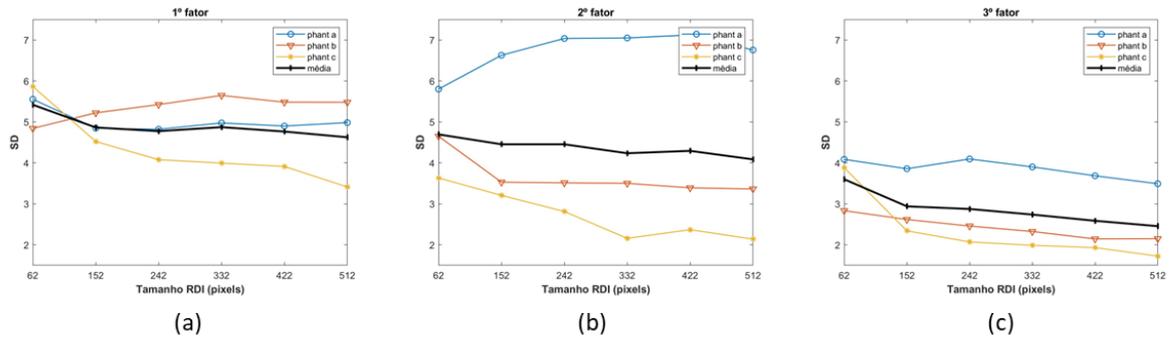


Figura 41: Dependência dos valores de SD-FT com o tamanho de RDI quadradas de 62, 152, 242, 332, 422 e 512 pixels. Valores de SD-FT de três fantasmas com diferentes níveis de organização para três critério de desorganização: (a) organização das fibras de colagénio por lamela, (b) complexidade lamelar e (c) variabilidade intra-lamelar.

6.3 Imagens SHG

Por forma a avaliar a eficiência dos métodos em imagens SHG, foram analisadas imagens adquiridas simultaneamente em transmissão e reflexão, de cortes de córneas humanas. Na Figura 42 estão representados dois exemplos representativos de imagens de duas amostras marcadas com H&E, amostra E1 (Figura 42(a) e (b)) e E2 (Figura 42(c) e (d)). As imagens (a) e (c) da Figura 42 foram adquiridas em modo de transmissão, enquanto as imagens (b) e (d) apresentam a mesma região adquirida em modo de reflexão. Como referido na secção 5.1.3, o sinal SHG é afetado pelos corantes H&E, e é possível observar essa influência ao observar os pares de imagens de cada amostra. Nas imagens abaixo, (b) e (d), o sinal SHG detetado em modo de reflexão é menos difuso que o sinal transmitido (Figura 42(a) e (c)), e dever-se-ia verificar o oposto como relatado na literatura^[160]. Identificou-se o mesmo nas restantes imagens adquiridas, de ambas as amostras.

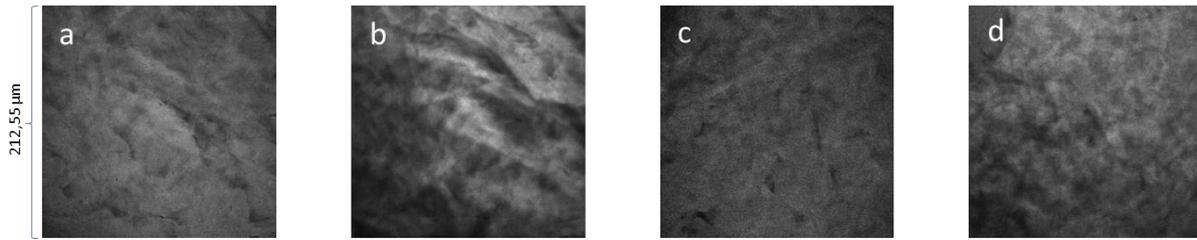


Figura 42: Imagens SHG utilizadas como exemplo para demonstração dos métodos. *a* e *c* são imagens adquiridas na geometria de transmissão e *b* e *d* são as imagens correspondentes adquiridas na geometria de reflexão.

6.3.1 Método ST

Na Figura 43 estão representados os mapas de Dol-ST e os respetivos valores médios de Dol-ST de cada uma das imagens representativa. Os resultados indicam que os valores de Dol-ST de cada par de imagens (transmissão e reflexão) são próximos, pelo que o método identifica estruturas semelhantes nas imagens. O mesmo se verifica pelos histogramas de OP (Figura 44). O método mostra-se consistente para as duas amostras.

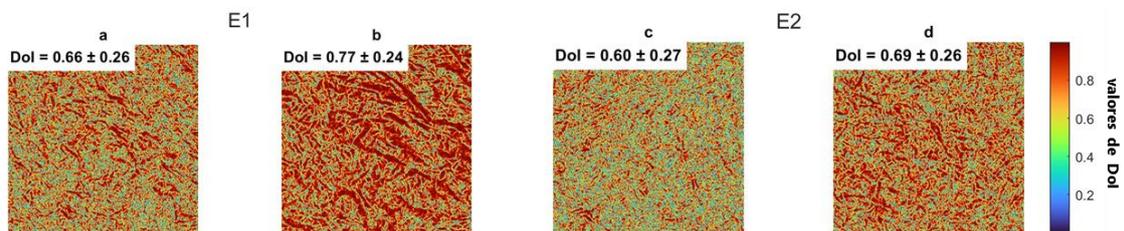


Figura 43: Mapas de Dol-ST das imagens exemplo, imagens *a* e *c* adquiridas em transmissão e *b* e *d* em reflexão. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de Dol-ST ao longo de imagem. A visualização dos mapas dá uma ideia de como estes se comportam em imagens adquiridas nas duas geometrias.

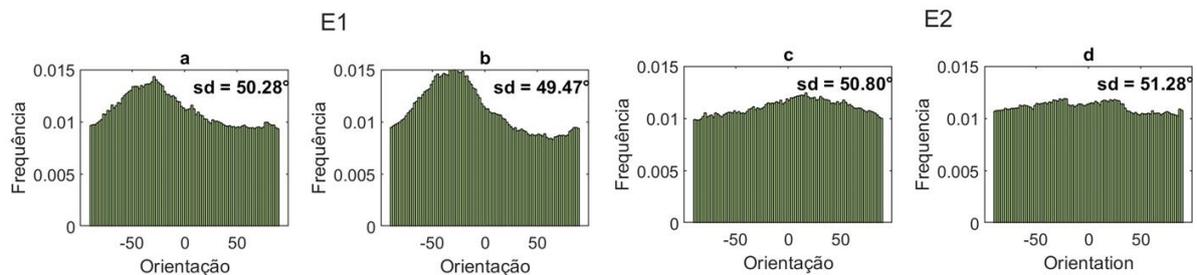


Figura 44: Histogramas de distribuição da orientação das imagens exemplo, calculada pelo método ST. Estão incluídos os valores SD-ST correspondentes.

Para os seguintes resultados, foram analisadas 94 imagens da amostra E1 e 100 da amostra

E2, metade adquiridas em transmissão e a outra metade em reflexão em ambas as amostras. Os grupos definidos como T e R correspondem às imagens adquiridas em transmissão e em reflexão, respetivamente. Na Figura 45 estão representados os valores de OP em função da geometria em que foram adquiridas as imagens para as duas amostras. Para esta análise, o valor de OP corresponde à média do histograma da distribuição de OP para cada imagem. Pode-se verificar que, para a amostra E1 (Figura 45(a)), as orientações preferenciais encontradas, para cada grupo, são semelhantes. As medianas não apresentam diferenças significativas com $p = 0.6071$. Para a amostra E2 (Figura 45(b)), os grupos mostram-se significativamente diferentes ($p = 0.0060$), a diferença entre as medianas é mais elevada para E2 e, o grupo R apresenta uma variância maior de valores OP.

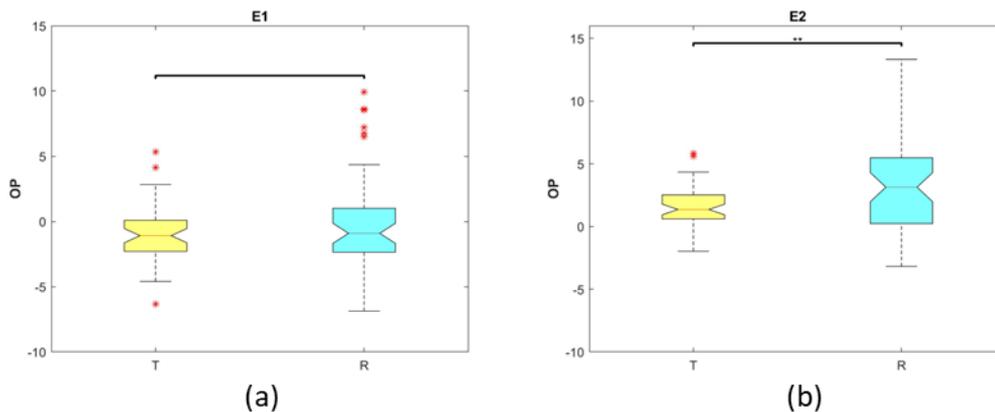


Figura 45: Variação da mediana \pm erro padrão da mediana (e.p.m.) entre os valores da orientação preferencial, determinados com o método ST, de grupos de imagens SHG adquiridas em transmissão (T) e em reflexão (R). (a) cortes de córnea humana E1 e (b) cortes de córnea humana E2. Realizado o teste estatístico Wilcoxon, $**p < 0.01$.

Quanto aos valores de Dol-ST (Figura 46), as imagens adquiridas em T e R, resultam em valores de Dol-ST são significativamente diferentes para as duas amostras, com $p = 4.6052E-16$ e $p = 7.9581E-18$, para E1 (Figura 46(a)) e E2 (Figura 46(b)), respetivamente. Para além das medianas não serem significativamente relacionadas, também se observa uma diferença nas variâncias dos valores entre grupos, nas duas amostras.

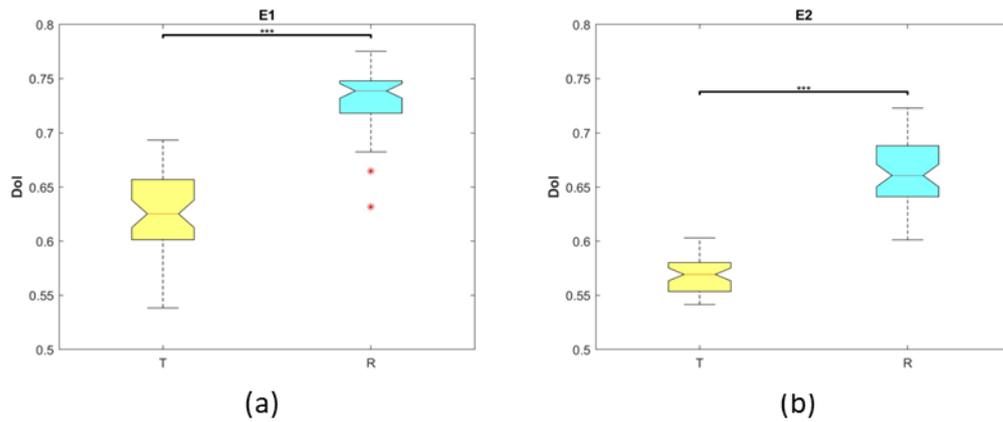


Figura 46: Variação da mediana \pm (e.p.m.) entre os valores de Dol de grupos de imagens SHG adquiridas em transmissão (T) e em reflexão (R). (a) cortes de córnea humana E1 e (b) cortes de córnea humana E2. Realizado o teste estatístico Wilcoxon, *** $p < 0.001$.

Observando os resultados de OP e Dol-ST da amostra E1 (Figura 45(a) e Figura 46(a)), tem-se que o método determina orientações análogas entre os grupos, mas no entanto determina que estes não têm níveis de organização semelhantes. Já para E2, embora também determine níveis de organização diferentes entre os grupos, considera que orientações preferenciais são significativamente diferentes (Figura 45(b)).

6.3.2 Método FT

As imagens da Figura 41 foram avaliadas igualmente com o método FT. O ajuste da elipse ao espectro de amplitude de cada imagem foi determinado, assim como OP e AR-FT. Os valores de AR-FT (Tabela 3) indicam que os espectros de frequências de cada imagem, tanto de transmissão como de reflexão, não apresentam uma orientação preferencial bem definida. Além disso, por estes valores (Tabela 3: Valores AR-FT de quatro imagens SHG.) o método aparenta não encontrar diferença entre o par de imagens transmissão e reflexão representativas de cada amostra.

Tabela 3: Valores AR-FT de quatro imagens SHG.

