



Universidade de Coimbra
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Física

Análise Automática da Morfologia do Plexus Nervoso Sub-basal da Córnea

Luís Carlos Gomes

Coimbra, 2011

Análise Automática da Morfologia do Plexus Nervoso Sub-basal da Córnea

Luís Carlos Gomes

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Biomédica realizado sob orientação científica de Professor Doutor José Silvestre Serra da Silva e Professor Doutor António Miguel Lino Santos Morgado

Departamento de Física

Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra

Setembro 2011

This work is funded by FEDER, through the Programa Operacional Factores de Competitividade-COMPETE and by National funds through FCT- Fundação para a Ciência e Tecnologia in the frame of project PTDC/SAU-BEB/104183/2008, F-COMP-01-0124-FEDER-010941

Este trabalho é financiado pelo FEDER, através do Programa Operacional Factores de Competitividade-COMPETE e fundos nacionais através da FCT- Fundação para a Ciência e Tecnologia no âmbito do projeto PTDC/SAU-BEB/104183/2008, F-COMP-01-0124-FEDER-010941



Agradecimentos

Esta a chegar ao fim uma das fases mais bonitas da minha vida, aqui conheci pessoas espectaculares que nunca esquecerei e fiz amigos que espero que fiquem comigo para a vida. Amigos que me apoiaram e que comigo partilharam as peripécias de uma vida estudantil.

Um ano antes de entrar nesta fase da minha vida de estudante desejava que este momento de tanta responsabilidade não chegasse; é verdade que houve momentos altos e momentos baixos mas as coisas foram sendo superadas e com muita insistência por parte das pessoas que sempre me apoiaram consegui lidar com todos os desafios.

A vida é mesmo assim e outros desafios virão para eu ultrapassar e para o conseguir com sucesso tenho de agradecer em primeiro lugar ao meu orientador José Silvestre por toda a dedicação e por toda a paciência do mundo que teve de ter para me conseguir guiar ao longo deste ano. Não deve ter sido fácil mas pela pessoa que é e pela preocupação que demonstra para com os seus alunos eu só tenho a agradecer-lhe pela dedicação e pelos pequenos puxões de orelhas que me deu ao longo do ano. Também gostaria de fazer um agradecimento ao Professor Miguel Morgado pela boa disposição que demonstra todos os dias para connosco e pela facilidade que é puder falar-lhe sobre os problemas de ser estudante de Engenharia, demonstrando sempre toda a atenção e toda a disposição ao serviço de um curso em crescimento.

Gostaria de deixar uma palavra de gratidão a todos os intervenientes do projecto *neurocornea* assim como àquelas reuniões logo de manhã onde se discutia o melhor para o projecto desenvolvido e onde pude conhecer alguns professores de uma

forma que normalmente não se está habituado a conhecer enquanto alunos. Um muito obrigado ao Professor José Paulo Domingues, ao Professor Custódio Loureiro, à Ana Ferreira, à Ana Batista, à Susana Silva e ao João Lamas.

Aos meus pais e irmão um OBRIGADO por tudo o que me proporcionaram nesta vida, nunca deixando de puxar por mim, mesmo quando queria ser o dono da razão, e por sempre me apoiarem e me permitirem ser o que sou hoje. MUITO OBRIGADO pais, são vocês os culpados por eu estar aqui. OBRIGADO Tiago por seres um chato de primeira mas seres meu irmão e das pessoas que mais gosto e que mais importância têm para mim neste mundo.

Como não podia deixar de ser queria agradecer a todos os Pxinxos & Txufas, e são muitos, por estes 5 anos fantásticos que partilhei com vocês e por serem aqueles amigos que sempre irão ficar comigo. Muito obrigado André, Tiago, Pedro, João André, Diogo, Duarte, Zé Pedro, Nuno Lopes, João Borba, Ana Cristina, Tatiana, Maria Carolina, Rute, Susana Silva, Inês, Susana Silva (Pxinxo), Rita e Ana Moço.

Aos meus grande companheiros de aventuras ao longo dos últimos 3 anos, onde marcamos presença pela nossa irreverência e pela nossa alegria. Um grande obrigado aos Caloriças e à Caloriças House onde vivi estes últimos 3 anos. E um grande obrigado pelo sucesso da “Green Operation”, sem vocês não seria possível. Muito obrigado Tiago, André, João André, Pedro e também ao Álvaro que mesmo chegando em último faz parte dos Caloriças.

Um agradecimento a todas as pessoas que conheci em Coimbra, tanto no curso como fora dele e como não me podia esquecer, um grande obrigado a todas as vizinhas por aturarem as revoluções que ocorriam na Caloriças House sem nunca reclamarem e se tornarem grandes amigas.

Por fim, um obrigado muito especial à Adelaide, uma pessoa muito especial para mim e que me apoiou incondicionalmente ao longo deste ano. Sempre ao meu lado e sempre a dar-me na cabeça quando eu reclamava e baixava os braços. Nunca me deixou bater no fundo e sempre me ouviu quando mais precisei.

Índice

Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	vi
Acrónimos	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
Capítulo 1 - Córnea – Estrutura Nervosa	1
1.1 – Constituição da córnea	1
1.2 – Estrutura nervosa da córnea	4
1.2.1 – Estrutura	4
1.2.2 – Função	6
1.2.3 – Distribuição e origem	7
1.2.4 – Orientação e deslocamento	9
1.2.5 – Parâmetros morfométricos	11
1.2.5.1 – Tortuosidade	11
1.2.5.2 – Densidade e comprimento dos nervos	12
1.2.6 – Bioquímica dos nervos	15
Capítulo 2 - Neuropatia Diabética	19
2.1 – Formas e quadro clínico da neuropatia diabética	20
2.1.1 – Neuropatia simétrica distal	20
2.1.2 – Neuropatia dolorosa	21
2.1.3 – Neuropatia autonómica	22
2.1.4 – Mononeuropatia	22
2.2 – Patogénese	23
2.2.1 – Activação da via do poli(ol)	24
2.2.2 – Produtos finais da glicosilação avançada (AGEs)	25
2.2.3 – Insuficiência vascular	25
2.2.4 – Factores Neurotróficos	25

2.2.5 – Disfunção do canal iónico da membrana neuronal	26
2.3 – Diagnóstico	26
2.4 – Os nervos da córnea como forma de diagnóstico da neuropatia diabética	28
Capítulo 3 – Estado de Arte	30
3.1 – Métodos de Segmentação dos nervos	30
3.1.1 – Segmentação dos nervos da córnea combinando a análise da simetria de fase e classificação com matriz Hessiana	31
3.1.2 – Segmentação dos nervos da córnea combinando a análise da simetria de fase e reconstrução morfológica	33
3.1.3 – Reconhecimento automático de estruturas nervosas da córnea com acompanhamento do nervo	34
3.1.4 – Análise Automática da Neuropatia Diabética Periférica utilizando Morfologia Quantitativa Multi-escala das fibras nervosas	36
3.1.4.1 – Modelo Simples	36
3.1.4.2 – Modelo Multi-escala	37
Capítulo 4 – Motivação	40
Capítulo 5 – Metodologia	42
5.1 – Materiais	42
5.2 – Definição dos parâmetros	44
5.3 – Pré-processamento	44
5.4 – Processamento	47
5.5 – Pós-Processamento	53
Capítulo 6 – Resultados e Discussão	56
6.1 – Conjunto de estudo	57
6.2 – Performance do método	58
6.2.1 – Avaliação da segmentação	58

6.3 – Avaliação dos parâmetros morfométricos	61
6.3.1 – Comprimento	64
6.3.2 – Densidade	70
6.3.3 – Tortuosidade	73
Capítulo 7 – Conclusão	77
7.1 – Perspectivas futuras	80
Referências	81

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Anatomia da córnea	2
Figura 1.2 – a) Nervos liso e granulados, b) Nervo granulado, c) Ramificação perpendicular dos nervos	5
Figura 1.3 – Sequência de imagens in vivo que mostram as alterações drásticas que ocorrem no plexus sub-basal em menos de 6 semanas	6
Figura 1.4 – Distribuição radial das fibras nervosas ao longo da córnea humana	7
Figura 1.5 – Vista tangencial de um feixe nervoso constituído por 8 fibras	8
Figura 1.6 – Distribuição dos nervos tanto no estroma como no plexus sub-basal	9
Figura 1.7 – Possível localização das terminações nervosas ou locais de perfuração da membrana de Bowman	9
Figura 1.8 – Região em espiral onde se pode ver o deslocamento das estruturas nervosas	10
Figura 1.9 – Ilustração dos vários neuroquímicos presentes na enervação da córnea (Alterado de Müller, 2003)	16
Figura 2.1 – Estruturas nervosas da córnea de um sujeito controlo e de um sujeito com neuropatia diabética	29
Figura 5.1 – Imagens representativas do conjunto de imagens utilizados ao longo do método	43
Figura 5.2 – Imagens antes e após a aplicação do algoritmo de simetria de fase	45
Figura 5.3 – Resultados da aplicação do algoritmo de simetria de fase com sobreposição dos pontos semente obtidos	46
Figura 5.4 – Imagens que representam a variação de luminosidade da periferia para o centro	47
Figura 5.5 – Resultados da aplicação do filtro de média, resultando numa diminuição da luminosidade	47
Figura 5.6 – Esquema representativo da selecção do primeiro candidato a ponto central do nervo	48
Figura 5.7 – Esquema que representa o perfil do nervo traçado após escolha da melhor direcção do nervo	49

Figura 5.8 – Ilustração de um perfil obtido ao longo da segmentação dos nervos . . .	50
Figura 5.9 – Esquema ilustrativo da selecção dos candidatos a ponto central que se seguem ao primeiro	53
Figura 5.10 – Imagem resultante do processamento e que demonstra uma acumulação de ruído nas extremidades da imagem	54
Figura 5.11 – Representação do pequeno ruído que se acumula por toda a imagem e é eliminado aplicando um valor limite ao tamanho das estruturas da imagem	55
Figura 5.12 – Imagem resultante do terceiro procedimento de eliminação de estruturas	55
Figura 6.1 – Resultados obtidos após aplicação do algoritmo proposto sobrepostos sobre a imagem original	57

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Comparação do comprimento dos nervos obtidos pelo estudo feito por Scarpa et al. pelo método manual (Alterado de Scarpa, 2008)	14
Tabela 1.2 – Comparação da densidade dos nervos obtidos pelo estudo feito por Scarpa et al. e pelo método manual (Alterado de Scarpa, 2008)	14
Tabela 1.3 – Sumário dos resultados obtidos por vários estudos e relativos à avaliação dos parâmetros morfométricos da córnea (Alterado de Patel 2009)	14
Tabela 2.1 – Características principais das várias formas de neuropatia diabética (Alterado de Gooch, 2004)	20
Tabela 2.2 – Factores patogénicos que afectam os nervos de pacientes que padecem de diabetes (Alterado de Gooch, 2004)	23
Tabela 6.1 – Tabela com todos os resultados necessários para avaliar a performance do método quanto à segmentação dos nervos	59
Tabela 6.2 – Valores médios dos pixéis correcta e falsamente segmentados como nervos e também dos não segmentados como nervos	60
Tabela 6.3 – Valores relativos ao comprimento dos nervos e obtidos tanto pelo método manual como pelo método proposto (automático)	62
Tabela 6.4 – Dados de todos os valores obtidos para a tortuosidade dos nervos presentes nas imagens. Valores obtidos pelo método manual e automático	63
Tabela 6.5 – Valores relativos à densidade dos nervos e obtidos tanto pelo método manual como pelo método proposto (automático)	64
Tabela 6.6 – Valores médios do comprimento dos nervos extraídos tanto pelo método manual como pelo método automático	65
Tabela 6.7 – Valores médios da densidade dos nervos extraídos tanto pelo método manual como pelo método automático	70
Tabela 6.8 – Valores médios da tortuosidade dos nervos extraídos tanto pelo método manual como pelo método automático	72

Acrónimos

AGEs – (Advanced Glicosilation End Products) Produtos finais da glicosilação avançada

CCM – (Corneal Confocal Microscopy) Microscopia confocal da córnea

CGRP – (Calcitonin gene-related peptide) Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina

CLAHE – (Contrast Limitation Adapted Histogram Equalization) Equalização adaptativa do histograma com limitação de contraste

CNTF – (Ciliar Neurotrophic Factor) Factor neurotrófico ciliar

EGF – (Epidermal Growth Factor) Factor de crescimento epidérmico

EMG – (Electromiography) Electromiografia

FCM – Fuzzy C-Mean Clustering

IDDM – (Insulin-dependent diabetes) Diabetes insulino-dependente

IGF-1 – (Insuline-like Growth Factor-1) Factor de crescimento da insulina

IVCM – (In Vivo Confocal Microscopy) Microscopia Confocal in vivo

LMS – (Least Mean Square) Mínimos Quadrados

LSCM – Laser Scanning Confocal Microscope

MAP – Mitogen Associated Protein kinase

NADPH – (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) Nicotinamida adenina difosfato

NGF – (Nerve Growth Factor) Factor de crescimento dos nervos

NIDDM – (Noninsulin-dependent diabetes) Diabetes não insulino-dependente

NNT – (Neuronal Network) Redes Neurais

NPY – (Neuropeptide Y) Neuropeptídeo Y

PACAP – (Pituitary adenylate cyclase-activating peptide) Peptídeo de activação da adenilato ciclase pituitária

ROI – (Region of interest) Região de interesse

SP – (Substance P) Substância P

TC – (Tortuosity Coefficient) Coeficiente de Tortuosidade

VIP – (Vasoactive Intestinal Polipeptide) Polipeptídeo intestinal vasoactivo

Resumo

A análise actual dos nervos da córnea é baseada numa identificação manual que está sempre sujeita a erros, e é ao mesmo tempo monótona para o especialista da área médica. Assim sendo a proposta desta tese foi desenvolver um método de segmentação automática de imagens contendo nervos da córnea e obtidas com recurso à microscopia confocal da córnea (CCM). Para satisfazer as necessidades dos especialistas médicos o método tem de ser capaz de segmentar com um grande percentagem de sucesso as imagens assim como tem de ser capaz de fornecer vários parâmetros morfométricos importantes para a análise das imagens. Estes parâmetros são cruciais para o diagnóstico da neuropatia diabética que afecta os nervos da córnea.

Os método proposto baseia-se numa segmentação ponto a ponto da imagem, começando num ponto chamado de ponto semente, ou de iniciação, e vai percorrendo toda a estrutura nervosa até atingir um ponto terminal. Como as imagens obtidas por CCM apresentam algumas dificuldades à segmentação foi necessário recorrer a um algoritmo de simetria de fase para realçar as estruturas nervosas.

A validação do algoritmo foi feita em 30 imagens, tendo-se em conta a percentagem de pixéis correctamente segmentados como nervo assim como a correlação entre os parâmetros morfométricos obtidos pelo método proposto e o método de segmentação manual.

Não é possível fazer uma comparação com o métodos descritos no estado da arte pois o conjunto de imagens difere de método para método no entanto os valores apresentados pelo método proposto são encorajadores e apresentam boas perspectivas futuras para a utilização do método em testes de diagnóstico da neuropatia diabética.

Abstract

The current analysis of corneal nerves is based on a manual identification that is always subject to errors, and at the same time is monotonous for the specialist in medical area. Therefore, the propose of this thesis was to develop a new method of automatic segmentation of images containing corneal nerves and obtained by using a corneal confocal microscope (CCM). To satisfy the necessity of the medical specialists, the method must be capable to segment the images, with great percentage of success, as well as it must be capable to provide several morphometric parameters that are important to image analysis. This parameters are crucial for the diagnose of diabetic neuropathy, one of the main complications of diabetes.

The proposed method is based in a point to point segmentation of the image, beginning in a point called seed point, or initiation point, and the method goes through the entire nervous structure until it reach a termination point. As the images obtained by CCM present some difficult to segmentation, it was necessary to use an algorithm of phase symmetry to enhance de nerves.

The method validation was made in 30 images, taking into account the percentage of pixels correctly segmented as nerves as well as the correlation between the morphometric parameters obtained by proposed method and the manual method.

It wasn't possible to compare with the method of state-of-art because the data set is different between methods, however, the values presented by the proposed method are very encouraging and present good future prospects to the use of this method in tests of diagnose of diabetic neuropathy.

Capítulo 1 – Córnea – Estrutura Nervosa

Situada na zona anterior do olho, a córnea é transparente e avascular e permite a resistência à tracção, a protecção contra factores externos e a existência de uma interface refractiva. Estas estruturas com aproximadamente $1,3 \text{ cm}^2$ (1/6 da superfície do olho) é uma das áreas do corpo humano com maior grau de enervação, sendo constituída por fibras A δ e fibras C, que não são mielinizadas (Patel, 2005) (Ghasemi, 2008) (Tuisku, 2008).

A sua espessura não é uniforme, sendo na região central – aproximadamente $534 \mu\text{m}$ – e na região periférica – aproximadamente $650 \mu\text{m}$ (Parwez *et al*, 2005) (Patel, 2005) (Ghasemi, 2008) (Tuisku, 2008).

1.1 – Constituição da córnea

A córnea divide-se em 5 sub-camadas: o epitélio, a membrana de Bowman, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio, (Fig. 1).

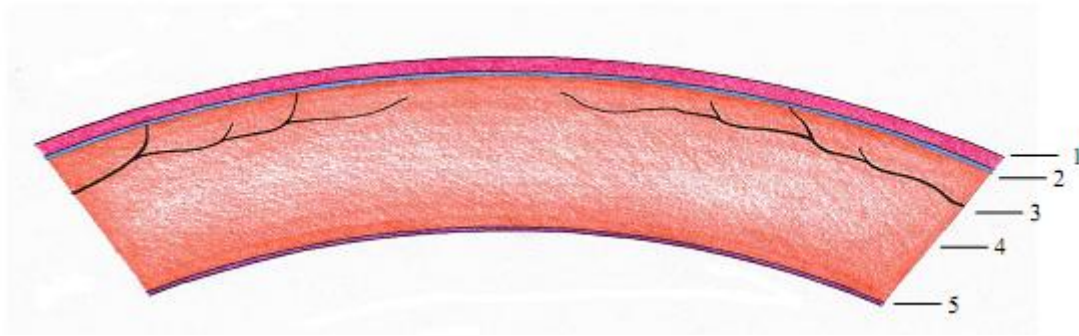


Figura 1.1: Ilustração da anatomia da córnea: 1) Epitélio, 2) Plexus nervoso sub-basal e Membrana de Bowman, 3) Nervos do estroma, 4) Estroma e 5) Membrana de Descemet e Endotélio (Tuiski, 2008).

Epitélio

O epitélio é formado por 5 a 7 camadas de células escamosas não queratinizadas e mede cerca de 40 a 60 μm de espessura. Na sua constituição existem 3 tipos de células: as células epiteliais superficiais, as células asa intermediárias e as células epiteliais basais, mais profundas. É um tecido altamente dinâmico em que as células estão em constante renovação.

As células epiteliais superficiais estão ligadas entre si por pequenas junções e desmossomas formando assim uma barreira contra agentes externos e dando ao epitélio as propriedades de uma membrana semi-permeável (Patel, 2005) (Ghasemi, 2008) (Tuisku, 2008).

Membrana de Bowman

A membrana de Bowman separa o epitélio do estroma e é constituída por fibrilhas de colagénio densamente entrelaçadas, provendo a córnea de uma força de tracção e permitindo-lhe ser uma membrana limitativa. A espessura desta camada sem células é de 8 a 16 μm . Esta membrana não se regenera após lesão (Patel, 2005) (Ghasemi, 2008) (Tuisku, 2008).

Estroma

O estroma representa cerca de 90% da espessura da córnea e 76% desta camada é hidratada. Caracteriza-se por ser uma matriz extra-celular constituída por proteoglicanos, fibrilhas de colagénio, organizadas em lamelas paralelas à superfície da córnea e queratócitos que se distribuem entre as lamelas de colagénio mantendo o arranjo destas estruturas. Estas lamelas conferem à córnea uma grande força e resiliência. A sua distribuição permite uma melhor transferência de substâncias através do tecido promovendo uma nutrição adequada (Patel, 2005) (Ghasemi, 2008) (Tuisku, 2008).

Membrana de Descemet

A membrana de Descemet encontra-se adjacente ao endotélio servindo-lhe como local de armazenamento. Esta membrana é constituída essencialmente por colagénio tipo IV e a sua espessura aumenta com a idade, desde 3 μm à nascença até 8 a 10 μm na idade adulta (Patel, 2005) (Ghasemi, 2008) (Tuisku, 2008).

Endotélio

Por fim, o endotélio é a camada posterior da superfície da córnea e é coberta por uma camada simples de células endoteliais. De todas as células que constituem a córnea estas são as que têm maior metabolismo necessitando de ser abastecidas através do humor aquoso. A densidade de células no endotélio vai diminuindo com a idade pois estas células são amitóticas (Patel, 2005) (Ghasemi, 2008) (Tuisku, 2008).

1.2 – Estrutura nervosa da córnea

1.2.1 – Estrutura

As estruturas que constituem a enervação do epitélio central da córnea dividem-se entre a membrana de Bowman, por onde penetram os nervos vindos do estroma, o plexus nervoso basal e epitelial, as células dendríticas ligadas às fibras nervosas e as terminações nervosas, que se dividem dicotomicamente (forma de Y) na camada celular superficial (Schimmelpfennig, 1982).

Estes nervos são estruturas com uma forma fina e alongada e assentam numa camada com pouco mais de 10 μm de espessura sendo a sua integridade dependente da difusão dos nutrientes através da camada endotelial basal (Malik *et al*, 2003) (Scarpa *et al*, 2008).

Os nervos que formam o conjunto de fibras epiteliais dividem-se entre estruturas nervosas lisas e granuladas (Figura 1.2 a-c) e agrupam-se para formar os feixes nervosos. Quando ocorrem ramificações nestes feixes estas dão-se perpendicularmente ao feixe principal (Müller *et al*, 2003).

Nas fibras nervosas granuladas, os grânulos que surgem ao longo do axónio contêm uma elevada densidade de mitocóndrias e a sua aparência ultra-estrutural é muito semelhante à descrita para as terminações nervosas nocirreceptoras de outros tecidos (Müller *et al*, 2003).

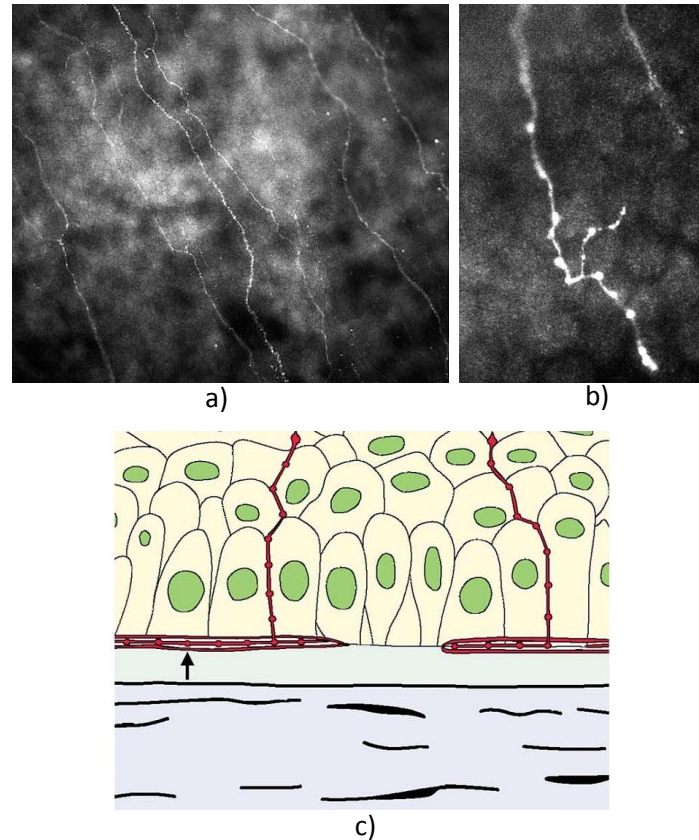


Figura 1.2: Imagens ilustrativas dos nervos da córnea. a) Ilustração de uma imagem constituída tanto por nervos lisos como nervos granulados, b) imagem constituída por um nervo em que se pode verificar a presença de grânulos ao longo da sua estrutura, c) esquema que ilustra a ramificação perpendicular dos ramos principais, ilustrando também a presença de ramos granulados (Müller *et al*, 2003).

O plexus nervoso sub-basal da córnea, sendo uma das camadas responsáveis pela enervação da córnea, é constituído por uma grande quantidade de nervos que lhe conferem um grande dinamismo caracterizado por um movimento contínuo das ramificações nervosas a uma velocidade de 23 μm /semana. Este dinamismo presente nesta camada leva a alteração drásticas desta estrutura como se pode verificar na figura 1.3 (Patel & McGhee, 2008).

