



MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Técnicas Não-Invasivas por Ultrassons para Visualização e Caracterização do Cristalino

Elena Velte
Coimbra, 2013



MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Técnicas Não-Invasivas por Ultrassons para Visualização e Caracterização do Cristalino

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação do Professor Doutor Mário Santos, do Professor Doutor Jaime Santos e do Mestre Miguel Caixinha, do Departamento de Electrotécnica e Computadores da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Elena Velte
Coimbra, 2013

Esta cópia da dissertação é fornecida na condição de quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgment.

Agradecimentos

A presente dissertação contou com o apoio e colaboração de várias pessoas, sem as quais não teria sido possível a sua concretização, e às quais dirijo os meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor Doutor Jaime dos Santos e ao Professor Doutor Mário dos Santos, orientadores científicos deste trabalho, pela orientação, pelos ensinamentos, pelas críticas e sugestões.

Ao meu supervisor Miguel Caixinha, pela disponibilidade sempre revelada, pelo apoio e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu amigo e colega de laboratório, Danilo, pelas muitas discussões científicas que me permitiram avançar no trabalho, e dar um passo atrás quando necessário. Agradeço o apoio, a companhia e a disponibilidade sempre demonstradas.

Aos meus amigos que me acompanharam ao longo do curso, pelos bons momentos partilhados. Em especial ao Samuel e à Diana, colegas de tese, pelas discussões e momentos de desespero partilhados, quando o tempo esgotava e o *stress* acumulava.

Um especial obrigado ao meu namorado, por ter estado sempre ao meu lado, por me apoiar e dar força nos momentos mais difíceis, e por me fazer acreditar que chegaria ao final desta grande etapa.

Aos meus pais e às minhas irmãs, pelo apoio incondicional, presença constante e pela confiança que sempre depositaram em mim.

A todos um especial obrigado.

Resumo

A catarata é definida como uma opacificação do cristalino que provoca variações nas suas propriedades ópticas ao longo de regiões com dimensão superior ao comprimento de onda da luz transmitida. Apesar de poder ter várias causas, o envelhecimento é o principal factor causador destas opacidades. Em geral, quase todos os idosos desenvolvem opacidades no cristalino, sendo esta a causa de 47% dos casos de cegueira, correspondentes a mais de 21 milhões de pessoas afectadas no mundo.

A imagiologia por ultrassons é um método de diagnóstico amplamente usado, que apresenta largas vantagens relativamente a outras técnicas, essencialmente devido ao facto de ser um método não-invasivo, de baixo custo e de produzir resultados em tempo real. O objectivo deste trabalho é a aplicação de técnicas não-invasivas por ultrassons ao estudo *in vitro* de cristalinos saudáveis e com diferentes graus de catarata induzida, com vista ao desenvolvimento de novos métodos de visualização e de caracterização deste tipo de tecido.

Foram adquiridos sinais de 120 cristalinos de suínos, 75 dos quais admissíveis ao presente trabalho. Os sinais adquiridos destes cristalinos permitiram a formação do grupo controlo. Posteriormente, os cristalinos foram imersos numa solução indutora de catarata durante 60, 120 e 180 minutos, dando origem a 3 graus de opacidade crescentes. Foi obtido um conjunto final de 200 sinais de cristalinos com catarata, ditribuídos pelos três grupos, de forma equilibrada. Para a visualização dos sinais, foram construídas imagens modo B. Devido às limitações deste método de visualização, associadas à sensibilidade da intensidade dos sinais adquiridos às configurações experimentais usadas para a aquisição, foi construída a imagem paramétrica de Nakagami, com base na distribuição estatística de mesmo nome, insensível a variações no método de aquisição usado. Com vista à classificação dos diferentes estados do tecido, procedeu-se à extracção de características de sinais A-scan e das imagens modo B e de Nakagami construídas. A extracção de características foi feita usando quatro abordagens diferentes: análise textural, análise espectral, análise estatística e análise dos parâmetros acústicos. As características extraídas foram sujeitas a diferentes métodos de selecção: testes não paramétricos, determinação de subconjuntos reforçada por classificação e análise de componentes principais, com o objectivo de identificar aquelas mais relevantes na tarefa da discriminação entre os diferentes estádios de evolução da catarata. As características seleccionadas foram usadas como entrada para classificadores binários *Support Vector Machines*, *Naive Bayes*, *K-Nearest Neighbors* e Discriminante Linear de Fisher. Foram também desenvolvidos classificadores multiclasse, baseados em *Support Vector Machines*.

Os métodos de visualização desenvolvidos permitiram diferenciar entre o cristalino saudável e o seu estado patológico e, ainda, identificar visualmente a formação e evolução dos diferentes estádios da catarata induzida. A classificação automática dos sinais através dos diferentes classificadores permitiu distinguir com elevada precisão (98,5%) entre cristalinos saudáveis e cristalinos com catarata. Foi também possível a classificação entre estados iniciais de catarata e estados mais avançados, com valores de precisão de 94%. Relativamente à classificação multiclasse, foi possível distinguir entre controlos, estados iniciais e estados mais avançados de catarata com um valor de *F-Measure* de 89%.

Abstract

Cataract is a visible opacity in the crystalline lens, which, when located on the visual axis, leads to visual loss. Despite being a multifactorial disease associated with genetic predisposition, smoking, diabetes mellitus, drug intake and environmental exposure to UVB radiation, aging remains the main cause of cataract development. Cataract is the leading cause of visual impairment worldwide, being responsible for 47% of all blindness in the world and affecting over 21 million people.

Ultrasound medical imaging is a widely used diagnostic tool, mostly due to its non-invasiveness, low cost and real time imaging. The general purpose of this work is the application of non-invasive ultrasound techniques to the *in vitro* analysis of healthy lenses and different stages of induced cataract, in order to develop new methods for visualization and characterization of lens tissue.

A total of 120 porcine lens samples were divided into four groups, comprising a control group and three immersion times of 60, 120 and 180 minutes. The control group was composed of 75 samples and each immersion time group of roughly 65 samples, leading to an experimental group of 200 signals. For lens visualization, the B mode image was reconstructed. However, this visualization method has the drawback of being easily influenced by system and operator related factors. In order to overcome this limitation, a parametric Nakagami image was constructed to complement the information given by the conventional B mode image. The Nakagami image has an outstanding ability to detect the local scatterer concentrations in a tissue, and yields consistent image results for different dynamic ranges and system gains when compared to B-mode images. In order to classify the obtained data, several features were extracted from each sample using four different approaches: textural analysis, spectral analysis, statistical analysis and analysis of acoustic parameters. Three different feature selection methods were used for the identification of the most discriminative features, which were later used in binary and multiclass classifiers. Support vector machines, k-nearest neighbors and Fishers discriminant analysis classifiers were tested for the different groups of selected features.

The applied visualization tools allowed to clearly differentiating between healthy and cataractous lenses. It was also possible to identify different developing stages of the induced cataracts. The automatic classification of the acquired data allowed discriminating between healthy and cataractous lenses with 98,5% precision. The differentiation between early and more advanced stages of cataract was also possible, with 94% precision. Multiclass classification allowed distinguishing between control group, initial stages and advanced stages of cataract, with an F-measure value of 89%.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice	vii
Índice de figuras.....	xi
Índice de tabelas	xv
Acrónimos	xvii
Introdução.....	1
1.1 MOTIVAÇÃO.....	1
1.2 OBJECTIVOS	2
1.3 ESTRUTURA DA TESE	3
1.4 CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS.....	3
Fundamentação teórica	5
2.1 ANATOMIA DO OLHO	5
2.2 O CRISTALINO	6
2.2.1 Anatomia macroscópica	6
2.2.2 Anatomia e fisiologia celular	7
2.2.3 Fisiologia patológica	8
2.3 A CATARATA.....	9
2.3.1 Catarata nuclear	10
2.3.2 Catarata cortical	11
2.3.3 Catarata subcapsular posterior	11
2.4 DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA DA CATARATA	12
2.4.1 Diagnóstico da catarata	12
2.4.2 Remoção da catarata	14
2.5 ULTRASSONS: CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
Estado da arte	15
3.1 VISUALIZAÇÃO DO CRISTALINO	15
3.2 PROCESSOS AUTOMÁTICOS DE CLASSIFICAÇÃO DA CATARATA.....	18
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA CATARATA POR ULTRASSONS	19
3.3.1 Parâmetros acústicos do cristalino	20
3.3.2 Modelo de Nakagami	21
3.4 RECONHECIMENTO DE PADRÕES EM APLICAÇÕES MÉDICAS.....	23
3.4.1 Técnicas de aprendizagem aplicadas a dados obtidos por ultrassons.....	23
Materiais e métodos.....	25
4.1 AQUISIÇÃO DE DADOS	25
4.1.1 Obtenção e preparação das amostras	25

4.1.2 Método de indução da catarata	26
4.1.3 Análise por ultrassons.....	27
4.1.3.1 Configuração experimental	27
4.1.3.2 Aquisição dos sinais	27
4.1.4 Microscopia óptica.....	28
4.2 PRÉ-PROCESSAMENTO.....	29
4.2.1 Reconstrução da imagem modo B	29
4.2.2 Processamento do ruído	31
4.2.2.1 Filtro de limiar adaptativo	32
4.2.2.2 Filtro de correlação assistido por ruído	35
4.2.2.3 Filtro baseado em wavelets	36
4.2.3 Normalização dos sinais	39
4.3 VISUALIZAÇÃO DO CRISTALINO	39
4.3.1 Distribuição de Nakagami na visualização do cristalino.....	39
4.3.1.1 Imagem paramétrica de Nakagami.....	41
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO CRISTALINO	42
4.4.1 Definição de regiões de interesse	42
4.4.2 Extração de características	45
4.4.2.1 Análise textural	45
4.4.2.2 Análise espectral dos sinais	50
4.4.2.3 Análise estatística dos sinais de backscattering	53
4.4.2.4 Análise de parâmetros acústicos	54
4.4.3 Análise de outliers.....	56
4.4.4 Construção do sistema de classificação.....	58
4.4.4.1 Seleção de características	58
4.4.4.2 Normalização dos dados.....	59
4.4.4.3 Construção do classificador	60
4.4.4.4 Avaliação da performance da classificação	62

Apresentação e discussão dos resultados..... 65

5.1 SINAIS ADQUIRIDOS	65
5.2 MÉTODOS DE INDUÇÃO DA CATARATA	66
5.3 PRÉ-PROCESSAMENTO DOS DADOS	68
5.4 VISUALIZAÇÃO DO CRISTALINO	72
5.4.1 Visualização por ultrassons.....	72
5.4.1.1 O cristalino saudável.....	73
5.4.1.2 Padrão de evolução da catarata	73
5.4.1.3 Catarata madura.....	76
5.4.1.4 Catarata Sutural.....	77
5.4.1.5 Lado anterior vs. lado posterior do cristalino	79
5.4.2 Microscopia óptica.....	80
5.5 CLASSIFICAÇÃO	81
5.5.1 Características extraídas.....	81
5.5.2 Descrição geral do estudo.....	84
5.5.3 Classificação binária	85
5.5.3.1 Seleção de características	85
5.5.3.2 Classificador binário I (controlo vs. catarata)	93
5.5.3.3 Classificador binário II (catarata inicial vs. catarata avançada).....	96
5.5.3.4 Desempenho do sistema binário	98
5.5.4 Classificação multiclasse.....	99
5.5.4.1 Seleção de características	100
5.5.4.2 Classificador multiclasse I (controlo, estado inicial e estado intermédio)	101

5.5.4.3 Classificador multiclasse II (controle, estado inicial, estado intermédio e estado avançado)	101
5.5.4.4 Desempenho do sistema multiclasse	102
Conclusões.....	105
TRABALHO FUTURO	107
Referências.....	109
ANEXO A - USING OF THE ULTRASOUND FREQUENCY DEPENDENT ATTENUATION AND NAKAGAMI DISTRIBUTION FOR CATARACT EVALUATION	
ANEXO B - CHARACTERIZATION OF SCATTERERS CONCENTRATION IN CATARACTOUS LENS USING NAKAGAMI DISTRIBUTION BY ULTRASOUNDS	
ANEXO C – PROTOCOLO DE AQUISIÇÃO	
ANEXO D1 - FLUXOGRAMA REFERENTE AO PROCESSO DE FILTRAGEM POR MEIO DO FILTRO DE LIMIAR ADAPTATIVO	
ANEXO D2 - FLUXOGRAMA REFERENTE À FILTRAGEM PELO FILTRO DE CORRELAÇÃO ASSISTIDO POR RUÍDO	
ANEXO D3 - FLUXOGRAMA REFERENTE À FILTRAGEM DO RUÍDO PELO FILTRO BASEADO EM <i>WAVELETS</i>	