AR-FT			
a.	b.	c.	d.
1.0129	1.0076	1.0082	1.0066

Na Figura 47 estão caracterizados os histogramas da parte positiva do espectro de Fourier, das imagens SHG. Como espectável, pelos resultados anteriores, os histogramas de OP apresentam uma distribuição homogénea, o que significa que existe uma quantidade equivalente de ângulos de cada secção, ou seja, o método não identifica orientações preferencial bem definidas.

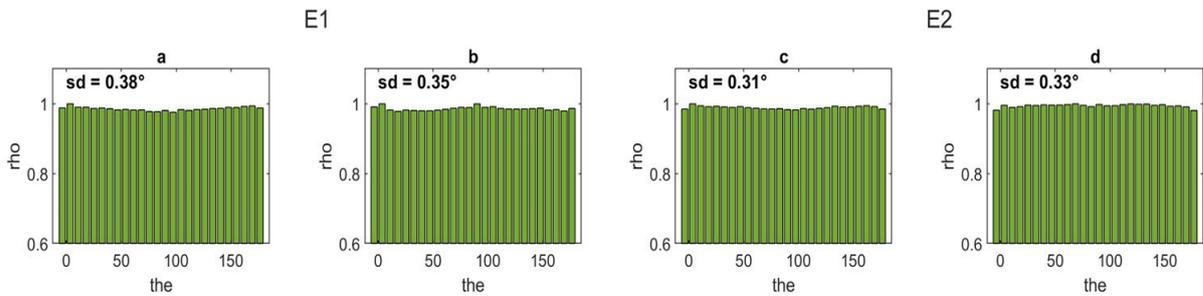


Figura 47: Gráfico de barras com desvio padrão da variável rho, das imagens SHG *a*, *b*, *c* e *d*, respetivamente.

Em semelhança com o método ST, analisou-se os valores de OP e de AR-FT para o mesmo conjunto de imagens das amostras E1 e E2, em função da sua geometria de aquisição. Na Figura 47 estão representados o resultados de OP e na Figura 48 os de AR-FT.

Para a amostra E1 os valores OP dos grupos não apresentam diferenças significativas, $p = 0.7738$, embora a variância do grupo T ser maior. Já para E2, os valores OP apresentam uma diferença significativa que não se verifica na primeira amostra, $p = 0.0083$.

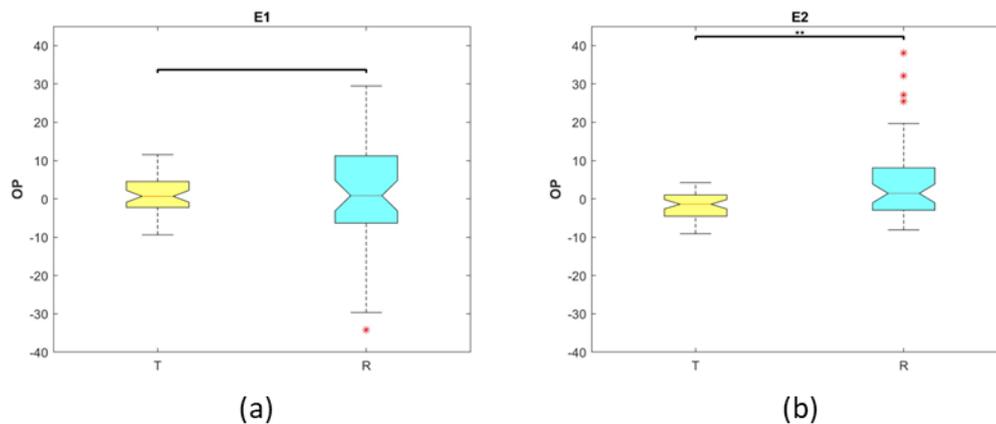


Figura 48: Variação da mediana \pm (e.p.m.) entre os valores da orientação preferencial, determinados com o método FT, de grupos de imagens SHG adquiridas em transmissão (T) e em reflexão (R). (a) cortes de córnea humana E1 e (b) cortes de córnea humana E2. Realizado o teste estatístico Wilcoxon, $**p < 0.01$.

Para os valores de AR-FT, a diferença estatística entre grupos é maior na amostra E1 do na E2. Apesar disso, a variância de valores de cada grupo de ambas as amostras, tem uma incidência em valores próximos de 1, o que indica que o método não encontra estruturas com OP definido.

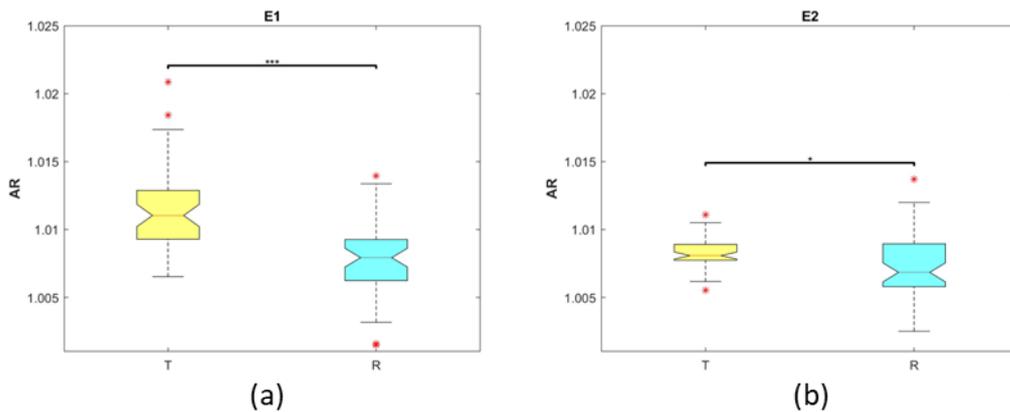


Figura 49: Variação da mediana \pm (e.p.m.) entre os valores de AR-FT de grupos de imagens SHG adquiridas em transmissão (T) e em reflexão (R). (a) cortes de córnea humana E1 e (b) cortes de córnea humana E2. Realizado o teste estatístico Wilcoxon, * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$.

Verificou-se nos resultados anteriores, em particular nos do parâmetro AR-FT (Figura 49) para ambas as córneas utilizadas, que o intervalo de valores que este toma era reduzido (entre 1.015 e 1.000). Sabendo que a organização do colagénio varia com a profundidade no estroma, estudou-se o comportamento dos métodos com o intuito de averiguar se estes determinavam níveis de estrutura diferentes consoante a profundidade. Os resultados estão apresentados na Figura 50. Apenas foi possível esta análise para a córnea E2 e até 300 μm de profundidade. Observa-se que ambos os métodos determinam que as diferentes organizações, encontradas ao longo do tecido, apresentam o mesmo nível de organização.

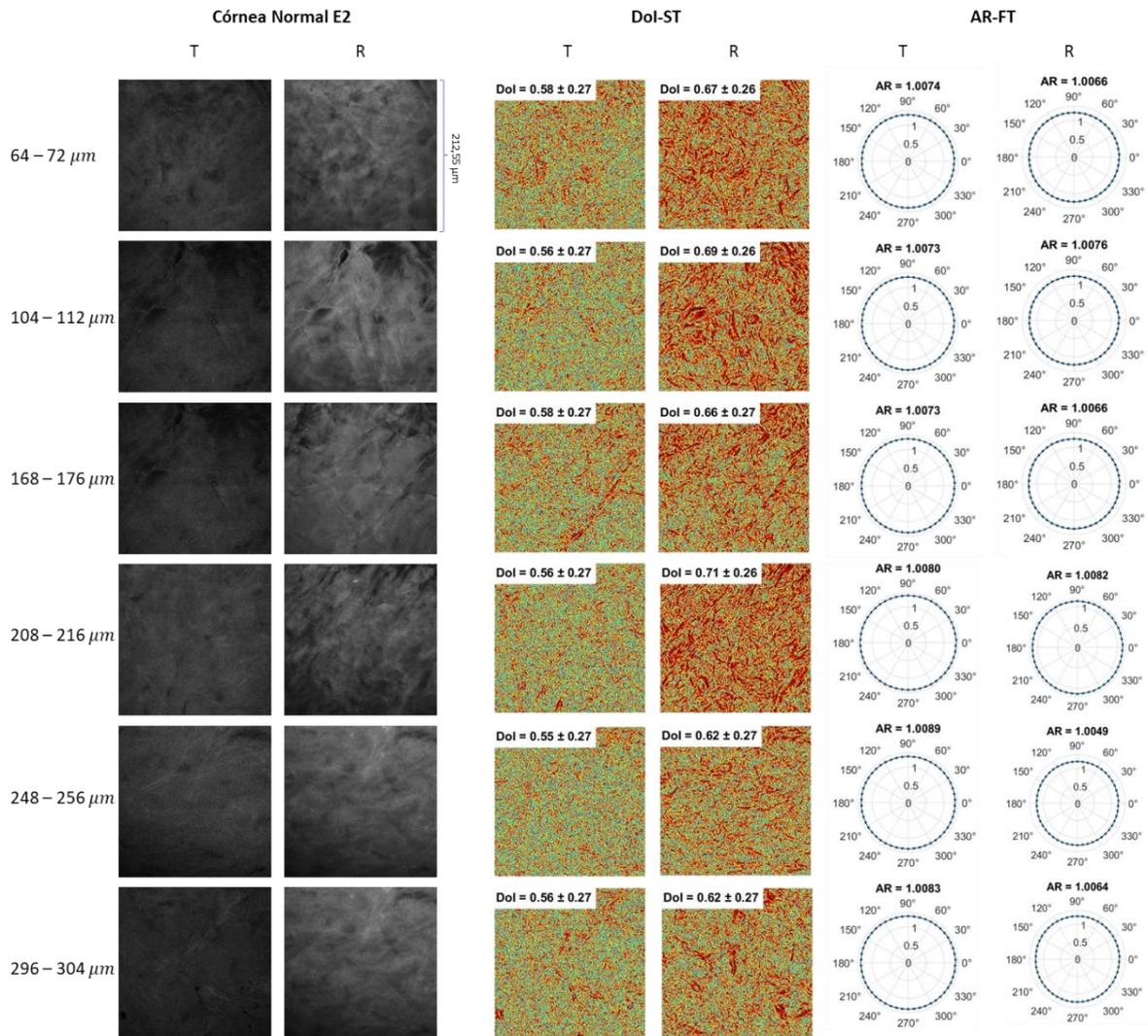


Figura 50: Imagens SHG detetadas em transmissão (T) e reflexão (R) de um corte de córnea humana não patológica marcada com eosina e hematoxilina e a representação dos dois parâmetros Dol-ST e AR-FT, dos métodos tensor de estrutura e transformada de Fourier, respetivamente.

7. Discussão

Neste estudo, implementou-se e comparou-se o desempenho de dois métodos utilizados na avaliação quantitativa da organização de estruturas colagenosas, e avaliou-se a capacidade de cada em detetar diferentes fatores que levam à desorganização das fibras de colagénio, recorrendo a imagens digitalmente geradas. E, ainda se demonstrou o seu potencial em caracterizar a organização estrutural da córnea usando uma configuração otimizada de um microscópio multifotão.

Os métodos estudados baseiam-se nas técnicas mais utilizadas atualmente, para a análise quantitativa de imagens SHG. Os resultados obtidos mostram que os métodos são capazes de identificar estruturas com diferentes níveis de organização.

Alguns dos fantasmas gerados representam situações extremas que não seriam detetadas em tecido corneano. No entanto, pretendia-se avaliar o comportamento dos métodos com a evolução da desorganização.

Embora as amostras utilizadas para a aquisição de imagens SHG das fibras de colagénio, não tenham sido as mais indicadas para este estudo, conseguiu-se mostrar que os métodos estão preparados para analisar quantitativamente imagens SHG da córnea. Comparou-se a performance de cada método em imagens de transmissão e reflexão. Por fim, comparou-se os resultados de cada método e foi possível identificar os aspetos onde cada um falha e em que cada um tem mais sucesso, permitindo assim, no futuro, otimizar cada um dos métodos.

7.1 Fantomas

7.1.1 Organização das fibras de colagénio por lamela - 1º fator

No primeiro critério em análise fez-se variar a organização das fibras de colagénio numa única lamela. O comportamento de cada método para este fator está dentro do esperado, ambos se mostraram capazes de identificar a evolução da desorganização. Os parâmetros de cada método (DoI-ST, SD-ST, AR-FT e SD-FT), apresentam relações lineares entre eles mostrando a consistência destes resultados. Em detalhe, o comportamento de DoI-ST e AR-FT demonstra um decréscimo com a evolução da desorganização, identificando a perda sucessiva de organização entre os fantomas. SD-FT e SD-ST, revelam que ambos os métodos identificam que, com a perda de organização das fibras, estas deixam de apresentar uma orientação preferencial.