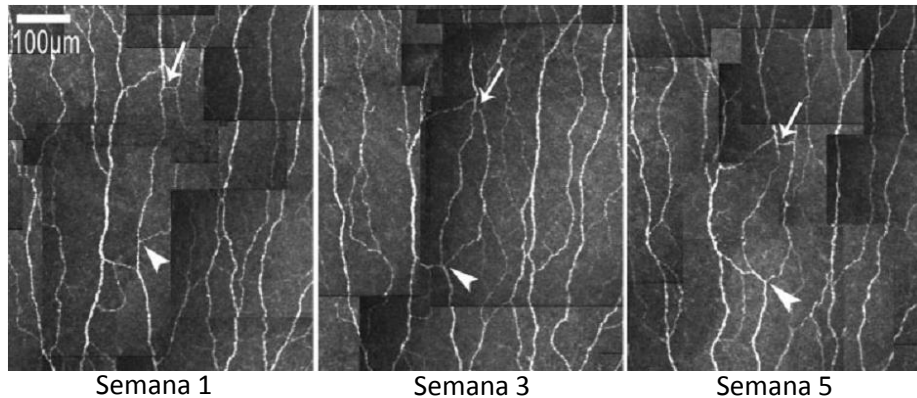


Figura 1.3: Sequência de imagens in vivo que mostram as alterações drásticas que ocorrem no plexus sub-basal em menos de 6 semanas. Demonstrando um estrutura altamente dinâmica (Patel & McGhee, 2008).

1.2.2 – Função

Certos fenómenos biológicos que ocorrem na córnea, como o metabolismo epitelial da córnea, como a adesão celular e também a cicatrização epitelial dependem de uma enervação adequada deste órgão (Malik *et al*, 2003). Além de terem uma acção preponderante nestes fenómenos biológicos, os nervos regulam a integridade e proliferação das células epiteliais assim como têm uma função protectora (Patel & McGhee, 2009) (Grupcheva *et al*, 2002), contribuindo para a manutenção da superfície ocular (Müller *et al*, 2003).

As fibras nervosas da córnea libertam factores difusíveis que estimulam o crescimento do epitélio, a diferenciação e a produção de colagénio tipo VII. Por seu turno as células epiteliais produzem factores solúveis como factor de crescimento neuronal e o factor neurotrófico derivado das células gliais que tem um efeito neurotrófico (Hu *et al*, 2008).

O enfraquecimento ou até a não enervação da córnea leva ao redução da função das células epiteliais e endoteliais, aumentando assim a permeabilidade destas camadas e diminuindo a migração e mitose celulares. Todos estes factores, responsáveis pela perda de sensibilidade, tornam a córnea mais predisposta a anormalidades no epitélio ou no estroma, a uma erosão recorrente assim como a uma cicatrização enfraquecida (Grupcheva *et al*, 2002).

Estudos já feitos, relativos ao grau de inervação da córnea, confirmam que uma disfunção na inervação da córnea pode levar a uma condição degenerativa conhecida como keratitis neurotrófica (Müller *et al*, 2003).

1.2.3 – Distribuição e origem

Grande parte das fibras nervosas que constituem a córnea são fibras sensoriais e têm origem no ramo oftálmico e no ramo maxilar pertencentes ao nervo trigeminal, e estudos feitos por LaVail *et al*, 1993 provam que a córnea recebe o seu fornecimento sensorial de cerca de 50 a 450 neurónios trigeminais. Além desta inervação sensorial proveniente do nervo trigeminal a córnea também recebe inervação sensorial do gânglio cervical superior (Müller *et al*, 2003) (Parwez *et al*, 2005).

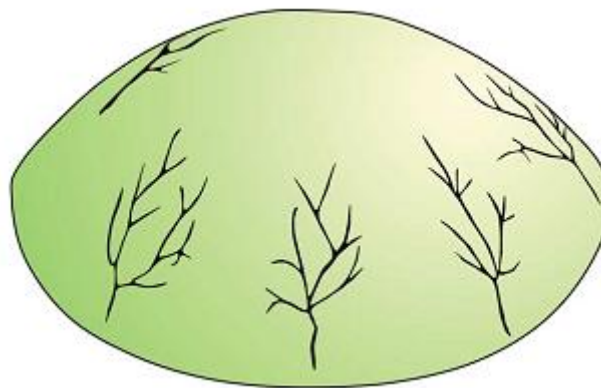


Figura 1.4: Distribuição radial das fibras nervosas ao longo da córnea humana (Müller *et al*, 2003).

Esta inervação entra pela periferia da córnea, de uma forma radial e paralela à sua superfície, como se pode ver na figura 1.4, formando o plexus sub-epitelial terminal que emerge acima e abaixo da camada de Bowman. Estes feixes perdem a bainha de mielina quando entram no limbo e continuam para dentro da córnea apenas rodeados por células de Schwann, subdividindo-se em pequenos ramos laterais. A ausência da bainha de mielina deve-se à necessidade de manter a transparência da córnea (Müller *et al*, 2003) (Grupcheva *et al*, 2002).

Os feixes nervosos sem bainha de mielina e situados na parte central da córnea contém um número variável de axónios e estão incorporados numa matriz extracelular densa e amorfa (Figura 1.5a). Existem células denominadas de queratócitos que se encontram muitas vezes próximos das fibras nervosas podendo em certas regiões envolver as fibras adjacentes (Müller *et al*, 2003).

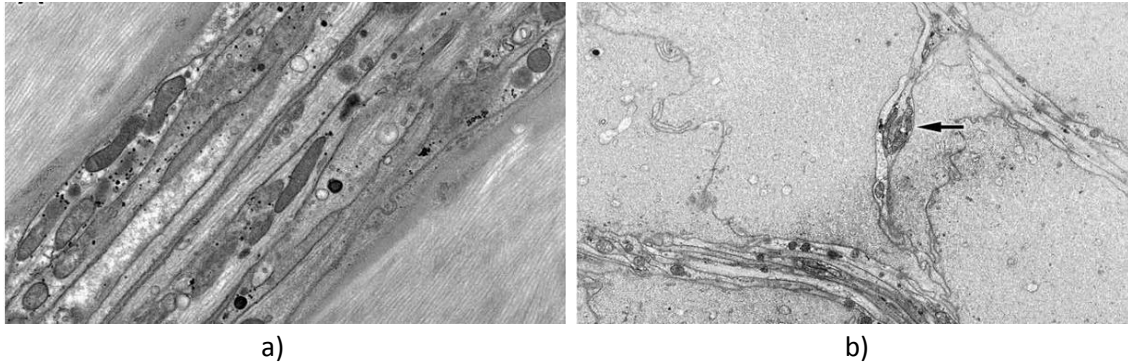


Figura 1.5: a) Imagem representativa de um feixe nervoso constituído por 8 fibras nervosas (vista tangencial), b) Conjunto de fibras nervosas a moverem-se entre as células epiteliais. Pode ver-se algumas ramificações secundárias entre feixes principais e também um aglomerado de mitocóndrias em alguns nervos (Müller *et al*, 2003).

Os troncos nervosos mais espessos do estroma movem-se da periferia para o centro antes de atingirem um terço do próprio estroma devido à organização das lamelas de colagénio, como constataram Müller *et al*, 2001; e Radner & Mallinger, 2002.

De forma seguirem em direcção à região central da córnea, e como se pode observar na figura 1.6, as fibras nervosas podem alterar abruptamente a sua direcção em 90°. Quando atingem a zona central da córnea estas fibras penetram a membrana de Bowman podendo também ocorrer uma penetração pela zona periférica. Após a penetração da membrana de Bowman, os feixes nervosos dividem-se em feixes mais pequenos e cada um destes feixes altera mais uma vez a sua direcção em 90° de forma a continuarem paralelos à superfície, mas desta vez entre a membrana de Bowman e as células da membrana basal epitelial, ou seja, pelo plexus nervoso sub-basal, formando uma correia epitelial (Müller *et al*, 2003).

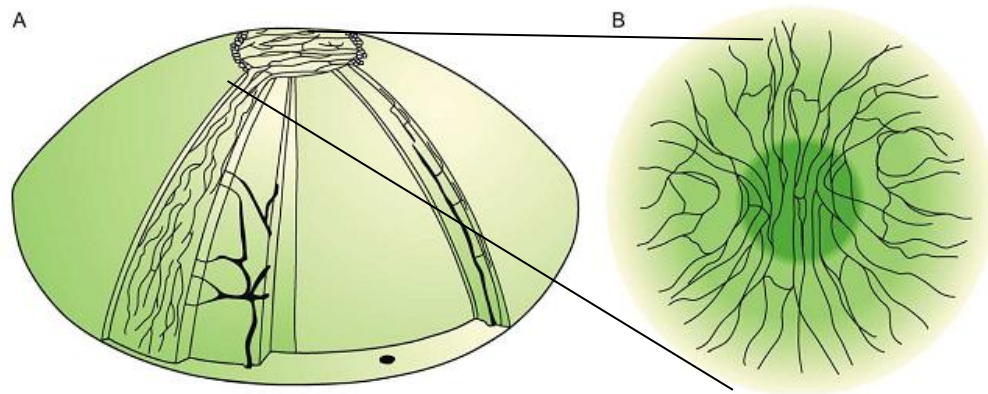


Figura 1.6: A) Distribuição esquemática dos nervos tanto no estroma como no plexus sub-basal. Pode ver-se a orientação preferencial dos nervos. B) Vista pormenorizada da distribuição dos nervos na região central da córnea onde se pode verificar uma tendência dos nervos se deslocarem para o centro da córnea e aí penetrarem para a membrana de Bowman (Müller *et al*, 2003)

Na córnea periférica média foram observadas áreas brilhantes (Figura 1.7), com uma forma irregular e com um diâmetro de 20 a 40 μm onde possivelmente ocorrem as terminações nervosas. Estas áreas foram observadas ao nível do plexus nervoso sub-basal (Patel & McGhee, 2005).

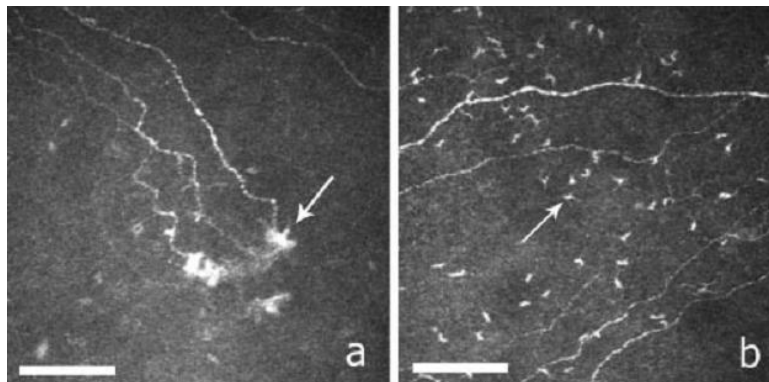


Figura 1.7: Os pontos mais brilhantes correspondem a um possível localização de terminações nervosas ou locais de perfuração dos nervos através da membrana de Bowman (Patel & McGhee, 2005).

1.2.4 – Orientação e deslocamento

Estudos com IVCM (Microscopia Confocal *in vivo*) feitos por Rosenberg *et al.* 2000, e Oliveira-Soto & Efron, 2001, mostram que as fibras nervosas sub-basais têm uma orientação preferencial de 6-12h, isto é, superior para inferior, no entanto outros

estudos mostram fibras orientadas perpendicularmente ao eixo, ou seja, com uma orientação 9-3h (temporal para medial) (Müller *et al*, 2003).

A orientação perpendicular à superfície da córnea por parte das ramificações nervosas, sugere que existe um deslocamento epitelial centrípeto, certamente devido a um movimento na mesma direcção e à mesma velocidade por parte das células e dos nervos epiteliais (Patel & McGhee, 2005).

Quanto ao deslocamento e segundo um estudo feito por Patel & McGhee, 2008; ao longo de um período de 6 semanas o padrão de nervos do plexus sub-basal aparenta sofrer alterações, migrando da periferia da córnea para o centro formando uma espiral, (Figura 1.8). Nesta região os nervos alteram a sua direcção de migração submetendo-se a uma rotação no sentido horário e a velocidade de migração diminui com a aproximação ao centro da espiral ($5.6 \pm 3.4 \mu\text{m}/\text{semana}$ a $13 \mu\text{m}$ da espiral, $13.9 \pm 5.5 \mu\text{m}/\text{semana}$ a $333 \mu\text{m}$ da espiral, e $25.9 \pm 8.6 \mu\text{m}/\text{semana}$ a $698 \mu\text{m}$ da espiral) (Patel & McGhee, 2008).

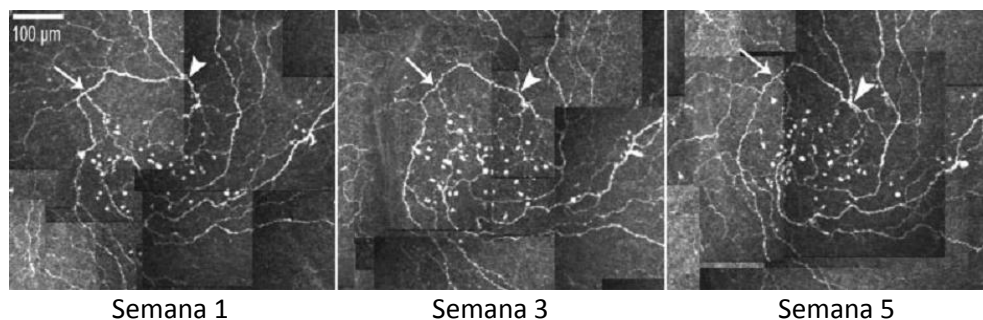


Figura 1.8: Sequência de imagens retiradas *in vivo* da região em espiral e onde se pode ver o deslocamento das estruturas nervosas e do próprio vórtex (Patel & McGhee, 2008).

A densidade média dos nervos é significativamente alta na região em espiral ($25,249 \pm 616 \mu\text{m}/\text{mm}^2$) quando comparada com a região central da córnea ($21,668 \pm 1411 \mu\text{m}/\text{mm}^2$). As dimensões médias destes complexos são de $898 \pm 201 \mu\text{m}$ na horizontal e $671 \pm 155 \mu\text{m}$ na vertical. Estes nervos aparentam formar um conjunto de anastomose com muitos deles a ramificarem-se juntando-se posteriormente aos nervos adjacentes ou ao mesmo nervo (Patel & McGhee, 2008).

1.2.5 – Parâmetros morfométricos

1.2.5.1 – Tortuosidade

A tortuosidade do nervos da córnea é um dos parâmetros mais importantes a avaliar quando se estuda a relação destes nervos com complicações como a neuropatia diabética pois existe uma grande relação entre este parâmetro e a gravidade da doença (Scarpa *et al*, 2008). O coeficiente de tortuosidade é o parâmetro mensurável que nos dá informação sobre as alterações no grau de curvatura ao longo de um nervo (Ana Ferreira *et al*, 2010b).

No estudo feito por Kallinikos *et al*, 2004; este parâmetro foi calculado com recurso a uma série de funções matemáticas simples. Começam por considerar que cada nervo corresponde ao gráfico de uma função. Considerando que a derivada de uma função f no ponto x corresponde à taxa de variação que ocorre na função à medida que uma das suas variáveis independentes também varia, ou seja, corresponde à inclinação da recta tangente ao gráfico da função nesse ponto. Sendo assim, ao aumentar o valor de x com uma certa quantidade dx pode-se calcular $f(x + dx)$. Tomando como partida um conjunto de pontos x_j igualmente espaçados ao longo de uma linha que une os dois extremos do nervo, a primeira derivada é dada pela diferença entre dois pontos consecutivos e divididos pelo intervalo dx . Já a segunda derivada é calculada como sendo a diferença entre dois valores consecutivos da primeira derivada e também estes divididos pelo intervalo dx . Este intervalo, no caso dos nervos, corresponde à distância entre as projecções no eixo do xx de dois pixéis consecutivos sendo sempre igual a 1 pixel. As equações seguintes mostram o que foi explicado anteriormente correspondendo cada uma à primeira e segunda derivadas no intervalo (x_j, x_{j+1}) :

$$f'(x_j) = \frac{f(x_{j+1}) - f(x_j)}{dx}, \quad (1.1)$$

$$f''(x_j) = \frac{f(x_{j+1}) - 2f(x_j) + f(x_{j-1}))}{(dx)^2}, \quad (1.2)$$

Para calcular o valor de TC, as duas derivadas são elevadas ao quadrado e depois somadas, em seguida o resultado é multiplicado pelo tamanho do intervalo (x_j , x_{j+1}), de forma a fazer uma estimativa correcta das alterações na direcção do nervo dentro desse mesmo intervalo. Cada valor calculado é somado de forma a ter-se um valor para todo o nervo e não para cada intervalo e em seguida é feita a raiz quadrada desse valor, chegando-se assim ao valor final de TC como exemplificado na seguinte equação:

$$TC = \sqrt{\sum_{j=1}^{n-1} (x_{j+1} - x_j) \{ [f'(x_j)]^2 + [f''(x_j)]^2 \}}, \quad (1.3)$$

onde $x_{j+1} - x_j = dx$, e $f'(x_j)$ e $f''(x_j)$ são a primeira e segunda derivada no ponto x_j respectivamente (Kallinikos *et al*, 2004).

De forma a comprovar esta função para o cálculo do TC, Kallinikos *et al*, fizeram um teste em 4 funções matemática muitos simples: (1) $f(x) = \text{sen}(x)$; (2) $f(x) = \text{sen}(2x)$; (3) $f(x) = \text{sen}(4x)$; e (4) $f(x) = x$. Os valores obtidos para cada função foram (1) 2,5066, (2) 7,9265, (3) 29,2292 e (4) 0, respectivamente, mostrando que o valor de TC aumenta para curvas com um maior grau de tortuosidade e é 0 em curvas que correspondem a uma linha como no caso da função $f(x) = x$. De forma a verificarem a independência deste valor quanto ao ângulo do eixo do nervo, verificaram a função TC para as mesmas funções teste mas rodadas em vários ângulos e os valores de TC mantiveram-se inalterados (Kallinikos *et al*, 2004).

1.2.5.2 – Densidade e comprimento do nervos

A orientação dos nervos do estroma é um factor importante quando se têm em consideração a densidade dos nervos. O comprimento dos nervos por imagem varia com o caminho do nervo através do campo da imagem, isto é, um nervo que atravessasse

obliquamente a imagem irá sempre parecer mais pequeno que um cujo caminho é paralelo ao plano da imagem. O comprimento do nervo também depende da resolução axial do microscópio usado, pois usando um sistema óptico com uma secção mais grossa pode levar a um aparecimento de um nervo mais comprido (Patel & McGhee, 2009).

A maioria dos estudos definiu que a densidade dos nervos sub-basais corresponde ao comprimento total dos nervos visíveis numa área definida ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$ ou mm/mm^2), mas alguns investigadores decidiram apenas incluir os nervos com comprimentos superior a 50 μm nas suas medidas (Patel & McGhee, 2009).

Segundo Erie *et al*, 2005; a densidade média dos nervos é $8404 \pm 2012 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ (com intervalo entre 4735 e $14018 \mu\text{m}/\text{mm}^2$), o número médio de nervos é de 4.6 ± 1.6 nervos (com intervalo entre 1 e 8 nervos) e a orientação média dos nervos é de 94 ± 16 graus (com um intervalo entre 58 e 146 graus).

Segundo o estudo de Grupcheva *et al*, 2002; foi feita uma análise confocal e microestrutural *in vivo* de 50 córneas de 50 indivíduos clinicamente saudáveis divididos em 2 grupos com idades muito diferentes. Um primeiro grupo (grupo 1) com 25 indivíduos com idades compreendidas entre os 20 e os 30 anos e um segundo grupo (grupo 2) também este com 25 indivíduos com idades entre os 65 e os 75 anos. A densidade dos nervos para o grupo 1 foi de $632.35 \pm 287.57 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ e $582.39 \pm 327.13 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ para o grupo 2. Estes valores podem ser comprovados na tabela 1.3.

Também Scarpa *et al*, 2008; concluiu no seu estudo que o comprimento total dos nervos (densidade) é muito diferente nas várias imagens que se obtém dos nervos da córnea, estando num intervalo entre 0 ($0 \mu\text{m}/\text{mm}^2$) e 2522 ($18177 \mu\text{m}/\text{mm}^2$) μm utilizando um método manual em todas as imagens.

Tabela 1.1: Valores relativos ao comprimento dos nervos analisados pelo estudo feito por Scarpa et al.. O estudo compara os valores obtidos pelo método manual com os valores obtidos pelo método automático. Todos os valores aparecem em μm . Alterado de Scarpa et al, 2008.

	Comprimento dos nervos	Todas as imagens		Região de interesse	
		Método manual	Método automático	Método manual	Método automático
Todos os objectos (n=90)	Média	983	856	974	837
	Desv. padrão	483	440	480	436
	Min	0	0	0	0
	Max	2,522	2,024	2,503	1,959

Tabela 1.2: Valores relativos à densidade dos nervos analisados pelo estudo feito por Scarpa et al.. O estudo compara os valores obtidos pelo método manual com os valores obtidos pelo método automático. Todos os valores aparecem em $\mu\text{m}/\text{mm}^2$. Alterado de Scarpa et al, 2008.

	Comprimento dos nervos	Todas as imagens		Região de Interesse	
		Método manual	Método automático	Método manual	Método automático
Todos os objectos (n=90)	Média	7,088	6,171	9,033	7,772
	Desv. padrão	3,483	3,172	3,153	2,961
	Min	0	0	0	0
	Max	18,177	14,593	20,859	16,001

Na tabela seguinte pode verificar-se os diferentes resultados obtidos por diferentes estudos, incluindo os estudos abordados anteriormente.

Tabela 1.3: Sumário dos resultados obtidos por vários estudos relativos à avaliação dos parâmetros morfométricos dos nervos da córnea. LSCM (Laser Scanning Confocal Microscope), SSCM (Slit-scanning Confocal Microscope), TSCM (Tandem Scanning Confocal Microscope). Alterado de Patel & McGhee, 2009.

	Densidade dos nervos sub-basais (mm/mm^2)	Diâmetro dos nervos sub-basais (μm)	Frequência de grânulos (grânulos/mm)	Grau de tortuosidade
Patel et al. (31olhos) LSCM	25,9 (7,0)			
Niederer et al. (30 olhos) LSCM	21,6 (5,98)			
Mocan et al. (24 olhos) LSCM		3,16 (0,43)		1,71 (0,5)
Simo Mannion et al. (13 olhos) SSCM	1,82 (0,790)	1,7 (0,4)		
Zang et al. (30 olhos) SSCM	15,18 (7,67)	3,6 (0,4)	90 (18)	2,2 (0,9)
Hosal et al. (19 olhos) SSCM		4,68 (0,68)		1,83 (0,62)
Erie et al. (65 olhos) TSCM	8,40 (2,01)			
Calvillo et al. (17 olhos) TSCM	5,87 (3,32)			
Benitez del Castillo et al. TSCM				
Jovens (11 olhos)	0,77 (0,09)	2,14 (0,40)	198 (65)	1,09 (0,54)
Idosos (10 olhos)	0,62 (0,09)	2,47 (0,33)	182 (63)	1,50 (0,52)
Grupcheva et al. SSCM				
Jovens (25 olhos)	0,63 (0,29)	0,52 (0,23)	213 (123)	
Idosos (25 olhos)	0,58 (0,33)	0,56 (0,27)	201 (192)	
Oliveira-Soto & Efron (14 olhos) SSCM	10,11 (4,29)	2,9 (0,2)	222 (43)	1,2 (0,4)

Uma das razões mais prováveis para a discrepância nestes valores pode ser explicada utilizando um LSCM (Laser scanning confocal microscope). Quando captados por este microscópio e utilizando uma iluminação brilhante e reduzida os nervos aparecem finos e os grânulos aparentam ser mais proeminentes e numerosos quando comparados com o ajuste automático da luminosidade. Isto indica que deve ser utilizado uma iluminação com uma intensidade fixa uma vez que afecta a espessura dos nervos, particularmente quando eles se aproximam do limite da resolução do microscópio. Pode-se então inferir que as dimensões de objectos reflectivos obtidos por microscopia confocal também dependem de uma intensidade constante da iluminação do microscópio (Patel & McGhee, 2009).

1.2.6 – Bioquímica dos nervos

Os nervos sensoriais que constituem a córnea são caracterizados por expressarem uma grande variedade de substâncias biologicamente activas, sendo os principais a substância P e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP). Associados a estas substâncias existe o peptídeo de activação da adenilato ciclase pituitária (PACAP) que é um neuropeptídeo com uma estrutura muito semelhante ao polipeptídeo intestinal vasoactivo (VIP) (Müller *et al*, 2003). Outros autores como Marfurt *et al*, 1998; descreveram a existência de nervos que expressam galanina, argumentando ainda que em roedores existiam fortes evidências para que os nervos que expressam galanina fossem diferentes dos que expressam SP e CGRP. Muitos destes nervos não peptidérgicos são facilmente distinguíveis por expressarem uma superfície celular glicoconjugada que liga I-B4 (Müller *et al*, 2003).