Índice de figuras

FIGURA 1. ESQUEMA SIMPLIFICADO DA ANATOMIA DO OLHO HUMANO.....	6
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DE UM CRISTALINO HUMANO ADULTO.....	6
FIGURA 3. ANATOMIA DO CRISTALINO.	7
FIGURA 4. EFEITO DA CATARATA SOBRE A VISÃO NORMAL.....	9
FIGURA 5. LOCALIZAÇÃO DOS TRÊS TIPOS DE CATARATA SENIL NO CRISTALINO.....	10
FIGURA 6. IMAGEM ILUSTRATIVA DA CATARATA NUCLEAR.....	10
FIGURA 7. IMAGEM ILUSTRATIVA DA CATARATA CORTICAL.	11
FIGURA 8. IMAGEM ILUSTRATIVA DE CATARATA SUBCAPSULAR POSTERIOR.	12
FIGURA 9. IMAGENS PADRONIZADAS UTILIZADAS NA CLASSIFICAÇÃO PELO SISTEMA LOCS III.	13
FIGURA 10. ESQUEMAS PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS DIFERENTES PARÂMETROS DE GRADAÇÃO DA CATARATA.	13
FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOIS TIPOS DE REFLEXÃO.....	14
FIGURA 12. FOTOGRAFIAS POR LÂMPADA DE FENDA DO CRISTALINO SAUDÁVEL E COM DIFERENTES GRAUS DE OPACIDADE NUCLEAR.....	16
FIGURA 13. FOTOGRAFIAS DE CRISTALINOS COM DIFERENTES GRAUS DE CATARATA, OBTIDAS POR RETROILUMINAÇÃO.....	16
FIGURA 14. IMAGENS DE CRISTALINOS OBTIDAS POR TÉCNICAS NÃO-INVASIVAS.	17
FIGURA 15. IMAGENS DE CRISTALINOS OBTIDAS POR DIFERENTES TÉCNICAS.....	17
FIGURA 16. COMPORTAMENTO DE UM SINAL ACÚSTICO AO LONGO DO OLHO.....	20
FIGURA 17. VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE NAKAGAMI COM O TEMPO DE IMERSÃO.	22
FIGURA 18. PROCESSO DE ENUCLEAÇÃO DO CRISTALINO.	26
FIGURA 19. REPRESENTAÇÃO SIMPLIFICADA DA CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL UTILIZADA PARA A AQUISIÇÃO DOS SINAIS... 27	27
FIGURA 20. EFEITO DO VARIAÇÃO DO ÂNGULO DE INCIDÊNCIA SOBRE A INFORMAÇÃO RECOLHIDA NO TRANSDUTOR.	28
FIGURA 21. TIPOS DE REPRESENTAÇÃO DOS SINAIS DE ULTRASSONS.....	29
FIGURA 22. VELOCIDADE DE PROPAGAÇÃO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.	30
FIGURA 23. REPRESENTAÇÃO DE UM B-SCAN DE UM CRISTALINO COM CATARATA.	31
FIGURA 24. A-SCAN DA REGIÃO IDENTIFICADA NA FIGURA 23.....	31
FIGURA 25. SINAL DE UM CRISTALINO COM CATARATA.....	34
FIGURA 26. ESQUEMA ILUSTRATIVO DA APLICAÇÃO DO FILTRO DE LIMIAR ADAPTATIVO.	34
FIGURA 27. ESQUEMA DA APLICAÇÃO DO FILTRO DE CORRELAÇÃO ASSISTIDO POR RUÍDO.....	36
FIGURA 28. DECOMPOSIÇÃO POR <i>WAVELETS</i> DE UM SINAL, COM OBTENÇÃO DAS RESPECTIVAS.....	37
FIGURA 29. COMPARAÇÃO ENTRE A <i>WAVELET</i> MÃE <i>DB9</i>	38
FIGURA 30. SINAL CORRESPONDENTE À ZONA CENTRAL DE UM CRISTALINO COM CATARATA.	38
FIGURA 31. DISTRIBUIÇÃO DE NAKAGAMI PARA DIFERENTES VALORES DO PARÂMETRO <i>m</i>	40
FIGURA 32. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OBTENÇÃO DO VALOR DO PARÂMETRO <i>m</i> DE NAKAGAMI.....	41
FIGURA 33. REALCE DE DIFERENTES REGIÕES DA IMAGEM MODO B ADQUIRIDA.	43
FIGURA 34. IMAGEM TÍPICA DE UM CRISTALINO COM CATARATA, CORRESPONDENTE À REGIÃO 1.....	43
FIGURA 35. REPRESENTAÇÃO DAS REGIÕES DE INTERESSE 2 A 5.....	45
FIGURA 36. REPRESENTAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL E DOS PARÂMETROS USADOS PARA O CÁLCULO DA VELOCIDADE.	54
FIGURA 37. SINAL TÍPICO ADQUIRIDO DA REGIÃO CENTRAL DE UM CRISTALINO.	55
FIGURA 38. REPRESENTAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL E DOS PARÂMETROS NECESSÁRIOS AO CÁLCULO DO VALOR DA ATENUAÇÃO.....	55
FIGURA 39. NÚMERO DE <i>OUTLIERS</i> IDENTIFICADO EM FUNÇÃO DO PARÂMETRO <i>N</i>	57
FIGURA 40. GRÁFICO QUE REPRESENTA A VARIÂNCIA ENTRE OS DADOS DE CADA CLASSE, EM FUNÇÃO DO PARÂMETRO DE DECISÃO <i>N</i>	57

FIGURA 41. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA COMBINAÇÃO DE DOIS CLASSIFICADORES BINÁRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS EM TRÊS GRUPOS.	61
FIGURA 42. REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DE UMA CURVA ROC.	63
FIGURA 43. IMAGENS MODO B COMPARATIVAS ENTRE OS DOIS MÉTODOS DE INDUÇÃO USADOS.	67
FIGURA 44. IMAGENS PARAMÉTRICAS DE NAKAGAMI PARA COMPARAÇÃO DOS DOIS MÉTODOS DE INDUÇÃO USADOS, PARA OS 3 TEMPOS DE IMERSÃO.	67
FIGURA 45. REPRESENTAÇÃO DA IMAGEM DE NAKAGAMI.	69
FIGURA 46. APLICAÇÃO DOS DIFERENTES FILTROS A UM SINAL.	69
FIGURA 47. SINAIS APÓS APLICAÇÃO DE UM VALOR DE CORTE AOS SINAIS FILTRADOS.	70
FIGURA 48. PARÂMETRO DE NAKAGAMI OBTIDO PARA OS SINAIS FIGURA 47.	70
FIGURA 49. IMAGENS DE NAKAGAMI PARA OS DIFERENTES PASSOS DO PROCESSAMENTO.	72
FIGURA 50. IMAGENS REPRESENTATIVAS DO GRUPO DE CONTROLO.	73
FIGURA 51. IMAGENS MODO B DO PADRÃO DE EVOLUÇÃO DA CATARATA OBSERVADO.	73
FIGURA 52. IMAGENS DE NAKAGAMI OBTIDAS PARA OS DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO.	74
FIGURA 53. COMPARAÇÃO ENTRE A IMAGEM MODO B E A IMAGEM PARAMÉTRICA DE NAKAGAMI DO PARÂMETRO Ω	74
FIGURA 54. DIFERENTES REPRESENTAÇÕES DO MESMO CRISTALINO NO MESMO ESTADO DE CATARATA.	75
FIGURA 55. DIAGRAMA DA ANATOMIA MACROSCÓPICA DO CRISTALINO. É REPRESENTADO O NÚCLEO FETAL (<i>NF</i>), O NÚCLEO ADULTO (<i>NA</i>) E O CÓRTEX (<i>C</i>).	75
FIGURA 56. IMAGEM DE NAKAGAMI ILUSTRATIVA DA COMPACTAÇÃO DAS FIBRAS.	76
FIGURA 57. REPRESENTAÇÃO DE UM CRISTALINO COM CATARATA MADURA, OBTIDO POR AUMENTO DO TEMPO DE IMERSÃO NA SOLUÇÃO INDUTORA.	77
FIGURA 58. REPRESENTAÇÃO DA CATARATA SUTURAL.	77
FIGURA 59. IMAGENS B-SCAN DO PADRÃO DE EVOLUÇÃO OBTIDO PARA CRISTALINOS COM CATARATA SUTURAL, PARA OS QUATRO TEMPOS DE IMERSÃO.	78
FIGURA 60. IMAGENS DE NAKAGAMI DO PADRÃO DE EVOLUÇÃO OBTIDO PARA CRISTALINOS COM CATARATA SUTURAL, CORRESPONDENTES ÀS IMAGENS MODO B REPRESENTADAS NA FIGURA 59.	78
FIGURA 61. SEQUÊNCIA DE IMAGENS MODO B E DE NAKAGAMI CORRESPONDENTES AO LADO POSTERIOR DO CRISTALINO, PARA OS QUATRO TEMPOS DE IMERSÃO.	79
FIGURA 62. IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA DE CRISTALINOS DA REGIÃO CORTICAL PARA AS DIFERENTES CLASSES DE ESTUDO.	80
FIGURA 63. IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA DE CRISTALINOS DA REGIÃO NUCLEAR PARA AS DIFERENTES CLASSES DE ESTUDO.	80
FIGURA 64. IMAGEM OBTIDA DE UM CRISTALINO COM CATARATA CORRESPONDENTE A 60 MINUTOS DE IMERSÃO.	80
FIGURA 65. CARACTERÍSTICAS EXTRAÍDAS POR ANÁLISE TEXTURAL.	82
FIGURA 66. <i>BOXPLOTS</i> ILUSTRATIVOS DA VARIAÇÃO DO VALOR DE CARACTERÍSTICAS DE ACORDO COM A CLASSE DE ESTUDO.	83
FIGURA 67. CARACTERÍSTICAS EXTRAÍDAS POR ANÁLISE ESTATÍSTICA.	83
FIGURA 68. <i>BOXPLOTS</i> DE CARACTERÍSTICAS EXTRAÍDAS POR ANÁLISE DE PARÂMETROS ACÚSTICOS, PARA AS QUATRO CLASSES DE ESTUDO.	84
FIGURA 69. GRÁFICO DOS <i>P-VALUES</i> DO TESTE <i>WILCOXON RANK-SUM</i> CALCULADOS PARA AS DIFERENTES CARACTERÍSTICAS, PARA AMBOS OS CASOS DE CLASSIFICAÇÃO.	86
FIGURA 70. VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>F-MEASURE</i> COM O NÚMERO DE CARACTERÍSTICAS SELECIONADAS.	86
FIGURA 71. VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>F-MEASURE</i> COM O NÚMERO DE CARACTERÍSTICAS SELECIONADAS.	87
FIGURA 72. VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>F-MEASURE</i> COM O NÚMERO DE DIMENSÕES DE PROJEÇÃO UTILIZADAS PARA A PCA.	87
FIGURA 73. GRÁFICO QUE REPRESENTA OS <i>P-VALUES</i> DO <i>WILCOXON RANK-SUM TEST</i> CALCULADOS PARA AS DIFERENTES CARACTERÍSTICAS.	88
FIGURA 74. VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>F-MEASURE</i> COM O NÚMERO DE CARACTERÍSTICAS SELECIONADAS.	88
FIGURA 75. VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>F-MEASURE</i> COM O NÚMERO DE DIMENSÕES DE PROJEÇÃO UTILIZADAS PARA A ANÁLISE PCA.	89

FIGURA 76. GRÁFICO QUE REPRESENTA OS <i>P-VALUES</i> DO <i>WILCOXON RANK-SUM TEST</i> CALCULADOS PARA AS DIFERENTES CARACTERÍSTICAS.	89
FIGURA 77. VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>F-MEASURE</i> COM O NÚMERO DE CARACTERÍSTICAS SELECIONADAS.	90
FIGURA 78. VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>F-MEASURE</i> COM O NÚMERO DE DIMENSÕES DE PROJEÇÃO UTILIZADAS PARA A PCA.	90
FIGURA 79. GRÁFICO QUE REPRESENTA OS <i>P-VALUES</i> DO <i>WILCOXON RANK-SUM TEST</i> CALCULADOS PARA AS DIFERENTES CARACTERÍSTICAS.	91
FIGURA 80. VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>F-MEASURE</i> COM O NÚMERO DE CARACTERÍSTICAS SELECIONADAS.	91
FIGURA 81. VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>F-MEASURE</i> COM O NÚMERO DE DIMENSÕES DE PROJEÇÃO UTILIZADAS PARA A PCA.	91
FIGURA 82. GRÁFICO QUE REPRESENTA OS <i>P-VALUES</i> DO <i>WILCOXON RANK-SUM TEST</i> CALCULADOS PARA AS DIFERENTES CARACTERÍSTICAS.	92
FIGURA 83. VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>F-MEASURE</i> COM O NÚMERO DE CARACTERÍSTICAS SELECIONADAS.	92
FIGURA 84. VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>F-MEASURE</i> COM O NÚMERO DE CARACTERÍSTICAS SELECIONADAS.	93
FIGURA 85. VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>F-MEASURE</i> COM O NÚMERO DE DIMENSÕES DE PROJEÇÃO UTILIZADAS PARA A PCA.	93
FIGURA 86. VARIAÇÃO DO DESEMPENHO DO CLASSIFICADOR EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE CARACTERÍSTICAS, PARA OS DOIS CLASSIFICADORES MULTICLASSE.	100
FIGURA 87. VARIAÇÃO DO DESEMPENHO DO CLASSIFICADOR EM FUNÇÃO DO Nº DE DIMENSÕES DE PROJEÇÃO PARA OS DOIS CLASSIFICADORES MULTICLASSE.	100

Índice de tabelas

TABELA 1. MÉTRICAS EXTRAÍDAS DA MATRIZ DE COMPRIMENTO DE SEQUÊNCIAS DE NÍVEIS DE CINZENTO.	49
TABELA 2. REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DA MATRIZ DE CONFUSÃO PARA O CASO BINÁRIO..	62
TABELA 3. ESCALA PARA A AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE UM CLASSIFICADOR ATRAVÉS DO PARÂMETRO AUC.	63
TABELA 4. REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DA MATRIZ DE CONFUSÃO PARA O CASO MULTICLASSE.....	64
TABELA 5. OBTENÇÃO DOS VALORES DE VP, VN, FN E FP A PARTIR DA MATRIZ DE CONFUSÃO DA TABELA 4.	64
TABELA 6. DESCRIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS RESTANTES APÓS AS DIFERENTES ETAPAS DO ESTUDO.	66
TABELA 7. VALORES DO ICC OBTIDOS DA COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS DE INDUÇÃO DE CATARATA PARA OS TRÊS TEMPOS DE IMERSÃO.	68
TABELA 8. CARACTERÍSTICAS EXTRAÍDAS DA ANÁLISE TEXTURAL.	81
TABELA 9. CARACTERÍSTICAS EXTRAÍDAS DA ANÁLISE ESPECTRAL.	81
TABELA 10. CARACTERÍSTICAS EXTRAÍDAS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	82
TABELA 11. CARACTERÍSTICAS EXTRAÍDAS DOS PARÂMETROS ACÚSTICOS.	82
TABELA 12. RESULTADOS OBTIDOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DO CLASSIFICADOR BINÁRIO DE BAYES.	94
TABELA 13. RESULTADOS OBTIDOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DO CLASSIFICADOR BINÁRIO KNN.	94
TABELA 14. RESULTADOS OBTIDOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DO CLASSIFICADOR BINÁRIO FLD.	95
TABELA 15. RESULTADOS OBTIDOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DO CLASSIFICADOR BINÁRIO SVM.	95
TABELA 16. RESULTADOS OBTIDOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DO CLASSIFICADOR BINÁRIO DE BAYES..	96
TABELA 17. RESULTADOS OBTIDOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DO CLASSIFICADOR BINÁRIO KNN.	97
TABELA 18. RESULTADOS OBTIDOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DO CLASSIFICADOR BINÁRIO FLD.	97
TABELA 19. RESULTADOS OBTIDOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DO CLASSIFICADOR BINÁRIO SVM.	98
TABELA 20. MÉTRICAS DE DESEMPENHO RELATIVAS AOS DOIS MÉTODOS DE CLASSIFICAÇÃO SELECIONADOS PARA AS DUAS TAREFAS DE CLASSIFICAÇÃO.....	99
TABELA 21. MATRIZ DE CONFUSÃO RELATIVA AOS RESULTADOS OBTIDOS PELA CLASSIFICAÇÃO COM O GRUPO DE CARACTERÍSTICAS SELECIONADAS ATRAVÉS DA ANÁLISE PCA (A) E RESPECTIVAS MÉTRICAS DE DESEMPENHO CALCULADAS (B).	101
TABELA 22. MATRIZ DE CONFUSÃO RELATIVA AOS RESULTADOS OBTIDOS PELA CLASSIFICAÇÃO COM O GRUPO DE CARACTERÍSTICAS SELECIONADAS ATRAVÉS DA PESQUISA ALEATÓRIA DE SUBGRUPOS (A) E RESPECTIVAS MÉTRICAS DE DESEMPENHO CALCULADAS (B).	101
TABELA 23. MATRIZ DE CONFUSÃO (A) E MÉTRICAS DE DESEMPENHO (B) OBTIDOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DO GRUPO 1 (PCA).	102
TABELA 24. MATRIZ DE CONFUSÃO E MÉTRICAS DE DESEMPENHO OBTIDOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DO GRUPO 2.....	102
TABELA 25. DESEMPENHO OS CLASSIFICADORES MULTICLASSE, PARA OS DOIS GRUPOS DE CARACTERÍSTICAS SELECIONADAS. O PRIMEIRO GRUPO CORRESPONDE À SELECÇÃO POR PCA E O SEGUNDO POR PESQUISA DE SUBCONJUNTOS REFORÇADA POR CLASSIFICAÇÃO.	102