No que diz respeito à dependência dos parâmetros de cada método com a área da imagem analisada, foram analisados três fantomas representativos do primeiro critério. O método ST (secção 6.1.2) é invariante à escala para tamanhos iguais e superiores a 152x152 pixels. Já no método FT, o parâmetro AR-FT apresenta uma diminuição com o aumento da escala, pelo que é variante com esta. Como o comportamento de AR-FT demonstra ter uma tendência decrescente menos acentuada para regiões superiores a 242x242 pixels, supõe-se que para tamanhos superiores aos analisados aqui este parâmetro estabilize e se torne invariante com a escala. Embora, SD-FT apresente um comportamento aproximadamente constante para tamanhos intermédios (entre 152x152 pixels e 32x332 pixels), identifica-se uma ligeira diminuição, pelo que se considera este parâmetro também invariante com a escala.

7.1.2 Complexidade lamelar - 2º fator

Para o segundo critério, em que o aumento da desorganização envolve apenas o aumento do número de lamelas na imagem, no método ST, DoI-ST apresenta um decréscimo repentino até imagens que contenham aproximadamente 8 lamelas. Para complexidades superiores, o decréscimo torna-se mais suave. Nas primeiras 8 imagens, ambas as curvas de DoI-ST e SD-ST, mostram que este tem dificuldade em determinar o nível da organização estrutural, apresentando uma larga variação dos valores. Por sua vez, o parâmetro AR-FT de SD-FT apresentam um decréscimo linear, ao avaliar a complexidade lamelar. Portanto, o método FT mostra-se ter maior capacidade para avaliar diferenças do nível de organização devido ao aumento do número de lamelas na imagem.

Em ST, a média da dependência do parâmetro DoI-ST com a escala, para os três fantasmas representativos, é aproximadamente constante demonstrando que para este tipo de estruturas é invariante à escala. No entanto, SD-ST apresenta um suave decréscimo até regiões com 332 pixels de lado e tem um comportamento aproximadamente constante para áreas superiores. Portanto, como os resultados dos parâmetros apenas são concordantes para tamanhos iguais ou superiores a 332x332 pixels, conclui-se que ST é invariante à escala, para estruturas com variação lamelar, quando a área de análise está dentro destes valores.

7.1.3 Variabilidade lamelar - 3º fator

Quando o fator de organização estrutural tem por base a variabilidade do alinhamento das fibras em cada lamela, o método ST não identifica estruturas de baixo nível de desorganização com valores de DoI-ST superiores a 0,70, como é observado nos outros critérios. Aliás, a variância dos valores de DoI-ST entre o primeiro e último fantoma é menor para este critério. O decréscimo esperado para este parâmetro com o aumento da desorganização estrutural é menos acentuado. Para o parâmetro SD-ST, o método apresenta uma falha na detecção da dependência deste parâmetro com a evolução da

desorganização. Para além de SD-ST estar relacionado com a determinação da orientação preferencial, mede também a dispersão da sua distribuição na imagem. Logo, verifica-se que a dispersão das orientações encontradas, não aumenta linearmente com a desorganização definida neste fator. Já o método FT mostra o aumento da complicação em identificar a orientação dominante da imagem em estruturas desorganizadas, tal como esperado. Apesar de ser mais evidente para os dois primeiros critérios, também se observa um decréscimo nas curvas de análise do terceiro critério em FT, o que não se observa em ST.

Para este fator de desorganização, o parâmetro Dol-ST apresenta um comportamento aproximadamente constante, tal como se observa para os outros dois critérios. No entanto, SD-ST apresenta um comportamento não linear, em particular aumento acentuado para regiões superiores a 152x152 pixels. O comportamento de Dol-ST e SD-ST é mais distinto entre si para este fator de desorganização do que para os outros dois, mas conclui-se que o método é variante com a escala. O mesmo se conclui para o método FT, também é variante com a escala. Este mostra que ambos os seus parâmetros diminuem linearmente com a escala.

O terceiro fator é aquele para o qual os métodos ST e FT apresentam mais valores atípicos. Porém, conclui-se que o método FT obtém melhores resultados e ST perde a capacidade de encontrar a orientação preferencial da imagem.

Em suma, os resultados da dependência dos parâmetros de ST, com o aumento da desorganização dos três critérios, mostram que este método tem a robustez necessária para identificar diferentes níveis de organização estrutural e o aumento da desorganização dos mesmos. Nos resultados de FT, tanto AR-FT como SD-FT apresentam uma dependência com a crescente desorganização nos três critérios, conforme esperado. Portanto, também é possível concluir que o método FT também se encontra capaz de identificar diferentes organizações estruturais e de encontrar a orientação preferencial correspondente.

De entre os critérios estudados, quando o número de lamelas por imagem é singular, como no primeiro fator, os métodos são mais eficientes. Para o segundo critério de desorganização, o comportamento dos métodos mostrou-se semelhante. Apresentam

resultados com mais valores atípicos que no primeiro fator, mas identificam a evolução da desorganização dos critérios. Por último, quando se trata de complexidade intra-lamelar, os métodos encontraram mais adversidades. Porém, aqui o método FT destaca-se, dado que ST falha em determinar a dependência de SD-ST com a evolução da desorganização. Outra vantagem encontrada no método FT é a relação entre os seus parâmetros. Para todos os critérios de organização, esta é mais elevada do que em ST, mostrando que este método é mais consistente na determinação da organização estrutural.

No teste de invariância à escala, apesar de os resultados obtidos usando o método FT se mostrarem concordantes de entre todos os critérios, é detetada uma influência da área em análise nos seus parâmetros. O método FT é variante com a escala para os três critérios. Já o método ST é invariante com a escala, exceto para o terceiro critério. No entanto, verifica-se nos dois métodos, que para escalas superiores a dependência com o tamanho da imagem é quase constante. Portanto, supõe-se que para áreas de análise tamanhos maiores aos analisados, se verifique a invariância de ambos os métodos.

Tem de se ter em conta que tanto o método ST como o FT estão a ser verificados com imagens criadas digitalmente, com base em vários fatores, para se assemelharem o mais possível a uma imagem SHG de fibras de colagénio. Os fatores de desorganização definidos geram algumas imagens que não têm nenhuma analogia com imagens SHG reais. Por isso, já se esperava obter valores um tanto atípicos com os fantasmas, porque o que se quer provar é a sua habilidade em detetar e avaliar diferentes estruturas. E pode-se concluir os dois métodos elaborados estão preparados para tal.

É de realçar que o método ST apresenta apenas valores de DoI-ST diferentes para níveis elevados de desorganização, que o grupo que o implementou este método em imagens SHG da córnea pela primeira vez. Isto pode significar que definir valores de limiar entre níveis de desorganização, usando apenas uma pequena amostra de imagens como este grupo fez, não será o mais indicado. No entanto, não significa que este método seja menos eficiente, apenas que é necessário aplicar o método num número mais elevado de

amostras para definir, com rigor, os limites de cada nível de organização estrutural.

Também se apurou que o método FT aparenta ter melhores resultados na detecção da evolução da desorganização estrutural e, por isso ser mais eficiente do que ST. Contudo, o tensor de estrutura aplicado à análise da orientação de imagens de fibras de colagénio, é ainda uma abordagem em crescimento, havendo mais informação e relatos de abordagens com base na transformada de Fourier, fazendo com que a versão desenvolvida aqui esteja mais bem preparada e otimizada para este tipo de análise.

7.2 Imagens SHG

Os resultados da análise de imagens nas duas geometrias de aquisição são apresentados na secção 6.3. Em análise estão duas córneas humanas, E1 e E2.

Nas imagens representativas das amostras marcadas (Figura 42), o método ST (secção 6.3.1) identifica organizações semelhantes entre cada par transmissão-reflexão das duas amostras. Os valores de $DOI-ST$ entre cada par são relativamente próximos e os histogramas correspondentes da distribuição de $OP-ST$ também apresentam perfis semelhantes.

Para as mesmas imagens representativas (Figura 42), o método FT (secção 6.3.2) também determina que a distribuição fibrilar é semelhante entre cada par transmissão reflexão das duas córneas. No entanto, o método ST determina que as imagens têm um nível de organização mais elevado. Os valores de $AR-FT$ indicam que o espectro perde a sua forma elíptica, ou seja, que o método não deteta uma orientação dominante bem definida nas imagens. Sendo ambas as amostras de córneas saudáveis, em que se sabe que o colagénio se apresenta mais organizado^[121], seria de esperar que os resultados dos métodos o indicassem. No entanto, apenas o método ST determina que a estrutura das fibras é organizada. Uma explicação para o sucedido é a influencia dos corantes, presentes nas amostras, no sinal SHG. Tem de se ter em conta que no método FT a resolução é limitada pelo ruído da imagem, tornando necessário a filtragem do mesmo, enquanto o método ST é aplicado diretamente à imagem, pixel por pixel, não havendo necessidade de pré

processamento. Portanto, independentemente da condição das amostras, a probabilidade de se perder informação relevante das imagens na análise de FT é maior devido à filtragem. Em imagens em que o sinal adquirido não é apenas SHG, o impacto poderá ser maior.

Com o objetivo de avaliar de forma mais rigorosa a prestação dos parâmetros de cada método em geometrias diferentes, foram analisados 47 pares transmissão/reflexão da amostra E1 e 50 pares da E2.

Tem-se que para a córnea E1, a determinação da orientação preferencial do método ST entre grupos não apresenta diferenças significativas. O mesmo não se pode afirmar para a córnea E2. A mediana dos grupos é significativamente diferente. Neste aspeto o método FT é concordante, a relação entre os grupos apresenta a mesma significância estatística em ambas as amostras, que o método ST. Ainda na determinação das orientações dominantes, existe uma diferença nos resultados dos métodos, o método FT encontra uma variância maior de valores OP no grupo de reflexão que no de transmissão, para a córnea E1 e o método ST determina o mesmo, mas na córnea E2. Por apenas se ter analisado duas amostras, não se conseguiu averiguar o porquê desta disparidade nos resultados. No entanto, sabe-se que as imagens em análise foram adquiridas de diferentes profundidades da amostra. Ou seja, a possibilidade de estas apresentarem diferentes organizações estruturais e como consequência apresentarem um número mais diversificado de orientações preferenciais é elevada, em ambas as direções. Os métodos podem estar a detetar isto na amostras mas apenas nas imagens em reflexão.

Em relação ao parâmetro de isotropia do método ST, os seus valores para E1 são significativamente diferentes entre grupos, tomando valores mais elevados para o grupo de imagens em reflexão. Na córnea E2, também se verifica uma diferença considerável e ainda, que os valores são mais elevados para o grupo de reflexão. Portanto, o método ST determina estruturas com nível de organização mais elevado para as imagens adquiridas em reflexão, nas duas amostras analisadas. Já o método FT apresenta resultados contraditórios. A mediana do parâmetro AR-FT mostra-se menor e mais próxima de 1 para o grupo de imagens em reflexão nas duas amostras, afirmando que este as imagens deste

grupo têm uma estrutura menos organizada. A discordância na determinação do nível de organização estrutural entre os métodos também se verifica nesta análise. Porém, existe a concordância de que as imagens de transmissão apresentam distribuições fibrilares bastante distintas das imagens em reflexão. Existe a necessidade de melhorar a robustez dos métodos para o estudo simultâneo de imagens nas duas geometrias e, ainda apenas para imagens em reflexão. A configuração em reflexão é a única que permite aquisição de imagens SHG *in vivo*.

Ainda na comparação resultados dos parâmetros DoI-ST e AR-FT, existe um aspeto importante que os distingue. Os valores de AR-FT têm uma maior incidência para valores abaixo de 1.015 nas duas amostras que, por ser muito próximo de 1, indica que o método FT não deteta estruturas bem organizadas, com uma orientação predominante bem definida em nenhuma das amostras. Por isto e pelo facto de o parâmetro DoI-ST apresentar valores mais diversificados que AR-FT, considera-se o ST mais eficaz neste aspeto.

Com o intuito de observar se as diferentes organizações, existentes no estroma corneano com a profundidade ^[161], eram determinadas pelos métodos como tendo ou não diferentes graus de organização, averiguou-se um conjunto de imagens, 6 de transmissão e 6 de reflexão, de várias profundidades do tecido (Figura 50). Observa-se que ambos os métodos não identificam as diferenças na distribuição das fibras como sendo distribuições com níveis de organização distintos.