Os nervos simpáticos da córnea, além de conterem os clássicos neurotransmissores, contêm também noradrenalina, serotonina e o neuropeptídeo Y (NPY). Segundo Too *et al*, 1989 e Yamamoto *et al*, 1991; estes nervos também contêm colecistoquinina, peptídeo natriurético cerebral, a vasopressina, a neurotensina e a β endorfina. Sendo assim, e segundo Müller *et al*, 2003, até 2003 tinham sido localizados 17 neuropeptídeos e neurotransmissores.

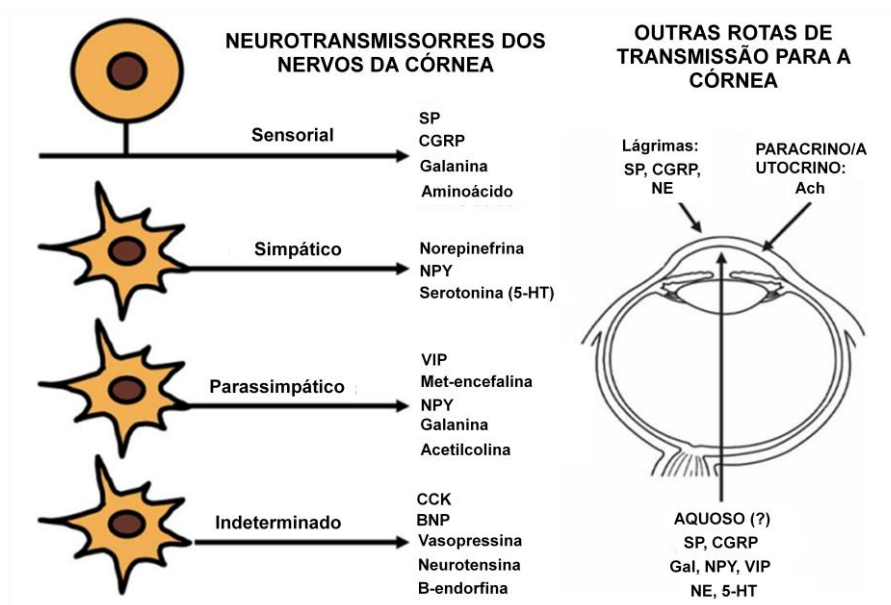


Figura 1.9: Esquema ilustrativo de todos os neuroquímicos presentes na enervação da córnea e as respectivas vias pelas quais estes neurotransmissores atingem a córnea. Alterado de Müller *et al*, 2003.

Substância P (SP)

Esta substância é importante para a regeneração do epitélio da córnea. De acordo com Nakamura *et al*, 1997, esta substância está presente em concentrações fisiologicamente relevantes em córneas normais e os seus receptores específicos (NK1) são expressos de uma forma abundante em células epiteliais da córnea. A substância P também se encontra nas lágrimas e a sua concentração diminui em pacientes com keratitis herpética. A SP promove os processos celulares fundamentais para a manutenção do epitélio e para a cicatrização, e segundo Garcia-Hirschfeld *et al*, 1994, estimula a proliferação de células epiteliais, já segundo Nishida *et al*, 1996 estimula a migração e segundo Araki-Sasaki *et al*, 2000, estimula a adesão celular.

Alguns dos efeitos tróficos da SP são apenas expressos a quando das suas interacções sinérgicas com outros factores de crescimento, isto porque quando sozinha a substância P não consegue acelerar a cicatrização dinâmica da córnea nem promover a ligação a uma matriz extracelular por parte das células epiteliais, no entanto quando co-administrada com o factor de crescimento da insulina (IGF-1) ou o

factor de crescimento epidérmico (EGF) estes exercem um efeito sinérgico poderoso em ambos os processos (Müller *et al*, 2003).

A capacidade da SP promover a adesão e migração das células epiteliais é mediada pelos efeitos na adesão molecular por parte dos neuropeptídeos e proteínas citoesqueléticas. Por exemplo, a substância P aumenta (através da activação da proteína cinase C e da cinase calmodulina) a expressão da E-caderina, uma proteína que medeia a adesão célula a célula nas células epiteliais.

A acção da SP/IGF-1 também estimula a expressão celular epitelial da $\alpha 5$ integrina, uma subunidade do receptor de fibronectina, e aumenta a adesão celular epitelial à fibronectina. A fibronectina é um constituinte da lamina basal e é depositado no local da lesão após a erosão epitelial fornecendo uma matriz temporária que promova a migração celular. A combinação SP/IGF-1 também promove a fosforilação da tirosina das cinases de adesão local e da paxilina (Müller *et al*, 2003).

Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

A CGRP que é vista em conjunto com a SP em muitas fibras nervosas, também tem um papel importante na renovação epitelial e na cicatrização. Segundo Müller & Klooster, 2001; o epitélio da córnea é densamente enervado por nervos produtores desta substância.

Acetilcolina (Ach)

O epitélio da córnea contém uma das maiores concentrações desta substância pois a maior parte da sua produção ocorre nas células do epitélio da córnea. Algumas observações sugerem que esta substância funciona de uma forma parácrina ou autócrina. Os trabalhos feitos *in vitro* mostraram que a acetilcolina estimula a síntese de DNA por parte das células epiteliais (Colley *et al*, 1985) e aumenta a produção de GMP-cíclica activando o ciclo da fosfatidilinositol (Proia *et al*, 1986).

Polipeptídio intestinal vasoactivo (VIP) e factor de crescimento dos nervos (NGF)

Esta substância é expressa num número limitados de nervos e alguns estudos demonstraram que estimula as células epiteliais a produzirem o factor de crescimento dos nervos (Campbell *et al*, 2001).

O NGF tem uma importância fisiológica na homeostase e regeneração do epitélio e do estroma. Um tratamento com NGF murina pode salvar a córnea dos defeitos de um epitélio não cicatrizado assim como de uma ulceração do estroma. Além disso, esta substância tem propriedades anti-inflamatórias e promotoras de cicatrização. A NGF estimula a proliferação de células epiteliais e potencia a migração destas células o que se torna um factor importante na cicatrização de feridas. Os efeitos biológicos da NGF são em parte mediados pela via de transdução de sinal da MAP (Mitogen Associated Protein kinase) (Müller *et al*, 2003).

Neurotensina

A neurotensina, um peptídeo abundantemente expresso no sistema nervoso central, exerce efeitos tróficos nos queratócitos da córnea. Os queratócitos da córnea em meio de cultura expressam um receptor de neurotensina e a administração de JMV449, um agonista estável da neurotensina, aumenta significativamente a proliferação e viabilidade dos queratócitos diminuindo a sua apoptose (Müller *et al*, 2003).

Factor neurotrófico ciliar (CNTF)

Esta substância exerce um certo número de efeitos tróficos nos tecidos periféricos e no sistema nervoso central e periférico. Estimula a síntese de VIP nos gânglios simpáticos. Recentemente foi descoberto que esta substância é libertada em resposta ao stress oxidativo das células endoteliais da córnea através de um mecanismo que envolve a subunidade α do seu receptor (Müller *et al*, 2003).

Capítulo 2 – Neuropatia Diabética

A neuropatia diabética é extremamente comum no mundo actual mas ainda carece de um tratamento adequado assim como de um diagnóstico atempado. Sendo assim, um conhecimento apropriado dos mecanismos por detrás desta patologia assim como o reconhecimento das suas inúmeras variantes são de extrema importância, permitindo uma redução da mortalidade associada a este problema.

Nas últimas décadas o nosso conhecimento acerca da neuropatia diabética têm aumentado consideravelmente, impulsionado pelos avanços da ciência e do próprio conhecimento da diabetes. Esse conhecimento levou à conclusão que são muitos os mecanismos que provocam danos na estrutura nervosa em doentes com diabetes, mais propriamente com neuropatia diabética. Alguns desses mecanismos estão relacionados com as vias metabólicas associadas aos nervos, com danos oxidativos assim como os efeitos de uma vascularização insuficiente (Gooch & Podwell, 2004).

Devido às diferentes metodologias implementadas, as várias definições utilizadas por diversos estudos, assim como os critérios de diagnóstico, têm sido difícil estabelecer uma epidemiologia da doença (Gooch & Podwell, 2004). Segundo um dos maiores estudos feitos na área (Rochester Diabetic Neuropathy Cohort), dois terços dos pacientes com neuropatia diabética não são insulino-dependentes (NIDDM) enquanto que o outro terço é insulino-dependente (IDDM) (Dyck *et al*, 1993).

2.1 – Formas e quadro clínico da neuropatia diabética

A neuropatia diabética pode ocorrer de forma isolada ou em combinações variadas já que é composta por um conjunto vasto de síndromes, produzindo um quadro clínico extenso como se pode observar na tabela 2.1. Devido a todos estes factos é necessário uma familiarização com as características clínicas desta patologia de forma a distingui-la de outras condições neurológicas.

As formas mais comuns de classificação da neuropatia diabética são as neuropatia simétrica distal, a neuropatia dolorosa, a neuropatia autonómica e a mononeuropatia (Gooch & Podwell, 2004).

Tabela 2.1: Tabela com as características principais da várias formas de neuropatia diabética (modificado de Gooch & Podwell, 2004).

Síndromes Neuropáticas	Características principais
Neuropatia simétrica distal	
Neuropatia sensorial das fibras grandes	Entorpecimento, parestesias, disestesias, hiperestesias, ataxia
Neuropatia motora-sensorial	As características de cima e fraqueza distal
Neuropatia dolorosa	
Neuropatia das fibras pequenas	Entorpecimento, parestesias, disestesias, hiperestesias
Caquexia diabética neuropática	Dor neuropática grave e perda rápida de peso
Mononeuropatia	
Cranial	Diplopia, paralisia do terceiro nervo, fraqueza hemifacial
Radicular	Dor, seguida de entorpecimento e/ou fraqueza numa distribuição radicular
Periférica	Dor, seguida de entorpecimento e/ou fraqueza na área de um único nervo
Neuropatia Autonómica	Impotência, ortostasia, arritmia cardíaca, diarreia, prisão de ventre

2.1.2 - Neuropatia simétrica distal

É a forma mais comum da neuropatia diabética que geralmente se inicia com entorpecimento gradual na região dos pés. Estes sintomas vão piorando em termos de distribuição e intensidade ao longo dos anos, atingindo toda a perna podendo chegar às mãos e braços. Chegado a este estado o paciente pode desenvolver neuropatia dolorosa, uma das várias formas de neuropatia diabética (Gooch & Podwell, 2004).

A perda de sensibilidade, nas pernas, cerca de 12 vezes menos sensibilidade (Armstrong *et al*, 1998), pode trazer graves consequências ao paciente na medida em que o risco de não reconhecimento de uma ulceração cutânea aumenta substancialmente. Este facto pode levar à amputação dos membros visto que o risco de uma ulceração cutânea associada a uma vascularização deficiente e um grau de cicatrização muito baixo leva a uma aumento da necrose dos tecidos e gangrena. A perda de sensibilidade está associada à não percepção de pequenos toques, dor e também percepção de variações de temperatura sendo seguidas de uma perda de propriocepção que se manifesta por uma ataxia na locomoção. Esta propriocepção leva os pacientes a perderem a noção do espaço em que os seus pés estão localizados levando a uma dificuldade extrema de se deslocarem em locais escuros assim como a uma perda da capacidade de condução de um veículo (Gooch & Podwell, 2004).

A seguir a uma perda de sensibilidade ocorre uma atrofia dos nervos motores, começando mais uma vez pelo pés e pernas, passando depois para as mãos e braços (Gooch & Podwell, 2004).

2.1.2 – Neuropatia dolorosa

Esta forma de neuropatia, que pode desenvolver-se a partir da forma descrita anteriormente, caracteriza-se por uma vulnerabilidade de pequenas fibras nervosas cutâneas, responsáveis pela percepção da dor e variações de temperatura, ao dano. A danificação destes nervos leva a uma perda da sensação da variação da temperatura assim como pequenas picadas de agulha na região dos pés e das pernas. Além desta perda de sensibilidade, a neuropatia dolorosa é também caracterizada por sensação de dor extrema ao mesmo tempo que ocorre uma sensação de entorpecimento. A perda de percepção de queimaduras, choques eléctricos, cortes assim como picadas pode levar a um incapacidade dos pacientes com esta forma de neuropatia diabética. Associada à sensação de uma dor extrema está a alodínia que se caracteriza uma sensação de dor em situações em que a sensação não deveria ser de dor como o toque num objecto (Gooch & Podwell, 2004).

Uma neuropatia dolorosa severa pode levar a uma perda de peso e esta situação parece desencadear-se em pacientes que façam um controlo rigoroso dos níveis de glicose ou que façam uma terapia oral da hipoglicémia (Gooch & Podwell, 2004).

Esta patologia pode melhorar ao fim de alguns anos após os primeiros sintomas mas em grande parte dos casos torna-se crónica (Gooch & Podwell, 2004).

2.1.3 – Neuropatia autonómica

A neuropatia autonómica é mais uma forma de neuropatia diabética a afecta cerca de 50% dos paciente com diabetes. Caracteriza-se por uma disfunção genital e urinária que se manifesta por uma impotência em mais de 40% dos homens com neuropatia diabética (Dyck *et al*, 1993). Outros dos sintomas mais comuns é a hipotensão ortoestática podendo causar síncope levando a um aumento do risco de quedas, fracturas e danos na região do crânio. A dismotilidade gastrointestinal é mais um dos sintomas provocando prisão de ventre e diarreia intermitente (Krendel, 2002).

Mesmo sendo uma patologia leve, pode conduzir a uma disfunção cardíaca grave assim como a um acidente vascular cerebral (AVC), devido à desregularização do tónus vascular (Töyry *et al*, 1996).

2.1.4 – Mononeuropatia

A mononeuropatia é produzida por uma aceleração da aterosclerose, trombose, inflamação e também por uma vasodilatação enfraquecida, levando a uma oclusão das arteríolas que fornecem os nervos (Gooch & Podwell, 2004).

A isquemia aguda de um nervo periférico caracteriza-se por uma súbita dor que se prolonga por horas ao invés de durar alguns minutos como seria normal. O terceiro nervo craniano é o nervo periférico mais afectado por esta doença sendo as fibras responsáveis pelo movimento do olho, e que constituem parte desse nervo, as mais

afectadas pois situam-se no interior do nervo onde a circulação sanguínea é mais pobre tornando-as mais vulneráveis ao decréscimo da perfusão, ao contrário das fibras mais periféricas onde a circulação sanguínea é mais abundante (Gooch & Podwell, 2004).

Mesmo sendo uma forma de neuropatia diabética comum, está ausente num grande número de pacientes que padecem de neuropatia (Gooch & Podwell, 2004).

2.2 – Patogénese

A relação entre os danos que ocorrem nos nervos periféricos e as consequências metabólicas da hiperglicémia, assim como a dependência crónica na insulina ou a isquemia vascular tem evoluído consideravelmente nos últimos anos mesmo falando de uma relação bastante complexa (Gooch & Podwell, 2004).

A tabela 2.2 demonstra alguns dos factores patogénicos associados à neuropatia diabética.

Tabela 2.2: Tabela com os factores patogénicos que afectam os nervos de pacientes que padecem de diabetes (modificado de Gooch & Podwell, 2004).

Factores Patogénicos
Activação da via do poliol
Excesso de sorbitol e frutose
Decréscimo de mio-inositol
Aumento da actividade da aldose reductase
Decréscimo da NADPH
Decréscimo do óxido nítrico (NO)
Produtos finais da glicosilação avançada
Deposição intra-neuronal e extra-neuronal
Formação do peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)
Aumento das lipoproteínas pouco densas
Insuficiência vascular
Aterosclerose acelerada da vascularização dos nervos
Decréscimo do óxido nítrico e enfraquecimento da vasodilatação
Factores neurotróficos
Deficiência em NGF
Deficiência em insulina
Disfunção dos canais iónicos da membrana neuronal
Activação do canal de cálcio através de voltagem excessiva
Disfunção do canal de sódio

Segundo a tabela 2.2 pode-se concluir que são muitos os factores patogénicos que afectam a neuropatia diabética agrupando-se num conjunto de acções potenciadoras desses factores, como a activação da via do poliol, os produtos finais da glicosilação avançada, a insuficiência vascular, os factores neurotróficos assim como a disfunção do canal iónico da membrana neuronal.

2.2.1 – Activação da via do poliol

A via do poliol é uma via utilizada pelas células para processar o excesso intracelular de glicose resultante da hiperglicémia crónica. A sua utilização produz sorbitol e frutose através de uma série de reacções catalisadas pela aldose reductase (Oates, 2002) (Verroti et al, 2001). O excesso de frutose e sorbitol tem efeitos nocivos ao nível da expressão do co-transportador de sódio/mio-inositol levando a um decréscimo da absorção destes compostos e da sua concentração dentro das células. Estes efeitos influenciam a actividade dos nervos, uma vez que o excesso de frutose e sorbitol contribui para a degradação estrutural da membrana neuronal e o decréscimo da concentração de mio-inositol influencia a concentração de fosfatidilinositol, que é o seu precursor (Gooch & Podwell, 2004). A fosfatidilinositol sendo crucial para a activação da Na/K ATPase e para a actividade da bomba de sódio, ao diminuir os seus níveis de concentração cria distúrbios no fluxo iónico diminuindo a velocidade de condução dos nervos (Kihara *et al*, 2001).

Como a activação da via do poliol consome a aldose reductase, esgotando o seu co-factor, NADPH (nicotinamida adenina di-fosfato), e este é necessário na síntese de NO, então a sua diminuição provoca uma diminuição de NO que é um potente vasodilatador que causa o relaxamento dos músculos na parede dos vasos sanguíneos. A diminuição do NO aumenta o risco de isquemia neuronal, influenciando assim a actividade dos nervos (Gooch & Podwell, 2004).

2.2.2 – Produtos finais da glicosilação avançada (AGEs)

Estes agentes resultam da elevada concentração de glicose no interior das células podendo ser encontrados em muitos tecidos do corpo humano, mais propriamente em tecidos dentro ou à volta dos nervos periféricos (Gooch & Podwell, 2004). Estes agentes contribuem para os danos a nível neuronal porque potenciam a activação da NADPH oxidase, levando à formação de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e a um aumento dos danos oxidativos (Thornalley, 2002).

2.2.3 – Insuficiência vascular

Os capilares que abastecem a estrutura nervosa estão mais susceptíveis a danos no interior do nervo do que na zona mais periférica tornando os nervos de pacientes com neuropatia diabética mais sujeitos a danos isquémicos (Malik *et al*, 1993). O aumento da eficiência da condução dos nervos deve-se à perfusão dos capilares mais internos, e como nos pacientes com diabetes há uma ausência dessa perfusão leva a crer que a insuficiência cardíaca esteja associada à neuropatia diabética (Teshfaye *et al*, 1996). As restrições na vasodilatação provocadas pela diminuição da concentração de NO assim como o aumento da concentração de AGEs que promove a aterosclerose são factores que combinados podem levar a uma diminuição do fluxo de sangue para níveis críticos (Gooch & Podwell, 2004). Como se pode ver, a insuficiência vascular está associada a outros factores como os descritos anteriormente.

2.2.4 – Factores neurotróficos

São muitas as substâncias associadas à sobrevivência e regeneração dos nervos constituindo um grupo bastante heterogéneo visto que cada um dos constituintes desse grupo apresentam propriedades biológicas bem diferentes. O factor neurotrófico mais conhecido é o factor de crescimentos dos nervos, NGF, que actua

principalmente a nível dos nervos sensoriais e simpáticos mais pequenos estando ausente em pacientes com diabetes, assim como outro factor neurotrófico, o factor de crescimento derivado da insulina (IGF-1) (Gooch & Podwell, 2004).

Como o NGF têm uma expressão reduzida no caso de pacientes com diabetes, a reparação normal dos tecidos nervosos é severamente afectada por esta deficiência (Xu & Sima, 2001).

2.2.5 – Disfunção do canal iónico da membrana neuronal

A integridade estrutural da membrana neuronal e a função dos canais iónicos presentes nesta membrana são seriamente ameaçados pela diabetes uma vez que os pacientes com esta doença demonstraram ter uma actividade excessiva do cálcio certamente devido à diminuição da concentração do inibidor do canal do complexo Cálcio-Proteína G. Dados mais recentes sugerem que a disfunção do canal de sódio desempenhe um papel importante na neuropatia diabética dolorosa (Gooch & Podwell, 2004).

2.3 – Diagnóstico

Não é fácil provar que os danos provocados nos nervos são consequência da diabetes e sendo assim a neuropatia diabética além de ser um possível diagnóstico clínico também actua como um diagnóstico de exclusão. De forma a fazer um diagnóstico seguro da doença é necessário conhecer o historial clínico do paciente e fazer exames clínicos que possam revelar padrões que estejam em conformidade com algum síndrome diabético ou uma combinação destes (Gooch & Podwell, 2004).

Quando os pacientes apresentam sintomas que indiquem a presença de neuropatia mas não tenham um diagnóstico anterior de diabetes, deve ser feito um teste de tolerância à glicose (durante 3 horas), assim como de forma a garantir que a neuropatia é uma consequência da diabetes e não de outros factores é necessário

assegurar uma avaliação de outras possíveis causas fazendo testes de electrodiagnóstico assim como estudos do soro (plasma) (Gooch & Podwell, 2004). A intolerância à glicose como única anormalidade nos testes de soro em grande parte dos pacientes com neuropatia dolorosa evidencia que estes também sofram de diabetes e esta seja uma das maiores causa para o início da neuropatia dolorosa (Mendel & Sahenk, 2003) (Sumner *et al*, 2003).

A electromiografia (EMG) assim como os estudos da condução dos nervos podem ser formas de diagnóstico da neuropatia diabética sendo úteis para a confirmação de padrões consistente com esta doença pois fornecem uma informação bastante precisa do tipo de danos provocados nos nervos, assim como a sua gravidade, simetria e distribuição. No entanto, é necessário conseguir distinguir esses padrões dos padrões provocados por outros processos neuropáticos. Os estudos de condução dos nervos funcionam muito bem como distinção entre uma desordem dos axónios, característica inicial da neuropatia diabética simétrica distal, e a desmielinização dos nervos que não está associada a nenhuma forma de neuropatia diabética (Gooch & Podwell, 2004).

Visto que as técnicas anteriores dificilmente captam distúrbios ao nível das fibras nervosas mais pequenas, é então necessário recorrer a um conjunto de técnicas mais específicas para o diagnóstico da neuropatia diabética, incluindo testes quantitativos sensoriais, que comparam os limites de detecção sensorial de um paciente em contacto com diferentes valores de temperatura e estímulos vibratórios, com os limites alcançados por sujeitos controlo, e testes de quantificação da densidade de pequenas fibras nervosas recorrendo a biopsias da pele retirada das regiões distal e proximal da perna (Gooch & Podwell, 2004).

Na presença de sintomas autonómicos são necessários testes mais apropriados a estes sintomas de forma a fazer um correcto diagnóstico do problema. Existe um conjunto variado de testes autonómicos que podem ser feitos, como a medição do intervalo R-R obtido do electrocardiograma durante a repetição de vários ciclos respiratórios, a manobra de Valsalva, os testes de inclinação, a resposta simpática da pele, os testes de regulação térmica do suor, os teste de suor impresso em material silástico e os testes quantitativos do reflexo do axónio sudomotor (Levitt *et al*, 1996).

2.2.4 – Os nervos da córnea como forma de diagnóstico da neuropatia diabética

O interesse pelo estudo dos nervos da córnea tem aumentado devido ao facto de estes permitirem um diagnóstico antecipado e uma avaliação precisa da neuropatia periférica (Ana Ferreira *et al*, 2010b). Segundo Ana Ferreira *et al*, 2010b; o número de nervos no plexus sub-basal em pacientes com neuropatia diabética é significativamente inferior ao dos indivíduos saudáveis, mesmo considerando casos de curta duração.

Num estudo feito por Rosenberg *et al*, 2000; os pacientes com neuropatia diabética apresentaram um decréscimo da densidade dos nervos, um espessamento da córnea e uma diminuição do epitélio resultando numa redução da sensibilidade da córnea (Rosenberg *et al*, 2000). Esse decréscimo progressivo do número de fibras nervosas em diabéticos é sugestivo de uma degeneração maior, assim como a redução do número de ramificações e sugere uma redução na capacidade regenerativa com o aumento do grau de neuropatia diabética (Malik *et al*, 2003).

Recorrendo à microscopia confocal da córnea é possível confirmar uma redução significativa dos número de fibras nervosas em pacientes que padecem de neuropatia diabética resultando numa diminuição da sua densidade. Além desta redução da densidade é possível observar uma diminuição do comprimento e ramificação dos nervos que piora com o aumento do grau de neuropatia diabética (Patel & McGhee, 2009)

Além dos parâmetros referidos anteriormente como padrões da presença de neuropatia diabética, existe um outro parâmetro morfométrico que revela uma grande correlação com o grau de neuropatia diabética. Esse parâmetro, já foi referido no capítulo 1 e trata-se da tortuosidade dos nervos que não é mais que um indicador do grau de curvatura de um nervo. A tortuosidade tem sido reveladora da presença de neuropatia diabética já que segundo vários estudos efectuados a tortuosidade de um nervo aumenta com a gravidade da doença (Kallinikos *et al*, 2004).