Acrónimos

AUC	Área sob a curva (<i>Area Under Curve</i>)
CSP	Catarata subcapsular posterior
dB	Decibéis
DEM	Decomposição Empírica de Modos
ERO	Espécies Reactivas de Oxigênio
FN	Falso Negativo
FP	Falso Positivo
FCM	Frequência Central Média
FM	Frequência Média
FMI	Função de Modo Intrínseco
GLCM	Matriz de Co-ocorrência de Níveis de Cinzento (<i>Gray Level Co-occurrence Matrix</i>)
GLRLM	Matriz de Comprimento de Sequências de Níveis de Cinzento (<i>Gray Level Run Length Matrix</i>)
GSH	Glutationa na forma reduzida
HHT	Transformada de Hilbert Huang (<i>Hilbert Huang Transform</i>)
IBS	<i>Integrated Backscattering</i>
KNN	K-Vizinhos mais próximos (<i>K-Nearest Neighbors</i>)
LB	Largura de Banda
LOCS	<i>Lens Opacities Classification System</i>
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
NAC	<i>Noise Assisted Correlation</i>
NO	Opacidade Nuclear (<i>Nuclear Opacity</i>)
OCCCGS	<i>Oxford Clinical Cataract Classification and Grading System</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCA	Análise de Componentes Principais (<i>Principal Component Analysis</i>)
PRF	Frequência de repetição de pulsos (<i>Pulse Repetition Frequency</i>)
PSD	Densidade Espectral de Potência (<i>Power Spectral Density</i>)
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROI	Região de Interesse (<i>Region of Interest</i>)
SNR	Razão Sinal-Ruído (<i>Signal to Noise Ratio</i>)
SVM	<i>Support Vector Machines</i>
TCO	Tomografia de Coerência Óptica
TFD	Transformada de Fourier Discreta
TWD	Transformada <i>Wavelet</i> Discreta
VN	Verdadeiro Negativo
VP	Verdadeiro Positivo

Introdução

1.1 Motivação

A catarata é uma patologia caracterizada pela opacificação total ou parcial do cristalino ou da sua cápsula. A catarata senil, isto é, provocada pelo envelhecimento, representa actualmente a maior causa de cegueira ou de baixa visão no mundo [1]. Em geral, quase todos os idosos desenvolvem opacidades no cristalino. Estima-se que 47% dos casos de cegueira (21,2 milhões) sejam devidos a catarata relacionada com a idade. No entanto, também os casos de catarata não relacionados com a idade tomam dimensões preocupantes: cerca de 1,4 milhões de crianças no mundo são cegas, devido à catarata. A cirurgia da catarata está, juntamente com a cirurgia refractiva, entre as intervenções de saúde de maior relação custo/eficácia, e representam as cirurgias mais realizadas no mundo na área da oftalmologia [2].

O desenvolvimento de um sistema objectivo e reprodutível para a classificação da catarata tem ocupado a comunidade científica internacional. A avaliação quantitativa da catarata é fundamental para o estudo da sua progressão com base em estudos longitudinais, epidemiológicos e ensaios clínicos. Para além disso, pode ter um papel importante na identificação dos mecanismos moleculares e celulares implicados no processo de cataratogénese, e nos factores de risco que lhe estão associados [3].

A indústria farmacêutica tem, nos últimos anos, identificado novos potenciais fármacos para redução do risco de desenvolvimento de catarata. A detecção subclínica e a identificação da maior ou menor susceptibilidade de desenvolvimento deste tipo de patologia, poderá contribuir para o desenvolvimento de fármacos mais direccionados, aumentando a sua eficácia e deste modo ajudar a prevenir, retardar ou mesmo reparar a perda de visão nas fases iniciais da catarata [4]. Para além da vantagem óbvia da avaliação do estado patológico, o conhecimento detalhado da morfologia, extensão e grau de severidade da catarata tem um papel central na preparação da cirurgia de remoção da catarata através da técnica cirúrgica de

facoemulsificação, na qual a determinação com rigor da dureza do cristalino é um factor decisivo para a sua decorrência sem complicações [5], [6]. O diagnóstico subclínico da catarata e identificação de fenótipos de progressão da doença pode ainda ser importante na gestão de recursos hospitalares na optimização do tratamento e redução das listas de espera associadas à cirurgia de facoemulsificação, ou para ajudar a controlar certos distúrbios sistémicos que foram associados a esta patologia ocular, como por exemplo Alzheimer, Parkinson ou diabetes, especialmente em doentes mais jovens [7].

A existência de técnicas de imagiologia sofisticadas é fundamental tanto no diagnóstico clínico da catarata como no estabelecimento de correlações entre o historial clínico geral do doente e o grau, tipo e etiologia da catarata que apresenta. Neste contexto, a tecnologia por ultrassons pode proporcionar um diagnóstico precoce ou subclínico, por meio da sua aplicação à visualização do cristalino e à caracterização objectiva da catarata. É nesta perspectiva que os ultrassons como método de imagem e diagnóstico não-invasivo poderão contribuir para uma caracterização objectiva da catarata, através da avaliação de parâmetros extraídos de sinais acústicos e, deste modo, proporcionar a identificação subclínica das alterações das propriedades ópticas de cristalinos com esta patologia.

1.2 Objectivos

O âmbito da presente dissertação é a análise de cristalinos saudáveis e com catarata induzida com recurso a técnicas por ultrassons. Pretende-se dar continuidade aos estudos realizados nesta área, em duas abordagens distintas: por um lado a visualização do cristalino e das suas alterações na sequência da evolução da catarata, de modo a complementar as técnicas de visualização existentes, e por outro lado a caracterização do tecido do cristalino, tanto saudável como patológico, que permita no futuro caracterizar objectivamente a catarata. As duas abordagens caminham no sentido da optimização do processo de diagnóstico e de terapêutica desta patologia.

Relativamente à visualização do cristalino, pretende-se melhorar as técnicas de obtenção de imagem deste tipo de tecido, possibilitando a visualização da sua estrutura interna, por meio de imagens obtidas por ultrassons complementadas com imagens paramétricas que reflectam as propriedades acústicas do tecido e que permitam inferir acerca da sua dureza.

Para uma caracterização do tecido do cristalino complementar aos métodos visuais, pretende-se a extracção de parâmetros dos sinais acústicos que permitam diferenciar o tecido saudável do patológico, com o objectivo final de classificar qualquer estágio de catarata, usando para isso técnicas de aprendizagem supervisionada. A determinação destes parâmetros poderá ser importante na condução de estudos futuros para a construção de um sistema de diagnóstico assistido completamente automatizado. Desta forma, espera-se contribuir para a evolução dos actuais métodos de detecção e classificação da catarata, através da obtenção de um método objectivo de diagnóstico subclínico para detecção da patologia mesmo antes de afectar a visão.

1.3 Estrutura da tese

Esta tese está organizada em 6 capítulos. No Capítulo 1, *Introdução*, é apresentada a dissertação elaborada no âmbito do projecto de Mestrado em Engenharia Biomédica, com abordagem à sua motivação, objectivos, estrutura e contribuições científicas a que deu origem.

No Capítulo 2, *Fundamentação teórica*, são apresentados os fundamentos teóricos, que procuram contextualizar e facilitar a compreensão do trabalho realizado.

No Capítulo 3, *Estado da arte*, é apresentado o estado da arte, com um breve enquadramento das actuais áreas de estudo no âmbito do projecto: técnicas de visualização do cristalino, processos automáticos de classificação da catarata, caracterização da catarata por ultrassons e reconhecimento de padrões em aplicações médicas.

No Capítulo 4, *Materiais e métodos*, são descritos os materiais e os métodos usados no trabalho desenvolvido. Este capítulo é dividido em 4 secções: *Aquisição dos dados*, que explica como foram obtidas e preparadas as amostras para análise, a metodologia usada para a indução e simulação de diferentes tipos e estádios de catarata e os procedimentos de aquisição de sinais das amostras por ultrassons e por microscopia óptica; *Pré-processamento*, no qual é explicado a reconstrução das imagens modo B, o tratamento do ruído dos sinais acústicos e a normalização dos dados; *Visualização do cristalino*, que aborda a visualização dos sinais acústicos por meio da imagem paramétrica de Nakagami; *Caracterização do cristalino*, onde é feita a definição e selecção das regiões de interesse para as diferentes abordagens de análise, a extracção de características, a análise de *outliers*, a construção do sistema de classificação e a avaliação da performance obtida pelos classificadores desenvolvidos.

No Capítulo 5, *Apresentação e discussão dos resultados*, são apresentados os resultados das diferentes etapas do trabalho, juntamente com a sua análise e discussão. Este capítulo é dividido em 5 partes: sinais adquiridos, métodos de indução da catarata, pré-processamento dos dados, visualização do cristalino e, por fim, os resultados obtidos pelos classificadores desenvolvidos.

As conclusões do trabalho são apresentadas no Capítulo 6, *Conclusões*. Neste capítulo são também feitas as considerações finais e sugestões para trabalhos futuros. Seguem-se as referências que fundamentam o trabalho realizado e, por fim, os *Anexos*.

1.4 Contribuições científicas

O presente trabalho resultou em dois artigos científicos. O primeiro foi apresentado no 3rd *Portuguese Meeting in Bioengineering (ENBENG), 2013*, e está disponível na IEEE Xplore. O segundo foi apresentado no *IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), 2013*, e estará brevemente disponível no IEEE Xplore. Uma cópia dos artigos encontra-se nos Anexos A e B.

Fundamentação teórica

2.1 Anatomia do olho

O olho é um dos órgãos mais complexos do corpo humano, sendo constituído por três camadas [8]. A região mais exterior, correspondente à primeira camada, é composta pela córnea e esclerótica. A córnea refracta e transmite a luz para o cristalino e protege o olho de infecções e danos estruturais. A esclerótica, que consiste num tecido conjuntivo, protege o olho de forças internas e externas e é responsável pela manutenção da sua forma. A sua parte visível está coberta por uma membrana mucosa transparente, a conjuntiva [8], [9].

A camada intermédia do olho é composta pela íris, corpo ciliar e coróide. A íris define o tamanho da abertura pupilar, e assim a quantidade de luz que chega à retina. O corpo ciliar está envolvido no mecanismo de acomodação, que permite a deformação e consequente alteração do poder dióptrico do cristalino. A coróide é responsável pelo fornecimento de oxigénio e nutrientes às camadas adjacentes por via da sua complexa rede vascular [8], [9].

A camada mais interna do olho, a retina, é uma estrutura complexa de células nervosas com várias subcamadas, com a função de captar e processar a luz [8], [9].

Estas camadas envolvem três estruturas transparentes do olho: o cristalino, o humor vítreo e o humor aquoso. O cristalino é um corpo transparente e elástico, que tem a função de focar os raios luminosos na retina, de modo a criar uma imagem nítida. O humor vítreo e humor aquoso são massas transparentes, incolores e gelatinosas. O humor vítreo é responsável pela nutrição da córnea e cristalino, enquanto que a função do humor aquoso é essencialmente a manutenção da forma do olho e a protecção do cristalino [10]. A Figura 1 ilustra a anatomia macroscópica do olho.

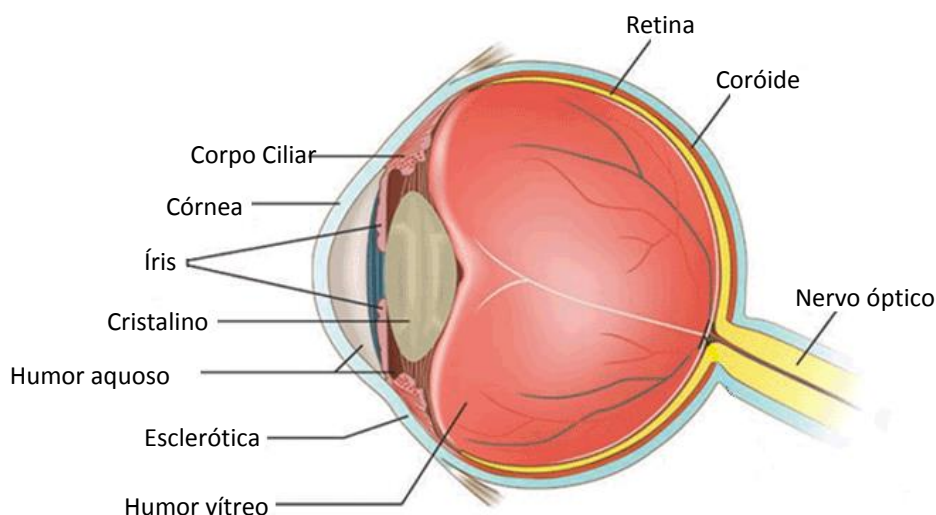


Figura 1. Esquema simplificado da anatomia do olho humano. Imagem adaptada de [11].

2.2 O cristalino

2.2.1 Anatomia macroscópica

O cristalino é uma estrutura transparente e biconvexa, que possui uma complexa arquitetura e uma estrutura proteica única [5]. Macroscopicamente é constituído por uma cápsula fibrosa, pelo córtex (zona periférica) e pelo núcleo (zona central). O núcleo divide-se em várias subcamadas, formadas em diferentes fases do desenvolvimento do cristalino. Por ordem de formação, essas camadas são o núcleo embrionário, o núcleo fetal, o núcleo juvenil e o núcleo adulto [10]. A sua disposição espacial é ilustrada na Figura 2.