Resumidamente, na determinação das orientações preferenciais em imagens SHG, os métodos demonstraram resultados semelhantes, não havendo espaço para determinar qual o melhor para este cálculo. No entanto, quanto ao nível da organização das fibras, o método FT demonstrou ser menos eficaz. Apesar de os métodos divergirem quanto à decisão de qual dos grupos apresenta uma estrutura mais bem organizada, são concordantes que as imagens de transmissão e reflexão contêm estruturas com organizações diferentes. Conclui-se que é necessário melhorar a robustez dos métodos estudados para análise simultânea de imagens adquiridas nas duas geometrias. Os resultados estão condicionados pelo tipo de amostras utilizadas, e os resultados do método

FT demonstram ser mais afetados por essa condição.

8. Conclusões e trabalhos futuros

O objetivo primário deste projeto era desenvolver uma métrica quantitativa padrão por meio do desenvolvimento de algoritmo através de imagens SHG em transmissão e reflexão, utilizando as primeiras como *ground-truth*, que determinasse a orientação preferencial das fibras de colagénio. Contudo, no decorrer do projeto foram encontradas algumas adversidades que levaram à alteração do plano de trabalhos e do propósito do mesmo. Foi então que surgiu o objetivo final deste projeto: estudar e comparar a capacidade de dois métodos em detetar efetivamente a geometria do colagénio, com o intuito de, posteriormente, ser um estudo útil para o desenvolvimento da métrica generalizada inicialmente proposta. Embora existam várias técnicas de análise quantitativa para este propósito, escolheu-se fazer a comparação entre o tensor de estrutura^[17], um método ainda pouco explorado, mas com resultados positivos relatados até então, com outro baseado na transformada de Fourier, por ser uma das aplicações mais utilizadas neste campo^[94,162,163]. Neste estudo, demonstrou-se a viabilidade e aptidão dos dois em analisar diferentes padrões estruturais com diferentes níveis de organização e de analisar quantitativamente imagens SHG, adquiridas em duas configurações diferentes.

Este trabalho mostra que os dois métodos de análise quantitativa estudadas têm a capacidade de determinar a orientação preferencial de fibras de colagénio. Além disso, demonstram eficiência em determinar diferentes graus de organização estrutural.

Quanto à caracterização do nível da organização em diferentes tipos de arranjos, ambos os métodos se revelam mais eficientes quando o número de lamelas na imagem é singular e se varia apenas a tortuosidade das fibras (primeiro fator). Para o segundo caso estudado, o aumento da complexidade lamelar (segundo fator), os métodos também se mostram capazes em determinar a evolução da organização embora com mais discrepâncias. Para estes dois fatores os resultados dos métodos são concordantes entre si. O último tipo de arranjo avaliado, a variabilidade intra-lamelar (terceiro fator), foi onde os métodos

apresentaram mais dificuldades, em particular o ST, o que se pode considerar como uma falha e um ponto a melhorar. Embora FT também tenha demonstrado dificuldades para este caso, os resultados mostram que este é capaz de detetar o aumento da desorganização da estrutura. Cada método apresenta vantagens e desvantagens, no entanto, o método FT mostra-se mais bem preparado para a análise de uma maior variedade de arranjos estruturais que ST.

Na análise das imagens SHG de transmissão e reflexão, os resultados da determinação da orientação preferencial dos dois métodos são concordantes. Ambos mostram encontrar orientações preferenciais significativamente semelhantes entre as imagens transmissão e reflexão para a amostra E1 mas para a amostra E2 encontram valores um pouco mais distintos. O que leva a concluir que a replicação dos métodos ainda não é robusta o suficiente na deteção da orientação preferencial das fibras. Na análise do nível estrutural, os resultados dos métodos são discordantes. Conclui-se que ST é mais eficiente neste aspeto por determinar estruturas com maior organização que FT, em amostras de córneas saudáveis. Tendo apenas utilizado duas amostras, deduz-se que é ainda necessária a otimização dos métodos para avaliação simultânea de imagens nas duas geometrias.

Resumidamente, sendo o tensor de estrutura uma abordagem ainda pouco explorada para a determinação da orientação preferencial de distribuições biológicas à base de colagénio, mostrou ter potencial quando comparada com uma das abordagens mais estudadas e utilizadas para análise de imagens SHG. E o método baseada na transformada de Fourier, demonstrou que, apesar da sua vasta aplicação bem sucedida, ainda existem aspetos a aprimorar.

Em conclusão, o objetivo de fazer a comparação, até agora não realizada, destes dois métodos foi atingido. Este estudo permitiu averiguar alguns dos pontos positivos e negativos dos métodos, permitindo em estudos futuros de otimização, saber quais as falhas a colmatar. Na tentativa de desenvolver uma métrica quantitativa generalizada de imagens SHG do colagénio, o conhecimento sobre as abordagens já existentes e as suas falhas, pode

também ser considerado um dos pontos de partida para o seu desenvolvimento.

Num futuro próximo, propõe-se que os métodos apresentados sejam aplicados a imagens SHG adquiridas a partir de amostras não marcadas, e a um número mais elevado de amostras, de forma a verificar com maior precisão a execução dos mesmos. Também se sugere que seria interessante confrontar estes métodos com outras abordagens já implementadas. São deixados em anexo, os resultados iniciais do desenvolvimento de uma versão da aplicação do método matriz de coocorrências de níveis de cinzento (GLCM) a imagens SHG.

Referências

1. International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas - Tenth edition 2021* (9th ed.). (2021). <https://diabetesatlas.org/>
2. Zong, H., Ward, M., & Stitt, A. W. (2011). AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reports*, 11(4), 244–252. <https://doi.org/10.1007/s11892-011-0198-7>
3. Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M., & Creager, M. A. (2006). Advanced Glycation End Products. *Circulation*, 114(6), 597–605. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854>
4. Hoy, R. C., D’Erminio, D. N., Krishnamoorthy, D., Natelson, D. M., Laudier, D. M., Illien-Jünger, S., & Iatridis, J. C. (2020). Advanced glycation end products cause RAGE-dependent annulus fibrosus collagen disruption and loss identified using in situ second harmonic generation imaging in mice intervertebral disk in vivo and in organ culture models. *JOR Spine*, 3(4), e1126. <https://doi.org/10.1002/JSP2.1126>
5. Keating, A., Pineda, R., & Colby, K. (2010). Corneal Cross Linking for Keratoconus. [Http://Dx.Doi.Org/10.3109/08820538.2010.518503](http://Dx.Doi.Org/10.3109/08820538.2010.518503), 25(5–6), 249–255. <https://doi.org/10.3109/08820538.2010.518503>
6. Lutz, V., Sattler, M., Gallinat, S., Wenck, H., Poertner, R., & Fischer, F. (2012). Impact of collagen crosslinking on the second harmonic generation signal and the fluorescence lifetime of collagen autofluorescence. *Skin Research and Technology*, 18(2), 168–179. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2011.00549.x>
7. Zipfel, W. R., Williams, R. M., & Webb, W. W. (2003). Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. In *Nature Biotechnology* (Vol. 21, Issue 11, pp. 1369–1377). <https://doi.org/10.1038/nbt899>
8. Zipfel, W. R., Williams, R. M., & Webb, W. W. (2003). Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. In *Nature Biotechnology* (Vol. 21, Issue 11, pp. 1369–1377). <https://doi.org/10.1038/nbt899>
9. Centonze, V. E., & White, J. G. (1998). Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophysical Journal*, 75(4), 2015–2024. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77643-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77643-X)
10. Roth, S., & Freund, I. (1979). Second harmonic generation in collagen. *The Journal of Chemical Physics*, 70(4), 1637–1643. <https://doi.org/10.1063/1.437677>
11. Campagnola, P. J., Clark, H. A., Mohler, W. A., Lewis, A., & Loew, L. M. (2001). Second-harmonic imaging microscopy of living cells. *Journal of Biomedical Optics*, 6(3), 277. <https://doi.org/10.1117/1.1383294>
12. Thorling, C. A., Crawford, D., Burczynski, F. J., Liu, X., Liao, I., & Roberts, M. S. (2014). Multiphoton microscopy in defining liver function. *Journal of Biomedical Optics*, 19(9), 090901. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.9.090901>
13. Steven, P., Hovakimyan, M., Guthoff, R. F., Hüttmann, G., & Stachs, O. (2010). Imaging corneal crosslinking by autofluorescence 2-photon microscopy, second harmonic generation, and fluorescence lifetime measurements. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 36(12), 2150–2159. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.06.068>

14. Campagnola, P. J., Millard, A. C., Terasaki, M., Hoppe, P. E., Malone, C. J., & Mohler, W. A. (2002). Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous Structural Proteins in Biological Tissues. *Biophysical Journal*, 82(1), 493–508. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75414-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75414-3)
15. Mohler, W., Millard, A. C., & Campagnola, P. J. (2003). Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods*, 29(1), 97–109. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00292-X](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00292-X)
16. Batista, A., Breunig, H. G., Uchugonova, A., Morgado, A. M., & König, K. (2016). Two-photon spectral fluorescence lifetime and second-harmonic generation imaging of the porcine cornea with a 12-femtosecond laser microscope. *Journal of Biomedical Optics*, 21(3), 036002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.3.036002>
17. Ávila, F. J., & Bueno, J. M. (2015). Analysis and quantification of collagen organization with the structure tensor in second harmonic microscopy images of ocular tissues. *Applied Optics*, 54(33), 9848. <https://doi.org/10.1364/AO.54.009848>
18. Nishida, T., & Saika, S. (2011). *Cornea and sclera: anatomy and physiology* (J. H. Krachmer, M. J. Mannis, & E. J. Holland, Eds.; 3rd ed., Vol. 1).
19. Remington, L. Ann. (2012). *Clinical anatomy and physiology of the visual system*. Elsevier/Butterworth-Heinemann.
20. Batista, A., Breunig, H. G., Donitsky, C., & König, K. (2018). 16 Two-photon microscopy and fluorescence lifetime imaging of the cornea. In *Multiphoton Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging* (pp. 301–320). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110429985-018>
21. Bye, L. A., Modi, N. C., & Stanford, M. (2013). *Basic Sciences for Ophthalmology* (1st ed). Oxford University Press.
22. Lang, G. K., & Amann, J. (2000). *Ophthalmology: a short textbook* (1st ed.). Thieme.
23. Bye, L., Modi, N., & Stanford, M. (2013). *Basic Sciences for Ophthalmology* (Vol. 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/med/9780199584994.001.0001>
24. DelMonte, D. W., & Kim, T. (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 37(3), 588–598. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.12.037>
25. Nishida, T., & Saika, S. (2011). *Cornea and sclera: anatomy and physiology* (J. H. Krachmer, M. J. Mannis, & E. J. Holland, Eds.; 3rd ed., Vol. 1).
26. DelMonte, D. W., & Kim, T. (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 37(3), 588–598. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.12.037>
27. Benedek, G. B. (n.d.). *Theory of Transparency of the Eye*.
28. Kubitscheck, U. (2017). *Fluorescence microscopy : from principles to biological applications* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
29. So, P. T. C., Dong, C. Y., Masters, B. R., & Berland, K. M. (2000). Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.2.1.399>
30. König, K., & Uchugonova, A. (2009). Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging at the Dawn of Clinical Application. In A. Periasamy & R. Clegg (Eds.), *FLIM Microscopy in Biology and Medicine* (1s Edition). CRC Press.
31. Valeur, B. (2001). *Molecular fluorescence : principles and applications* (1st ed.). Wiley-VCH.
32. So, P. T. (n.d.). *Two-photon Fluorescence Light Microscopy*. www.els.net