Fazendo uma análise qualitativa da figura 2.1 pode verificar-se que na primeira imagem, sujeito controlo, surgem 3 fibras nervosas com uma aparência granular típica e uma tortuosidade normal, enquanto que na segunda imagem, retirada de um

paciente com neuropatia diabética, o número de fibras nervosas diminui para apenas 1 fibra e com um grau de tortuosidade bastante elevado (Kallinikos et al, 2004).

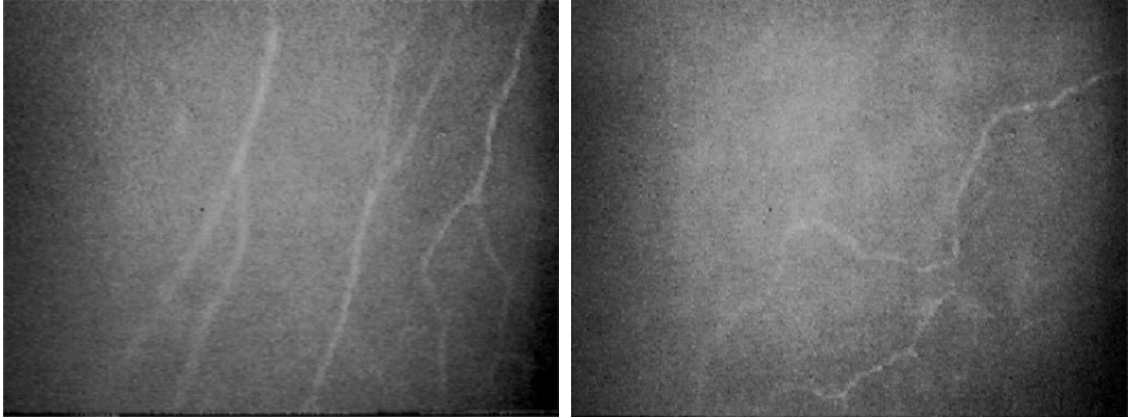


Figura 2.1: Imagens representativas de estruturas nervosas da córnea. A imagem da esquerda representa um sujeito controlo e a imagem da direita um paciente com neuropatia diabética (Kallinikos *et al*, 2004).

3 – Estado da arte

Ao longo deste capítulo são abordados diferentes métodos já desenvolvidos e que serviram como base para o método proposto. O que foi descrito aqui funcionou como uma preparação do terreno a ser explorado pelos próximos intervenientes nesta área.

3.1 – Métodos de segmentação dos nervos

Um dos problemas principais relativo à utilização de imagens resultantes de microscopia confocal da córnea (CCM) está relacionado com o facto de estas apresentarem áreas muito brilhantes no centro diminuindo a sua intensidade à medida que a análise se desloca para a periferia, certamente devendo-se à curvatura da córnea que possa causar uma reflexão não uniforme da luz. Este efeito provoca então uma não-uniformização do contraste e luminosidade das imagens.

Nos vários métodos apresentados de seguida serão abordadas as várias alternativas utilizadas por diferentes autores para solucionar os problemas da segmentação dos nervos

3.1.1 – Segmentação dos nervos da córnea combinando a análise da simetria de fase e classificação com matriz Hessiana (Ana Ferreira et al, 2010a)

O método desenvolvido por Ana Ferreira et al, 2010a; tem como principais objectivos a segmentação dos nervos da córnea e consequente extracção dos parâmetros morfométricos como a tortuosidade, a densidade e o comprimento dos nervos.

O algoritmo divide-se em 3 fases: uma primeira fase que tem como função o realce do contraste dos nervos assim como a correcção da iluminação das imagens, funcionando como um pré-processamento, a segunda fase tem como objectivo a identificação de estruturas lineares e classificação destas como estruturas nervosas e por fim a terceira fase corresponde à reconstrução dos segmentos de forma a ter-se um nervo completo e não apenas pequenos segmentos não unidos.

Tendo em conta o que é descrito em 3.1 os autores sentiram a necessidade de aplicar um pré-processamento nas imagens antes de as submeter ao método de segmentação. Esse pré-processamento consiste na aplicação de uma equalização adaptativa do histograma da imagem com limitação do contraste (CLAHE) utilizando um máscara com tamanho de 8x8 pixéis, de forma a uniformizar a imagem. Em seguida é utilizado um algoritmo de simetria de fase com a intenção de realçar as fronteiras dos nervos. Este algoritmo de simetria de fase baseia-se na análise da informação local das frequências e apresenta vantagens em relação a outros algoritmos do género pela não necessidade de uma segmentação inicial das imagens.

Após concluído o pré-processamento e iniciando-se a fase do processamento é então feita a procura das estruturas nervosas utilizando um método baseado na matriz Hessiana sendo calculados os seus valores próprios (λ_1 e λ_2) que descrevem a curvatura em cada ponto da imagem permitindo assim extrair a direcção dos nervos. É também definido um parâmetro R_b que serve como variável discriminatória entre estruturas tubulares e estruturas esféricas. Este valor corresponde ao quociente entre os dois valores próprios, podendo ocorrer 4 casos distintos, os 2 primeiros correspondem a estruturas tubulares claras ou escuras nas quais o valor de λ_1 é baixo e valor λ_2 é elevado negativo ou elevado positivo, consoante a estrutura é clara ou escura, os

outros dois casos correspondem a estruturas circulares e nestes casos a estrutura é circular clara se ambos os valores próprios forem elevados e negativos, se forem elevados mas positivos então a estrutura é circular escura.

Como os resultados finais do processamento não eram constituído por estruturas completas mas sim por um conjunto de segmentos, os autores decidiram fazer mais uma abordagem e aplicar um pós-processamento que consiste na reconstrução dos nervos unindo os segmentos vizinhos. A abordagem é baseada na ideia de um crescimento por regiões utilizando como pontos semente os pontos extremos de cada segmento.

Começando pelo segmento ao qual chamam de S_0 , calcula-se o esqueleto desse segmento e o número de ramificações utilizando operações morfológicas. No caso de o esqueleto ser constituído por ramificações então é feita uma erosão nos pontos terminais do esqueleto até se obter um segmento sem ramificações. Em seguida calcula-se os extremos como sendo os pontos limite do maior eixo que define a estrutura. Utilizando esses pontos faz-se um crescimento por regiões até que se atinja os segmentos vizinhos (S_1 e S_2).

Os autores do método desenvolveram critérios de exclusão de forma a evitar ligações erradas entre segmentos, uma vez que, existem segmentos que certamente não são estruturas nervosas podendo ser células de suporte dos nervos ou queratócitos. Esses critérios baseiam-se na ideia de vizinhos mútuos, isto é, se o segmento S_i é vizinho de S_j então o contrário também tem de acontecer. De salientar que quando se fala de vizinho está-se a referir ao segmento mais próximo. Então a ideia do critério é não considerar as ligações em que a vizinhança dos segmentos não fosse mútua. Assim, se um segmento S_i estivesse mais próximo de S_j mas este de S_k então não haveria ligação entre S_i e S_j . Outro dos critérios é considerar que 2 segmentos só estão suficiente próximos se a distância entre eles for inferior ao comprimento dos segmentos.

Sendo válida a vizinhança de dois segmentos então estes são unidos por um linha que depois é dilatada até atingir a espessura dos nervos que lhe dão origem.

3.1.2 – Segmentação dos nervos da córnea combinando a análise da simetria de fase e reconstrução morfológica (Ana Ferreira et al, 2010b)

Este segundo método foi também desenvolvido por Ana Ferreira et al, 2010b e pretende ser uma alternativa ao método anterior evitando o recurso a um pós-processamento e alterando o algoritmo principal centrando-se mais na aplicação de operações morfológicas como o crescimento por regiões e a remoção de estruturas consideradas desprezáveis à segmentação, como estruturas em forma de esfera ou pequenas ramificações que surjam na esqueletização dos segmentos. De salientar que o pré-processamento utilizado neste novo método é igual ao do método anterior consistindo então na aplicação de um equalização local da imagem, baseando-se no histograma local da uma região com o tamanho de 8x8 pixéis. Com o objectivo de realçar as estruturas presentes na imagem aplica-se um algoritmo de simetria de fase baseado na análise da informação local das frequências.

De forma a ter-se uma imagem semente para iniciar o crescimento dos nervos os autores aplicaram um limite dinâmico de forma a que apenas 10% dos pixéis da imagem original se encontrem acima desse limite. A justificação para este valor está relacionada com a ideia de que os pixéis com nervo correspondem a cerca de 10% do total da imagem. Com este pequeno passo elimina-se muito do ruído e tem-se assim um ponto de partida.

Em seguida é feita uma pesquisa pelo pontos semente da imagem. Para isso os autores decidiram aplicar duas regiões distintas à imagem binária: uma com todos os pixéis que se encontrem a 5% da margem da imagem e outra com todos os pixéis que se encontrem a 35% da margem.

Depois de obtidos pontos semente é feito um crescimento por regiões aplicando-se diversas operações morfológicas e removendo ruído através da comparação de regiões que tenham crescido com regiões onde não ocorra crescimento.

O passo seguinte tem como objectivo o cálculo do esqueleto morfológico da imagem e consequente remoção de falsas ramificações. Além deste passo é feita um

eliminação de regiões que não representem estruturas contínuas, como pequenos nervos ou regiões com ruído.

Por fim os resultados são comparados com a imagem após a aplicação do limite (imagem semente) e é feita a reconstrução morfológica dos nervos.

3.1.3 – Reconhecimento automático de estruturas nervosas da córnea com acompanhamento do nervo^(Scarpa et al, 2008)

O método foi desenvolvido por Ruggeri et al, 2008; foi o primeiro método a produzir resultados quanto à segmentação de nervos da córnea, tornando-se um método pioneiro na área. Mostrou ter alguns resultados positivos, nomeadamente na correcta segmentação dos nervos (cerca de 80,4% a 83,8% dos nervos correctamente segmentados), e também no cálculo do comprimento dos nervos onde mostrou existir uma boa correlação entre os valores obtidos pelo método automático e os valores obtidos pelo método manual.

Tal como nos métodos anteriores o grande problema das imagens obtidos por CCM prende-se com o facto de estas não terem uma luminosidade e contraste uniformes variando do centro para a periferia da imagem (mais claras no centro, mais escuras na periferia). Como dito anteriormente isto deve-se à curvatura da córnea que provoca uma reflexão não uniforme da iluminação e deve-se também à atenuação da luz ao longo dos vários caminhos de iluminação. De forma a compensar estes problemas os autores aplicaram um processo de equalização de forma a normalizar a luminosidade e o contraste. Como este procedimento a amplitude do ruído aumenta, então os autores aplicaram um filtro de mediana de forma a reduzir os vários artefactos que surgem.

O método utilizado para segmentação baseia-se numa avaliação local dos pontos candidatos a nervo. O objectivo não é olhar para a imagem com um todo e classificar as estruturas presentes na imagem como nervo ou não nervo, mas sim começar num conjunto de pontos semente e ponto a ponto classificá-los como nervo ou não nervo, e assim conseguir uma estrutura final que se possa classificar como estrutura nervosa.

Sendo assim o método desenvolvido por Ruggeri et al. começa pela pesquisa dos melhores candidatos a pontos semente e para isso é sobreposta uma grelha sobre a imagem com as linhas e as colunas espaçadas entre si em 10 pixéis. Em seguida é feita uma análise de todos os pixéis sobre a grelha tendo em atenção a intensidade desses pixéis.

A análise e consequente validação dos pixéis como pontos semente é feita tendo em conta um limite definido como sendo 80% da intensidade média dos pixéis de toda a imagem. Assim todos os pixéis da grelha que estiverem acima desse limiar são considerados pontos semente.

Tendo todos os pontos semente o próximo passo é começar num desses pontos, avaliar qual a melhor direcção do nervo e mover-se o algoritmo ao longo desse nervo de forma a classificar cada ponto correctamente. Essa validação é feita recorrendo ao perfil transversal do nervo em cada ponto e cada um é classificado segundo um algoritmo de classificação denominado de Fuzzy C-Mean Clustering (FCM). Este algoritmo divide os pixéis em 2 grupos (clusters) um como sendo o conjunto de pontos do nervo e o outro correspondendo ao conjunto de pontos do background. A linha que une os pontos centrais de dois perfis consecutivos serve para encontrar o próximo candidato a ponto do nervo. Este seguimento do nervo e validação dos pontos como tal é feita até surgir um situação que implique terminar a segmentação e começar noutro ponto semente. As situações descritas pelos autores são o atingir do fim do nervo ou quando se atinge uma secção do nervo em que o contraste seja muito baixo.

O resultado final do processamento aplicado por Ruggeri et al, 2008; mostrou um conjunto de imagens em que os nervos não eram constituídos por um único segmento com o comprimento do nervo mas sim um conjunto de segmentos não ligados ao longo do nervo. Com isto, os autores sentiram a necessidade de fazer um melhoramento do método aplicando um pós-processamento no final da segmentação. Este pós-processamento não tem como objectivo eliminar estruturas mas sim ligar os segmentos de forma ter um nervo completo no final.

O processo tem por base encontrar os pontos extremos de cada segmento e esboçar 5 arcos correspondentes a 5 ligações possíveis entre os 2 segmentos vizinhos. A escolha do melhor arco é feita seleccionando aquele cuja intensidade média do

conjunto de pontos que o forma seja a mais alta. Após escolhido o principal candidato são esboçados mais 2 arcos de cada lado do arco principal, e a uma distância predefinida deste, que funcionarão como auxiliares da classificação. Isto porque se a diferença entre a média das intensidades dos pixels do arco principal e dos pixels dos arcos auxiliares for maior que um determinado limite empírico então esse candidato é classificado como nervo.

3.1.4 – Análise Automática da Neuropatia Diabética Periférica utilizando Morfologia Quantitativa Multi-escala das fibras nervosas^(Dabbah et al, 2011)

O método desenvolvido por Dabbah et al, 2011; é o método mais recente de segmentação dos nervos da córnea. O método baseia-se num algoritmo multi-escala de detecção adaptativa bimodal e explora a estrutura curvilínea de um nervo adaptando-se à informação local da imagem. Os nervos detectados são quantificados e em seguida usados como vectores característica para classificação usando classificados como Redes Neurais (NNT).

3.1.4.1 – Modelo Simples

O método começa pelo realce do contraste das fibras nervosas baseando-se na criação de um modelo duplo. Um para os nervos (foreground) e um para o fundo da imagem (background). Este modelo duplo adapta-se às condições locais da imagem de forma a lidar com as pequenas variações de iluminação. O modelo para os nervos, corresponde a uma onduleta de Gabor (Gabor wavelet) e o modelo do fundo, corresponde a um envelope Gaussiano a 2 dimensões. Este caracteriza-se por ter um parâmetro ao qual o autores chamaram de magnitude do envelope e funciona como um limite utilizado para distinguir as fibras nervosas do background. Este valor pode ser definido de forma empírica com o intuito de controlar a sensibilidade e a precisão da detecção.

Este modelo duplo é útil para gerar dois tipos de resposta, uma positiva, e uma resposta negativa, que serão aplicadas na imagem original.

Este método realça as fibras nervosas orientadas na direcção principal, esbatendo tudo o que tiver numa orientação diferente, uma vez que aumenta o contraste entre os nervos e o ruído do background e ocorre uma redução efectiva do ruído em volta da estrutura nervosa. Através da alteração dos parâmetros dos dois modelos, esta operação ajusta-os de forma a estes se adequarem às características da vizinhança do pixel referência, assim como adaptando o método à orientação do nervo.

O produto das diferentes respostas com o pixel referência são então combinados e gera-se assim o valor realçado do pixel referência.

A estimativa da orientação do nervo é feita usando o algoritmo dos mínimos quadrados (LMS), que produz uma orientação suave e estável ao longo do nervo, desde que aplicado numa região com nervos, pois numa região com background a estimativa é constituída por ruído devido à falta de nervos e de uma orientação uniforme.

A imagem resultante do processos descritos anteriormente fornece o grau de confiança de cada pixel como pertencente a um nervo, resultando assim na extracção das fibras nervosas presentes na imagem inicial. As coordenadas dos pontos centrais ao longo das estruturas detectadas funcionam como coordenadas que identificam a estrutura.

3.1.4.2 – Modelo Multi-escala

O algoritmo é descrito como multi-escalar porque na sua forma simples apenas tem em consideração um único comprimento de onda, para o filtro de Gabor assim como assume que os nervos tem uma largura única. Devido a estas limitações os autores sentiram a necessidade de tornar o algoritmo multi-escalar variando em cada nível os parâmetros anteriores, tornando o algoritmo como uma pirâmide. A combinação de valores para cada parâmetro e em cada nível são testados no modelo simples e ficam guardados num vector \mathcal{L} .

Em cada nível da pirâmide ocorre uma convolução da imagem inicial com o modelo duplo obtendo-se as características nesse nível e no final as características de cada nível são aglomeradas num só vector denominado de vector das características.

O vector com as características é gerado através da transformação $\mathcal{T}: \mathbb{R}^{M \times N} \rightarrow \mathbb{R}^{M \times N \times O \times S}$ em que $M \times N$ são as dimensões da imagem, O é o número de orientações usadas e S o número de níveis ($2\mathcal{L} + 1$). Também para o cálculo do vector com as características é necessário um modelo duplo separado entre background e nervos. A única diferença é que estes modelos são função dos níveis da pirâmide. A adaptação destes modelos ao longo dos vários níveis e orientações deve cobrir todas as características espaciais dos nervos consideradas relevantes. Como dito anteriormente isso é feito convoluindo os modelos com as imagens, originando assim as respostas positivas e negativas tal como no modelo simples. Encontrando a diferença entre estas duas resposta pode gerar-se então o vector características que descreve a imagem.

O vector características gerado não fornece uma informação precisa para a classificação dos pixéis como pertencentes ou não pertencentes a um nervo. Esta limitação deve-se ao tamanho do próprio vector, que é dependente do número de orientações, O , e do número de níveis da pirâmide, S .

Um vector dependente de um parâmetro que é importante mas não tem interesse na classificação dos pixéis como nervo ou não nervo provocou nos autores a necessidade de criar uma alternativa a este vector. Assim a solução foi gerar o vector com as características na forma canónica, ou seja, considerar que pixéis similares têm características similares. Com esta nova solução cria-se um vector invariante quanto à orientação local dos nervos.

A forma de conseguir este novo vector consiste em atribuir à primeira amostra do vector o seu valor máximo, correspondendo assim à orientação predominante, e depois rodar todas as amostras segundo esse offset em que o número de ciclos é definido pelo valor máximo do vector das características.

Assim os autores garantiram que as características seriam alinhadas de forma canónica, sendo mais fácil perceber que informação o vector das características fornecia acerca da classificação dos pixéis como nervo.

Por fim a classificação dos pixéis é feita utilizando classificadores com Redes Neurais (NNT).

Capítulo 4 – Motivação

A Diabetes Mellitus é uma das doenças com maior prevalência no mundo actual e essa sua prevalência tem aumentado de forma significativa. Uma das maiores causas desta doença é a neuropatia diabética que afecta cerca de 50% dos diabéticos, 25 anos após o diagnóstico, e as principais complicações associadas a esta causa estão relacionadas com a amputação dos membros anteriores e também com a perda da capacidade visual, o que torna o estudo nesta área uma necessidade premente, e ainda mais urgente o desenvolvimento de ferramentas de análise que permitam um diagnóstico rápido e não invasivo.

Sendo a córnea a região transparente do olho e um dos tecidos com maior densidade de nervos no corpo humano, sendo superior à da polpa dentária, cerca de 20 a 40 vezes superior, assim como superior à densidade de nervos na pele pois chega a atingir uma densidade 600 vezes superior, torna-se fundamental uma observação cuidada e precisa das camadas nervosas que constituem este órgão, mais propriamente a camada sub-basal e o estroma.

A microscopia confocal da córnea mostra ser uma ferramenta importante para uma aquisição, rápida e não invasiva, de imagens das várias camadas nervosas que constituem a córnea, fornecendo uma informação clínica importante para o estudo da neuropatia diabética. Essa informação pode ser tão importante que permita uma previsão ou até diagnóstico da principal resultante da Diabetes Mellitus.

Devido às propriedades evidenciadas pela microscopia confocal é possível extrair imagens com uma profundidade tão específica que permita focar uma camada específica do endotélio, como a camada sub-basal referida anteriormente e que tem aproximadamente 10 μm de espessura, correspondendo a cerca de 2% do total de espessura da córnea. Como referido no capítulo 1, esta camada é tão importante para o estudo efectuado pois é nela que se encontra a maioria da estrutura nervosa que compõe a córnea. Sendo uma área com uma grande densidade de nervos é fácil capturá-los numa imagem e depois proceder à sua análise.

Como a análise actual é baseada numa identificação manual dos nervos, o que torna o trabalho muito monótono e acima de tudo sujeito a erros que podem levar a uma informação clínica subjectiva e também ela sujeita a erros, o objectivo principal do trabalho passou então pelo desenvolvimento de um método automático e eficiente de segmentação dos nervos que permita extrair a sua forma e consequentemente permita determinar quantitativamente alguns parâmetros morfométricos como a densidade, tortuosidade, comprimento entre outros. Ao mesmo tempo é necessário também avaliar quais os parâmetros que são melhores indicadores da neuropatia diabética.

Capítulo 5 – Metodologia

Neste capítulo vai ser descrito o método automático de segmentação dos nervos da córnea. Este método é composto por um pré-processamento que tem como objectivo tornar a imagem uniforme tanto no seu contraste como na luminosidade assim como tem o objectivo de realçar as estruturas nervosas, que se caracterizam por se assemelharem a estruturas tubulares, o método também é composto por um processamento cuja principal função é a segmentação dos nervos da córnea, no entanto este divide-se em 2 partes, uma primeira parte que corresponde a uma procura dos pontos semente pela imagem, estes pontos correspondem ao locais de inicio da segmentação, e uma segunda parte que corresponde à segmentação em geral e onde o método percorre toda a estrutura nervosa e classifica os pixéis entre nervo e não nervo. Por fim a última parte do método corresponde a um pós-processamento do resultado final do processamento visto ser haver a necessidade de eliminar algumas estruturas que surgem na segmentação final e não são estruturas nervosas.

5.1 - Materiais

As imagens que foram objecto de estudo, são obtidas do epitélio sub-basal da córnea e adquiridas em sujeitos controlo e com patologia recorrendo a um

microscópio confocal ConfoScan 4. Estas imagens, figura 5.1, representam uma área de 460x350 μm , adquiridas com uma ampliação de 40X e guardadas em formato digital, monocromáticas, com um tamanho de 768x576 pixéis (Ruggeri *et al*, 2006).

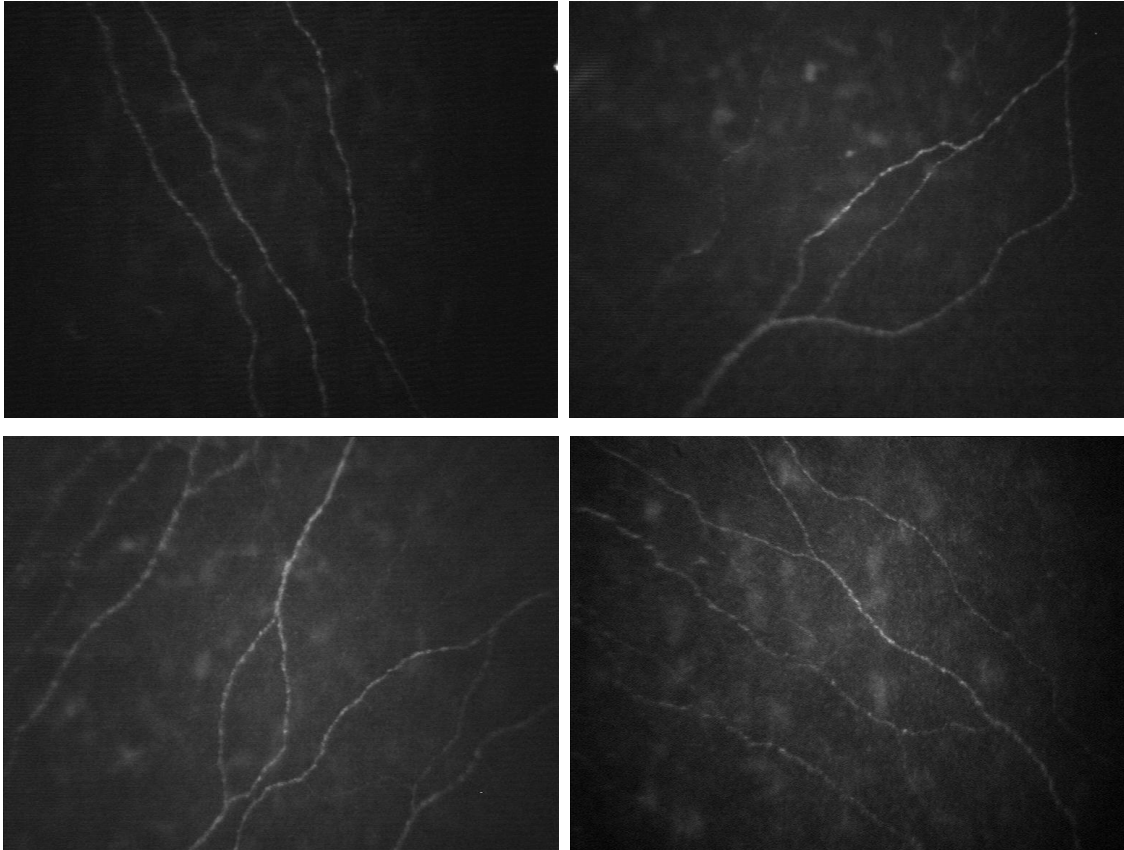


Figura 5.1: 4 imagens representativas do conjunto de imagens usadas, que demonstram uma grande diversidade na quantidade e forma dos nervos (Ruggeri *et al*, 2006).