O diâmetro e a espessura das diferentes regiões do cristalino são hoje bem conhecidos. Expressos sob a percentagem total do cristalino, o diâmetro e a espessura são respectivamente: 16% e 17% para o córtex, 24% e 21% para o núcleo adulto, 12% e 9% para o núcleo juvenil, 45% e 49% para o núcleo fetal, e 3% e 4% para o núcleo embrionário. O diâmetro médio do cristalino humano é de 9,6mm e a sua espessura média de 4,2mm [12].

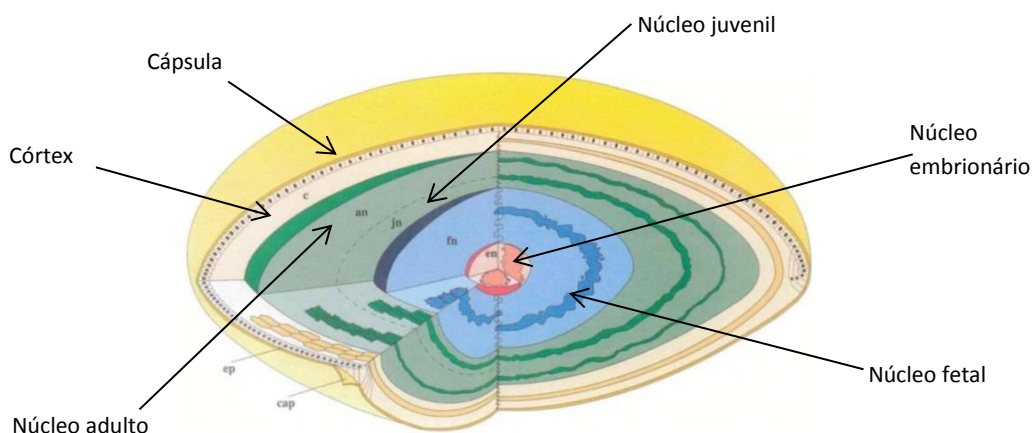


Figura 2. Representação de um cristalino humano adulto. Adaptado de [12].

2.2.2 Anatomia e fisiologia celular

A homogeneidade óptica do cristalino é resultado do seu complexo arranjo celular [13]. Na sua embriogénese, o cristalino deriva da ectoderme por invaginação da placa ectodérmica; forma-se uma vesícula cuja cavidade é preenchida por células alongadas, correspondentes às fibras primárias do cristalino [10].

No lado anterior do cristalino, o epitélio surge como uma camada única de células que contém uma zona germinativa em forma de anel. No cristalino adulto, esta camada representa uma população muito estática com pouca divisão ou morte celular. Apenas as células próximas da região equatorial são nucleadas e metabolicamente activas, sofrendo divisão antes de se alongarem para formarem fibras completamente diferenciadas que preenchem o cristalino. As novas fibras do cristalino formam-se em camadas em torno das células primárias, ficando as fibras mais jovens sempre na camada mais externa. À medida que o processo de diferenciação celular avança, o núcleo e os organelos celulares são degradados. Este processo de degradação permite que as fibras mais profundas, que constituem a maior parte do cristalino adulto, sejam desprovidas de organelos, levando assim à sua transparência [10], [13], [14]. O padrão de crescimento é guiado por linhas de sutura em forma de Y, que partem dos polos do cristalino e se estendem radialmente. Estas linhas correspondem às regiões em que as fibras de crescimento em regiões contrárias se encontram [15]. As diferentes regiões são ilustradas na Figura 3. A simetria e homogeneidade dos padrões de crescimento das fibras mantêm-se com o envelhecimento, sendo apenas interrompidas por mecanismos patológicos [16].

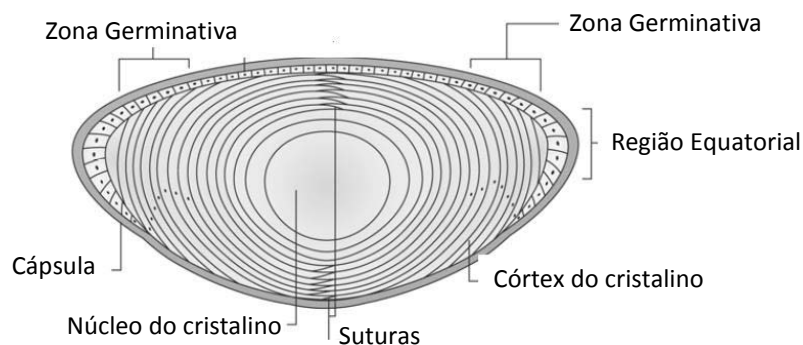


Figura 3. Anatomia do cristalino. Imagem adaptada de [10].

Apesar de as células epiteliais do cristalino serem metabolicamente activas, o cristalino não tem vasos sanguíneos: a chegada de nutrientes é garantida pela difusão a partir do humor aquoso, através das bombas de sódio/potássio, bombas de cálcio e canais iónicos presentes na membrana celular do epitélio do cristalino. As fibras estão ligadas entre si e ao epitélio anterior por meio de numerosas *gap junctions*¹, permitindo assim a troca livre de substâncias [10], [14].

As proteínas do cristalino constituem mais de 30% da sua massa. As proteínas cristalinas (proteínas estruturais) são as principais constituintes, representando 90% da quantidade total de proteínas presentes [14], [5]. Dentro das cristalinas, distinguem-se nos mamíferos as α , β e

¹ Canais intercelulares que permitem a transferência directa de iões e pequenas moléculas entre células.

as γ cristalinas, cuja estrutura e solubilidade definem a normal transparência do cristalino, bem como o seu elevado índice refractivo [14], [5]. As restantes proteínas incluem as proteínas membranares, as proteínas do citoesqueleto (tais como a actina, a filensina, e a espectrina), as proteínas transportadoras, as proteínas de junção (responsáveis pela comunicação intercelular) e as enzimas envolvidas no metabolismo de síntese e degradação proteica [14]. A principal enzima é a glutatona (GSH), um antioxidante natural que é responsável pela manutenção da transparência do cristalino. Outros constituintes do cristalino saudáveis são as vitaminas, como por exemplo os β , C e E carotenos e ainda a vitamina C, que têm também um papel antioxidante [17].

A quantidade absoluta de colesterol no cristalino não é particularmente elevada. No entanto, as fibras do cristalino possuem poucos organelos, e todo o colesterol do tecido está localizado nas membranas plasmáticas. Assim, as membranas do cristalino contêm mais colesterol do que qualquer outra membrana biológica conhecida. Relativamente à razão entre o colesterol e os fosfolípidos das membranas celulares das fibras, esta varia entre 0,8 (no córtex superficial) e 5 (no córtex profundo e núcleo adulto). Com o avançar da idade, a perda de fosfolípidos na região nuclear leva a um aumento do rácio de colesterol/fosfolípidos, provocando o aumento da rigidez membranar. Pensa-se que este aumento da rigidez membranar possa contribuir para o aumento da rigidez do cristalino com catarata [14], [18].

2.2.3 Fisiologia patológica

A transparência do cristalino está associada à organização estrutural das suas fibras. A dispersão e absorção que a luz sofre ao passar pelo cristalino são reduzidas, devido à grande homogeneidade óptica deste tecido, que é conseguida pelo regular espaçamento e arranjo estrutural das suas fibras [12]. Este arranjo pode ser perturbado essencialmente por três factores: as alterações envolvidas nos processos da biologia do envelhecimento celular, a exposição excessiva à radiação ultravioleta e as alterações provocadas por doenças do metabolismo e/ou doenças sistémicas, como é o caso da diabetes [14], [19], [20]. Sabe-se que o *stress* oxidativo tem um papel central e comum aos mecanismos implicados nestes três factores. Esta condição resulta de um desequilíbrio entre a produção de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e os mecanismos celulares capazes de reparar ou eliminar as lesões causadas pelos radicais livres de oxigénio. É a acumulação de lesões oxidativas que está na base das perturbações acima referidas [21].

No olho, as espécies reactivas de oxigénio podem iniciar reacções bioquímicas tóxicas, como a peroxidação dos lípidos das membranas celulares e danos nas cadeias de proteínas. Como já foi referido, a configuração das proteínas cristalinas é um factor essencial para a manutenção da transparência do cristalino. As modificações que as proteínas que constituem o tecido do cristalino sofrem ao longo do processo de envelhecimento têm a sua maior origem no mecanismo de oxidação, que resulta na acumulação de lesões que promovem alterações na forma original das proteínas [5]. Os radicais livres de oxigénio interferem não só com as proteínas cristalinas, mas também com as enzimas que têm a função de eliminar proteínas danificadas, e que constituem o sistema de defesa enzimática [21]. Os danos oxidativos, aliados à perda de funcionalidade do sistema de defesa, levam em última instância à agregação e perda da solubilidade das proteínas. Uma vez insolúveis, as proteínas formam

grandes agregados proteicos que podem exceder a dimensão do comprimento de onda da luz, produzindo assim alterações no índice de refração do cristalino e alterando consequentemente a forma como a luz penetra no olho para atingir a retina [5]. Os processos descritos resultam na perda de transparência do cristalino, e estão na base da formação da catarata [5], [22].

2.3 A catarata

A catarata é definida como qualquer opacificação do cristalino de dimensão acima da ordem de grandeza do comprimento de onda da luz transmitida que provoque variações nas suas propriedades ópticas [14], [23]. É considerada uma disfunção óptica multifactorial associada a factores de risco tais como o envelhecimento, a exposição a radiação ultravioleta, a desnutrição, a administração de certo tipo de fármacos e a diabetes [20]. A formação de catarata pode ainda estar associada a factores de hereditariedade ou resultar de lesões traumáticas do olho ou de doenças oculares. No entanto, a causa maior do aparecimento de catarata relaciona-se com o processo natural do envelhecimento [24].

A catarata pode afectar a visão devido a vários factores, que incluem o aparecimento de miopia (por alteração do índice de refração do cristalino), astigmatismo lenticular², diplopia monocular³, alterações na percepção da cor e perda da sensibilidade ao contraste [5]. No entanto, a principal causa da perda de acuidade visual é o aumento da dispersão de luz e a redução da sua transmissão; a luz proveniente dos objectos é dispersa e o contraste da imagem formada na retina é reduzido [25]. A interferência das alterações do cristalino na propagação normal da luz e o seu efeito sobre a visão normal é ilustrada na Figura 4.

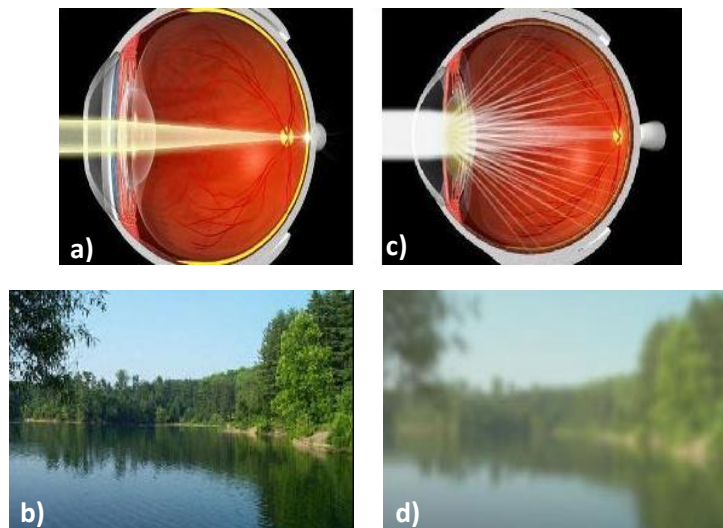


Figura 4. Efeito da catarata sobre a visão normal. a) Focagem da luz para um cristalino normal e b) respectiva imagem formada; c) dispersão da luz na presença de catarata e d) degradação da imagem resultante desse processo. Imagens adaptadas de [26].

² Tipo de astigmatismo devido a irregularidades da superfície anterior e posterior do cristalino.

³ Fenómeno de percepção dupla de um objecto devido à disfunção dos músculos oculares.

As alterações descritas afectam mais o núcleo do cristalino do que o seu córtex, e constituem a base da perda de acomodação e de transparência do cristalino com a idade. Na catarata senil, devida ao envelhecimento, podem distinguir-se várias formas, que se distinguem pelos seus mecanismos de formação [14]. De acordo com a localização da opacidade no cristalino, ela pode ser classificada em três tipos: catarata nuclear, se a opacidade estiver localizada no núcleo do cristalino; catarata cortical, se a opacidade se localizar no córtex do cristalino e catarata subcapsular posterior se a opacidade for na região retro-capsular [27]. A Figura 5 relaciona os diferentes tipos de catarata com a sua localização no cristalino.

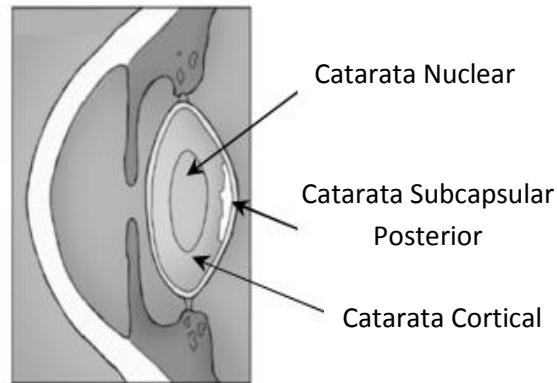


Figura 5. Localização dos três tipos de catarata senil no cristalino. Adaptado de [27].

2.3.1 Catarata nuclear

A catarata nuclear é uma opacidade no núcleo do cristalino. Os danos oxidativos resultantes da falta de glutathione nuclear são um factor diferenciador deste tipo de catarata, sendo responsáveis pelo aumento da insolubilidade proteica e pela consequente formação de agregados proteicos de elevado peso molecular. Estes agregados levam à opacidade do núcleo, ao aumento da sua rigidez e à acumulação aumentada de grupos cromóforos que são responsáveis pelo amarelecimento do cristalino. Os vacúolos subcapsulares, que consistem em pequenas infiltrações de água, são também característicos deste tipo de catarata [14]. A Figura 6 mostra uma imagem esquematizada da catarata nuclear.