33. Anthony, N., Guo, P., & Berland, K. (2009). Principles of Fluorescence for Quantitative Fluorescence Microscopy. In A. Periasamy & R. Clegg (Eds.), *FLIM Microscopy in Biology and Medicine* (1st Edition). CRC Press.
34. Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*, *78*(1), 929–958.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>
35. Yeh, A. T., Choi, B., Nelson, J. S., & Tromberg, B. J. (2003). Reversible Dissociation of Collagen in Tissues. *Journal of Investigative Dermatology*, *121*(6), 1332–1335.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12634.x>
36. Shi, L., Lu, L., Harvey, G., Harvey, T., Rodríguez-Contreras, A., & Alfano, R. R. (2017). Label-Free Fluorescence Spectroscopy for Detecting Key Biomolecules in Brain Tissue from a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Scientific Reports*, *7*(1), 2599.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-02673-5>
37. Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer.
38. Sekar, S. K. V., Bargigia, I., Mora, A. D., Taroni, P., Ruggeri, A., Tosi, A., Pifferi, A., & Farina, A. (2017). Diffuse optical characterization of collagen absorption from 500 to 1700 nm. *Journal of Biomedical Optics*, *22*(1), 015006.
<https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.1.015006>
39. Zheng, W., Wu, Y., Li, D., & Qu, J. Y. (2008). Autofluorescence of epithelial tissue: single-photon versus two-photon excitation. *Journal of Biomedical Optics*, *13*(5), 054010. <https://doi.org/10.1117/1.2975866>
40. Bianchini, P., & Diaspro, A. (2008). Three-dimensional (3D) backward and forward second harmonic generation (SHG) microscopy of biological tissues. *Journal of Biophotonics*, *1*(6), 443–450. <https://doi.org/10.1002/jbio.200810060>
41. Huang, S., Heikal, A. A., & Webb, W. W. (2002). Two-Photon Fluorescence Spectroscopy and Microscopy of NAD(P)H and Flavoprotein. *Biophysical Journal*, *82*(5), 2811–2825. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75621-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75621-X)
42. Franken, P. A., Hill, A. E., Peters, C. W., & Weinreich, G. (1961). Generation of Optical Harmonics. *Physical Review Letters*, *7*(4), 118–119.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.7.118>
43. Thomas, G., van Voskuilen, J., Gerritsen, H. C., & Sterenborg, H. J. C. M. (2014). Advances and challenges in label-free nonlinear optical imaging using two-photon excitation fluorescence and second harmonic generation for cancer research. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *141*, 128–138.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.08.025>
44. Dudenkova, V. v., Shirmanova, M. v., Lukina, M. M., Feldshtein, F. I., Virkin, A., & Zagainova, E. v. (2019). Examination of Collagen Structure and State by the Second Harmonic Generation Microscopy. *Biochemistry (Moscow)*, *84*(S1), 89–107.
<https://doi.org/10.1134/S0006297919140062>
45. Gauderon, R., Lukins, P. B., & Sheppard, C. J. R. (2001). *Optimization of second-harmonic generation microscopy*. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(00\)00066-4](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(00)00066-4)
46. Masters, B. R., & So, P. T. C. (2008). *Handbook of biomedical Nonlinear Optical Microscopy* (6th ed.). Oxford University Press, Inc.
47. Boyd, R. W. (2020). *Nonlinear Optics*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-05510-1>
48. New, G. (2011). *Introduction to Nonlinear Optics*. Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511975851>

49. Prockop, D. J., & Fertala, A. (1998). The collagen fibril: the almost crystalline structure. *Journal of Structural Biology*, 122(1–2), 111–118.
<https://doi.org/10.1006/JSBI.1998.3976>
50. Pavone, F. S., & Campagnola, P. J. (Eds.). (2016). *Second Harmonic Generation Imaging* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b15039>
51. Lee, W. (2019). *IDENTIFICATION OF QUANTITATIVE SECOND-HARMONIC GENERATION IMAGING METRICS FOR COLLAGENOUS TISSUE*. University of Illinois at Urbana-Champaign.
52. Pavone, F. S., & Campagnola, P. J. (2016). *Second Harmonic Generation Imaging*.
53. Campagnola, P. (2011). Second Harmonic Generation Imaging Microscopy: Applications to Diseases Diagnostics. *Analytical Chemistry*, 83(9), 3224–3231.
<https://doi.org/10.1021/ac1032325>
54. Theodossiou, T. A., Thrasivoulou, C., Ekwobi, C., & Becker, D. L. (2006). Second harmonic generation confocal microscopy of collagen type I from rat tendon cryosections. *Biophysical Journal*, 91(12), 4665–4677.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.106.093740>
55. Han, M., Giese, G., & Bille, J. F. (2005). Second harmonic generation imaging of collagen fibrils in cornea and sclera. *Optics Express*, 13(15), 5791.
<https://doi.org/10.1364/OPEX.13.005791>
56. Chen, X., Nadiarynkh, O., Plotnikov, S., & Campagnola, P. J. (2012). Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nature Protocols*, 7(4), 654–669. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2012.009>
57. Williams, R. M., Zipfel, W. R., & Webb, W. W. (2005). Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils. *Biophysical Journal*, 88(2), 1377–1386.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047308>
58. Anthony, N., Guo, P., & Berland, K. (2009). Principles of Fluorescence for Quantitative Fluorescence Microscopy. In A. Periasamy & R. Clegg (Eds.), *FLIM Microscopy in Biology and Medicine* (1st Edition). CRC Press.
59. Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science*, 248(4951), 73–76.
<https://doi.org/10.1126/science.2321027>
60. König, K., & Uchugonova, A. (2009). Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging at the Dawn of Clinical Application. In A. Periasamy & R. Clegg (Eds.), *FLIM Microscopy in Biology and Medicine* (1s Edition). CRC Press.
61. Periasamy, A., & Clegg, R. M. (Eds.). (2009). *FLIM Microscopy in Biology and Medicine*. Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/9781420078916>
62. Diaspro, A., & Sheppard, C. J. R. (2001). Two-Photon Microscopy: Basic Principles and Architectures. In A. Diaspro (Ed.), *Confocal and two-photon microscopy : foundations, applications, and advances* (1st Ed.). Wiley-Liss.
63. Parodi, V., Jacchetti, E., Osellame, R., Cerullo, G., Polli, D., & Raimondi, M. T. (2020). Nonlinear Optical Microscopy: From Fundamentals to Applications in Live Bioimaging. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1174.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.585363/BIBTEX>
64. Vo-Dinh, T. (Ed.). (2003). *Biomedical Photonics Handbook* (Vol. 1). CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9780203008997>

65. Kim, B.-M., Eichler, J., & Silva, L. B. da. (1999). Frequency doubling of ultrashort laser pulses in biological tissues. *Applied Optics*, Vol. 38, Issue 34, Pp. 7145–7150, 38(34), 7145–7150. <https://doi.org/10.1364/AO.38.007145>
66. Fukutake, N. (2020). A general theory of far-field optical microscopy image formation and resolution limit using double-sided Feynman diagrams. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73584-1>
67. Georgiou, E., Theodossiou, T., Hovhannisyanyan, V., Politopoulos, K., Rapti, G. S., & Yova, D. (2000). Second and third optical harmonic generation in type I collagen, by nanosecond laser irradiation, over a broad spectral region. *Optics Communications*, 176(1–3), 253–260. [https://doi.org/10.1016/S0030-4018\(00\)00504-6](https://doi.org/10.1016/S0030-4018(00)00504-6)
68. Guo, Y., Ho, P. P., Tirkslionas, A., Liu, F., & Alfano, R. R. (1996). Optical harmonic generation from animal tissues by the use of picosecond and femtosecond laser pulses. *Applied Optics*, 35(34), 6810. <https://doi.org/10.1364/AO.35.006810>
69. Hovanessian, V., & Lalayan, A. (1996). Second harmonic generation in biofiber-containing tissues. *PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON LASERS-SOCIETY FOR OPTICAL AND QUANTUM ELECTRONICS*, 107–109.
70. Williams, R. M., Zipfel, W. R., & Webb, W. W. (2005). Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils. *Biophysical Journal*, 88(2), 1377–1386. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047308>
71. Brown, E., McKee, T., diTomaso, E., Pluen, A., Seed, B., Boucher, Y., & Jain, R. K. (2003). Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. *Nature Medicine*, 9(6), 796–800. <https://doi.org/10.1038/nm879>
72. Fine, S., & Hansen, W. P. (1971). Optical Second Harmonic Generation in Biological Systems. *Applied Optics*, 10(10), 2350. <https://doi.org/10.1364/AO.10.002350>
73. Sheppard, C., Gannaway, J., Kompfner, R., & Walsh, D. (1977). The scanning harmonic optical microscope. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 13(9), 912–912. <https://doi.org/10.1109/JQE.1977.1069615>
74. Gannaway, J. N., & Sheppard, C. J. R. (1978). Second-harmonic imaging in the scanning optical microscope. *Optical and Quantum Electronics*, 10(5), 435–439. <https://doi.org/10.1007/BF00620308>
75. Freund, I., Deutsch, M., & Sprecher, A. (1986). Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon. *Biophysical Journal*, 50(4), 693–712. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(86\)83510-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(86)83510-X)
76. Guo, Y., Ho, P. P., Savage, H., Harris, D., Sacks, P., Schantz, S., Liu, F., Zhadin, N., & Alfano, R. R. (1997). Second-harmonic tomography of tissues. *Optics Letters*, 22(17), 1323. <https://doi.org/10.1364/OL.22.001323>
77. Campagnola, P. J., Millard, A. C., Terasaki, M., Hoppe, P. E., Malone, C. J., & Mohler, W. A. (2002). Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous Structural Proteins in Biological Tissues. *Biophysical Journal*, 82(1), 493–508. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75414-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75414-3)
78. Cox, G. C., Manconi, F., & Kable, E. (2002). *Second harmonic imaging of collagen in mammalian tissue* (A. Periasamy & P. T. C. So, Eds.; pp. 148–156). <https://doi.org/10.1117/12.470689>

79. Bianchini, P., & Diaspro, A. (2008). Three-dimensional (3D) backward and forward second harmonic generation (SHG) microscopy of biological tissues. *Journal of Biophotonics*, 1(6), 443–450. <https://doi.org/10.1002/jbio.200810060>
80. Latour, G., Gusachenko, I., Kowalczyk, L., Lamarre, I., & Schanne-Klein, M.-C. (2012). In vivo structural imaging of the cornea by polarization-resolved second harmonic microscopy. *Biomedical Optics Express*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.1364/BOE.3.000001>
81. Theodossiou, T. A., Thrasivoulou, C., Ekwobi, C., & Becker, D. L. (2006). Second harmonic generation confocal microscopy of collagen type I from rat tendon cryosections. *Biophysical Journal*, 91(12), 4665–4677. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.093740>
82. Hristu, R., Eftimie, L. G., Stanciu, S. G., Tranca, D. E., Paun, B., Sajin, M., & Stanciu, G. A. (2018). Quantitative second harmonic generation microscopy for the structural characterization of capsular collagen in thyroid neoplasms. *Biomedical Optics Express*, 9(8), 3923. <https://doi.org/10.1364/BOE.9.003923>
83. Cox, G., Kable, E., Jones, A., Fraser, I., Manconi, F., & Gorrell, M. D. (2003). 3-Dimensional imaging of collagen using second harmonic generation. *Journal of Structural Biology*, 141(1), 53–62. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(02\)00576-2](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(02)00576-2)
84. Han, M., Giese, G., & Bille, J. F. (2005). Second harmonic generation imaging of collagen fibrils in cornea and sclera. *Optics Express*, 13(15), 5791. <https://doi.org/10.1364/OPEX.13.005791>
85. Yeh, A. T., Nassif, N., Zoumi, A., & Tromberg, B. J. (2002). Selective corneal imaging using combined second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Optics Letters*, 27(23), 2082. <https://doi.org/10.1364/OL.27.002082>
86. Stoller, P., Kim, B.-M., Rubenchik, A. M., Reiser, K. M., & da Silva, L. B. (2002). Polarization-dependent optical second-harmonic imaging of a rat-tail tendon. *Journal of Biomedical Optics*, 7(2), 205. <https://doi.org/10.1117/1.1431967>
87. Zoumi, A., Lu, X., Kassab, G. S., & Tromberg, B. J. (2004). Imaging Coronary Artery Microstructure Using Second-Harmonic and Two-Photon Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal*, 87(4), 2778–2786. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.042887>
88. Stoller, P., Reiser, K. M., Celliers, P. M., & Rubenchik, A. M. (2002). Polarization-Modulated Second Harmonic Generation in Collagen. *Biophysical Journal*, 82(6), 3330–3342. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75673-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75673-7)
89. Su, P.-J., Chen, W.-L., Hong, J.-B., Li, T.-H., Wu, R.-J., Chou, C.-K., Chen, S.-J., Hu, C., Lin, S.-J., & Dong, C.-Y. (2009). Discrimination of collagen in normal and pathological skin dermis through second-order susceptibility microscopy. *Optics Express*, 17(13), 11161. <https://doi.org/10.1364/OE.17.011161>
90. Cicchi, R., & Pavone, F. S. (2014). Multimodal nonlinear microscopy: A powerful label-free method for supporting standard diagnostics on biological tissues. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 07(05), 1330008. <https://doi.org/10.1142/S1793545813300085>
91. Vogler, N., Medyukhina, A., Latka, I., Kemper, S., Böhm, M., Dietzek, B., & Popp, J. (2011). Towards multimodal nonlinear optical tomography - experimental methodology. *Laser Physics Letters*, 8(8), 617–624. <https://doi.org/10.1002/lapl.201110033>
92. Gailhouste, L., Grand, Y. le, Odin, C., Guyader, D., Turlin, B., Ezan, F., Désille, Y., Guilbert, T., Bessard, A., Frémin, C., Theret, N., & Baffet, G. (2010). Fibrillar collagen