Nestas imagens os nervos surgem como estruturas claras sobre um fundo negro. Esta característica permite considerá-las estruturas semelhantes a estruturas vasculares e assim utilizar métodos baseados na segmentação dessas estruturas e assim conseguir um método robusto para segmentação dos nervos da córnea.

5.2 – Definição dos parâmetros do algoritmo

A metodologia usada tem como base, um algoritmo desenvolvido por Toliaş & Panas, 1998; que tinha como princípio a divisão dos pixéis em 2 grupos, um grupo que

representava os pontos pertencentes ao nervo e um grupo com os pontos do fundo da imagem (background) e para isso utilizava um algoritmo Fuzzy C-mean* para classificar os pixels segundo esses grupos. Este princípio ajudou a separar o nervo do resto da imagem, tornando-se mais fácil definir os limites da estrutura nervosa, o método continha um conjunto de variáveis que foram úteis para perceber o mecanismo deste tipo de segmentação, variáveis como os pontos centrais, os pontos fronteira, a direcção do nervo, o perfil do nervo e também o contraste. De salientar que no método proposto não se utilizou o algoritmo Fuzzy C-mean mas uma aproximação à ideia subjacente a este algoritmo em que se assume automaticamente que um valor abaixo de um certo limiar é logo considerado como não nervo, o valor máximo como o valor mais provável e todos os outros com uma probabilidade de pertencerem à estrutura nervosa acima de 50%. Assim é mais fácil segmentar em regiões em que o contraste é muito baixo e consequentemente a diferença entre as intensidades dos pixels também, fazendo com que o algoritmo Fuzzy C-mean não seja uma boa ferramenta para a segmentação.

O método é descrito por um conjunto de variáveis que auxiliam na segmentação dos nervos. Essas variáveis permitem definir os segmentos finais da segmentação uma vez que estes são compostos por um conjunto de pontos denominados como pontos centrais ou C_p e pontos fronteira ou FE_p e FD_p . Além de auxiliarem na definição das estruturas nervosas, segmentos, estas variáveis permitem controlar a segmentação dos nervos uma vez que existem variáveis que controlam a direcção, N_p , o diâmetro, D_p , e o nível de contraste, NC_p .

5.3 - Pré-processamento

Em imagens de microscopia confocal, o fundo da imagem é muitas vezes caracterizado por uma variação gradual da sua intensidade desde a periferia para o centro da imagem, sendo esta última região muito mais clara. Os nervos destacam-se do fundo por serem estruturas claras e lineares. Devido a esta não uniformização das

imagens é necessário submetê-las a um processamento inicial antes do algoritmo principal.

Com o intuito de realçar as fronteiras do nervo aplicou-se um algoritmo de simetria de fase baseado na análise local dos pontos de simetria e assimetria de um objecto que fornecem padrões facilmente reconhecíveis. Este procedimento mostrou ser capaz de evidenciar os nervos que constituem cada uma das imagens (Kovesi, 1997).

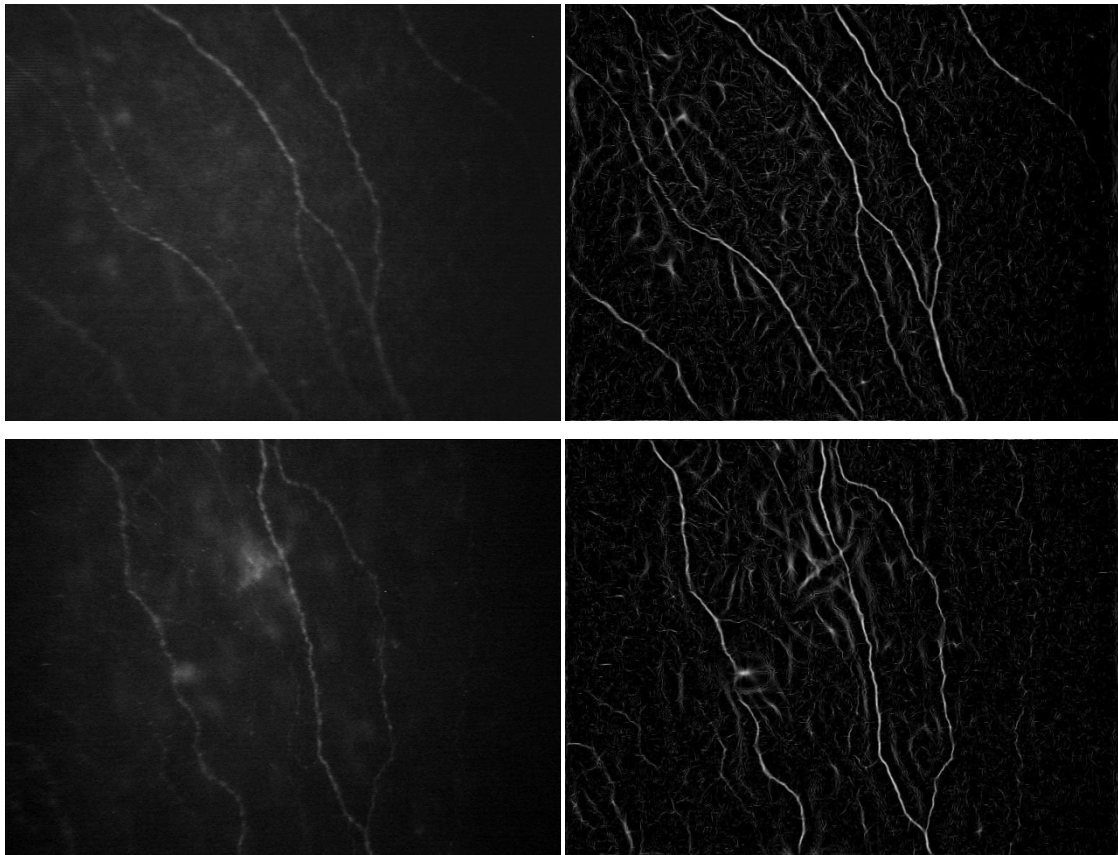


Figura 5.2: Coluna da esquerda – Imagens antes da aplicação do algoritmo de simetria de fase. Coluna da direita – Imagens resultantes da aplicação do algoritmo de simetria de fase que evidencia a estrutura vascular do fundo da imagem tornando mais fácil a obtenção dos pontos semente.

Tornou-se assim mais fácil obter os pontos semente sem correr os risco de obter muitos pontos fora das regiões de interesse, isto é, obter muitos pontos no fundo da imagem. Tornou-se claro que seria muito difícil obter um número considerável de pontos semente ao longo dos nervos sem obter esses pontos no fundo

da imagem, então o objectivo foi fazer um balanço entre o número de pontos semente dentro e fora dos nervos.

O cálculo destes pontos é feito dividindo a imagem em duas regiões, uma região central onde há uma maior concentração de estruturas nervosas e há um maior contraste, sendo mais fácil procurar os pontos semente e uma região periférica onde há menos nervos e estes têm um menor contraste em relação ao fundo da imagem. As imagens da figura 5.2 ilustram isso mesmo, um menor contraste nas regiões mais periféricas dos nervos. Assim sendo, estabeleceu-se um limiar diferente para as duas regiões da imagem e dinâmico dentro de cada região, uma vez que dentro da mesma região existem zonas com menor contraste e variando o valor limite conseguia-se um maior número de pontos semente nessas regiões evitando noutras regiões haja um grande número destes pontos fora dos nervos. Esta variação dentro de uma região, central ou periférica, da imagem depende da intensidade média dos pixéis em cada uma das regiões de interesse, ROI's, definidas com um tamanho de 48x48 pixéis. A variação na região central obedece à equação $y = -0.0721*x + 4.25$ e na região periférica obedece à equação $y = -0.0571*x + 3.5286$. Nestas duas equações o valor de x representa a intensidade média dos pixéis dentro da região de interesse e y representa o valor limite da intensidade dos pontos semente.

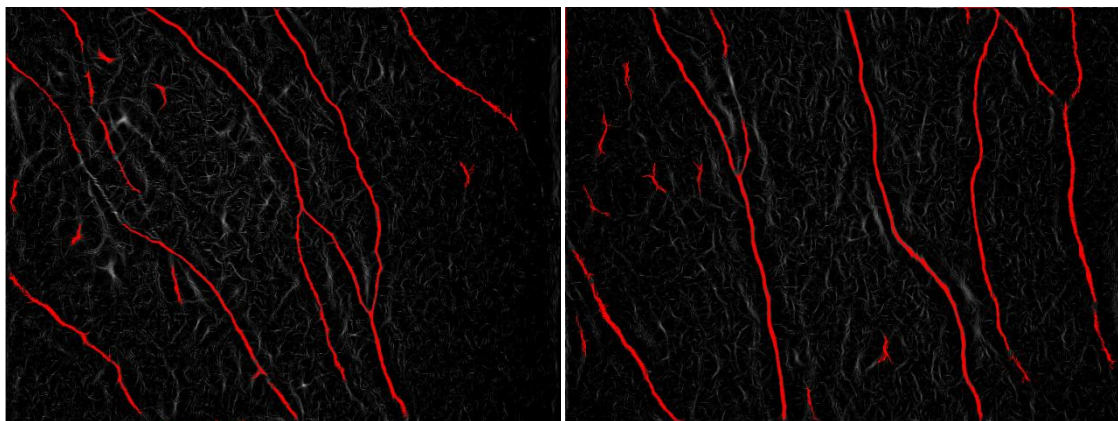


Figura 5.3: Resultado após aplicação do algoritmo de simetria de fase com os pontos semente obtidos em seguida. Pode notar-se que os pontos semente ocupam quase toda a estrutura nervosa.

Após se ter todos os pontos semente necessários para a segmentação da imagem aplica-se então um outro pré-processamento, independente do primeiro

aplicado à imagem original, que tem como objectivo diminuir a variação de intensidade da periferia para o centro das imagens e também remover o ruído e pequenas estruturas que surgem nas imagens.

Aplicou-se então um filtro de média com uma dimensão de 50x50 obtendo-se assim uma imagem representativa do ruído. Em seguida fez-se uma subtracção desse resultado à imagem original obtendo-se assim uma imagem mais limpa e como menor variação da intensidade. Na imagem 5.4 pode ver-se a variação de luminosidade nas imagens e na imagem 5.5 o resultado da aplicação de um filtro de média.

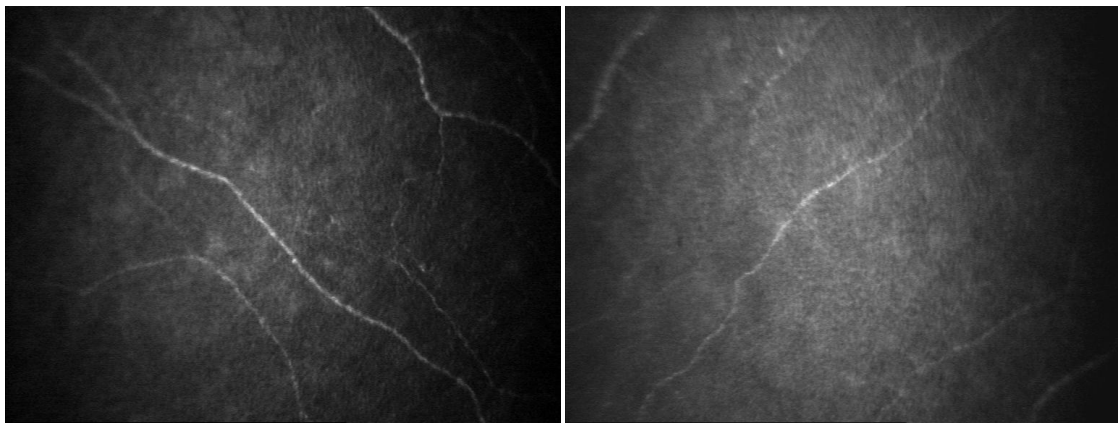


Figura 5.4: Duas imagens representativas da variação de luminosidade da periferia para o centro da imagem.

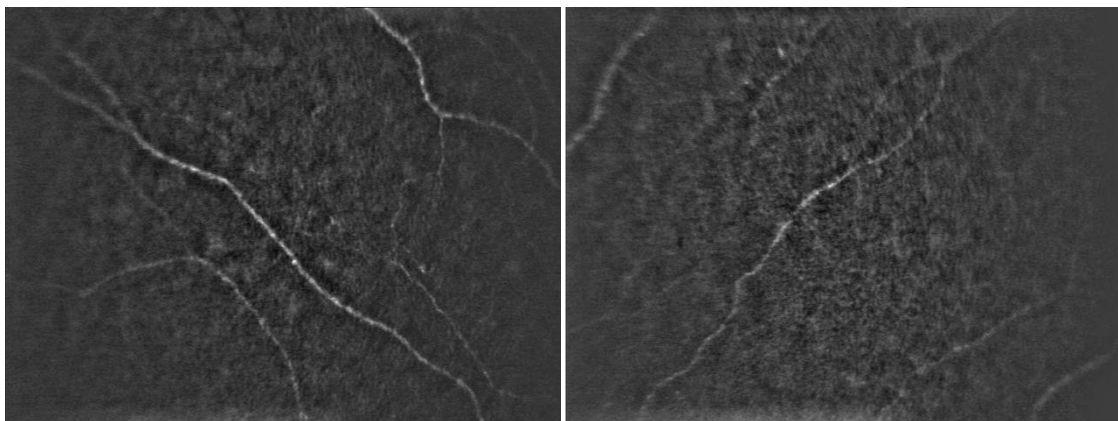


Figura 5.5: Resultado da aplicação do filtro de média e no qual se pode constatar uma maior uniformização da luminosidade da imagem, pois já não se verifica um grande contraste entre o centro e a periferia da imagem.

5.4 - Processamento

Depois de feito um pré-processamento e de localizados todos os pontos semente da imagem inicia-se então a fase do processamento.

O processamento começa com a utilização do primeiro ponto da lista de pontos semente calculados anteriormente. É feita uma procura na sua vizinhança, definindo 3 direcções principais (horizontal, vertical e diagonal), escolhendo-se qual dos vizinhos é o melhor candidato a ponto do nervo. Este processo é feito analisando qual dos pontos vizinhos tem maior intensidade, aumentando assim a probabilidade do ponto não estar fora do nervo. Esse ponto, em conjunto com o ponto semente, é utilizado para definir a direcção do nervo naquela região. Na imagem 5.6 pode ver-se a posição dos 3 pontos (a azul) na vizinhança do ponto semente (a vermelho).

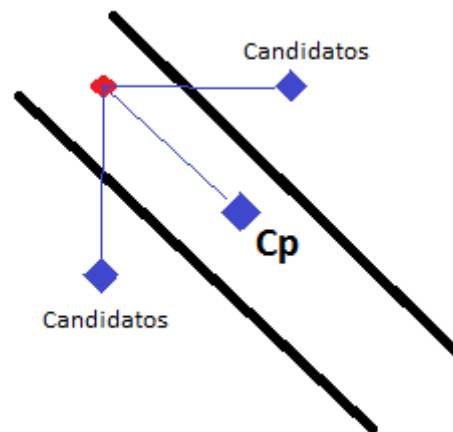


Figura 5.6: Esquema representativo da selecção do próximo ponto candidato a ponto central C_p (pontos a azul). Pode verificar-se que o algoritmo faz uma busca em 3 direcções distintas de forma a escolher a melhor direcção para o nervo. A linha a preto representa a fronteira do nervo e o ponto vermelho o ponto anterior que foi classificado como pertencente ao nervo

Depois de definida a orientação é determinado o perfil que melhor representa o nervo no ponto C_p . Esse perfil corresponde à recta perpendicular à direcção do nervo. Ao longo deste capítulo serão referidos vários perfis e de forma a distingui-los serão utilizados os seguintes índices: *perfil-1*, *perfil*, e *perfil+1* para definir o perfil anterior, o perfil actual e o perfil seguinte respectivamente. Assim sendo, o *perfil(s)* será o conjunto de pontos pertencentes a um perfil do nervo com coordenadas $s_n = [i(n), j(n)]^T$ sendo n o número de píxeis que pertence a esse perfil. O número de

pixéis de um perfil será sempre 2 vezes o diâmetro do nervo calculado para o perfil *perfil-1*, ou seja, $n = 2D_{perfil-1}$.

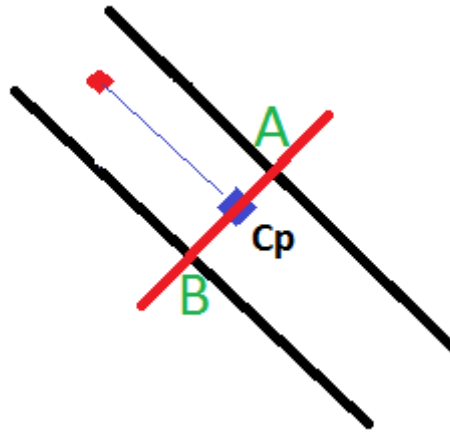


Figura 5.7: Esquema que representa o perfil do nervo (recta vermelha) traçado após escolha da melhor direcção para o nervo. As letras A e B representam os pontos correspondentes à fronteira do nervo no perfil.

Como referido anteriormente, ao longo do processo de segmentação os pixéis de um perfil são divididos em 2 grupos, o grupo com os pixéis do nervo, e o grupo com os pixéis fora do nervo, essa divisão é feita tendo em conta os valores de intensidade dos pixéis de todo o perfil. Assim sendo o valor com intensidade máximo tem a mais probabilidade de pertencer ao nervo, os valores abaixo de um certo limiar são logo classificados como não pertencentes ao nervo e os valores acima desse limiar têm uma probabilidade acima de 50%. Esse limiar corresponde à média entre o valor máximo e o valor mínimo do perfil. Visto que estamos falar de probabilidades então os valores do perfil passam a estar entre 0 e 1, passando o perfil a designar-se por $m_{nervo}(s)$, com os pixéis fora do nervo a passarem a 0 e o valor máximo a passar a 1, ou seja, quanto mais alto o valor do perfil maior a probabilidade de pertencer ao nervo.

Antes de avançar é necessário salientar que nesta fase do processo nem todos os perfis são aceites como tal, pois é nesta fase que entra o primeiro critério de aceitação de um ponto como potencial ponto do nervo. Esse critério está relacionado com a diferença entre a intensidade máxima e mínima de um perfil, isto é, se a diferença for inferior a 6 valores de intensidade o perfil é logo rejeitado e inicia-se novamente a segmentação mas com o próximo ponto semente, se for superior então a

segmentação avança, segundo o que foi explicado no parágrafo anterior, e até ao próximo critério de aceitação.

Na figura seguinte pode ver-se o exemplo de um perfil do nervo. O perfil pode ser unimodal ou não consoante o aparecimento de bifurcações ou até devido ao efeito do ruído próximo do nervo. O conceito de unimodal ou bimodal está relacionado com o número de sub-perfis existentes num perfil. No caso da figura 5.8 o perfil é unimodal pois apenas por uma curva, se fosse constituída por duas ou mais curvas então ter-se-ia vários sub-perfis. É sobre esta definição de sub-perfil que assenta o segundo critério de aceitação de um perfil pois todos os perfis que apresentem mais que duas curvas gaussianas, sub-perfis, são excluídos passando-se assim ao próximo ponto semente. Definiu-se como sendo dois o número máximo de sub-perfis pois aceita-se que possa existir um nervo ao lado de outro ou então que ocorra uma bifurcação, mas mais que isso já é considerado ruído perto da região do nervo.



Figura 5.8: Ilustração de um perfil tipo obtido ao longo da segmentação dos nervos. Na figura pode-se verificar que a curva que define este perfil é muita similar a uma curva gaussiana.

Como se pode observar na imagem anterior a distribuição das intensidades ao longo do perfil do nervo também pode ser modelada por uma função degrau com as seguintes características

$$perfil(s) = \begin{cases} d, & \text{onde } -w/2 < 0 < w/2 \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (5.1)$$

onde d corresponde à probabilidade de pertencer ao nervo e w a largura do nervo.

Para o caso em que só se tem um nervo, ou um perfil, as coordenadas do ponto central do nervo $C_p = [C_p^i C_p^j]^T$ são calculadas encontrando as coordenadas que correspondem ao centro de gravidade do perfil, $m_{nervo}(s)$, como explicado nas equações seguintes:

$$C_p^i = \frac{\sum_{k=1}^n m_{nervo}(s_k) \cdot i(k)}{\sum_{k=1}^n m_{nervo}(s_k)} \quad (5.2)$$

e

$$C_p^j = \frac{\sum_{k=1}^n m_{nervo}(s_k) \cdot j(k)}{\sum_{k=1}^n m_{nervo}(s_k)} \quad (5.3)$$

Os valores β_{nervo} e $\beta_{nãonervo}$ são calculados usando também o perfil original, $perfil(s)$, que corresponde ao perfil composto pela intensidade dos pixéis:

$$\beta_{nervo} = \frac{\sum_{k=1}^n m_{nervo}(s_k) \cdot perfil(s_k)}{\sum_{k=1}^n m_{nervo}(s_k)} \quad (5.4)$$

e

$$\beta_{nãonervo} = \frac{\sum_{k=1}^n (1 - m_{nervo}(s_k)) \cdot perfil(s_k)}{\sum_{k=1}^n (1 - m_{nervo}(s_k))} \quad (5.5)$$

Estes valores são importantes para o cálculo do contraste do nervo.

Quanto ao diâmetro do nervo é calculado como sendo a distância ponderada entre os pontos do perfil em que $\| \cdot \|$ corresponde à distância Euclideana:

$$D_p = \sum_{k=1}^{n-1} m_{nervo}(s_k) \cdot \|s_{k+1} - s_k\| \quad (5.6)$$

Ponderada porque tem em conta a probabilidade que cada pixel tem em pertencer ao nervo, dando assim um maior ênfase aos pixéis com valores mais altos no perfil.

As fronteiras do nervo são definidas como sendo os pontos que em que há transição do nervo para o fundo da imagem definindo-se assim como sendo os pontos correspondentes ao primeiro e último valor diferente de 0 no perfil do nervo, ou seja as suas coordenadas são $FE_p = [FE_p^i, FE_p^j]^T$ e $FD_p = [FD_p^i, FD_p^j]^T$ em que $FE_p < C_p$ e $FD_p > C_p$.

A primeira derivada da função degrau ilustrada na equação 5.1 também permite calcular a fronteira do nervo como sendo os pontos extremo da função derivada.

O contraste do nervo, de forma a ser aplicado tanto a imagens com nervos claros como a imagens com nervos escuros, é definido por:

$$NC_p = \frac{|\beta_{nervo} - \beta_{n\tilde{a}onervo}|}{\max\{\beta_{nervo}, \beta_{n\tilde{a}onervo}\}} \quad (5.7)$$

Este valor NC_p é importante no processo de segmentação para definir a resolução do algoritmo sendo o último critério de aceitação de um perfil. Definindo um limite, faz-se uma avaliação do perfil comparando o valor NC_p com esse limite e se for superior então o perfil corresponde ao perfil de um nervo. O limite que é definido não é um valor constante mas sim variável pois depende do número de pontos semente na região do perfil em causa, isto porque quantos mais pontos semente maior o contraste da imagem logo o limite definido pode ser maior, assim como é menor no caso de haver poucos pontos semente, evitando assim que a segmentação falhe em regiões com pouco contraste. A variação deste limite obedece à seguinte equação $y = 0,0043 * x - 0,0153$ em que x representa a densidade de pontos semente e y o valor do limite.

Após o ponto passar por todos os critérios de aceitação descritos ao longo da fase do processamento, o objectivo é encontrar o próximo candidato. Uma vez

definida a orientação do nervo o que se faz é identificar o próximo candidato como sendo o ponto situado a 2 pixéis de distância do ponto anterior e com a mesma orientação, ou seja, faz-se uma extensão de 2 pixéis na direcção do nervo de forma a encontrar o próximo candidato.

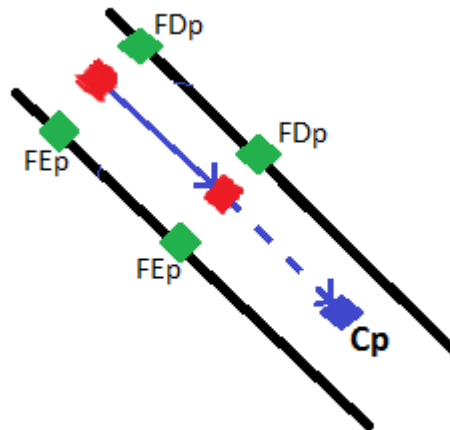


Figura 5.9: Esquema ilustrativo da selecção do próximo ponto candidato a ponto central (azul), C_p . A direcção anterior auxilia na procura do novo candidato. A vermelho estão os pontos já confirmados como nervo e a verde os respectivos pontos fronteira.