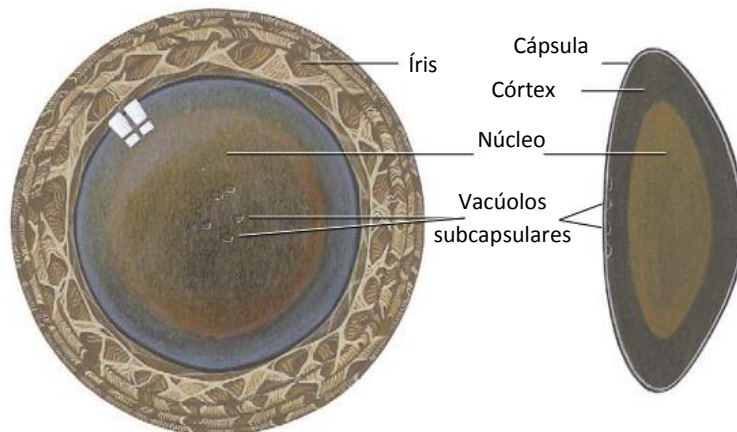


Figura 6. Imagem ilustrativa da catarata nuclear. Adaptado de [28].

2.3.2 Catarata cortical

As fibras corticais, mais superficiais e nucleadas, são geralmente menos resistentes aos danos oxidativos quando comparadas com as fibras mais profundas, livres de organelos celulares. Com o avançar da idade e o aumento da permeabilidade membranar, verifica-se um aumento do conteúdo de sódio e cálcio intracelular. Estas alterações são aumentadas na catarata cortical, e acompanhadas de uma redução da actividade da proteína membranar Na^+/K^+ ATPase, levando à hidratação excessiva do cristalino e à formação de fissuras de água. As primeiras alterações verificadas no córtex do cristalino são os *retrodots*⁴ e as sombras radiais, sendo estas últimas as opacidades corticais mais proeminentes. São inicialmente constituídas por um reduzido número de feixes de fibras opacas, e vão progredindo para formar áreas opacificadas de maior tamanho, que se estendem aos polos do cristalino e ao plano equatorial para produzir opacidades cada vez maiores e mais densas. Os principais factores indutores deste tipo de catarata são o *stress* mecânico e a exposição à radiação ultravioleta [14]. A Figura 7 mostra uma imagem ilustrativa da catarata cortical, com identificação das estruturas descritas.

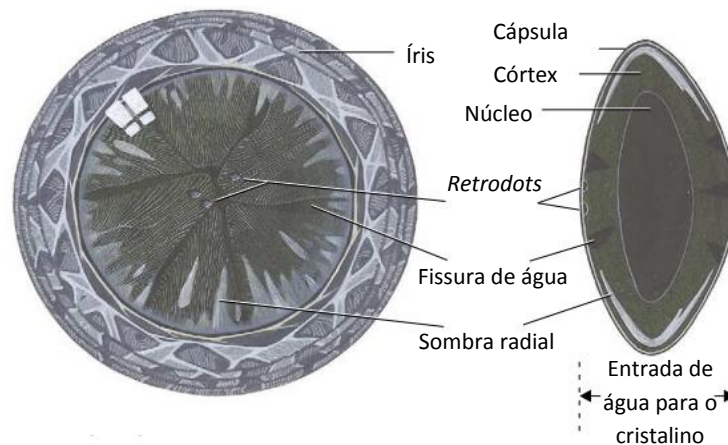


Figura 7. Imagem ilustrativa da catarata cortical. Adaptado de [11].

2.3.3 Catarata subcapsular posterior

A catarata subcapsular posterior (CSP) é uma opacidade discóide subjacente à cápsula do cristalino no seu pólo posterior. Este tipo de catarata é provocado por anomalias no crescimento das fibras a partir do epitélio, e está associada a uma falha no crescimento do cristalino [14]. É ilustrada na Figura 8.

⁴ Pequenas opacificações circulares ou ovais e de contornos suaves, muitas vezes dispostas em padrões circulares ou espirais, que podem também estar presentes no cristalino normal, sem catarata. A frequência da sua ocorrência aumenta exponencialmente após os 40 anos de idade.

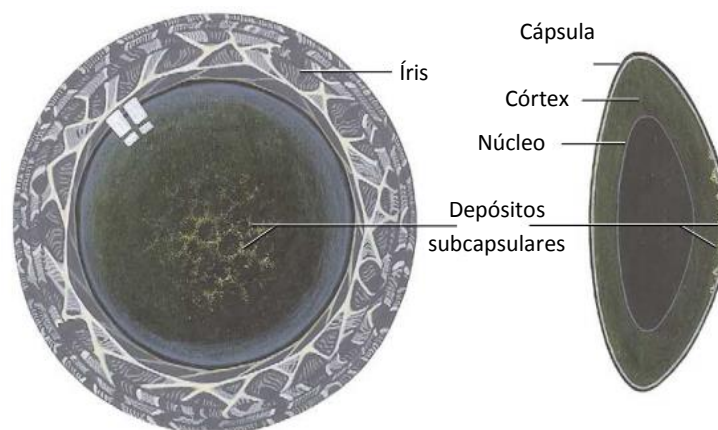


Figura 8. Imagem ilustrativa de catarata subcapsular posterior. Adaptado de [11].

2.4 Diagnóstico e terapêutica da catarata

2.4.1 Diagnóstico da catarata

O diagnóstico da catarata é geralmente feito pelo oftalmologista ou optometrista, através da realização de testes padrão de medida da acuidade visual (avaliação na escala optométrica de Snellen) e pela observação do cristalino e do reflexo retiniano por lâmpada de fenda. Alguns clínicos consideram também a medição da sensibilidade ao contraste para o diagnóstico e classificação da catarata [5].

Diversos métodos de diagnóstico da catarata têm sido propostos ao longo dos anos, na tentativa de desenvolver um método objectivo e universal para a sua classificação, tanto em ambiente clínico como em estudos epidemiológicos. Os sistemas de classificação variam nos seus métodos de avaliação, desde documentações fotográficas complexas à simples utilização do reflexo retiniano por meio de um oftalmoscópio [29]. Exemplos destes sistemas são o “*Oxford Clinical Cataract Classification and Grading System*”, o “*Lens Opacities Classification System III*” (LOCS III), o “*World Health Organization Simplified Cataract Grading System*”, o “*Wisconsin Grading System*”, e o “*Emery and Little Cataract Classification System*”, entre muitos outros menos referenciados na literatura [25], [29]. Estes sistemas são de natureza subjectiva por estarem associados a alguma variabilidade inter-observador; a influência das diferentes configurações na aquisição das imagens e a diferença entre o grau de experiência dos examinadores são apenas alguns exemplos de indutores da variabilidade, que tornam este tipo de classificação vulnerável a inconsistências na sua aplicação [3].

Os vários sistemas que existem para a classificação da catarata, quase todos para a catarata senil, classificam de forma independente os três tipos de localização da catarata: nuclear, cortical e subcapsular posterior. A maioria dos sistemas foi desenhada para classificação da morfologia e tipo de catarata através de parâmetros observáveis por instrumentos como lâmpada de fenda e microscópio de retroiluminação, para serem posteriormente comparados com diagramas e/ou fotografias padronizadas [25], [30]. Os sistemas de classificação mais comuns são o sistema Oxford de classificação e gradação clínica de catarata, OCCCOS (*Oxford*

Clinical Cataract Classification and Grading System) e o sistema de classificação de opacidades do cristalino III, LOCS III (*Lens Opacities Classification System*) [25].

O sistema LOCS III evoluiu a partir de duas versões anteriores. Este sistema procede à gradação da catarata em quatro categorias: cor do núcleo, opalescência do núcleo, opacidade cortical e opacidade subcapsular posterior. A opalescência e cor do núcleo são avaliadas numa escala decimal de 0 a 7, e a opacidade cortical e subcapsular posterior numa escala decimal de 0 a 6, por comparação com uma escala semelhante à apresentada na Figura 9 [25]. Este sistema foi validado em 1993 por Chylacket e Karbassiet, e tem sido extensivamente usado em ensaios clínicos na área da catarata [31], [32].

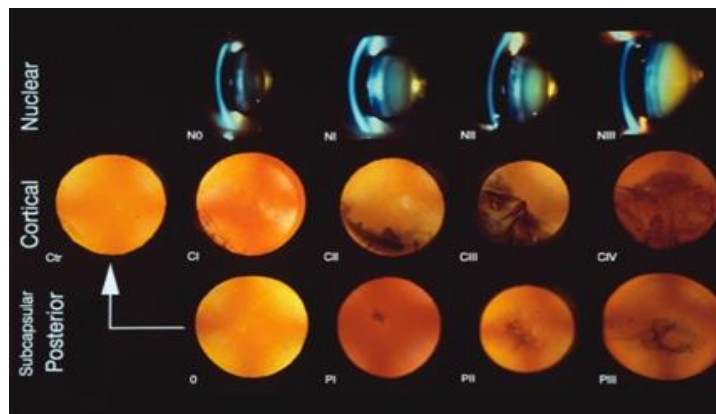


Figura 9. Imagens padronizadas utilizadas na classificação pelo sistema LOCS III. Adaptado de [33].

O sistema OCCGS é largamente aceite e tem sido usado em vários ensaios clínicos e estudos *in vivo*. É um sistema padronizado de classificação e gradação da catarata, que regista e quantifica as características morfológicas da catarata que são visíveis por lâmpada de fenda [4, 6]. Os parâmetros da catarata que são graduados por este sistema são a dimensão transparente da zona anterior do cristalino, a opacidade subcapsular posterior, as sombras radiais, as fissuras de água, os vacúolos subcapsulares, os *retrodots*, a brunescência nuclear⁵ e o *scatter* nuclear branco. Cada característica é avaliada numa escala de 0 a 5, sendo o resultado registado num quadro de classificação, para obtenção do resultado final [5], [25]. Na Figura 10 são apresentados exemplos de esquemas utilizados como base para avaliação das características descritas.

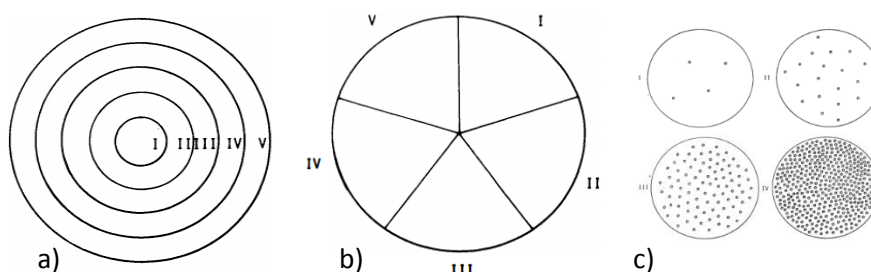


Figura 10. Esquemas padrão para quantificação dos diferentes parâmetros de gradação da catarata. a) Esquema para quantificação da dimensão da opacidade supcapsular; b) esquema para estimativa da extensão das sombras radiais; c) esquema para quantificação dos vacúolos e *retrodots*. Adaptado de [5].

⁵ Cor acastanhada que se vai intensificando com o tempo.

2.4.2 Remoção da catarata

Hoje em dia não existe um método terapêutico eficaz para esta patologia, sendo a cirurgia de remoção da catarata, designada por facoemulsificação, a única forma de restabelecer a visão em doentes com catarata [1]. A facoemulsificação foi introduzida em 1960, por Charles Kelman, substituindo o método da extracção extracapsular da catarata, ECCE (*Extracapsular Cataract Extraction*). A facoemulsificação consiste na fragmentação do cristalino opacificado por meio de energia acústica, o qual é posteriormente removido por aspiração. A visão é restituída por meio de uma lente intra-ocular implantada no olho no local do cristalino. O sucesso da cirurgia depende da preparação minuciosa do procedimento, devido ao facto de as características da catarata influenciarem grandemente a definição da energia de facoemulsificação e do tempo durante o qual o cristalino lhe deve ser exposto [1], [34].

2.5 Ultrassons: considerações gerais

Os ultrassons são vibrações mecânicas que se propagam através da matéria sob a forma de ondas de pressão, com uma frequência de oscilação superior a 20kHz. São aplicados na medicina essencialmente como método imagiológico, apresentando diversas vantagens relativamente a outros métodos, principalmente devido à ausência de radiação ionizante, à natureza não invasiva, ao baixo custo e à produção de resultados em tempo real [35], [36].

A imagiologia por ultrassons baseia-se na informação recolhida por sensores de efeito piezoeléctrico, a funcionarem em modo pulso-eco. O pulso emitido penetra no tecido sendo parcialmente reflectido nas regiões de variação de impedância acústica, retomando ao transdutor que os converte em sinais eléctricos [37]. À medida que a onda penetra no tecido, a energia acústica vai sendo atenuada por absorção e reflexão. O comportamento da onda ultrassónica quando encontra um obstáculo depende do tamanho desse obstáculo. Se o tamanho for grande quando comparado com o comprimento de onda incidente (e se tiver uma superfície relativamente suave), a reflexão é especular (Figura 11 a). Parte da onda pode ser reflectida, mantendo a sua coerência quando regressa ao transdutor; a restante é transmitida para o obstáculo. Se o tamanho do obstáculo for de dimensões inferiores ou comparáveis ao comprimento de onda da onda incidente, então a energia da onda incidente vai ser reflectida em várias direcções. A este fenómeno chama-se reflexão difusa, dispersão ou *scattering* (Figura 11 b). O feixe que é captado pelo transdutor proveniente de reflexões difusas já não é coerente, mas sim a soma de várias componentes de onda que produzem um padrão complexo de interferência construtiva e destrutiva. Este padrão de interferência, conhecido como '*speckle*', confere a aparência característica das imagens de ultrassons obtidas de tecidos complexos [36].



Figura 11. Representação esquemática dos dois tipos de reflexão. a) Reflexão especular; b) reflexão difusa.

Estado da arte

3.1 Visualização do cristalino

Os estudos morfológicos do cristalino estão intimamente ligados à disponibilidade de técnicas de visualização e caracterização deste tipo de tecido. Apesar de a estrutura do cristalino ser estudada desde os finais do século XIX por diversos métodos (microscopia óptica, microscopia electrónica de varrimento e de transmissão, técnicas por ultrassons, técnicas radiográficas e espectroscopia de Raman), os métodos disponíveis para a visualização e caracterização objectiva e detalhada do cristalino e da catarata em ambiente clínico continuam a ser escassos [4].

Dentro dos métodos disponíveis para a visualização do cristalino, as técnicas de imagiologia óptica representam a principal ferramenta usada em estudos clínicos ou de investigação na área da catarata. No entanto, a utilização destes métodos implica que não haja obstruções à passagem de luz pelo cristalino, limitando a sua utilização em muitas circunstâncias [38]. Exemplos destas técnicas são a fotografia por lâmpada de fenda e a fotografia por retroiluminação, que são técnicas fotográficas que permitem captar uma secção do cristalino e que constituem a base de muitos sistemas de classificação de catarata actualmente utilizados [39].