- scoring by second harmonic microscopy: A new tool in the assessment of liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, 52(3), 398–406.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.12.009>
93. Guilbert, T., Odin, C., le Grand, Y., Gailhouste, L., Turlin, B., Ezan, F., Désille, Y., Baffet, G., & Guyader, D. (2010). A robust collagen scoring method for human liver fibrosis by second harmonic microscopy. *Optics Express*, 18(25), 25794.
<https://doi.org/10.1364/OE.18.025794>
 94. Matteini, P., Ratto, F., Rossi, F., Cicchi, R., Stringari, C., Kapsokalyvas, D., Pavone, F. S., & Pini, R. (2009). Photothermally-induced disordered patterns of corneal collagen revealed by SHG imaging. *Optics Express*, 17(6), 4868.
<https://doi.org/10.1364/OE.17.004868>
 95. Theodossiou, T., Rapti, G. S., Hovhannisyanyan, V., Georgiou, E., Politopoulos, K., & Yova, D. (2002). Thermally Induced Irreversible Conformational Changes in Collagen Probed by Optical Second Harmonic Generation and Laser-induced Fluorescence. *Lasers in Medical Science*, 17(1), 34–41. <https://doi.org/10.1007/s10103-002-8264-7>
 96. Lo, W., Chang, Y.-L., Liu, J.-S., Hseuh, C.-M., Hovhannisyanyan, V., Chen, S.-J., Tan, H.-Y., & Dong, C.-Y. (2009). Multimodal, multiphoton microscopy and image correlation analysis for characterizing corneal thermal damage. *Journal of Biomedical Optics*, 14(5), 054003. <https://doi.org/10.1117/1.3213602>
 97. Guo, Y., Savage, H. E., Liu, F., Schantz, S. P., Ho, P. P., & Alfano, R. R. (1999). Subsurface tumor progression investigated by noninvasive optical second harmonic tomography (second harmonic generation optical tomography/histology). In *Medical Sciences* (Vol. 96). www.pnas.org.
 98. Nadiarnykh, O., LaComb, R. B., Brewer, M. A., & Campagnola, P. J. (2010). Alterations of the extracellular matrix in ovarian cancer studied by Second Harmonic Generation imaging microscopy. *BMC Cancer*, 10(1), 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-94>
 99. Plotnikov, S. v., Kenny, A. M., Walsh, S. J., Zubrowski, B., Joseph, C., Scranton, V. L., Kuchel, G. A., Dauser, D., Xu, M., Pilbeam, C. C., Adams, D. J., Dougherty, R. P., Campagnola, P. J., & Mohler, W. A. (2008). Measurement of muscle disease by quantitative second-harmonic generation imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 13(4), 044018. <https://doi.org/10.1117/1.2967536>
 100. LaComb, R., Nadiarnykh, O., & Campagnola, P. J. (2008). Quantitative Second Harmonic Generation Imaging of the Diseased State Osteogenesis Imperfecta: Experiment and Simulation. *Biophysical Journal*, 94(11), 4504–4514.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114405>
 101. Batista, A., Breunig, H. G., König, A., Schindele, A., Hager, T., Seitz, B., Morgado, A. M., & König, K. (2018). Assessment of Human Corneas Prior to Transplantation Using High-Resolution Two-Photon Imaging. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59(1), 176. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22002>
 102. Zhang, X., Tao, X., Zhang, J., Li, Z., Xu, Y., Wang, Y., Zhang, C., & Mu, G. (2015). A Review of Collagen Cross-Linking in Cornea and Sclera. *Journal of Ophthalmology*, 2015, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/289467>
 103. Hovakimyan, M., Guthoff, R. F., & Stachs, O. (2012). Collagen Cross-Linking: Current Status and Future Directions. *Journal of Ophthalmology*, 2012, 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2012/406850>

104. Batista, A., Breunig, H. G., Hager, T., Seitz, B., & König, K. (2019). Early evaluation of corneal collagen crosslinking in ex-vivo human corneas using two-photon imaging. *Scientific Reports*, *9*(1), 10241. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46572-3>
105. Dudenkova, V. v., Shirmanova, M. v., Lukina, M. M., Feldshtein, F. I., Virkin, A., & Zagainova, E. v. (2019). Examination of Collagen Structure and State by the Second Harmonic Generation Microscopy. *Biochemistry (Moscow)*, *84*(S1), 89–107. <https://doi.org/10.1134/S0006297919140062>
106. Campagnola, P. (2011). Second Harmonic Generation Imaging Microscopy: Applications to Diseases Diagnostics. *Analytical Chemistry*, *83*(9), 3224–3231. <https://doi.org/10.1021/ac1032325>
107. Ait-Belkacem, D. (2012). Microscopic structural study of collagen aging in isolated fibrils using polarized second harmonic generation. *Journal of Biomedical Optics*, *17*(8), 080506. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.8.080506>
108. Stanciu, S. G., Xu, S., Peng, Q., Yan, J., Stanciu, G. A., Welsch, R. E., So, P. T. C., Csucs, G., & Yu, H. (2015). Experimenting Liver Fibrosis Diagnostic by Two Photon Excitation Microscopy and Bag-of-Features Image Classification. *Scientific Reports*, *4*(1), 4636. <https://doi.org/10.1038/srep04636>
109. Cicchi, R., Vogler, N., Kapsokalyvas, D., Dietzek, B., Popp, J., & Pavone, F. S. (2013). From molecular structure to tissue architecture: collagen organization probed by SHG microscopy. *Journal of Biophotonics*, *6*(2), 129–142. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200092>
110. Ghazaryan, A., Tsai, H. F., Hayrapetyan, G., Chen, W.-L., Chen, Y.-F., Jeong, M. Y., Kim, C.-S., Chen, S.-J., & Dong, C.-Y. (2012). Analysis of collagen fiber domain organization by Fourier second harmonic generation microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, *18*(3), 031105. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.3.031105>
111. Frisch, K. E., Duenwald-Kuehl, S. E., Kobayashi, H., Chamberlain, C. S., Lakes, R. S., & Vanderby, R. (2012). Quantification of collagen organization using fractal dimensions and Fourier transforms. *Acta Histochemica*, *114*(2), 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.03.010>
112. Mostaço-Guidolin, L. B., Ko, A. C.-T., Wang, F., Xiang, B., Hewko, M., Tian, G., Major, A., Shiomi, M., & Sowa, M. G. (2013). Collagen morphology and texture analysis: from statistics to classification. *Scientific Reports*, *3*(1), 2190. <https://doi.org/10.1038/srep02190>
113. Cicchi, R., Kapsokalyvas, D., de Giorgi, V., Maio, V., van Wiechen, A., Massi, D., Lotti, T., & Pavone, F. S. (2009). Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *Journal of Biophotonics*, *3*(1–2), 34–43. <https://doi.org/10.1002/jbio.200910062>
114. Kirkpatrick, N. D., Brewer, M. A., & Utzinger, U. (2007). Endogenous Optical Biomarkers of Ovarian Cancer Evaluated with Multiphoton Microscopy. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *16*(10), 2048–2057. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0009>
115. Liu, Y., Zhu, X., Huang, Z., Cai, J., Chen, R., Xiong, S., Chen, G., & Zeng, H. (2015). Texture analysis of collagen second-harmonic generation images based on local difference local binary pattern and wavelets differentiates human skin abnormal scars from normal scars. *Journal of Biomedical Optics*, *20*(1), 016021. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.1.016021>

116. Ávila, F. J., & Bueno, J. M. (2015). Analysis and quantification of collagen organization with the structure tensor in second harmonic microscopy images of ocular tissues. *Applied Optics*, 54(33), 9848. <https://doi.org/10.1364/AO.54.009848>
117. Hristu, R., Stanciu, S. G., Tranca, D. E., & Stanciu, G. A. (2017). Improved quantification of collagen anisotropy with polarization-resolved second harmonic generation microscopy. *Journal of Biophotonics*, 10(9), 1171–1179. <https://doi.org/10.1002/jbio.201600197>
118. Schomberg, H., & Timmer, J. (1995). The gridding method for image reconstruction by Fourier transformation. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 14(3), 596–607. <https://doi.org/10.1109/42.414625>
119. Pijanka, J. K., Markov, P. P., Midgett, D., Paterson, N. G., White, N., Blain, E. J., Nguyen, T. D., Quigley, H. A., & Boote, C. (2019). Quantification of collagen fiber structure using second harmonic generation imaging and two-dimensional discrete Fourier transform analysis: Application to the human optic nerve head. *Journal of Biophotonics*, 12(5). <https://doi.org/10.1002/JBIO.201800376>
120. Ávila, F. J., del Barco, O., & Bueno, J. M. (2017). Quantifying external and internal collagen organization from Stokes-vector-based second harmonic generation imaging polarimetry. *Journal of Optics (United Kingdom)*, 19(10). <https://doi.org/10.1088/2040-8986/AA825D>
121. Bueno, J. M., Ávila, F. J., Lorenzo-Martín, E., Gallego-Muñoz, P., & Carmen Martínez-García, M. (2021). Assessment of the corneal collagen organization after chemical burn using second harmonic generation microscopy. *Biomedical Optics Express*, 12(2), 756. <https://doi.org/10.1364/BOE.412819>
122. Mega, Y., Robitaille, M., Zareian, R., McLean, J., Ruberti, J., & DiMarzio, C. (2012). Quantification of lamellar orientation in corneal collagen using second harmonic generation images. *Optics Letters*, 37(16), 3312. <https://doi.org/10.1364/OL.37.003312>
123. Bueno, J. M., Palacios, R., Chessey, M. K., & Ginis, H. (2013). Analysis of spatial lamellar distribution from adaptive-optics second harmonic generation corneal images. *Biomedical Optics Express*, 4(7), 1006. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.001006>
124. Batista, A., Breunig, H. G., König, A., Schindele, A., Hager, T., Seitz, B., & König, K. (2018). High-resolution, label-free two-photon imaging of diseased human corneas. *Journal of Biomedical Optics*, 23(03), 1. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.3.036002>
125. Malik, J., Belongie, S., Leung, T., & Shi, J. (2000). *Contour and Texture Analysis for Image Segmentation* (pp. 139–172). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4413-5_9
126. Belongie, S., Carson, C., Greenspan, H., & Malik, J. (1998). Color- and texture-based image segmentation using EM and its application to content-based image retrieval. *Sixth International Conference on Computer Vision (IEEE Cat. No.98CH36271)*, 675–682. <https://doi.org/10.1109/ICCV.1998.710790>
127. Bigun, J., Granlund, G. H., & Wiklund, J. (1991). Multidimensional orientation estimation with applications to texture analysis and optical flow. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 13(8), 775–790. <https://doi.org/10.1109/34.85668>
128. Rousson, M., Brox, T., & Deriche, R. (2003). Active unsupervised texture segmentation on a diffusion based feature space. *2003 IEEE Computer Society*

- Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, 2003. Proceedings.*, II-699–704. <https://doi.org/10.1109/CVPR.2003.1211535>
129. Bigun, J., Bigun, T., & Nilsson, K. (2004). Recognition by symmetry derivatives and the generalized structure tensor. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 26(12), 1590–1605. <https://doi.org/10.1109/TPAMI.2004.126>
 130. Freed, A. D., Einstein, D. R., & Vesely, I. (2005). Invariant formulation for dispersed transverse isotropy in aortic heart valves. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 4(2–3), 100–117. <https://doi.org/10.1007/s10237-005-0069-8>
 131. Gasser, T. C., Ogden, R. W., & Holzapfel, G. A. (2006). Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations. *Journal of The Royal Society Interface*, 3(6), 15–35. <https://doi.org/10.1098/rsif.2005.0073>
 132. Bueno, J. M., Ávila, F. J., Lorenzo-Martín, E., Gallego-Muñoz, P., & Carmen Martínez-García, M. (2021). Assessment of the corneal collagen organization after chemical burn using second harmonic generation microscopy. *Biomedical Optics Express*, 12(2), 756. <https://doi.org/10.1364/BOE.412819>
 133. Bueno, J. M., Ávila, F. J., & Artal, P. (2017). Comparison of second harmonic microscopy images of collagen-based ocular tissues with 800 and 1045 nm. *Biomedical Optics Express*, 8(11), 5065. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.005065>
 134. Ávila, F. J., Artal, P., & Bueno, J. M. (2019). Quantitative Discrimination of Healthy and Diseased Corneas With Second Harmonic Generation Microscopy. *Translational Vision Science & Technology*, 8(3), 51. <https://doi.org/10.1167/tvst.8.3.51>
 135. W. Becker. (2021). *The bh TCSPC handbook* (9th edition). www.becker-hickl.com
 136. Diaspro, A., & Sheppard, C. J. R. (2001). Two-Photon Microscopy: Basic Principles and Architectures. In A. Diaspro (Ed.), *Confocal and two-photon microscopy : foundations, applications, and advances* (1st Ed.). Wiley-Liss.
 137. Hall, G., Tilbury, K. B., Campbell, K. R., Eliceiri, K. W., & Campagnola, P. J. (2014). Experimental and simulation study of the wavelength dependent second harmonic generation of collagen in scattering tissues. *Optics Letters*, 39(7), 1897. <https://doi.org/10.1364/OL.39.001897>
 138. Borile, G., Sandrin, D., Filippi, A., Anderson, K. I., & Romanato, F. (2021). Label-Free Multiphoton Microscopy: Much More Than Fancy Images. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2657. <https://doi.org/10.3390/ijms22052657>
 139. Chen, J., Xu, J., Kang, D., Xu, M., Zhuo, S., Zhu, X., & Jiang, X. (2013). Multiphoton microscopic imaging of histological sections without hematoxylin and eosin staining differentiates carcinoma *in situ* lesion from normal oesophagus. *Applied Physics Letters*, 103(18), 183701. <https://doi.org/10.1063/1.4826322>
 140. Gibbs, S. L., Genega, E., Salemi, J., Kianzad, V., Goodwill, H. L., Xie, Y., Oketokoun, R., Khurd, P., Kamen, A., & Frangioni, J. v. (2015). Near-infrared fluorescent digital pathology for the automation of disease diagnosis and biomarker assessment. *Molecular Imaging*, 14(4). <https://doi.org/10.2310/7290.2015.00005>
 141. Batista, A., Breunig, H. G., Donitsky, C., & König, K. (2018). 16 Two-photon microscopy and fluorescence lifetime imaging of the cornea. In *Multiphoton Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging* (pp. 301–320). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110429985-018>
 142. Mohapatra, S., & Weisshaar, J. C. (2018). Modified Pearson correlation coefficient for two-color imaging in spherocylindrical cells. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 428. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2444-3>

143. Brox, T., van den Boomgaard, R., Lauze, F., van de Weijer, J., Weickert, J., Mrázek, P., & Kornprobst, P. (2006). Adaptive structure tensors and their applications. *Mathematics and Visualization*, 0(200709), 17–47. https://doi.org/10.1007/3-540-31272-2_2/COVER
144. Köthe, U. (2003). Edge and junction detection with an improved structure tensor. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 2781, 25–32. https://doi.org/10.1007/978-3-540-45243-0_4/COVER
145. Fernández, J. J., & Li, S. (2003). An improved algorithm for anisotropic nonlinear diffusion for denoising cryo-tomograms. *Journal of Structural Biology*, 144(1–2), 152–161. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2003.09.010>
146. Kühne, G., Weickert, J., Schuster, O., & Richter, S. (2001). A tensor-driven active contour model for moving object segmentation. *IEEE International Conference on Image Processing*, 2, 73–76. <https://doi.org/10.1109/ICIP.2001.958427>
147. Qu, J., Lei, J., Li, Y., Dong, W., Zeng, Z., & Chen, D. (2018). Structure Tensor-Based Algorithm for Hyperspectral and Panchromatic Images Fusion. *Remote Sensing 2018*, Vol. 10, Page 373, 10(3), 373. <https://doi.org/10.3390/RS10030373>
148. Demirkaya, O., Asyali, M. H., & Sahoo, P. K. (2008). *Image Processing with MATLAB*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420008937>
149. Gonzalez, R. C., & Woods, R. E. (n.d.). *Digital Image Processing* (3rd ed.). Prentice-Hall, Inc.
150. Gonzalez, R. C., & Woods, R. E. (n.d.). *Digital Image Processing Using MATLAB*.
151. Sheridan, P. (2007). A Method to Perform a Fast Fourier Transform With Primitive Image Transformations. *IEEE Transactions on Image Processing*, 16(5), 1355–1369. <https://doi.org/10.1109/TIP.2007.891790>
152. Pijanka, J. K., Markov, P. P., Midgett, D., Paterson, N. G., White, N., Blain, E. J., Nguyen, T. D., Quigley, H. A., & Boote, C. (2019). Quantification of collagen fiber structure using second harmonic generation imaging and two-dimensional discrete Fourier transform analysis: Application to the human optic nerve head. *Journal of Biophotonics*, 12(5). <https://doi.org/10.1002/jbio.201800376>
153. Zhuo, S., Chen, J., Wu, G., Xie, S., Zheng, L., Jiang, X., & Zhu, X. (2010). Quantitatively linking collagen alteration and epithelial tumor progression by second harmonic generation microscopy. *Applied Physics Letters*, 96(21), 213704. <https://doi.org/10.1063/1.3441337>
154. Kalman, D. (2008). The Most Marvelous Theorem in Mathematics. *Math Horizons*, 8. <https://doi.org/10.1080/10724117.2008.11974767>
155. Fitzgibbon, A., Pilu, M., & Fisher, R. B. (1999). Direct least square fitting of ellipses. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 21(5), 476–480. <https://doi.org/10.1109/34.765658>
156. Ohad Gal. (n.d.). *fit_ellipse*. MATLAB Central File Exchange. Retrieved June 12, 2022, from https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/3215-fit_ellipse
157. Tan, H.-Y., Chang, Y.-L., Lo, W., Hsueh, C.-M., Chen, W.-L., Ghazaryan, A. A., Hu, P.-S., Young, T.-H., Chen, S.-J., & Dong, C.-Y. (2013). Characterizing the morphologic changes in collagen crosslinked–treated corneas by Fourier transform–second harmonic generation imaging. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 39(5), 779–788. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2012.11.036>

158. Hsueh, C.-M., Lo, W., Chen, W.-L., Hovhannisyan, V. A., Liu, G.-Y., Wang, S.-S., Tan, H.-Y., & Dong, C.-Y. (2009). Structural Characterization of Edematous Corneas by Forward and Backward Second Harmonic Generation Imaging. *Biophysical Journal*, *97*(4), 1198–1205. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.05.040>
159. Keating, A., Pineda, R., & Colby, K. (2010). Corneal Cross Linking for Keratoconus. *Seminars in Ophthalmology*, *25*(5–6), 249–255. <https://doi.org/10.3109/08820538.2010.518503>
160. Batista, A., Breunig, H. G., Uchugonova, A., Morgado, A. M., & König, K. (2016). Two-photon spectral fluorescence lifetime and second-harmonic generation imaging of the porcine cornea with a 12-femtosecond laser microscope. *Journal of Biomedical Optics*, *21*(3), 036002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.3.036002>
161. Germann, J. A., Martinez-Enriquez, E., & Marcos, S. (2018). Quantization of collagen organization in the stroma with a new order coefficient. *Biomedical Optics Express*, *9*(1), 173. <https://doi.org/10.1364/BOE.9.000173>
162. Ghazaryan, A., Tsai, H. F., Hayrapetyan, G., Chen, W.-L., Chen, Y.-F., Jeong, M. Y., Kim, C.-S., Chen, S.-J., & Dong, C.-Y. (2012). Analysis of collagen fiber domain organization by Fourier second harmonic generation microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, *18*(3), 031105. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.3.031105>
163. Rentchler, E. C., Gant, K. L., Drapkin, R., Patankar, M., & Campagnola, P. J. (2019). Imaging collagen alterations in STICs and high grade ovarian cancers in the fallopian tubes by second harmonic generation microscopy. *Cancers*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/CANCERS11111805>
164. Cicchi, R., Kapsokalyvas, D., de Giorgi, V., Maio, V., van Wiechen, A., Massi, D., Lotti, T., & Pavone, F. S. (2010). Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *Journal of Biophotonics*, *3*(1–2), 34–43. <https://doi.org/10.1002/JBIO.200910062>
165. J, A., VB, P., AA, de T., L, D.-L., C, A. M., F, B.-L., LA, A., & CL, C. (2012). Quantitative changes in human epithelial cancers and osteogenesis imperfecta disease detected using nonlinear multicontrast microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, *17*(8), 081407. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.8.081407>
166. Zhuo, S., Chen, J., Wu, G., Xie, S., Zheng, L., Jiang, X., & Zhu, X. (2010). Quantitatively linking collagen alteration and epithelial tumor progression by second harmonic generation microscopy. *Applied Physics Letters*, *96*(21), 213704. <https://doi.org/10.1063/1.3441337>

Apêndice A

Códigos Matlab

A.1 Método ST

```
function [DoIval, stdDoI, DoI, POd, mu, sd] = ST_function(image)

Img = double(image(:,:,1));

% normalização
Img = (Img - min(Img(:))) / (max(Img(:)) - min(Img(:)));

[N,M] = size(Img);
fontSize = 10;

% filtrar a imagem
sigma = 4;
G = imgaussfilt(Img,sigma);
[Ix,Iy] = gradient(G);

% tensor de estrutura e filtro G2
Ix2 = Ix.*Ix;
Ixy = Ix.*Iy;
Iy2 = Iy.*Iy;

sigma2 = 2;
Tx2 = imgaussfilt(Ix2, sigma2);
Txy = imgaussfilt(Ixy, sigma2);
Ty2 = imgaussfilt(Iy2, sigma2);

% decomposição de valores próprios
H = zeros(N,M,2,2);
H(:,:,1,1) = Tx2;
H(:,:,2,2) = Ty2;
H(:,:,1,2) = Txy;
H(:,:,2,1) = Txy;

L1 = zeros(N,M);
L2 = zeros(N,M);
E1 = zeros(N,M,2);
E2 = zeros(N,M,2);
for i = 1:N
    for j = 1:M
        Hmat = zeros(2,2);
        Hmat(:, :) = H(i,j, :, :);
        [V,D] = eig(Hmat);
        L1(i,j) = D(1,1);
        L2(i,j) = D(2,2);
    end
end
```

```

        E1(i,j,:) = V(:,1);
        E2(i,j,:) = V(:,2);
    end
end

% coeficientes

L = (L2-L1)./(L1+L2);

L(isnan(L))=0;

DoI = L.^2;

DoIval = mean(DoI(:));
stdDoI = std(DoI(:));

figure(), clf
colormap turbo
imagesc(DoI), axis off, axis square
caption = sprintf('DoI = %.2f ± %.2f', DoIval, stdDoI);
text(10,10,caption, 'VerticalAlignment', 'top', 'FontSize', 10, 'color',
'k', 'FontWeight', 'bold', 'BackgroundColor', 'w', 'EdgeColor', 'w');
title('DoI', 'FontSize', fontSize)

PO = (1/2)*atan2((2*Txy), (Ty2-Tx2));
figure(), clf
colormap turbo
imagesc(PO), axis off, axis square
title('OP', 'FontSize', fontSize)

POd = rad2deg(PO);
POd = POd(:);

mu = mean(POd(:));
sd = std(POd(:));

figure()
H = histogram(POd, 'FaceColor', '[0.4660 0.6740 0.1880]');
for i = 1:H.NumBins
    y(i) = H.BinCounts(i)/max(H.BinCounts);
end
H.BinCounts = y;
title('Histogram OP', 'FontSize', fontSize);
xlabel('Orientation', 'FontSize', fontSize);
ylabel('Frequency', 'FontSize', fontSize);
ylim([0 1.1]);
legend(sprintf('std %.3f', sd));

```

A.2 Método FT

```

function [Img, rho_y, the_pos, img_fft, phi, AR, ellipse_struct, sd] =
FT_function(image)

Img = double(image(:,:,1));
% normalização
Img = (Img - min(Img(:))) / max(Img(:));