A segmentação prossegue até um dos critérios falhar, passando-se assim para o ponto semente seguinte. Quando o algoritmo analisar todos os pontos semente o processamento da imagem fica completo.

5.5 - Pós-Processamento

O resultado final da segmentação são imagens com estruturas correspondentes a ruído. E assim sendo aplicou-se um pós-processamento de forma a eliminar essas estruturas e ficar com uma um resultado final mais próximo do esperado.

O primeiro procedimento consistiu em eliminar as barras que existiam na periferia da imagem.

Considerando a imagem como sendo binária, aplicou-se uma moldura com uma espessura de 15 pixéis em toda a imagem e somou-se os pixéis com valor 1 em cada uma das linhas e colunas que correspondiam a essa moldura, se a soma fosse superior a um determinado valor então estar-se-ia na presença de uma dessas barras e eliminava-se colocando todos os pixéis a 0. Na imagem 5.10 pode ver-se a barra horizontal presente em algumas imagens.

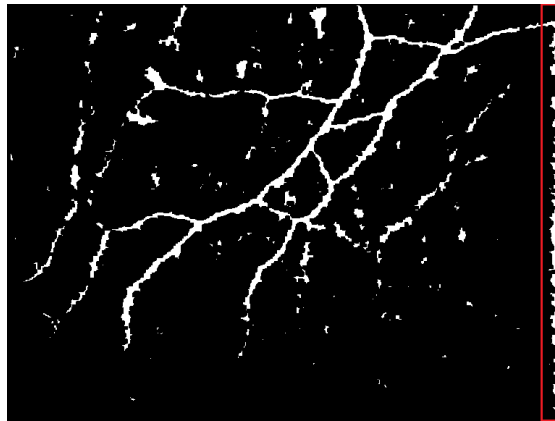


Figura 5.10: Acumulação de ruído na extremidade da imagem.

O segundo procedimento baseia-se no tamanho do ruído presente na imagem. Calcula-se o tamanho de todas as estruturas presentes na imagem e aquelas que tenham um tamanho inferior a um valor limite são eliminadas. Mas este procedimento só permite remover pequenas estruturas porque ao aumentar o valor limite corria-se o risco de eliminar segmentos do nervo que não unidos. A imagem 5.11 apresenta o ruído de pequenas dimensões presente na imagem e que é eliminado por este segundo procedimento.

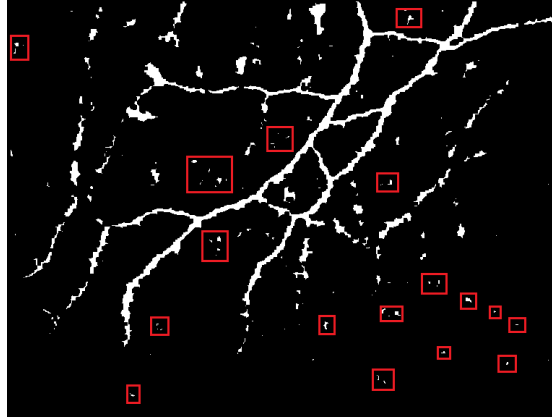


Figura 5.11: Ruído proveniente de pontos semente, rectângulos a vermelho na imagem, que são eliminados aplicando um valor limite ao tamanho das estruturas que compõem a imagem.

Devido à limitação do segundo procedimento foi necessário utilizar um terceiro procedimento que tem em conta a forma das estruturas, isto porque se verificou que existiam aglomerados que formavam uma única estrutura; devido ao seu tamanho passavam facilmente no procedimento anterior. Então calculou-se o menor rectângulo que conseguia englobar toda a estrutura e de seguida calculou-se a sua área. Uma vez que já tinha sido determinado o tamanho da estrutura, calculava-se a razão entre as duas áreas, isto é, a percentagem de pixéis considerados nervo que estavam dentro do rectângulo e se essa percentagem fosse superior a um valor limite a estrutura era rejeitada. Na imagem 5.12 pode ver-se alguns aglomerados que não são nervo mas que se encontram próximo de uma estrutura nervosa.

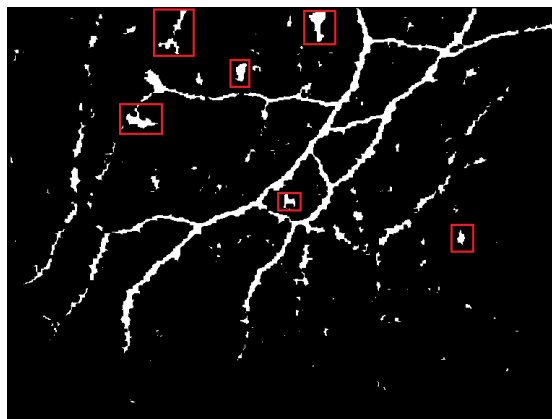


Figura 5.12: Imagem resultante do terceiro procedimento de eliminação de estruturas.

6 – Resultados e Discussão

A segmentação obtida pelo método proposto é comparada com a segmentação manual feita por um especialista da área médica, considerando-se que esta segmentação manual corresponde ao resultado ideal fazendo-se assim uma avaliação da performance do algoritmo.

O método de segmentação é um método automático que não necessita da intervenção do utilizador. A figura 6.1 apresenta alguns dos resultados obtidos pelo algoritmo.

A seguir apresentam-se os resultados relativos à performance do método, nomeadamente a percentagem de pixéis correctamente segmentados e pixéis classificados de forma incorrecta por parte do algoritmo. Os resultados são apresentados em tabelas e também utilizando ilustrações gráficas recorrendo a gráficos de dispersão (scatterplots) para comparação dos resultados, relativos aos parâmetros morfométricos, obtidos pelo método proposto e pela segmentação manual. Utilizam-se também gráficos de Bland-Altman para avaliar a diferença entre o comprimento de um nervo obtido por segmentação manual e um nervo obtido pelo método proposto e gráficos box-plot para avaliar as diferenças entre os resultados da tortuosidade e densidade obtidos pelo método manual e pelo método proposto.

6.1 – Conjunto de estudo

As imagens, como referido no capítulo de 5, foram obtidas recorrendo a um microscópio confocal da córnea e representam áreas da córnea que contêm as estruturas nervosas, mais propriamente o plexus nervoso sub-basal.

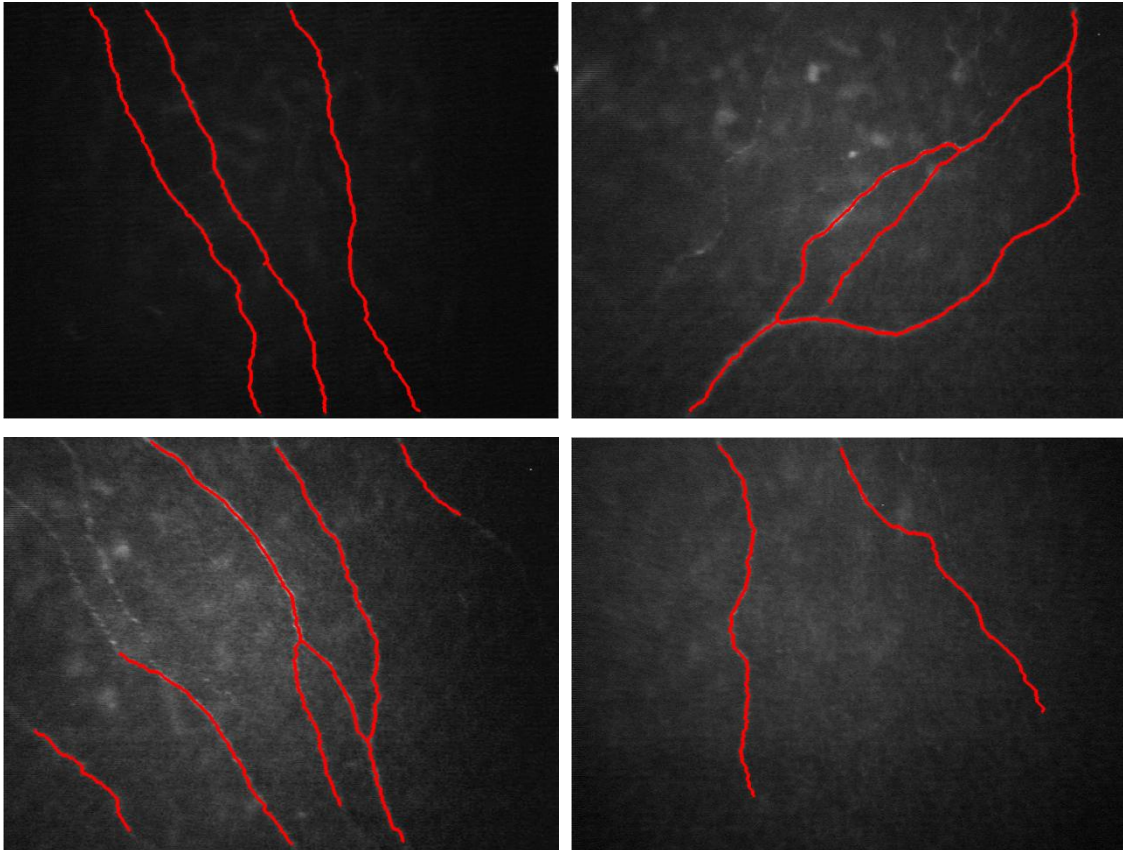


Figura 6.1: Resultados obtidos após aplicação do algoritmo proposto. Como imagem de fundo a imagem original e sobreposto a vermelho o resultado da segmentação. Como se pode ver os resultados são muito semelhantes ao que a imagem original apresenta.

Os testes foram feitos utilizando 30 imagens com um tamanho de 576x768 píxéis. A figura 6.1 apresenta um exemplo das 30 imagens utilizadas para testar o algoritmo. Só foram utilizadas 30 imagens porque foi este conjunto de imagens que apresentou melhores resultados a nível de segmentação e de cálculo dos parâmetros morfométricos.

6.2 – Performance do método

A capacidade de um algoritmo em discriminar uma estrutura alvo de tudo o que não interessa para a segmentação não pode ser feito recorrendo apenas a uma avaliação qualitativa dos resultados pois esta avaliação é subjectiva e sempre sujeita a erros de análise. Então é necessário fazer uma avaliação quantitativa desses resultados, ao mesmo tempo que deve ser feita uma comparação com os resultados do método referência (manual).

6.2.1 – Avaliação da segmentação

Com o intuito de fazer uma avaliação quantitativa dos resultados obtidos utilizando o método automático proposto, foram retirados um conjunto de dados, calculado com recurso a uma ferramenta de programação desenvolvida em Matlab, The MathWorks®, que forneceu, para cada uma das imagens, os valores apresentados na tabela 6.1. As equações 6.1 a 6.5 apresentam a forma de cálculo de alguns valores, nomeadamente os pixéis correctamente segmentados como nervo, os pixéis errados, os pixéis falsos, ou classificados como nervo mas não sendo nervo e os pixéis não segmentados como nervo mas que são nervo.

$$\text{Pixéis correctos} = \frac{TP}{(TP + FP + FN)}, \quad (6.1)$$

$$\text{Pixéis errados} = \text{Pixéis falsos} + \text{Pixéis não segmentados}, \quad (6.2)$$

$$\text{Pixéis falsos} = \frac{FP}{(TP + FP + FN)}, \quad (6.3)$$

$$\text{Pixéis não segmentados} = \frac{FN}{(TP + FP + FN)}, \quad (6.4)$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{TP}{(TP + FN)}. \quad (6.5)$$

Tabela 6.1: Tabela com todos os resultados necessários para avaliar a performance do método quanto à segmentação dos nervos. Os valores TP, FP e FN são os pixéis verdadeiros positivos, falsos positivos e falsos negativos respectivamente.

Imagem	Pixéis Correctos	Pixéis Errados	Pixéis Falsos	Pixéis não segmentados	TP	FP	FN	Sensibilidade	Neuropatia Diabética
20	84,9%	15,1%	9,9%	5,2%	1527	179	93	94,3%	Não
21	99,9%	0,1%	0,0%	0,1%	1695	0	2	99,9%	Não
22	62,2%	37,8%	24,3%	13,5%	1087	425	236	82,2%	Não
23	99,4%	0,6%	0,0%	0,6%	1582	0	9	99,4%	Não
28	81,3%	18,7%	8,1%	10,6%	1674	167	218	88,5%	Não
32	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	601	0	0	100,0%	Não
36	85,1%	14,9%	7,0%	7,9%	2054	170	191	91,5%	Não
38	91,0%	9,0%	5,7%	3,3%	1820	113	66	96,5%	Não
39	85,4%	14,6%	9,2%	5,3%	2498	270	156	94,1%	Não
50	84,5%	15,5%	8,2%	7,3%	2253	219	195	92,0%	Não
51	87,0%	13,0%	5,2%	7,8%	2491	149	224	91,7%	Sim
52	86,6%	13,4%	10,1%	3,3%	2797	327	107	96,3%	Sim
53	89,9%	10,1%	4,1%	6,0%	2186	99	147	93,7%	Sim
56	90,3%	9,7%	6,8%	2,9%	1833	138	58	96,9%	Não
59	83,2%	16,8%	4,3%	12,5%	1354	70	203	87,0%	Sim
60	83,1%	16,9%	6,0%	10,9%	2007	144	264	88,4%	Sim
62	92,8%	7,2%	5,9%	1,3%	1685	107	24	98,6%	Não
63	72,0%	28,0%	1,1%	26,9%	741	11	277	72,8%	Sim
64	96,6%	3,4%	0,0%	3,4%	949	0	33	96,6%	Não
65	64,3%	35,7%	34,8%	0,9%	1476	800	20	98,7%	Não
70	88,0%	12,0%	0,0%	12,0%	1612	0	220	88,0%	Sim
71	97,5%	2,5%	0,3%	2,2%	1942	6	44	97,8%	Sim
76	84,7%	15,3%	8,8%	6,4%	2159	225	164	92,9%	Não
81	86,2%	13,8%	13,7%	0,2%	2113	335	5	99,8%	Não
82	88,3%	11,7%	11,2%	0,5%	2677	338	16	99,4%	Não
83	74,5%	25,5%	12,5%	13,1%	1111	186	195	85,1%	Não
84	97,4%	2,6%	2,2%	0,4%	890	20	4	99,6%	Não
85	80,5%	19,5%	8,2%	11,4%	1597	162	226	87,6%	Não
86	79,9%	20,1%	5,1%	15,0%	1280	81	241	84,2%	Não
87	91,2%	8,8%	3,7%	5,1%	1957	80	110	94,7%	Não

Analisando a tabela 6.1 pode ver-se que cerca de 1/3 dos resultados estão acima dos 90% de segmentação correcta (Imagens: 21, 23, 32, 38, 56, 62, 64, 71 e 84) e apenas cerca de 1/10 se encontra abaixo dos 75% (Imagens: 22, 63, 65 e 83).

Esta tabela serve apenas para introduzir os parâmetros utilizados para medir a performance do algoritmo, como os pixéis correctamente segmentados, os pixéis falsamente segmentados e os não segmentados.

Tabela 6.2: Tabela com os valores médios dos resultados apresentados na tabela anterior, assim como os valores extremos. Os valores são também divididos entre sujeitos normais e não normais de forma a se puder fazer uma melhor avaliação dos resultados e avaliar a influência de nervos com patologia no grau de segmentação.

	Nervos								
	Correctamente Segmentados			Falsamente Segmentados			Não segmentados		
%	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo
Todas as imagens (n=30)	62,2%	86,3%	100,0%	0,0%	7,2%	34,8%	0,0%	6,5%	26,9%
Sujeitos normais (n=22)	62,2%	86,4%	100,0%	0,0%	8,4%	34,8%	0,0%	5,2%	15,0%
Sujeitos com patologia (n=8)	72,0%	85,9%	97,5%	0,0%	3,9%	10,1%	2,2%	10,2%	26,9%

A tabela 6.2 serve como complemento da tabela 6.1 pois torna mais fácil a avaliação dos resultados obtidos pela segmentação com o método proposto.

Nesta tabela além de se apresentarem os valores para o conjunto de todas as imagens, também se divide os resultados entre sujeitos normais e sujeitos não normais. São tratadas 22 imagens relativas a sujeitos sem patologias e 8 imagens relativas a sujeitos com patologias.

Como se pode verificar o grau de segmentação dos nervos ronda os 86% sendo 86,4% (intervalo entre 62,2%-100%) no caso dos sujeitos normais e 85,9% (intervalo entre 72%-97,5%) no caso de sujeitos ditos não normais. Esta pequena diferença pode ser explicada pela elevada tortuosidade dos nervos presentes em sujeitos com patologia associada (Kallinikos *et al*, 2004) (Scarpa *et al*, 2008), tornando mais difícil uma segmentação eficaz da estrutura nervosa presente na imagem.

Quanto à segmentação incorrecta das imagens, é maior a percentagem de estruturas segmentadas de forma incorrecta que a percentagem de estruturas não segmentadas, no entanto, os resultados relativos a imagens de sujeitos não normais demonstram uma maior percentagem de estruturas não segmentadas em relação às segmentadas incorrectamente. Este facto pode dever-se ao não aparecimento de células de suporte, como os queratócitos, ou outras estruturas associadas, nos casos em que o sujeito sofre de uma patologia relacionada com a córnea.

Além do grau de segmentação que o método proporciona é também necessário falar do tempo que, em média, este demora a segmentar uma imagem. Para isso o

método foi testado em 10 das 30 imagens utilizadas de forma a ter uma ideia de quanto tempo era necessário para ter uma imagem segmentada. O tempo médio apresentado foi de 2 minutos e 13 segundos utilizando um processador Intel® Core™ i7 Q 720 @ 1.60 GHz.

O tempo de segmentação vai de encontro aos tempos apresentados pelos métodos já existentes com tempos entre 1 e 3 minutos (Ana Ferreira *et al*, 2010b) (Scarpa *et al*, 2008).

6.3 – Avaliação dos parâmetros morfométricos

Nesta secção pretende-se fazer uma comparação entre o método automático desenvolvido e o método manual. O objectivo é comparar os resultados obtidos para cada parâmetro morfométrico: o comprimento, a densidade e a tortuosidade dos nervos; e verificar se existe uma correlação entre os valores obtidos pelo método automático e os valores obtidos pelo método manual. Na tabela 6.3, apresentam-se todos os valores relativos ao comprimentos dos nervos presentes nas 30 imagens. Na tabela 6.4 os valores relativos à tortuosidade e na tabela 6.5 os valores relativos à densidade.

Tabela 6.3: Tabela relativa a todos os valores obtidos para o comprimento dos nervos presentes nas imagens. Cada linha corresponde a um nervo e nos casos em que os valores surgem entre parêntesis quer dizer que esse nervo é composto por vários segmentos e não apenas por 1 único segmento.

Imagem	Manual	Automático	Imagem	Manual	Automático	Imagem	Manual	Automático
	Comprimento (µm)	Comprimento (µm)		Comprimento (µm)	Comprimento (µm)		Comprimento (µm)	Comprimento (µm)
20	606	726	51	256	280	70	549	562
	391	308		559	506		535	481
	576	672		571	673		787	(287-160-122)
				1310	(555-514)			
21	575	567	52	241	281	71	584	581
	583	566		784	527		525	538
	565	562		565	493		916	(641-184)
				1173	1061			
22	219	99	53	193	243	76	809	(818-147)
	337	473		737	626		444	447
	315	(144-96)		517	558		920	(529-250)
	429	(419-110)		437	518			
		360	(88-252)					
23	1641	1582	56	1858	(1320-135-193)	81	647	582
							805	691
							522	538
28	217	178	59	270	264	82	230	285
	477	318		1264	1012		767	(526-114)
	1138	1236					559	622
							1068	1196
32	626	601	60	1133	1001	83	827	(680-97)
				1081	1079		421	450
36	209	(82-195)	62	591	(315-216)	84	475	486
	818	(727-90)		1147	1126		404	424
	666	790						
	300	158						
	173	149						
38	1866	(963-152-176-429)	63	419	135	85	940	(496-173)
				600	617		563	498
							262	340
39	471	489	64	552	573	86	411	457
	276	211		411	376		778	587
	823	833					262	317
	989	(538-118-260)						
		(149-227)						
50	595	756	65	828	(236-525)	87	1672	(540-859-85)
	776	555		642	421		336	313
	526	419						
	403							

Tabela 6.4: Tabela relativa a todos os valores obtidos para a tortuosidade dos nervos presentes na imagem. No caso da tortuosidade cada linha corresponde a um nervo mas neste caso os valores entre parêntesis correspondem a cada ramo do nervo, os ramos que surgem com / correspondem àqueles que o método não conseguiu segmentar.

Imagem	Manual	Automático	Imagem	Manual	Automático
	Tortuosidade	Tortuosidade		Tortuosidade	Tortuosidade
20	(9,7-8,19-23,66) (7,07-6,71-23,52) (10,77-8,31-18,84-11,09)	(/-/-21,19) (13,3-9,49-24,37) (11,79-2-14,86-14,66)	60	(13,64-46,11-22,11-3,46-11,7-470,75) (33,88-16,09-21,66-15,97)	(11,31-12,07-42,07-4,47-4,9-71,4) (24,37-5,1-20,78-15,43)
21	29,43 29,43 28,81	29,51 20,88 29,7	62	31,45 (27,04-34,9-4,24)	18,74 (23,54-845,11-5,48)
22	16,4 21,95 20,83 23,35	13,64 27,93 14,27 21,18	63	21,17 33,65	13,82 21,65
23	(10,72-19,8-4,24-16,16-32,2-12,61-5,83)	(13,34-25,5-/-15,72-21,98-11,83-8,89)	56	(34,42-7,35-8,83-5,66-26,32-26,15-8,31-5,48-16,25-8,43-2-18,38)	(11,15-13,45-11,27-/-20,78-20,74-7,87-6,71-16,55-4,24-6-12,57)
28	16,85 23,39 (16,73-22,72-14,07-12,77-12,21)	18,14 22,07 (20,27-24,06-20,17-12,77-15,84)	65	(16,22-16,97-18,92) 32,7	(10,91-17,06-14,98) 23,62
32	35,55	34,28	38	(24,29-22,11-10,72-26,57-18,57-8,49-6-11,7-9,33)	(23,75-14,46-/-10,28-22,83-9,8-7,42-17,12-/-)
36	(20,32-10,34-24,23) 18,6 (18,06-13,04-18,08) 18,14 11,96	(21,56-11,53-25,71) 21,93 (19,54-14,9-20,47) 15,49 10,86	71	30,1 26,66 (7,35-23,28-21,05-15,17)	16,94 24,84 (8,77-20,49-20,88-14,83)
70	28,14 26,96 (23,07-20,37-12,37)	28,65 27,6 (19,24-13,89-15,39)	76	(12,92-11,31-24,6) 30,51 (14,63-13,89-17,29-15,78-12,85)	(/-12,57-17,79) 14,44 (/-8,42-8,94-10,81-10,75)
39	(19,95-4,9-7,48) 16,85 (8,31-18,19-18,68-17,49) (25,48-5,74-17,8-12,65-8)	(17,16-8,37-5,66) 13,08 (11,66-19,67-18,14-18,47) (28,23-8-13,49-19,67-11,62)	81	(12,45-17,64-18,3) (19,7-15,52-17,26) 26,53	(12,53-10,04-13,38) (19,1-11,27-19,6) 28,43
50	(11,66-17,55-14,66) (16,25-15,78-17,15) 27,35 16,16	(12,04-12,08-12,47) (18,3-17,44-19,67) 28,6 15,8	82	19,29 (17,64-13,86-18) 28,46 (2449,56-17,29-11,22)	12,89 (15,46-13,86-20,4) 20,09 (18,67-22,85-10,95)
51	19,52 25,85 30,41 (2419,7-10,72-16,97-9,95-8,25)	12,21 16,76 19,45 (24,23-/-25,24-/-/)	83	(20,95-17,29-17,46) (14,04-15,78-10,91)	(17,37-13,89-12,25) (15,23-19,31-6,24)
52	15,62 (14,83-14,87-18,17) 27,6 (2398,36-20,45-9,7)	20,64 (8,48-11,14-19,52) 18,31 (24,8-34,54-/-)	84	20,66 23,85	25,1 26,76
53	14,21 (15,84-15,1-18) 26,68 16,61 21,75	17,92 (19,72-9,11-18,95) 28,39 84,47 15,53	85	(15,68-20,81-13,3-12,12-14,8-11,36) (18,65-12,29-13,89) (8,12-6,16-14,83)	(18,38-16,91-12,49-5,8,83-8,31) (20,35-11,4-11,22) (15,43-10,25-15,2)
64	27,46 25,06	34,91 25,46	86	16,76 (21,47-15,23-15,87) 17,97	14,68 (/-48,35-/-) 16,57
59	16,22 (24,66-8,31-14,35-13,27-16,28-10,25)	32,37 (31,45-10,3-6,71-13,64-14,21-6,96)	87	(31,27-12,73-10,86-13,93-18,38-17,64-9,22) 22,85	(30,1-11,58-11,96-14,63-19,57-9,96-8,37) 12,56

Tabela 6.5: Tabela relativa a todos os valores à densidade dos nervos e obtidos tanto pela segmentação manual como pela segmentação automática.