A fotografia por lâmpada de fenda dá informação útil sobre as dimensões e densidades ópticas da secção axial do cristalino captada. Com base nos negativos obtidos por esta técnica é possível medir as dimensões e as densidades ópticas de qualquer opacidade que se encontre no plano dessa secção [5]. A fotografia por lâmpada de fenda não permite a avaliação da região cortical do cristalino. Já o núcleo é bem identificado, permitindo a fácil quantificação da catarata nuclear [5], [39]. A Figura 12 mostra fotografias de lâmpada de fenda de um cristalino

saudável (a) e de cristalinos com opacidade nuclear, NO (*Nuclear Opacity*) de graus 2, 3 e 4 (b, c e d).

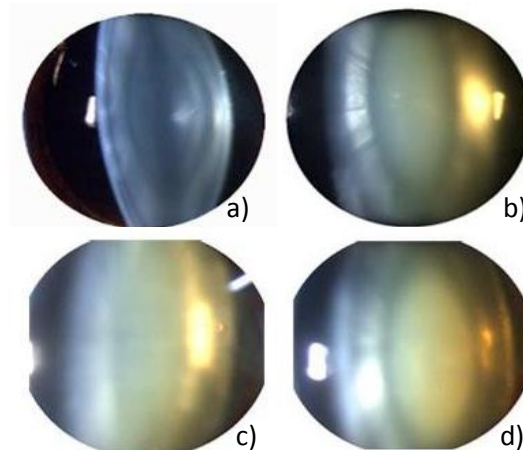


Figura 12. Fotografias por lâmpada de fenda do cristalino saudável e com diferentes graus de opacidade nuclear. (a) Cristalino saudável; b) opacidade nuclear de grau 2; c) opacidade nuclear de grau 3; c) opacidade de grau 4. Adaptado de [40].

A fotografia por retroiluminação é obtida pela luz transmitida pelo cristalino e reflectida pela retina. Permite a avaliação da quantidade total de opacidade cortical presente no cristalino, mas identifica mal a esclerose nuclear⁶; dá pouca informação sobre a extensão da opacidade nuclear e nenhuma informação sobre a extensão da área não opacificada do cristalino [5]. A Figura 13 mostra uma sequência de imagens de catarata cortical (primeira linha) e de catarata subcapsular posterior (segunda linha), obtidas por fotografia de retroiluminação.

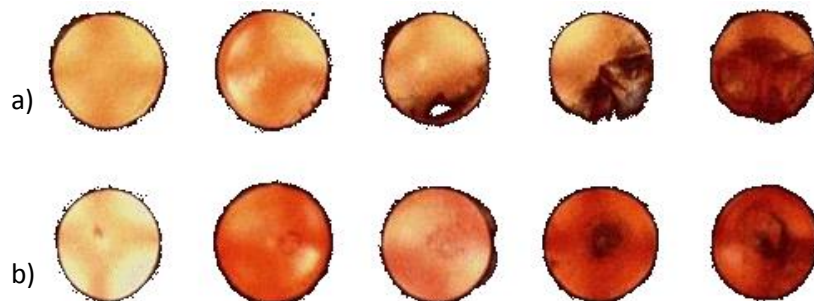


Figura 13. Fotografias de cristalinos com diferentes graus de catarata, obtidas por retroiluminação. a) catarata cortical; b) catarata subcapsular posterior. Para ambas as imagens, a primeira coluna corresponde ao caso mais ligeiro, com grau de severidade crescente até à última coluna. Imagem adaptada de [33].

Apesar de reflectirem bem a opacidade do cristalino, os métodos de imagiologia óptica não permitem observar as estruturas internas dos elementos dispersores presentes no cristalino, tornando impossível uma análise detalhada das variações da densidade ao longo de todo o cristalino [4], [5].

Outras técnicas têm surgido para a análise do cristalino e do seu estado patológico, como por exemplo a tomografia de coerência óptica (OCT) ou a ressonância magnética (RMI).

⁶ Alteração da densidade do núcleo do cristalino, provocada por alterações relacionadas com o envelhecimento. É causada pela compressão das fibras mais antigas no interior do núcleo, pela formação de novas fibras na região cortical.

As opacificações do cristalino são acompanhadas de alterações na composição do tecido, incluindo o seu estado de hidratação, tornando-as por isso passíveis de análise por RMI. A ressonância magnética apresenta a vantagem de permitir a aquisição de imagens em toda a profundidade da estrutura ocular e com boa resolução (Figura 14 a). É útil para esclarecer diagnósticos difíceis e para estudar mecanismos e efeitos de novas abordagens terapêuticas [38]. Relativamente à tomografia de coerência óptica, é possível obter imagens do cristalino saudável e da sua estrutura interna, incluindo a cápsula, o núcleo e o córtex (Figura 14 b) [41], [42].

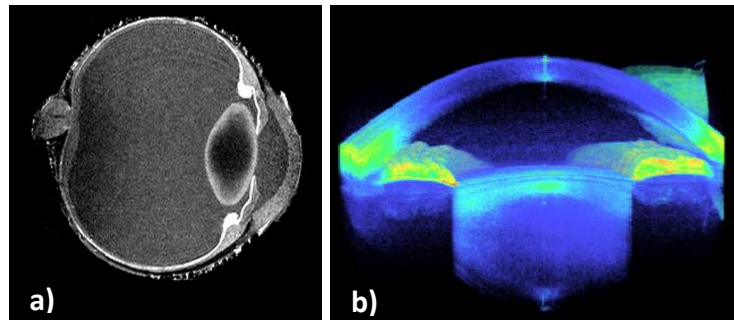


Figura 14. Imagens de cristalinos obtidas por técnicas não-invasivas. a) Imagem obtida por MRI, adaptada de [43]; b) imagem obtida por OCT, adaptada de [44].

Apesar de não apresentarem as limitações referidas para a imagiologia óptica, estes métodos apresentam várias outras desvantagens, tais como a impossibilidade de caracterização do tecido a nível da sua dureza, a complexidade do equipamento ou a apresentação de custos demasiado elevados para se tornarem um método de eleição para análise do cristalino em ambiente clínico.

Na área de investigação da catarata, outros métodos têm sido aplicados para a visualização e caracterização da catarata, como por exemplo as técnicas microscópicas ou por raio-X [4], [12]. A Figura 15 mostra alguns exemplos de imagens adquiridas por estas técnicas. Apesar de constituírem uma boa contribuição relativamente ao detalhe de observação de estruturas, a sua aplicação em ambiente clínico é inviável devido à sua natureza invasiva e à sensibilidade do tecido do cristalino à radiação ionizante.

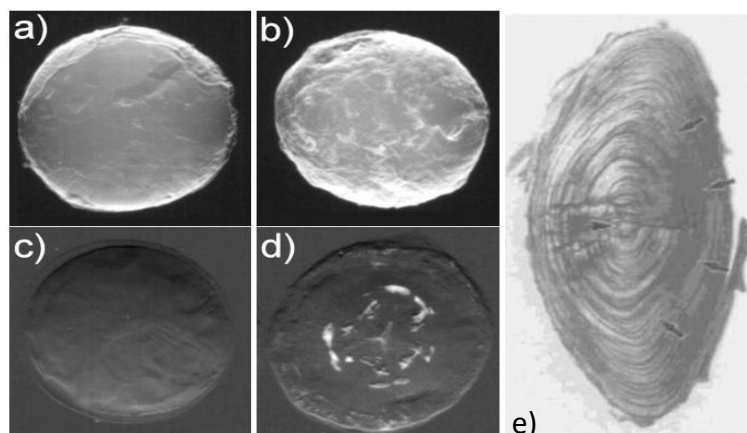


Figura 15. Imagens de cristalinos obtidas por diferentes técnicas. a) e c) representam cristalinos saudáveis; (b e d) com catarata. Imagens obtidas por raio-X, adaptadas de [4]. e) Imagem de uma secção de um cristalino humano obtido por microscopia electrónica. Adaptado de [12].

3.2 Processos automáticos de classificação da catarata

Os sistemas clínicos de gradação da catarata tipicamente utilizados são de natureza subjectiva, sendo por isso vulneráveis à variabilidade entre classificações ao longo do tempo e entre observadores [45]. O desenvolvimento de um método objectivo para a classificação da catarata tem sido o desafio para vários investigadores.

Jurkonis apresentou em 2005 [46] uma abordagem para a detecção automática da catarata usando ultrassons, baseada na detecção dos pontos fiduciais⁷ em sinais de radiofrequência e posterior cálculo de um parâmetro de decisão. A fórmula para o cálculo do parâmetro de decisão foi estabelecida empiricamente, com base na duração do sinal referente à cápsula anterior e à energia dos ecos de frequência mais baixa da região nuclear. Esta abordagem foi testada em 203 cristalinos humanos, divididos em 4 grupos: 66 controlos, 61 cristalinos com catarata incipiente, 56 com catarata imatura e 20 catarata madura. O método conseguiu identificar correctamente 70% dos casos de cristalinos saudáveis, 82% dos casos de catarata incipiente, 97% dos de catarata imatura e 100% dos de cataratas maduras [46].

Um outro estudo para avaliação do estado do cristalino por ultrassons foi publicado em 2007, por Paunksnis *et al.* [47]. Nesse estudo foi proposto um parâmetro para avaliação quantitativa da catarata, designado por *lens quality*, Q . Para obtenção do parâmetro Q foram avaliados dois fenómenos de interacção dos ultrassons com o tecido do cristalino: a atenuação e a dispersão. O estudo foi realizado com 228 sinais, tendo sido possível a identificação de três grupos com elevado grau de fiabilidade: cristalinos saudáveis, para $Q > 50$, cristalinos com catarata imatura ou incipiente, para $2 < Q < 20$ e catarata madura, para $Q < 1$. [47].

Exceptuando os trabalhos realizados com base nas abordagens por ultrassons referidas, a maioria dos grupos de investigação trabalham na classificação da catarata através da quantificação objectiva da informação contida em imagens de cristalinos. Geralmente as imagens utilizadas para este tipo de classificação são obtidas através das técnicas fotográficas para visualização do cristalino por lâmpada de fenda e por retroiluminação, explicadas na secção 3.1.

Ao longo de 4 anos (2007-2011) Li *et al.* publicaram diversos estudos na área da classificação automática da catarata cortical, nuclear e subcapsular posterior através de processamento de imagens, obtidas tanto por lâmpada de fenda como por retroiluminação [27], [45], [48], [49]. O sistema de classificação tem vindo a ser aperfeiçoado a nível de detecção da região de interesse e das características extraídas. Das regiões de interesse definidas foram extraídos diversos indicadores do grau de opacidade, entre eles o nível médio de amplitudes do histograma correspondente à região interior do cristalino, presença de sombras radiais na zona cortical, intensidade média de brilho da imagem do interior do cristalino e na região do sulco ciliar⁸, razão entre intensidades do lado anterior e o lado posterior, distribuição de intensidades no reflexo posterior e área total de opacidades na região cortical. Em 2011, este

⁷ Pontos de controlo que definem regiões características com propriedades importantes para a análise.

⁸ Espaço entre a superfície posterior da base da íris e a superfície anterior do corpo ciliar.

sistema foi validado para a classificação de catarata nuclear por Cheung *et al.* [50], através da comparação das classificações atribuídas pelo sistema com aquelas atribuídas por classificação manual feita com o sistema de classificação Wisconsin, que avalia o grau de catarata numa escala decimal de 0,1 a 5. As classificações diferiram em menos de uma unidade em 99% dos casos, levando os autores a concluir que é possível uma avaliação automatizada e precisa da catarata nuclear através deste método [50]. Apesar de não terem sido validadas, as classificações de catarata cortical e subcapsular posterior também têm sido testadas com este sistema, com variações inferiores a uma unidade em 86 e 82% dos casos, respectivamente.

3.3 Caracterização da catarata por ultrassons

A ultrassonografia é uma técnica não-invasiva que representa variações nas propriedades acústicas dos tecidos, podendo fornecer informação útil sobre a dureza do cristalino [51]. Em 1975, Oguchi *et al.* [52] mostraram pela primeira vez que o cristalino provoca absorção e dispersão (*scattering*) do feixe de ultrassons e que cristalinos com catarata contêm regiões de heterogeneidade acústica no seu interior, que podem ser observadas devido a estes efeitos. Desde então, Tabandeh, Paunksnis, Huang e Tsui [22], [47], [51], [53–55], foram alguns dos autores que exploraram a aplicabilidade das técnicas por ultrassons à temática da caracterização e avaliação da catarata, através da determinação de parâmetros acústicos tais como a velocidade de propagação e a atenuação.

A velocidade de propagação dos pulsos emitidos por transdutores ultrassónicos através dos tecidos oculares depende da sua densidade e elasticidade. Descontinuidades na densidade e/ou compressibilidade das estruturas geram fenómenos de reflexão, cuja amplitude é proporcional à densidade do meio no qual a onda se propaga, motivo pelo qual os ultrassons se propagam nos meios sólidos a velocidade superior à dos meios líquidos. Este é um princípio importante e com aplicabilidade no estudo e análise das estruturas oculares, uma vez que o olho é composto por meios de ambos os estados físicos. Na biometria A-scan, a onda acústica propaga-se através da córnea, humor aquoso, cristalino, humor vítreo, retina, coróide e esclera e é finalmente atenuada na gordura peri-orbitária. Neste trajecto a velocidade de propagação da onda sonora varia continuamente [51], [56]. A Figura 16 exemplifica o comportamento de um sinal acústico ao longo do olho humano.

Os pulsos ultrassónicos são atenuados principalmente como resultado da absorção e do *scattering*, que sofrem à medida que atravessam os tecidos. A atenuação depende da densidade e da estrutura do tecido e da frequência dos ultrassons utilizada [51], [54], [55], [57]. Sabe-se hoje que a dureza do cristalino depende de vários factores, tais como a idade, o grau de extensão da opacidade, o grau de compactação das fibras (que está relacionado com alterações na natureza das proteínas do cristalino), entre outras alterações bioquímicas. No cristalino com catarata, a agregação de proteínas e compactação de fibras no seu interior é maior que num cristalino saudável, o que contribui para o aumento da sua dureza [51]. Desta forma, é possível correlacionar as alterações do cristalino provocadas pelo processo de evolução da catarata com o seu valor de dureza e, conseqüentemente, com o valor de atenuação medido para os sinais acústicos [51], [54], [55], [57].