```

```

% espetro fft
amp2 = log(abs(fft2(Img))); % log apenas para visualização

img_fft = fftshift(amp2);

% filtro passa-banda
[x, y] = ndgrid(linspace(-1, 1, size(img_fft,1)), linspace(-1, 1,
size(img_fft,2)));

width      = .4;
gaus2d_low = exp(-(x.^2 + y.^2) ./ (2*width^2));
gaus2d_high = exp(-(x.^2 + y.^2) ./ (2*(width/5)^2));
gaus       = gaus2d_low - gaus2d_high;
img        = img_fft.*gaus;

% angulo em cada pixel da fft [-pi,pi]
theta = atan2(y,x);

nsections      = 50;
theta_sections = ((theta + pi)/(2*pi)).*(nsections - realmin);
theta_sections = floor(theta_sections) + 1;
theta_sections((x.^2 + y.^2) > 1) = 0;

rho = zeros(nsections, 1);
the = zeros(nsections, 1);
for i = 1 : nsections
    rho(i) = mean(img(theta_sections == i));
    the(i) = mean(theta(theta_sections == i));
end

% histogramas
th = (the*180)/pi;

figure(); clf
%plot(the(numel(the)/2:end), rho(numel(rho)/2:end))
plot(th, rho)
xlabel('the'); ylabel('rho')

figure(), clf
sz = 10;
% polarscatter(the,rho,sz,'filled')
polarscatter(the,rho,sz,'filled')
title('polarhist N=50')

rho_y = (rho(numel(rho)/2:end))/max(rho(numel(rho)/2:end));
the_pos = th(numel(th)/2:end);

sd = std(rho(numel(rho)/2:end));
sd = (sd*180)/pi;

figure(); clf
bar(the_pos(:),rho_y, 'FaceColor', [0.4660 0.6740 0.1880])
title('histograma')
xlabel('the');
ylim([0.6 1.1]);
legend(sprintf('SD %.2f°', sd));

% coordenadas cartesianas
[xx, yy] = pol2cart(the, rho);
fit_cart = figure();
plot(xx2, yy2, '.', 'Color', [0 0 1]);
xlabel('the'); ylabel('rho')
hold on; axis square

[ellipse_struct, ellipse_plot] = fit_ellipse(xx, yy, fit_cart);

```

```

% coordenadas polares
[the_ellipse, rho_ellipse] = cart2pol(ellipse_plot(1,:), ellipse_plot(2,:));

figure()
sz = 5;
polarscatter(the2, rho2, sz, 'filled', 'Color', [0 0 1])
hold on
polarplot(the_ellipse2, rho_ellipse2, 'k');

phi = ellipse_struct.('phi');

% AR
long_axis = ellipse_struct.('long_axis');
short_axis = ellipse_struct.('short_axis');

AR = long_axis/short_axis;

```

Apêndice B

GLCM

O método matriz de coocorrências de níveis de cinzento (GLCM) é uma ferramenta estatística usada para determinar a textura de uma imagem avaliando a relação entre os valores de intensidade dos pixels vizinhos. Para a análise das estruturas fibrilares de colagénio focamos na correlação entre pixels vizinhos. Com base nesse método, informações sobre o arranjo geométrico do colagénio e sobre a sua organização com a distância podem ser retiradas^[164–166]. Foi relatado anteriormente que para o colagénio organizado em fibrilas lineares e distintas, a correlação entre a intensidade dos pixels vizinhos diminui rapidamente com a distância. Quando a organização do colagénio é menos definida, valores de correlação mais baixos são alcançados para distâncias maiores^[164–166]. As correlações entre os valores de intensidade de pixels adjacentes foram computadas nas direções vertical, horizontal e diagonal para os mesmos intervalos de distância em imagens de tamanhos iguais.

B.1 Fantomas

Para demonstrar a viabilidade do método GLCM em avaliar eficientemente o arranjo das fibras de colagénio dentro da córnea, foram analisadas os três fantomas representativos de cada critério (Figura 22, Figura 23 e Figura 24). Foram investigadas as correlações entre os valores de intensidades dos pixels adjacentes nas direções horizontal (0°), diagonal (45°) e vertical (90°).

Conforme antecipado, para o primeiro critério de desorganização (Figura 51), em imagens com estruturas fibrilares simuladas com orientação definida, observa-se uma rápida diminuição da correlação em todas as direções (Figura 51(a)). Porém, nos fantomas com

grau de desorganização mais elevado, (b) e (c), era de esperar que a correlação apresentasse um decréscimo menos acentuado, mas identifica-se um perfil semelhante às curvas de correlação do fantoma (a) (estrutura organizada). Com o segundo critério (Figura 52) também se observa um decréscimo abrupto para o fantoma mais organizado (Figura 52(a)), exceto na direção vertical. Tal era esperado dado que a imagem simulada apresenta fibras alinhadas verticalmente. Nos fantasmas (b) e (c) deste critério, o decréscimo da correlação com a distância entre pixels é menos abrupto, no entanto, não se observa uma distinção clara entre os resultados destes dois fantasmas. Para o terceiro e último critério (Figura 53), as curvas de correlação dos três fantasmas têm um comportamento similar, no entanto o fantoma c apresenta um decréscimo ligeiramente menos acentuado em todas as direções.

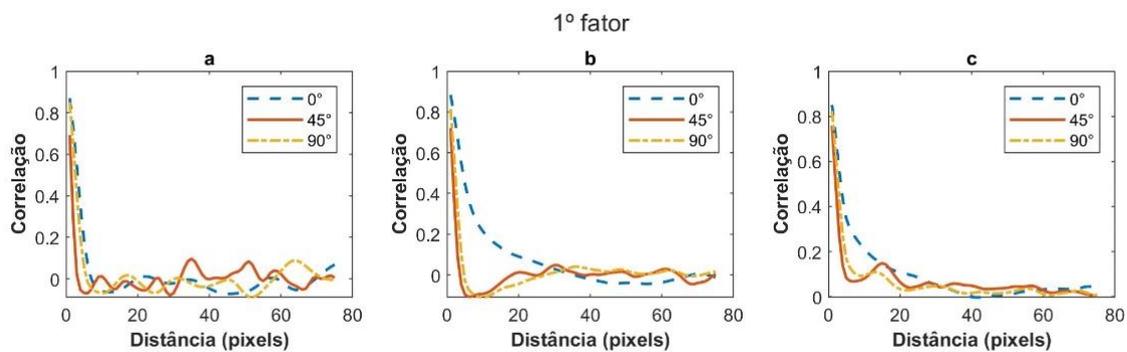


Figura 51: Correlação em função da distância (em pixels) de fantasmas representativos do critério de desorganização com base na organização das fibras de colagénio por lamela, nas direções horizontal (0°), diagonal (45°) e vertical (90°).

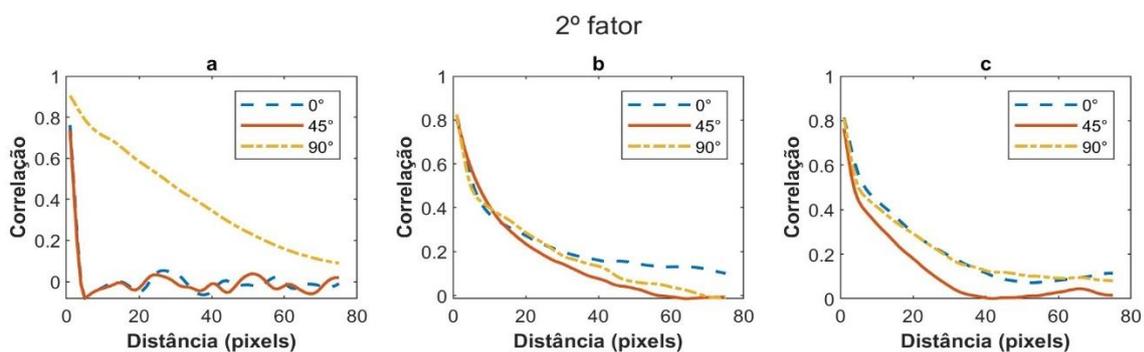


Figura 52: Correlação em função da distância (em pixels) de fantasmas representativos do critério de desorganização com base na complexidade lamelar, nas direções horizontal (0°), diagonal (45°) e vertical (90°).

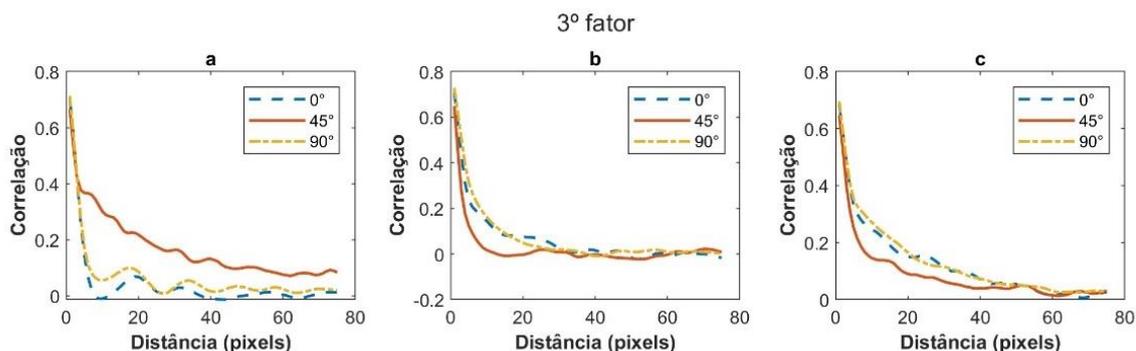


Figura 53: Correlação em função da distância (em pixels) de fantasmas representativos do critério de desorganização com base na variabilidade intra-lamelar, nas direções horizontal (0°), diagonal (45°) e vertical (90°).

Por último, a estrutura das fibras de colagénio foi analisada usando o método de textura de matriz de coocorrência de nível de cinzento. O GLCM pode fornecer recursos de textura com base em padrões estatísticos de nível de cinzento entre pixels vizinhos. Em particular, a correlação de intensidade em função da distância dos pixels. A correlação pode indicar se existe uma estrutura fibrosa ou não na imagem. Em detalhe, se a correlação diminuir drasticamente com a distância, a imagem apresenta fibras lineares distintas, se permanecer elevado à medida que a distância aumenta, a organização do colagénio tem uma estrutura fibrilar menos definida^[166]. Portanto, para o primeiro fator de desorganização (Figura 51), o método deteta estruturas com fibras de colagénio distintas nos três fantasmas. Para este fator, o método não identifica o aumento das tortuosidades das fibras como aumento de desorganização. O mesmo se sucede para o terceiro critério. Apenas a análise ao segundo fator mostra que, se consegue fazer a diferenciação entre uma estrutura organizada e não organizada. Porém, não faz distinção entre estruturas fibrilares desorganizadas. Conclui-se que o GLCM não tem capacidade em diferenciar estruturas organizadas de não organizadas.

B.2 Imagens SHG

A correlação foi analisada ao longo das direções da imagem horizontal, diagonal e vertical ao longo da imagem. As curvas obtidas para as duas córneas analisadas são mostradas na

Figura 54. Na córnea marcada observa-se uma diminuição linear mais lenta entre pixels para todas as direções, enquanto para a córnea não marcada a diminuição da correlação é mais acentuada. Porém, encontra-se uma diferença entre as curvas das imagens em transmissão e as em reflexão. Na córnea marcada o intervalo entre os valores máximos de correlação, em todas as direções, e os valores mínimos é maior na imagem adquirida em reflexão. O contrário se identifica na amostra não marcada.

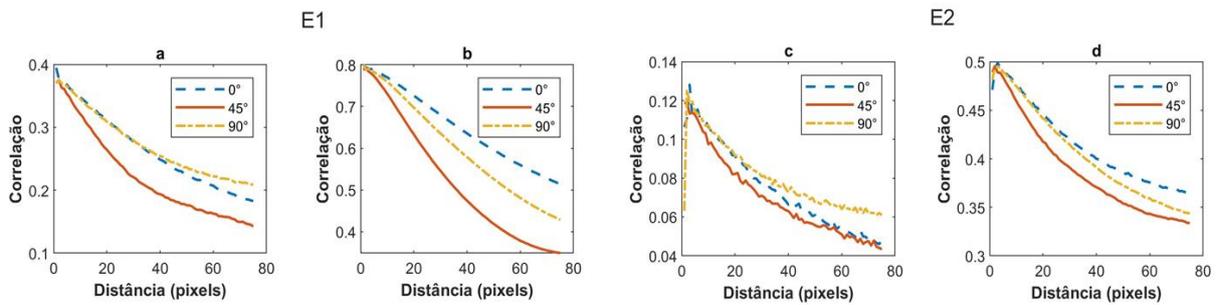


Figura 54: Correlação em função da distância (em pixels) de imagens SHG adquiridas em transmissão e em reflexão, nas direções horizontal (0°), diagonal (45°) e vertical (90°).

A disposição geométrica do colagénio foi avaliada, nas imagens SHG, através da correlação entre pixels vizinhos em função da distância utilizando GLCM. Mais uma vez a correlação foi analisada ao longo das direções da imagem vertical, diagonal e horizontal. Nas curvas obtidas para as imagens (a) e (b) (Figura 54) verifica-se uma diminuição linear lenta na correlação entre pixels com a distância nas três direções. É possível concluir que o método encontra correlações entre pixels nas diferentes direções em cada imagem, porém, os valores da correlação são mais elevados para a imagem em reflexão, o que indica uma estrutura melhor definida. Ou seja, o GLCM obtém resultados semelhantes aos do método ST, que encontram estruturas mais organizadas nas imagens e reflexão.