Imagem	Manual	Automático	Imagem	Manual	Automático
	Densidade ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$)	Densidade ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$)		Densidade ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$)	Densidade ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$)
20	3556	3856	60	5005	4702
21	3895	3831	62	3929	3314
22	2939	2566	63	2303	1700
23	3710	3576	64	2177	2145
28	4142	3915	65	3323	2965
32	1415	1359	70	4229	3643
36	4896	4639	71	4578	3987
38	4218	4150	76	4913	4234
39	3577	3653	81	4463	5210
50	5199	4556	82	5932	6217
51	6095	5968	83	2821	2554
52	6246	6828	84	1987	2057
53	5073	4595	85	3397	3585
56	4200	3603	86	3280	3077
59	3467	3074	87	4540	3744

As tabelas anteriores servem de base a todos os valores apresentados nas secções 6.3.1, 6.3.2 e 6.3.3, tantos para os que são apresentados em tabelas como os que são apresentados em gráficos.

6.3.1 – Comprimento

O comprimento é um parâmetro morfométrico muito importante. São inúmeros os estudos feitos na área que abordam o comprimento dos nervos e que relação existem entre este parâmetro e alguns fenómenos subjacentes aos nervos. Nesta secção pretende-se avaliar a resposta do algoritmo quando se pretende calcular o comprimento de cada nervo segmentado. Na tabela 6.6 pode visualizar-se os valores, como a média e os valores máximo e mínimo, relativos ao comprimento dos nervos.

Tabela 6.6: Valores extraídos pelo método para o comprimento dos nervos, após segmentação. Assim como os valores retirados do método manual que servirão como comparação e também como avaliação da performance do método proposto.

	Comprimento (Nervos completos)		
	Métodos	Média (μm)	Desvio Padrão (μm)
Todas as imagens (n=30)	Método Manual	621	296
	Método Automático	556	291
Sujeitos controlo (n=22)	Método Manual	609	290
	Método Automático	547	303
Sujeitos com patologia (n=8)	Método Manual	653	311
	Método Automático	573	272

O valor médio para o comprimento do nervo é de 556 ± 291 μm apresentando uma correlação de 0,8996 como se pode constatar no gráfico 6.1. Esta correlação permite concluir-se que o método tem um bom comportamento quando se trata de calcular o comprimento, uma vez que, uma correlação ótima, é uma correlação igual a 1 e uma correlação péssima é uma correlação igual a 0, e no caso específico o valor encontra-se bastante próximo de 1.

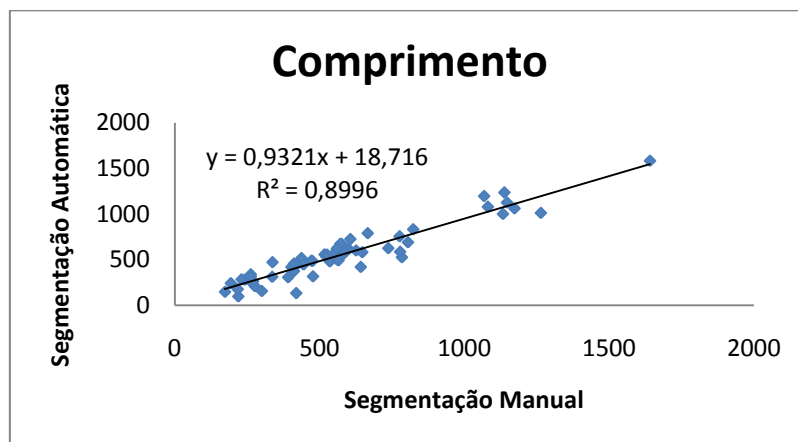


Gráfico 6.1: Gráfico de dispersão com os valores do comprimento dos nervos obtidos pelo método manual e automático existindo uma grande correlação entre estes valores, 0,8996.

O gráfico 6.1, assim como os gráficos de dispersão apresentados ao longo da deste capítulo são utilizados como ferramentas de qualidade e permitem extrair, além do parâmetro R^2 , coeficiente de correlação de Pearson, que fornece o grau de correlação entre duas medições, a linearidade entre duas medições, sabendo-se assim se as alterações ocorridas numa das variáveis, resultados da segmentação manual, são acompanhadas pela segunda variável, resultados da segmentação automática.

O gráfico 6.2 é um gráfico de Bland-Altman que também foi utilizado para fazer uma comparação entre os resultados da segmentação automática e os resultados da segmentação manual. A diferença média entre o comprimento dos nervos medidos pelos dois métodos, manual e automático, é de $-20,38 \pm 94,48 \mu\text{m}$, significando que em 95% da vezes a diferença entre os dois métodos situa-se entre $-230,4$ e $189,6 \mu\text{m}$. Estes valores demonstram haver uma diferença menor quando comparados com outros métodos, em que as diferenças se situam entre -38 (Ana Ferreira *et al*, 2010b) e -127 (Scarpa *et al*, 2008) μm .

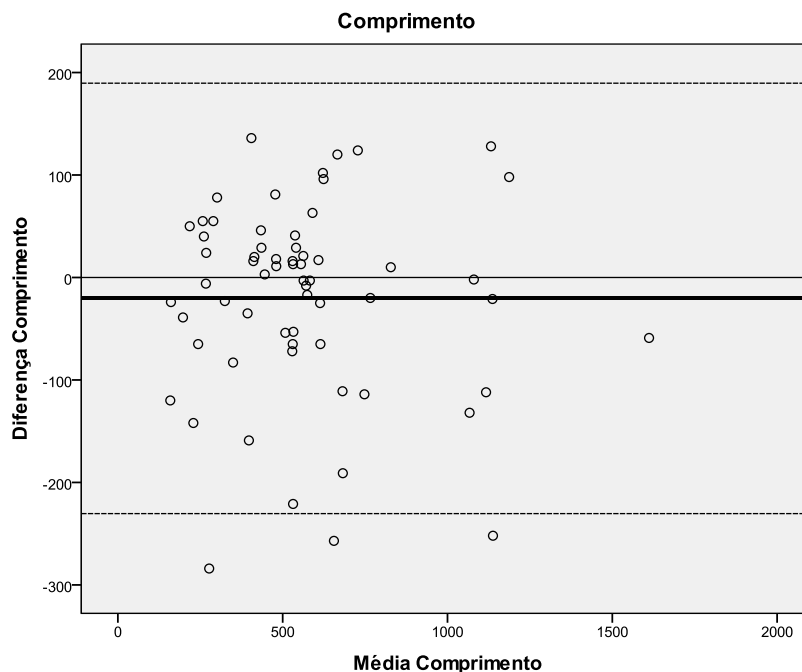


Gráfico 6.2: Gráfico de Bland-Altman para comparação dos resultados obtidos tanto pela segmentação manual como pela segmentação automática. Neste tipo de gráficos é feita uma comparação entre a diferença dos dois métodos e o valor médio entre os dois métodos obtendo-se assim a diferença entre os valores obtidos por um e outro método.

No caso dos sujeitos controlo o valor médio baixa um pouco estando na ordem dos $547 \pm 303 \mu\text{m}$ (intervalo: 99 – 1582 μm) e com uma correlação de 0,9233 como se pode verificar no gráfico 6.2. Esta correlação é maior quando comparada com a correlação para todas as imagens, evidenciando que os valores obtidos para os casos controlo têm maior concordância com os valores obtidos pelo método manual para o mesmo género de casos. Isto deve-se ao tipo de nervos que estas imagens apresentam

pois estes são mais lineares e normalmente com baixa tortuosidade, o que facilita a segmentação.

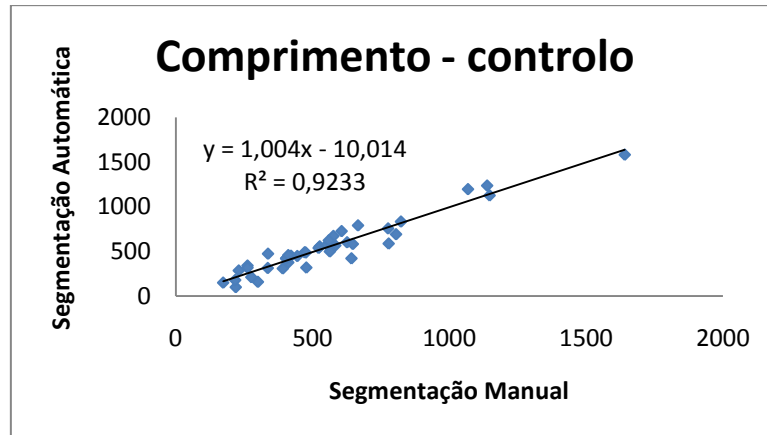


Gráfico 6.3: Gráfico de dispersão com os valores do comprimento dos nervos para os casos controlo obtidos tanto pelo método manual como pelo método automático existindo também uma forte correlação entre estes valores, 0,9233.

Também para os casos controlo se utilizou um gráfico de Bland-Altman para analisar a diferença o método automático e o método manual. Neste caso a diferença média entre os dois métodos é de $-7,79 \pm 84,05 \mu\text{m}$, o que significa que em 95% dos casos a diferença média se encontra entre $-168,7$ e $153,1 \mu\text{m}$. Mais uma vez os valores estão dentro do que se encontra na literatura sendo a diferença até bastante menor quando comparada com o método desenvolvido por Scarpa *et al*, 2008.

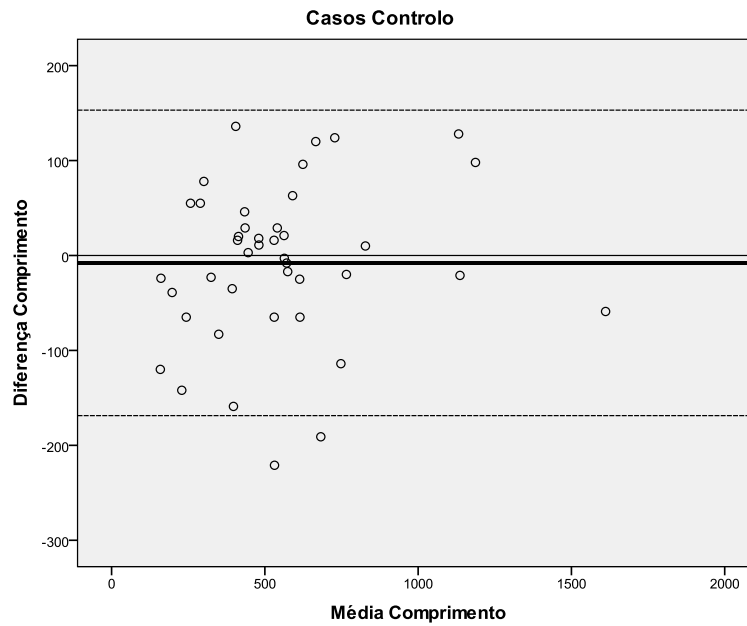


Gráfico 6.4: Gráfico de Bland-Altman para comparação dos resultados obtidos para os sujeitos controlo tanto pela segmentação manual como pela segmentação automática. Mais uma vez pode desde logo concluir-se que em média os comprimentos obtidos pelo método automático serão menores que os valores obtidos pela segmentação manual.

Quanto aos casos com patologia o comprimento médio dos nervos é de $573 \pm 272 \mu\text{m}$, sendo que é maior que o valor obtido para os casos normais. Mas isto justifica-se com o facto de também na segmentação manual as estruturas nervosas dos pacientes com patologias apresentarem comprimentos maiores. A partir do gráfico 6.5 pode ver-se que a correlação entre estes valores também é grande, sendo de 0,8779. No entanto esta correlação é mais baixa que nos casos controlo, havendo assim menos concordância entre os valores obtidos pelo método manual e o método proposto. Este facto deve-se certamente ao grau de tortuosidade dos nervos que torna mais difícil a segmentação.

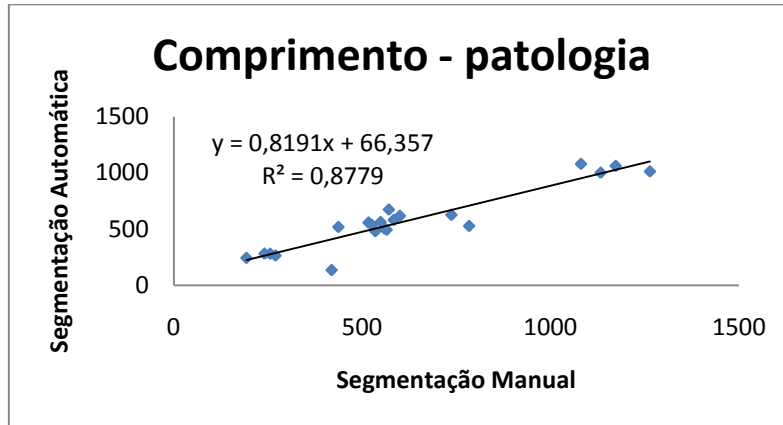


Gráfico 6.5: Gráfico de dispersão com os valores do comprimento dos nervos para os casos patológicos obtidos tanto pelo método manual como pelo método automático existindo também uma boa correlação entre estes valores, 0,8779.

Analisando o gráfico de Bland-Altman pode concluir-se que a diferença média entre a segmentação manual e automática é de $-48,52 \pm 107,92 \mu\text{m}$, resultando assim que em 95% dos casos a diferença média entre os dois métodos esteja entre $-265,5$ e $168,3 \mu\text{m}$. Também nos casos com patologia os valores vão de encontro aos obtidos na literatura.

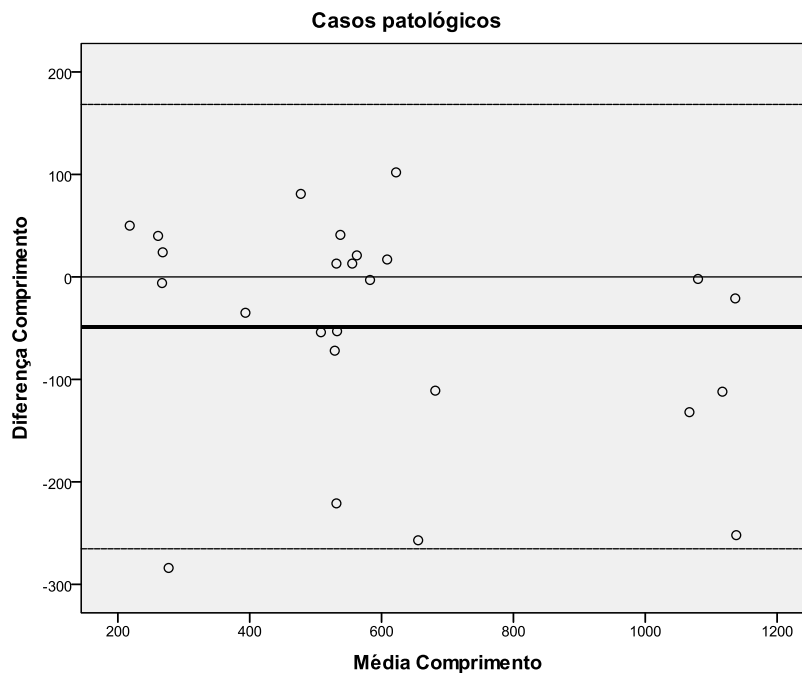


Gráfico 6.6: Gráfico de Bland-Altman para comparação dos resultados obtidos para os sujeitos com patologia tanto pela segmentação manual como pela segmentação automática. Mais uma vez pode desde logo concluir-se que em média os comprimentos obtidos pelo método automático serão menores que os valores obtidos pela segmentação manual.

De salientar que a média dos comprimentos no método automático apresenta-se menor que a média no método manual e isso deve-se sem dúvida ao facto de em grande parte das imagens a segmentação não estar completa ou então as regiões finais dos nervos serem de difícil segmentação devido ao seu pouco contraste. A comprovar este facto estão também os resultados obtidos pelos gráficos de Bland-Altman em que a diferença média entre o método proposto e o método manual é sempre negativa, evidenciando assim que em média os nervos obtidos pelo método automático são mais pequenos.

6.3.2 – Densidade

A densidade dos nervos tem a sua importância quando se quer avaliar a regeneração da estrutura nervosa da córnea, ou então quando se pretende avaliar que efeitos têm algumas intervenções cirúrgicas ou patologias, como a Neuropatia Diabética, na estrutura nervosa da córnea. Visto que uma boa enervação confere uma grande estabilidade e segurança para a córnea.

A tabela 6.7 apresenta os valores relativos à densidade dos nervos obtidos tanto pela segmentação manual como pela segmentação automática.

Tabela 6.7: Valores extraídos pelo método para a densidade dos nervos, após segmentação. Assim como os valores retirados do método manual que servirão como comparação e também como avaliação da performance do método proposto. Os valores obtidos vão de encontro aos encontrados na literatura.

	Densidade		
	Método	Média ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$)	Desvio Padrão ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$)
Todas as imagens ($n=30$)	Método Manual	3984	1188
	Método Automático	3777	1262
Sujeitos controlo ($n=22$)	Método Manual	3750	1079
	Método Automático	3582	1087
Sujeitos com patologia ($n=8$)	Método Manual	4625	1311
	Método Automático	4312	1613

Como se pode verificar, e de encontro ao que já se tinha denotado para o comprimento dos nervos, pode-se considerar que o algoritmo tem um bom desempenho quando se pretende calcular a densidade da estrutura nervosa presente

numa imagem. Analisando a tabela conclui-se que os valores obtidos, em média não são muito diferentes dos valores calculados pela segmentação manual, que serve como referência. Os gráficos seguintes demonstram que realmente essa diferença não é muito grande havendo até uma grande correlação entre os resultados.

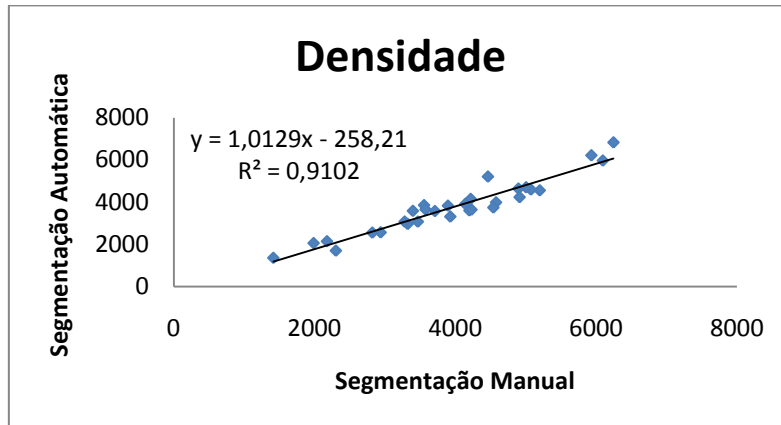


Gráfico 6.7: Gráfico de dispersão com os valores da densidade dos nervos obtidos tanto pelo método manual como pelo método automático demonstrando uma grande correlação entre estes valores, 0,9102. Tal como sucedido com o comprimento dos nervos.

Analisando o gráfico 6.7 verifica-se desde logo que a correlação entre os valores é de 0,9102 para uma média de $3777 \pm 1262 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ o que é uma correlação forte para os valores de densidade uma vez que mais de 90% dos valores obtidos pelo método manual e pelo método automático estão em conformidade. Pode também verificar-se que são poucos os valores discrepantes (outliers), isto é, os pontos que fogem muito da recta de ajuste sendo esta muito próxima da recta $y=x$. Além do mais, estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos na literatura e apresentados no capítulo 1, secção 1.2.5 (Patel & McGhee, 2009).

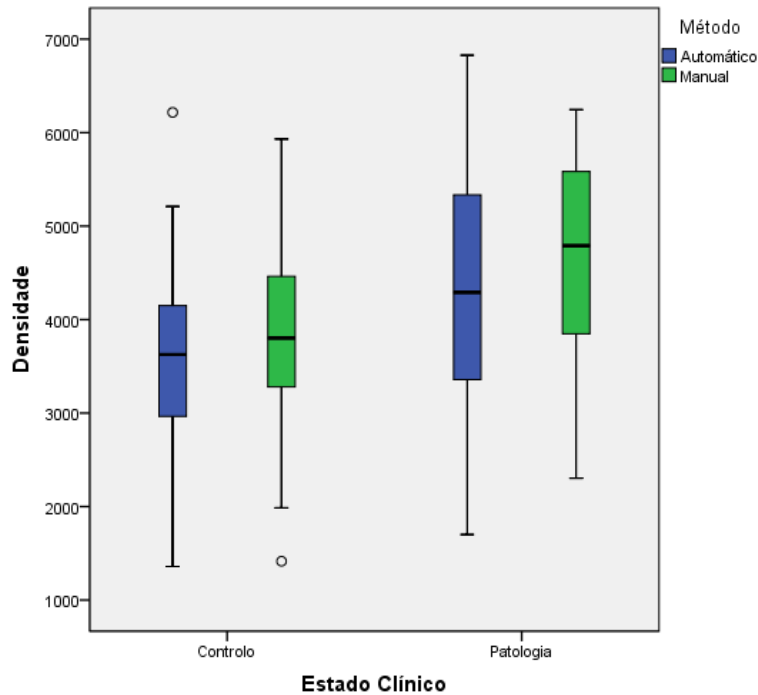


Gráfico 6.8: Gráfico box-plot – Densidade obtida pelo método manual e automático tanto para os casos controlo como para os casos com patologia.

A análise do gráfico 6.8 permite comparar os resultados do método proposto com o método manual ao mesmo tempo que se pode distinguir entre casos controlo e casos patológicos. A mediana do método proposto para os casos controlo, do método manual para os casos controlo, do método proposto para os casos com patologia e do método manual para os casos com patologia é respectivamente: 3628, 3802, 4291 e 4791. Evidenciando um resultado muito próximo entre os dois métodos no que se refere aos casos controlo. Para pequenas densidades de nervos, tanto em casos controlo como em casos com patologia, o método manual apresenta valores superiores, como se pode ver pelos valores mínimos do primeiro quartil, no entanto para valores grandes de densidade de nervos e no caso específico de pacientes com patologia o método automático apresenta valores superiores como se pode observar pelo valor máximo do último quartil. Isto indica que apenas neste caso específico é que o método proposto apresenta uma densidade de nervos superior ao método manual, uma vez que nos outros casos o método manual tem sempre uma maior densidade de nervos. O método automático apresenta uma maior dispersão dos valores no que se refere aos casos com patologia pois além de apresentar um intervalo de valores

consideravelmente maior, apresenta também uma maior dispersão entre os diferentes quartis, não muito significativa mas maior. No caso dos sujeitos controlo o intervalo de dos valores parece ser idêntico entre os dois métodos no entanto entre cada quartil o método automático apresenta uma maior dispersão nos primeiro e segundo quartil, já o terceiro e último quartis apresentam-se maiores no método manual. Mesmo apresentando estas diferenças na dispersão dos resultados elas não são significativas como se pode comprovar pela gráfico 6.8.

6.3.3 – Tortuosidade

A tortuosidade dos nervos ganhou grande importância quando os primeiros estudos associaram este parâmetro ao grau de Neuropatia de Diabética. Este parâmetro torna-se assim bastante importante para o trabalho que está a ser desenvolvido, pois pretende-se comprovar que há uma relação entre o grau de Neuropatia Diabética e o grau de tortuosidade dos nervos. Segundo o que foi descrito no capítulo 2, um sujeito com Neuropatia Diabética apresenta um maior grau de tortuosidade. Com esse intuito tentou-se estabelecer essa relação com este trabalho.

Na tabela 6.8 apresentam-se os valores tanto para sujeitos normais como para sujeitos com patologia, assim como os valores para todos os sujeitos.

Tabela 6.8: Valores extraídos pelo método para a tortuosidade dos nervos, após segmentação. Assim como os valores retirados do método manual que servirão como comparação e também como avaliação da performance do método proposto. Assim como os valores do comprimento e da densidade, estes valores também foram divididos entre sujeitos normais e sujeitos não normais.

	Tortuosidade		
	Métodos	Média	Desvio Padrão
Todas as imagens (n=30)	Método Manual	17,72	7,28
	Método Automático	16,97	8,87
Sujeitos controlo (n=22)	Método Manual	17,04	6,97
	Método Automático	16,23	6,97
Sujeitos com patologia (n=8)	Método Manual	19,78	7,87
	Método Automático	19,21	12,86

Analisando a tabela 6.8 e olhando para a média dos sujeitos controlo como dos sujeitos com patologia, pode-se concluir que este valor sobe quando se passa de sujeitos controlo para sujeitos com patologia, $16,23 \pm 6,97$ para sujeitos controlo e $19,21 \pm 12,86$ para sujeitos com patologia, estando dentro do que seria expectável, pois seria de esperar que os sujeitos com patologia apresentassem maior tortuosidade. Também se consegue verificar que utilizando o método automático os nervos são tão tortuosos. Este facto pode dever-se única e exclusivamente a um problema derivado do especialista, pois basta um pequeno tremer da mão durante a marcação do nervo para alterar o valor da tortuosidade.