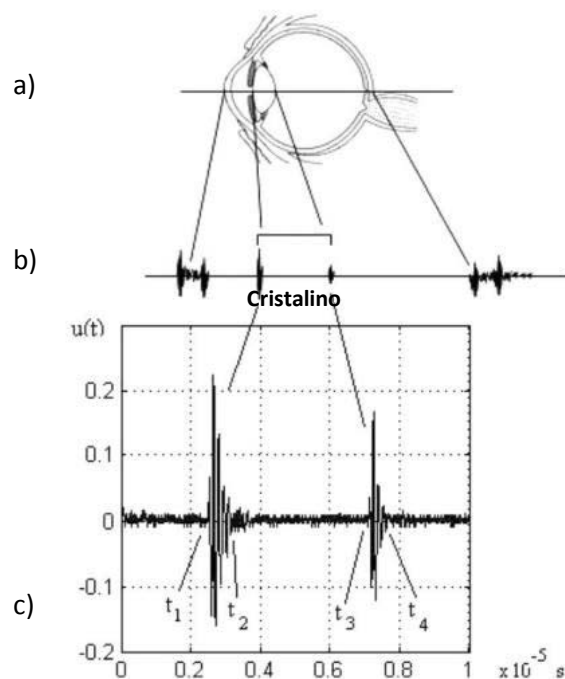


Figura 16. Comportamento de um sinal acústico ao longo do olho. a) Estrutura do olho; b) sinais obtidos das várias interfaces; c) sinais destacados de b), correspondentes às cápsulas anterior e posterior. Adaptado de [47].

3.3.1 Parâmetros acústicos do cristalino

Os primeiros estudos relativos à determinação da velocidade de propagação dos ultrassons em tecidos oculares datam de 1958, em que Oksala *et al.* determinaram uma velocidade de 1650ms^{-1} em cristalinos de bovino [58]. Em 1961, Yamatoto *et al.* obtiveram um valor de 1530ms^{-1} para cristalinos de suíno [59]. Em 1962, Jansson determinou uma velocidade de propagação dos ultrassons ao longo do cristalino humano de $1640,5\text{ms}^{-1}$ e de $1532,0\text{ms}^{-1}$ no humor vítreo [60].

Mais recentemente, começou a ser explorada a hipótese da caracterização do cristalino através da relação entre a sua dureza e os seus parâmetros acústicos [51], [54], [55], [61–63]. Num estudo realizado em 2000, Tabandeh *et al.* não encontraram uma correlação estatisticamente significativa entre a velocidade de propagação dos ultrassons no cristalino e a dureza do mesmo. No entanto, como a velocidade calculada correspondeu à velocidade média no núcleo e parte do córtex, foi formulada a hipótese de as variações de velocidade na região nuclear terem sido compensadas pelas alterações da velocidade na região do córtex [51]. Em 2007, Huang *et al.* encontraram uma variação da velocidade de propagação entre cristalinos saudáveis e com catarata de 1597ms^{-1} para 1759ms^{-1} e de 1589ms^{-1} para 1806ms^{-1} para a região nuclear e a região cortical, respectivamente [53]. Num estudo posterior, os mesmos autores obtiveram valores médios de propagação entre 1639 e 1735ms^{-1} , para cristalinos normais e com catarata [54].

A correlação do coeficiente de atenuação com o grau de severidade da catarata é amplamente aceite pela comunidade científica: a atenuação dos ultrassons em cristalinos com catarata é maior do que a atenuação em cristalinos saudáveis [55], [62], [63]. Paunksnis *et al.*

encontraram em 2003 um aumento do coeficiente de atenuação de cerca de 1,9 vezes para cristalinos com catarata diabética, quando comparado com cristalinos saudáveis (de 0,48 para 0,94dB/mm/MHz). Sugata *et al.* encontraram variações desde 0,13dB/mm/MHz, em controles, até 0,23dB/mm/MHz, em cataratas senis ligeiras, diabéticas e nucleares [61].

Para além das variações dos parâmetros acústicos entre cristalinos normais e cristalinos com catarata, verificou-se que os parâmetros acústicos variam regionalmente no cristalino normal como resultado das diferenças de concentração proteica e do conteúdo de água. A velocidade do som varia entre $1597,2\text{ms}^{-1}$ (para o córtex) e $1701,2\text{ms}^{-1}$ (para o núcleo). O mesmo se verificou para o coeficiente de atenuação, que apresenta valores inferiores na zona cortical anterior (0,0091dB/mm/MHz) quando comparado com a zona nuclear (0,2048dB/mm/MHz) [53].

3.3.2 Modelo de Nakagami

A distribuição estatística de Nakagami, que foi inicialmente proposta para descrever e interpretar estatisticamente os ecos de radar, tem sido extensamente aplicada à caracterização de tecidos por ultrassons [22], [64–67].

Tal como já foi referido anteriormente, a imagiologia por ultrassons é uma ferramenta muito útil na caracterização de tecidos biológicos, devido essencialmente ao seu carácter não-invasivo e pelo facto de não usar radiação ionizante [68]. A intensidade do eco do sinal proveniente de um cristalino com catarata difere, de um modo geral, da intensidade do eco proveniente de um cristalino saudável, uma vez que as zonas de maior opacidade são associadas a ecos mais intensos, correspondentes a reflexões especulares provocadas pelas variações de impedância no tecido [22], [64], [65]. No entanto, a intensidade do eco produzido pelo cristalino pode não ser um bom indicador da sua dureza, visto que a imagem convencional em modo de brilho (modo B) descreve apenas qualitativamente a estrutura do tecido, devido ao facto de a amplitude absoluta dos sinais variar com as configurações do sistema (como por exemplo o ganho ou a gama dinâmica), com o modo de aquisição (o ângulo de incidência dos ultrassons) e também com a experiência do utilizador [64], [69].

Já a distribuição de Nakagami revelou-se bastante robusta na obtenção de imagens consistentes, independentemente do utilizador e das configurações do sistema de aquisição, essencialmente devido ao facto de se basear apenas na variação local da estatística dos sinais de *backscattering*, e não apenas nos seus valores absolutos [64]. Para além disso, e devido à sua versatilidade na identificação de diversas funções de densidade de probabilidade dos sinais de *backscattering*⁹, a distribuição de Nakagami permite a caracterização de diferentes concentrações e distribuições de *scatterers* num tecido [63], [70], [71]. Deste modo, a imagem de Nakagami permite quantificar localmente as concentrações de *scatterers* no tecido e extrair informação dos sinais de *backscattering* das regiões de ecos menos intensos, que poderiam ser perdidas na formação da imagem modo B. Várias outras referências bibliográficas sugerem que a imagem de Nakagami pode ser usada para complementar as imagens modo B obtidas

⁹ Reflexão difusa provocada por pequenas estruturas presentes no tecido, os chamados *scatterers*, de tamanho inferior ao comprimento de onda incidente.

por ultrassons, para melhorar a informação associada ao arranjo espacial e à concentração dos *scatterers* nos tecidos e indirectamente para diferenciar os graus de dureza de cristalinos com catarata [22], [64–67]. Para além disso, o uso da distribuição de Nakagami simplifica a modelação da função de densidade de probabilidade da envolvente dos sinais de *backscattering* de tecidos biológicos, quando comparada com outras distribuições estatísticas, como por exemplo a distribuição de Rician ou a distribuição K generalizada [22], [64], [65]. O modelo de Nakagami constitui por isso um dos métodos mais usados na caracterização de tecidos biológicos [22], [64–67].

Em 2007, Tsui *et al.* verificaram experimentalmente que, para aquisições de sinais de cristalinos com estádios consecutivos de evolução da catarata, a intensidade dos sinais de *backscattering* da imagem modo B apresentou elevada variância e não variou de forma significativa. Já o parâmetro m de Nakagami aumentou significativamente de 0,3 para 0,8, para 40 e 160 minutos de imersão respectivamente [65].

Posteriormente, Jesus *et al.* repetiram o estudo da variação dos parâmetros de Nakagami, m e Ω , de cristalinos em função do tempo de imersão em solução indutora de catarata. Verificou-se um aumento consistente do parâmetro de Nakagami m com o tempo de imersão do cristalino, apresentando uma variação de 0,63 para 0,89 ao longo dos 180 minutos de imersão considerados no estudo [63], [72]. Já o parâmetro de escala, Ω , que reflecte a intensidade média do sinal de *backscattering*, não apresenta uma variação consistente ao longo do tempo de imersão. Este resultado é justificado pela dependência da amplitude dos sinais com as configurações do sistema de aquisição, bem como outros factores inerentes à própria aquisição dos sinais [63], [72]. Os gráficos da Figura 17 ilustram os resultados obtidos.

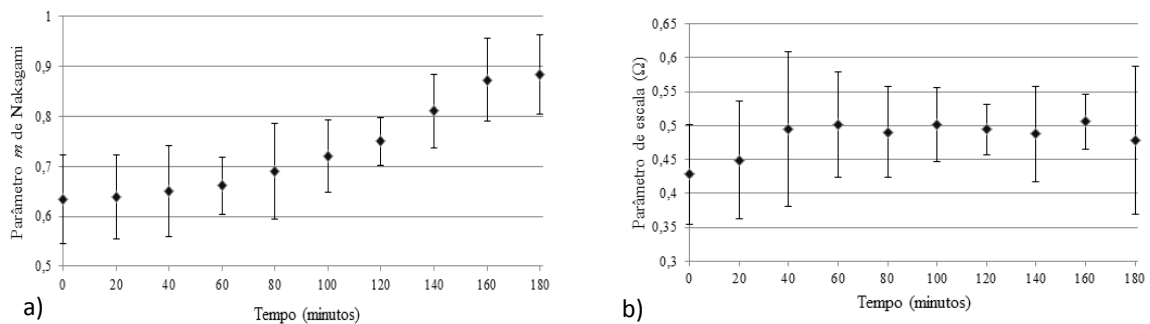


Figura 17. Variação dos parâmetros de Nakagami com o tempo de imersão. a) Parâmetro de forma, m ; b) parâmetro de escala, Ω [63], [72].

Relativamente à relação entre o parâmetro de Nakagami e a dureza do cristalino, Tsui *et al.* verificaram experimentalmente a existência de uma correlação forte entre estas duas grandezas ($r = 0,86$). Já a amplitude dos sinais nas imagens B-scan apresentou uma baixa correlação com os valores de dureza das regiões correspondentes ($r = 0,35$) [65].

Após uma análise do parâmetro m de Nakagami por simulações computacionais, realizada por Tsui *et al.*, os autores verificaram que uma compressão logarítmica aproxima a estatística das envolventes de *backscattering* de distribuições pós-Rayleigh para a maioria das concentrações de *scatterers*. Para além disso, concluíram que o parâmetro de Nakagami calculado com base

na envolvente dos sinais de *backscattering* comprimidos (m_{\log}) é mais sensível a variações na concentração de *scatterers* do que aquele calculado com base nas envolventes originais [66].

3.4 Reconhecimento de padrões em aplicações médicas

Desde o início dos anos 70 que se tem considerado a aplicação das técnicas de aprendizagem na análise de dados médicos, e o constante desenvolvimento da tecnologia e de algoritmos computacionais têm aumentado o interesse nesta abordagem no ramo da saúde [73], [74].

O diagnóstico feito a partir de dados clínicos é uma tarefa multifacetada, realizada com o objectivo de detectar e caracterizar com precisão possíveis anomalias. Esta detecção e caracterização constituem um passo fundamental para a eficácia do tratamento e dependem em geral de dois processos distintos: por um lado da percepção dos resultados e do reconhecimento de padrões únicos, e por outro do processo de identificação das relações entre os padrões identificados e os possíveis diagnósticos. Ambos os processos dependem grandemente do conhecimento empírico, da memória, intuição e diligência do profissional [73]. Os classificadores podem ser usados para auxiliar o profissional nesta tarefa, de modo a melhorar a velocidade, precisão e fiabilidade do diagnóstico [74].

3.4.1 Técnicas de aprendizagem aplicadas a dados obtidos por ultrassons

A aplicação de técnicas de reconhecimento de padrões a dados recolhidos com técnicas por ultrassons em outros órgãos e tecidos do corpo humano é já relativamente comum. No entanto, de acordo com a revisão bibliográfica feita, as técnicas de reconhecimento de padrões não foram, ainda, aplicadas a sinais acústicos para caracterização do tecido do cristalino. De um modo geral, as técnicas de reconhecimento de padrões são comumente aplicadas em sinais acústicos, sendo o fígado o órgão mais estudado [75–78].

Materiais e métodos

4.1 Aquisição de dados

No presente estudo os dados foram adquiridos de cristalinos de suíno, com recurso a técnicas por ultrassons e por microscopia óptica. Os sinais acústicos foram adquiridos com um transdutor de alta frequência (25MHz), em modo pulso-eco. Para as imagens de microscopia, foi usado um microscópio óptico invertido para aquisição digital de imagens de *slices* de cristalinos. Nesta secção serão explicados os procedimentos de preparação das amostras e da aquisição dos sinais para ambas as abordagens.

4.1.1 Obtenção e preparação das amostras

Devido à natural dificuldade em obter cristalinos humanos, optou-se pela análise de cristalinos de suíno, de mais fácil acesso. Sabe-se que os cristalinos de mamíferos são basicamente constituídos pelo mesmo tecido, com parâmetros de espectroscopia de Raman muito semelhantes [4]. Para além disso, dentro dos mamíferos, os cristalinos de suínos possuem um coeficiente de atenuação muito similar ao dos humanos, bem como uma distribuição proteica semelhante, constituindo por isso uma boa alternativa [62], [79]. Os olhos utilizados para este estudo foram recolhidos regularmente de talhos das imediações do laboratório, e foram removidos de animais com cerca de 6 meses de idade, abatidos no dia da recolha. Os cristalinos foram enucleados¹⁰ com um bisturi cirúrgico através de um corte realizado na zona do limbo esclero-corneano, possibilitando a sua extracção do mesmo sem traumatismos. Foram posteriormente limpos com solução salina com o objectivo de remover partes restantes

¹⁰ Processo de extracção do cristalino do olho.

da íris, do humor vítreo e do humor aquoso aderentes à cápsula. O acima exposto é ilustrado na Figura 18. A conservação dos cristalinos até ao processo de análise foi assegurada através da imersão em solução PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Todos os cristalinos foram rastreados para a presença de opacidade incipiente ou catarata.