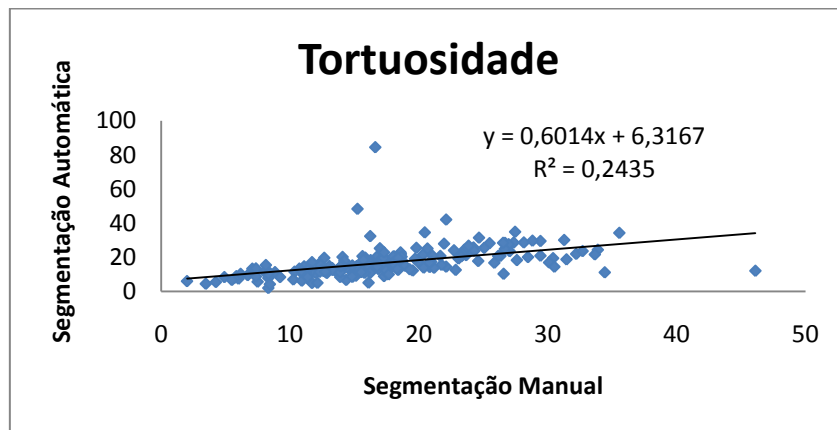


Gráfico 6.9: Gráfico de dispersão com os valores da tortuosidade dos nervos obtidos tanto pelo método manual como pelo método automático. No caso da tortuosidade a correlação entre os valores dos dois métodos é muito baixa, 0,2435.

Fazendo uma análise do gráfico 6.10, pretende-se estimar a correlação entre a segmentação manual e a segmentação automática, esperando-se que essa correlação seja bastante alta, mais uma vez porque uma correlação próxima de 1 indica que há relação entre os resultados obtidos pelo método manual e o método proposto, automático. No entanto, no caso da tortuosidade essa correlação não se verifica uma vez que corresponde 0,2435, isto é, apenas 1/4 dos dados estão correlacionados, o que é muito pouco e demonstra que o método falha quando se pretende calcular o grau de tortuosidade dos nervos. Esta situação deve-se principalmente às falhas durante a segmentação dos nervos pois no final da segmentação ainda surgem estruturas nervosas constituídas por vários segmentos soltos e não por um único

segmento. Este facto altera em muito o parâmetro da tortuosidade, uma vez que não tendo um segmento completo a sua tortuosidade altera-se consideravelmente.

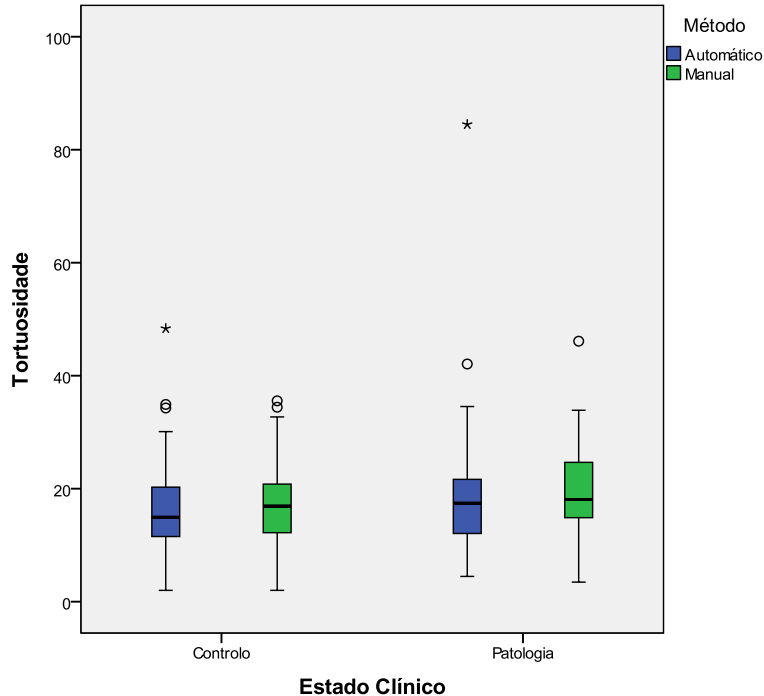


Gráfico 6.10: Gráfico box-plot – Tortuosidade obtida pelo método manual e automático tanto para os casos controlo como para os casos com patologia.

O gráfico 6.10, assim como o gráfico 6.8, é um gráfico box-plot que permite comparar os resultados obtidos pelos dois métodos (manual e automático) mas para os valores de tortuosidade. Fazendo uma análise do gráfico pode-se retirar que os valores da medianas não diferem muito entre o método manual a verde e o método automático a azul, no caso dos sujeitos controlo a mediana para o método automático foi de 14,94 e para o método manual foi 16,91, já no caso dos sujeitos com patologia a mediana para o método automático foi de 17,43 e para o método manual foi 18,08. Como se pode verificar, nos casos controlo e nos casos com patologia não existe grande diferença entre o intervalo de valores evidenciando que mesmo podendo não existir uma correlação entre os resultados dos dois métodos, evidenciado pelo gráfico 6.9, estes encontram-se no mesmo intervalo de valores. As diferenças mais significativas ocorrem nos casos com patologia em que o método proposto (automático) apresenta um segundo e último quartil com maior dispersão que no

método manual, enquanto que este último apresenta um primeiro e terceiro quartis com maior dispersão.

O facto de em cada quartil os valores limite serem sempre maiores nos casos patológicos em comparação com os controlo, tanto no método manual como no método proposto, evidencia que o método proposto seja capaz de fazer uma distinção correcta entre sujeitos controlo e sujeitos com patologia, algo que já tinha sido evidenciado ao analisar a tabela 6.8. No entanto o método proposto tem como limitação o facto de não ter uma boa correlação entre os seus resultados e os do método manual.

Capítulo 7 – Conclusões

O método desenvolvido nesta tese apresenta, como pode ser observado no capítulo 6, uma segmentação considerável das imagens obtidas por CCM, fazendo-a de uma forma automática. Os resultados são passíveis de discussão quando comparados com os da literatura pois o número de imagens utilizadas não é idêntico, no entanto fazendo uma referência apenas aos valores apresentados os resultados são apreciáveis pois andam à volta dos 86% de segmentação correctamente efectuada.

O método divide-se em 3 partes:

1. Uma primeira parte que corresponde a aplicação de um algoritmo de simetria de fase para realce das estruturas nervosas, ao mesmo tempo funcionando como um pré-processamento da imagem pois há uma diminuição da quantidade de estruturas que não são nervo, quando comparado com outras alternativas utilizadas e discutidas no capítulo 6.
2. A segunda parte corresponde a uma segmentação local, entendida como uma segmentação ponto a ponto que faz uma procura do ponto central e consequentemente dos pontos fronteira ao longo da estrutura nervosa, permitindo um maior controlo da segmentação, através da criação de 3 níveis de aceitação dos pontos como pertencentes aos nervos. Esses 3

níveis são a diferença de intensidades máxima e mínima de um perfil, o número de sub-perfis de um perfil e o contraste do nervo. Todos estes parâmetros são explicados no capítulo 5.

3. A última parte corresponde a um pós-processamento dos resultados de forma a diminuir o ruído ainda presente na imagem, derivado dos pontos semente encontrados fora da estrutura nervosa, certamente em estruturas que não sendo nervo têm intensidade muito próximas do nervo e não foram eliminadas no pré-processamento. Além deste ruído também serve para eliminar pequenas ramificações junto ao nervo.

O método além de ser capaz de segmentar as estruturas nervosas, também permite, enquadrado num programa já desenvolvido (cornea3), a obtenção de alguns parâmetros morfométricos como o comprimento e a densidade dos nervos, evidenciando uma grande correlação entre a segmentação manual e a segmentação automática proposta. Estes resultados permitem sugerir que o método possa ser utilizado para diagnóstico de algumas patologias relacionadas com os nervos da córnea, ajudando assim os especialistas fornecendo parâmetros importantes para o diagnóstico dessas patologias.

Além da extração dos parâmetros morfométricos, a grande vantagem que este método proporciona é a utilização de um método automático que evita a necessidade de uma segmentação manual subjectiva e sujeita a erros de análise por parte do especialista da área médica.

A avaliação da performance do método foi feita tendo em conta o grau de segmentação do método, nomeadamente a quantidade de pixéis correctamente segmentados como nervo e tendo em conta o grau de correlação entre os parâmetros morfométricos obtidos pelo método proposto e o método manual (referência). O grau de avaliação pode ser visto na tabela 6.2 do capítulo 6 onde se consegue visualizar que o a percentagem média de pixéis correctamente segmentados é de 86,3% e que o intervalo vai de 62,2% a 100%. Para avaliar o grau de correlação dos vários parâmetros utilizaram-se gráficos de dispersão para comparar os resultados do método

automático e do método manual para cada parâmetro. Este tipo de gráficos permite uma avaliação da correlação entre os valores obtidos pelos dois métodos, pois fornecem o parâmetro R^2 que indica precisamente qual a relação entre os resultados dos dois métodos. Sendo a correlação uma medida da relação entre duas variáveis, é de esperar um valor próximo de 1 em casos de grande correlação entre duas variáveis. Deste modo é possível dizer que o método apresenta uma boa relação com o método manual para o cálculo do comprimento e densidade pois nestes dois casos o valor apresentado foi de 0,8996 e 0,9102 respectivamente, sendo valores muito próximos de 1 e significando que 89,96% dos valores calculados pelos dois métodos para o comprimento e 91,02% dos valores calculados pelos dois métodos para a densidade estão correlacionados.

Para uma melhor avaliação dos resultados obtidos para o comprimento além de se utilizarem gráficos de dispersão utilizaram-se também gráficos de Bland-Altman que permitem ter uma ideia da diferença entre os resultados do método proposto e os da referência. Segundo os resultados obtidos a diferença média entre os comprimentos calculados pelo método proposto e os comprimentos obtidos pelo método manual é de $-20,38 \pm 94,48 \mu\text{m}$, um valor pequeno tendo em conta o comprimento médio dos nervos, $556 \mu\text{m}$, ou seja, a diferença entre os dois métodos representa 3,67% do tamanho médio de um nervo obtido pela segmentação automática.

Já no caso da tortuosidade o método não apresentou grande resultados visto que a correlação, apresentada entre os resultados do método proposto e a referência, é muito baixa sendo inferior a 0,5. Isto indica que mais de metade dos resultados não apresentam uma relação entre si. No entanto foi possível concluir que mesmo não havendo uma relação entre os métodos, o método proposto consegue distinguir entre sujeitos controlo e sujeitos patológicos, no que concerne à tortuosidade pois mostrou ter valores mais altos de tortuosidade nos casos em que os sujeitos eram patológicos. Situação que tinham sido evidenciada pelos resultados do método manual e pela literatura.

Além dos gráficos de dispersão utilizaram-se gráficos box-plot para analisar as diferenças entre os resultados dois métodos tanto para a densidade como para a

tortuosidade permitindo concluir que no caso da tortuosidade mesmo não havendo uma forte correlação o método apresenta maiores tortuosidades para nervos de pacientes com patologia.

7.1 – Trabalho futuro

Um trabalho muito importante relativo a este método e que deve ser feito num futuro próximo é melhorar a sua capacidade em obter um maior número de nervos completos para um cálculo da tortuosidade dos nervos mais próximo da tortuosidade real, pois este parâmetro é de extrema importância para o diagnóstico da neuropatia diabética, uma das patologias mais comuns na sociedade actual.

O grande desafio para este método será torná-lo capaz de fazer uma reconstrução 3D dos nervos da córnea possibilitando assim uma análise mais eficiente dos nervos assim como dos seus reais parâmetros, visto que alguns deles são influenciados pela disposição dos nervos na imagem em 2D, nomeadamente o comprimento do nervo e a densidade. Uma possível abordagem seria utilizar modelos matemáticos para fazer a reconstrução da estrutura nervosa, outra seria utilizar modelos de reconstrução 3D a partir de imagens em 2D, simulando assim a estrutura 3D dos nervos. Esta segunda abordagem seria possível através da obtenção da coordenada z d imagem, sabendo-se assim a que profundidade está a ser obtida a imagem.

Referências

Ana Ferreira et al, 2010a – A. Ferreira, A. M. Morgado and J. S. Silva, “Corneal nerves identification for earlier diagnosis and follow-up of diabetes,” in *RecPad, Conferência Portuguesa de Reconhecimento de Padrões*, 2010.

Ana Ferreira et al, 2010b – A. Ferreira, A. M. Morgado and J. S. Silva, “Corneal nerves segmentation and morphometric parameters quantification for early detection of diabetic neuropathy” in *MEDICOM 2010, IFMBE Proceedings* , vol. 29, pp. 264-267, 2010.

Araki-Sasaki et al, 2000 – K. Araki-Sasaki, S. Aizawa, M. Hiramoto, M. Nakamura, O. Iwase, K. Nakata, Y. Sasaki, T. Mano, H. Handa, Y. Tano, “Substance P-induced caused by interrupting the trigeminal nerve at various levels along its course” in *Transactions of the American Ophthalmological Society*, vol. 73, pp. 313–365, 2000.

Armstrong et al, 1998 – D. G. Armstrong, L. A. Lavery, L. B. Harkless, “Validation of a diabetic wound classification system” in *Diabetes Care*, vol. 21, pp. 855–859, 1998.

Campbell et al, 2001 – S. Campbell, T. W. Reid, C. J. Murphy, “The effect of growth factors, neuropeptides and neurotransmitters on NGF content in SV-40 transformed human corneal epithelial cells” in *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 41, S905, 2001.

Colley et al, 1985 – A. M. Colley, H. D. Cavanagh, L.A. Drake, M.L. Law, “Cyclic nucleotides in muscarinic regulation of DNA and RNA polymerase activity in cultured corneal epithelial cells of the rabbit” in *Current Eye Research*, vol. 4, pp. 941–950, 1985.

Dabbah et al, 2011 – M. A. Dabbah, J. Graham, I. N. Petropoulos, M. Tavakoli, and R. A. Malik, “Automatic Analysis of Diabetic Peripheral Neuropathy using Multi-scale Quantitative Morphology of Nerve Fibres in Corneal Confocal Microscopy Imaging,” in *Medical Image Analysis*, 2011.

Dyck et al, 1993 – P. J. Dyck, K. M. Kratz, J. L. Karnes, et al, “The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort” in *Neurology*, vol. 43, pp. 817–824, 1993.

Erie et al, 2005 – J. C. Erie, J. McLaren, D. O. Hodge, “The effect of age on the corneal subbasal nerve plexus” in *Cornea*, vol. 24, pp. 705–709, 2005

Garcia-Hirschfeld et al, 1994 – J. Garcia-Hirschfeld, L. G. Lopez-Briones, C. Belmonte, “Neurotrophic influences on corneal epithelial cells” in *Experimental Eye Research*, vol. 59, pp. 597–605, 1994.

Ghasemi, 2008 – N. Ghasemi, “Central and Peripheral Cornea and Corneal Epithelium Characterized Using Optical Coherence Tomography and Confocal Microscopy,” University of Waterloo, 2008.

Gooch & Podwell, 2004 – Clifton Gooch and David Podwell, “The Diabetic Neuropathies” in *The Neurologist*, vol. 10, pp. 311-322, 2004.

Grupcheva et al, 2002 – C. N. Grupcheva, T. Wong, A. F. Riley and C. McGhee, “Assessing the sub-basal nerve plexus of the living healthy human cornea by in vivo confocal microscopy”, in *Lens and Cornea for Clinical and Experimental Ophthalmology*, no. 30, pp. 187-190, 2002.

Hu et al, 2008 – Y. Hu, Y. Matsumoto, E. Adan, M. Dogru, K. Fukagawa, H. Fujishima, “Corneal In Vivo Confocal Scanning Laser Microscopy in Patients with Atopic Keratoconjunctivitis” in *American Academy of Ophthalmology*, pp. 2004-2012, 2008.

Kallinikos et al, 2004 – Panagiotis Kallinikos, Michael Berhanu, Clare O’Donnell, Andrew J. M. Boulton, Nathan Efron, and Rayaz A. Malik, “Corneal Nerve Tortuosity in Diabetic Patients with Neuropathy” in *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 45, no. 2, pp. 418-422, Feb. 2004.

Kihara et al, 2001 – M. Kihara, Y. Mitsui, S. Mitsuaki, et al, “Effect of zenarestat, an aldose reductase inhibitor, on endoneurial blood flow in experimental diabetic neuropathy of ra” in *Neuroscience Letters*, vol. 310, pp. 81–84, 2001.

Kovesi, 1997 – P. Kovesi, “Symmetry and Assymetry from local phase” in *10th Australian Joint Conference on Artificial Intelligence*, 1997.

Krendel, 2002 –D. A. Krendel, “Diabetic neuropathies” In: W. F. Brown, C. F. Bolton, M. D. Aminoff, (Editions), “Neuromuscular Function and Disease: Basic Clinical and Electrodiagnostic Aspects” Philadelphia: W. B. Saunders Company, pp. 1061–1080, 2002.

LaVail et al, 1993 – J. H. LaVail, W. E. Johnson, L. C. Spencer, “Immunohistochemical identification of trigeminal ganglion neurons that innervate the mouse cornea: relevance to intercellular spread of herpes simplex virus.” in *The Journal Comparative Neurology*, vol. 327, 133–140, 1993.

Levitt et al, 1996 – N. S. Levitt, K. B. Stansberry, S. Wynchank, et al, “The natural progression of autonomic neuropathy and autonomic function tests in a cohort of people with IDDM” in *Diabetes Care*, vol. 19, pp. 751–754, 1996.

Malik et al, 1993 – R. A. Malik, S. Tesfaye, S. D. Thompson, et al, “Endoneurial localization of microvascular damage in human diabetic neuropathy” in *Diabetologia*, vol. 36, pp. 454–459, 1993.

Malik et al, 2003 – R. A. Malik, P. Kallinikos, C. A. Abbott, C. H. M. van Schie, P. Morgan, N. Efron, A. J. M. Boulton, “Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients” in *Diabetologia*, no 46, pp. 683-688, 2003.

Marfurt et al, 1998 – C. F. Marfurt, M. A. Jones, K. Thrasher, “Parasympathetic innervation of the rat cornea” in *Experimental Eye Research*, vol. 66, pp. 437–448, 1998.

Mendel & Sahenk, 2003 – J. Mendel, Z. Sahenk, “Painful sensory neuropathy” *New England Journal of Medicine*, vol. 348, pp. 1243–1255, 2003.

Müller et al, 2001 – L. J. Müller, E. Pels, G. F. Vrensen, “The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature” in *British Journal of Ophthalmology*, vol. 85, pp. 437–443, 2001.

Müller et al, 2003 – L. J. Müller, C. F. Marfurt, F. Kruse, Timo M. T. Tervo, “Corneal nerves: structure, contents and function” in *Experimental Eye Research*, no. 76, pp. 521-542, 2003.

Müller & Klooster, 2001 – L. J. Müller, J. Klooster, “Distribution of substance P (SP) and calcitonin gene related peptide (GGRP) in human corneal nerves” in *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 42, S28, 2001.

Nakamura et al, 1997 – M. Nakamura, K. Ofuji, T. Chikama, T. Nishida, “The NK1 receptor and its participation in the synergistic enhancement of corneal epithelial migration by substance P and insulin-like growth factor-1” in *British Journal of Pharmacology*, vol. 120, pp. 547–552, 1997.

Nishida et al, 1996 – T. Nishida, M. Nakamura, K. Ofuji, T. W. Reid, M. J. Mannis, C. J. Murphy, “Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea” in *Journal of Cell Physiology*, vol. 169, pp. 159–166, 1996.

Oates, 2002 – P. J. Oates, “Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy” in *International Review of Neurobiology*, vol. 50, pp. 325–366, 2002.

Oliveira-Soto & Efron, 2001 – L. Oliveira-Soto, N. Efron, “Morphology of corneal nerves using confocal microscopy” in *Cornea* vol. 20, pp. 374–384, 2001.

Patel, 2005 – D. Patel, “In vivo confocal microscopy of the cornea in health and disease,” Department of Ophthalmology, University of Auckland, 2005.

Patel & McGhee, 2005 – D. Patel, C. McGhee, “Mapping of the Normal Human Corneal Sub-Basal Nerve Plexus by In Vivo Laser Scanning Confocal Microscopy” in *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 46, no. 12, pp. 4485-4488, Dec. 2005.

Patel & McGhee, 2008 – D. Patel, and C. McGhee, “In Vivo Laser Scanning Confocal Microscopy Confirms that the Human Corneal Sub-basal Nerve Plexus Is a Highly Dynamic Structure,” in *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 49, no. 8, pp 3409-3412, Aug. 2008.

Patel & McGhee, 2009 – D. Patel, C. McGhee, “In vivo confocal microscopy of human corneal nerves in health, in ocular and systemic disease, and following corneal surgery: a review” in *British Journal of Ophthalmology*, no. 93, pp. 853-860, 2009.

Parwez et al, 2005 – Parwez Hossain, Arun Sachdev, Rayaz A. Malik, “Early detection of diabetic peripheral neuropathy with corneal confocal microscopy” in *The Lancet*, vol. 366, pp. 1340-1342, 2005.

Proia et al, 1986 – A. D. Proia, S. M. Chung, G. K. Klintworth, E. G. Lapetina, “Cholinergic stimulation of phosphatidic acid formation by rat cornea in vitro” in *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 27, pp. 905–908, 1986.

Radner & Malinger, 2002 – W. Radner, R. Mallinger, “Interlacing collagen lamellae in the midstroma of the human cornea” in *Cornea* vol. 21, pp. 598–601, 2002.

Rosenberg et al, 2000 – M. E. Rosenberg, T. M. Tervo, I.J. Immonen, L. J. Müller, C. Gronhagen-Riska, M.H. Vesaluoma, “Corneal structure and sensitivity in type 1 diabetes mellitus” in *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 41, pp. 2915–2921, 2000.

Ruggeri et al, 2006 – A. Ruggeri, F. Scarpa, and E. Grisan, “Analysis of corneal images for the recognition of nerve structures,” in *Proc. 28th Annual International Conference of IEEE-EMBS*, New York, pp. 4739-4742, IEEE, 2006.

Scarpa et al, 2008 – F. Scarpa, E. Grisan, and A. Ruggeri, “Automatic Recognition of Corneal Nerve Structures in Images from Confocal Microscopy,” in *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 49, no. 11, pp. 4801-4807, Nov. 2008.

Schimmelpfennig, 1982 – B. Schimmelpfennig, “Nerve Structures in Human Central Corneal Epithelium,” in *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, no. 218, pp 14-20, 1982.

Sumner et al, 2003 – C. J. Sumner, S. Sheth, J. W. Griffin, et al, “The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance” in *Neurology*, vol. 60, pp. 108–111, 2003.

Tesfaye et al, 1996 – S. Tesfaye, R. A. Malik, N. Harris, et al, “Arterio-venous shunting and proliferating new vessels in acute painful neuropathy of rapid glycaemic control” in *Diabetologia*, vol. 39, pp. 329–335, 1996.

Thornalley, 2002 – P. J. Thornalley, “Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options” in *International Review of Neurobiology*, vol. 50, pp. 37–50, 2002.

Tolias & Panas, 1998 – Y. A. Tolias and S. M. Panas, “A Fuzzy Vessel Tracking Algorithm for Retinal Images Based on Fuzzy Clustering,” in *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 17, no. 2, pp. 263-273, April 1998.

Too et al, 1989 – H. P. Too, K. Todd, S. L. Lightman, A. Horn, W. G. Unger, M. R. Hanley, “Presence and actions of vasopressin-like peptides in the rabbit anterior uvea” in *Regulatory Peptides*, vol. 25, pp. 259–266, 1989.

Töyry et al, 1996 – J. P. Töyry, L. K. Niskanen, E. A. Länsimies, et al, “Autonomic neuropathy predicts the development of stroke in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus” in *Stroke*, vol. 27, pp. 1316–1318, 1996.

Tuisku, 2008 – I. Tuisku, “Corneal Nerves in Refractive Surgery and Dry Eye,” Department of Ophthalmology, University of Helsinki, 2008.

Verroti et al, 2001 – A. Verrotti, T. Giuva, G. Morgese, et al, “New Trends in the etiopathogenesis of diabetic peripheral neuropathy” in *Journal of Child Neurology*, vol. 6, pp. 389–394, 2001.

Xu & Sima, 2001 – G. Xu, A. F. Sima, “Altered immediate early gene expression in injured diabetic nerve: implications in regeneration” in *Journal of Neuro pathology & Experimental Neurology*, vol. 60, pp. 972–983, 2001.

Yamamoto et al, 1991 – R. Yamamoto, A. McGlenn, R. A. Stone, “Brain natriuretic peptide-immunoreactive nerves in the porcine eye” in *Neuroscience Letters*, vol. 122, pp. 151–153, 1991.