Figura 18. Processo de enucleação do cristalino. a) Olho de suíno, com incisão na zona do limbo esclero-corneano; b) extracção do cristalino do olho; c) cristalino após remoção de restos de íris, humor vítreo e humor aquoso.

4.1.2 Método de indução da catarata

A indução de catarata pode ser feita com recurso a vários métodos. O método a usar é escolhido de acordo com o tipo de catarata que se pretende induzir. O método mais utilizado e estudado na literatura para análises *in vivo* é a indução de catarata por selénio. Este método é especialmente útil devido ao facto de reproduzir os mecanismos celulares e moleculares implicados no mecanismo de cataratogénese explicados pela biologia do envelhecimento celular. Este é o modelo mais usado na indução de catarata nuclear e cortical, pois mimetiza parcialmente a catarata senil que ocorre em humanos [80], [81]. Para a indução de cataratas específicas, em termos de extensão e localização, pode ser utilizada a indução por laser de neodímio-YAG, ND-YAG (*Neodymium-Doped Yttrium Aluminum Garnet*). Estudos comprovam a fiabilidade do método para a indução de tipos específicos de catarata em olhos animais sem danificar as estruturas oculares envolventes [82].

Para estudos *in vitro*, o método mais referenciado na literatura para a indução de catarata consiste na imersão do cristalino numa solução de etanol, propanol e formalina, numa proporção 3:3:4. Este método tem revelado a sua reprodutibilidade em diversos estudos, permitindo obter uma evolução homogénea da catarata no cristalino, induzida por oxidação e desnaturação proteica. Variando o tempo de imersão na solução, é possível obter diferentes estádios de catarata e atingir um estado de catarata avançada, após 180 minutos de imersão na solução [53], [55], [65].

Por motivos de contenção de custos, neste estudo a catarata foi induzida com uma solução de etanol e água desionizada, na proporção de 1:2. Esta solução induz catarata pelas mesmas vias de oxidação e desnaturação proteica que a solução de etanol-propanol-formalina anteriormente referida. Para validação dos resultados obtidos com a solução de etanol, foi realizado um estudo em pequena escala com uma amostra da solução de etanol-propanol-formalina, tendo sido obtida boa concordância entre dois métodos de indução. Uma abordagem mais detalhada dos resultados obtidos e das conclusões retiradas deste estudo comparativo é apresentada no Capítulo 5.

4.1.3 Análise por ultrassons

A configuração experimental para aquisição dos sinais acústicos foi sofrendo várias alterações até à sua optimização. No Anexo C é incluído o actual protocolo de aquisição, elaborado para garantir reprodutibilidade da recolha de dados, minimizando qualquer variabilidade induzida pelo operador ou pelas configurações experimentais. A configuração experimental usada para a aquisição dos sinais, bem como a preparação das amostras é explicada nesta secção.

4.1.3.1 Configuração experimental

Para a aquisição dos sinais foi utilizado um transdutor com uma frequência central de 25MHz, com distância focal de 25mm e diâmetro activo de 5mm. O transdutor foi posicionado a uma distância de 25mm da cápsula anterior do cristalino, para garantir a aquisição dos sinais dentro da zona focal do transdutor.

Para a aquisição dos sinais, os cristalinos foram colocados num suporte com uma abertura circular, permitindo a sua suspensão com menor contacto possível na zona do equador. As aquisições foram feitas com os cristalinos imersos em solução PBS, que se revelou eficaz na manutenção do estado de conservação das amostras durante o processo de análise. O transdutor é colocado verticalmente num sistema de posicionamento XYZ de elevada precisão (passos de 10 μ m). A configuração experimental é ilustrada na Figura 19.

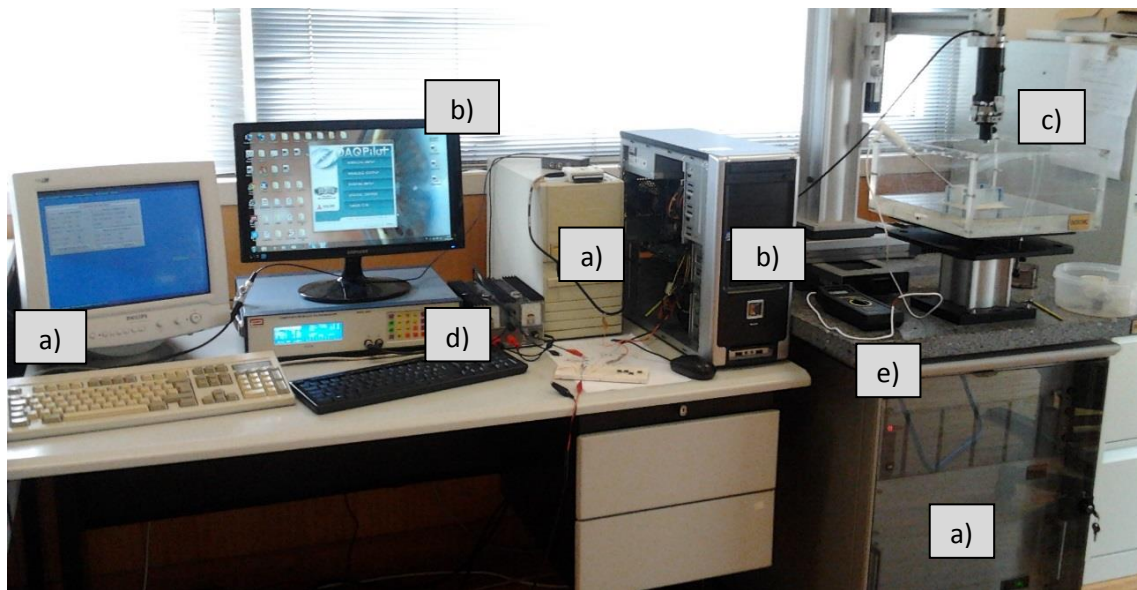


Figura 19. Representação simplificada da configuração experimental utilizada para a aquisição dos sinais. a) Instrumentação associada ao sistema de posicionamento do transdutor; b) instrumentação associada à aquisição dos sinais; c) transdutor; d) gerador de sinais; e) termómetro para controlo de temperatura.

4.1.3.2 Aquisição dos sinais

Quando o feixe de ultrassons é perpendicular à interface do cristalino, o transdutor pode receber uma grande quantidade de energia acústica por reflexão directa, permitindo a caracterização do tecido que atravessou. Caso contrário, a energia é menor e a informação contida nos sinais é substancialmente reduzida. O brilho da imagem modo B, que corresponde

à intensidade do eco medido, está desta forma associado à forma como os dados são adquiridos, dependendo da experiência do operador [64], [83]. A Figura 20 ilustra o efeito de uma incidência oblíqua do feixe sobre a amostra.

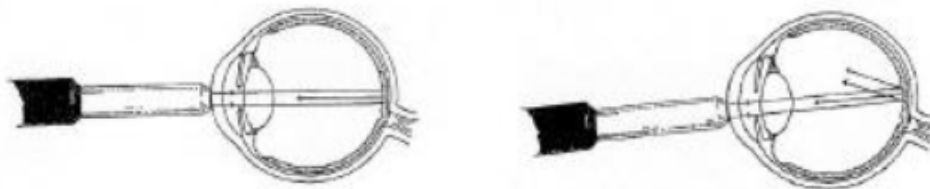


Figura 20. Efeito do variação do ângulo de incidência sobre a informação recolhida no transdutor. Imagem adaptada de [83].

Para minimizar a variabilidade nas aquisições devida a este factor, é importante garantir uma incidência perpendicular do feixe sobre o cristalino durante o processo de aquisição. Para tal, o cristalino deve ser colocado numa posição de modo a que o seu equador fique o mais paralelo possível ao plano de suporte; este processo pode ser facilitado com ajuda do osciloscópio, que permite monitorizar a intensidade do eco referente ao sinal da cápsula anterior. À medida que a posição do cristalino é ajustada, a amplitude da cápsula medida no osciloscópio é tanto maior quanto mais perpendicular for a incidência do feixe sobre o cristalino.

A par do ângulo de incidência, a localização da região de recolha dos sinais é também importante, uma vez que o cristalino tem variações estruturais ao longo do seu eixo, nomeadamente a espessura da sua cápsula. Para reduzir a variabilidade de dados induzida por este factor, devem ser adquiridas secções do cristalino que passem pelo centro, de modo a que seja obtido sempre o mesmo perfil de espessura da cápsula. Para além da espessura da cápsula, existem outras diferenças anatómicas entre o lado anterior e posterior do cristalino, como a existência de uma camada de células epiteliais nucleadas na região anterior do cristalino, que não está presente no lado posterior. Como já foi referido anteriormente, as células nucleadas têm uma maior susceptibilidade ao *stress* oxidativo, pelo que se optou por analisar também o lado posterior ao longo de diferentes tempos de imersão, para verificar a existência de diferenças no perfil de evolução da catarata. Os resultados deste estudo comparativo são apresentados no Capítulo 5.

4.1.4 Microscopia óptica

Foram obtidos *slices* dos cristalinos nas regiões do córtex e do núcleo para observação ao microscópio, com o objectivo de visualizar a distribuição proteica nestas duas regiões e perceber a alteração na concentração e distribuição que as proteínas sofrem para os diferentes tempos de imersão considerados no estudo. Os cristalinos foram incorporados em meio de suporte para congelação (*Cryomatrix Shandon médium, Thermo Scientific Ltd Shandon, WA, EUA*). Os *slices* foram feitos transversal e longitudinalmente, com uma espessura de 50µm, com recurso a um crióstato automático (Leica Microsystems CM3350S, Wetzlar, Germany). Posteriormente os *slices* foram colocados em lamelas revestidas

(Superfrost Plus, Eric Scientific) para tingimento e fixação do tecido e posterior observação ao microscópio óptico.

O protocolo de tingimento e fixação dos *slices* escolhido foi o protocolo de fixação de tecidos com Hematoxilina & Eosina (H&E, Merck) para tingimento de proteínas, tecido conectivo e colágeno. As imagens dos *slices* foram adquiridas com recurso a um microscópio invertido com sistema de aquisição digital de imagem. As imagens foram adquiridas com ampliações de $40\times$ para os *slices* do córtex e núcleo, e com uma ampliação de $4\times$ para os *slices* da região do núcleo-córtex. A quantidade de luz e tempos de exposição foram mantidos constantes para a aquisição de todas as imagens.

4.2 Pré-processamento

4.2.1 Reconstrução da imagem modo B

Na análise de tecidos biológicos por ultrassons, existem dois tipos básicos de representação dos sinais adquiridos: sinais A-scan e imagens em modo de brilho (modo B ou B-scan) [84]. Os sinais A-scan são os sinais originalmente adquiridos pelo sistema. A envolvente desses sinais é obtida pela transformada de Hilbert e pode, após compressão logarítmica, ser utilizada para reconstruir a imagem modo B [84], [85]. A Figura 21 apresenta o sinal A-scan (a), a imagem modo B (c) e a envolvente do sinal (b), que permite fazer a passagem da primeira forma de representação para a segunda.

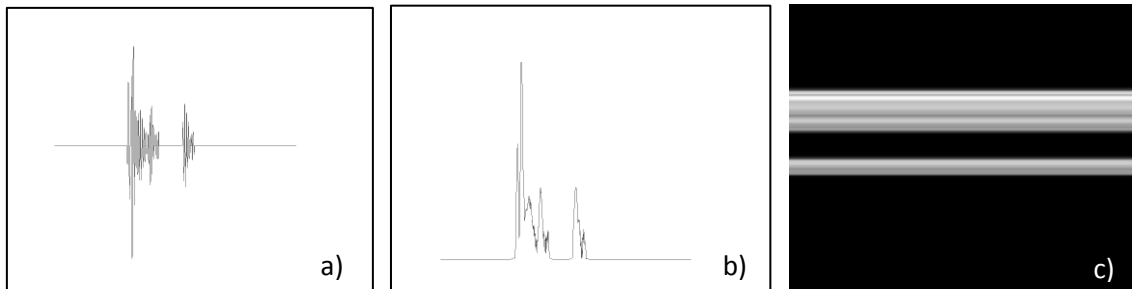


Figura 21. Tipos de representação dos sinais de ultrassons. a) Sinal A-scan de um cristalino com catarata; b) envolvente do sinal, obtida pela transformada de Hilbert; c) representação modo B do sinal A-scan apresentado.

Apesar de conterem grande quantidade de informação, os sinais A-scan são difíceis de interpretar pelo utilizador. Por isso, os dados de ultrassons são geralmente apresentadas sob a forma de imagens de brilho moduladas, as chamadas imagens modo B. A obtenção destas imagens passa pela detecção da envolvente dos sinais, seguida de uma compressão logarítmica. Os sinais são depois convertidos para uma escala de 256 níveis de cinzento, para posterior reconstrução na forma de imagem através da justaposição de várias linhas A-scan, obtidas de modo consecutivo de uma dada região do tecido analisado.

Para a reconstrução dos dados modulados das linhas de A-scan na forma de imagem bidimensional, os tamanhos axial e lateral da imagem devem ser calculados de acordo com as equações (1) e (2), de modo a garantir que as dimensões na imagem correspondam às dimensões da amostra analisada.

$$axial = \frac{v_m \times \Delta t}{2} \quad (1)$$

$$lateral = v_t \times t_a \quad (2)$$

em que v_m é a velocidade de propagação da onda acústica no meio, Δt o tempo de propagação do feixe, v_t a velocidade de deslocamento do transdutor sobre a amostra e t_a o tempo de aquisição durante o qual são adquiridas as amostras.

De acordo com a equação (1), para o cálculo do tamanho axial da imagem é necessário conhecer o tempo de propagação e a velocidade de propagação da onda acústica no meio. O tempo de propagação é obtido a partir do número de pontos seleccionado para a reconstrução da imagem (dependente da região de interesse seleccionada) e da frequência de amostragem, fixa para todas as aquisições (200MHz), de acordo com a equação (3).

$$\Delta t = \frac{N}{200 \times 10^6} \quad (3)$$

em que N é o número de pontos seleccionado para a reconstrução da imagem.

A velocidade de propagação no meio, v_m , depende das propriedades físicas do meio, nomeadamente da sua densidade. No entanto, também a temperatura é um factor importante a considerar na sua avaliação, uma vez que a velocidade de propagação da onda acústica tem uma relação de dependência com a temperatura [86]. Foi por isso estabelecida uma curva de calibração de modo a ter em conta a dependência da velocidade de propagação com a temperatura do meio (PBS) na análise dos dados. A temperatura foi variada entre 23 e 43°C, e a velocidade calculada para variações de 2 em 2 graus. Os valores obtidos são apresentados no gráfico da Figura 22.

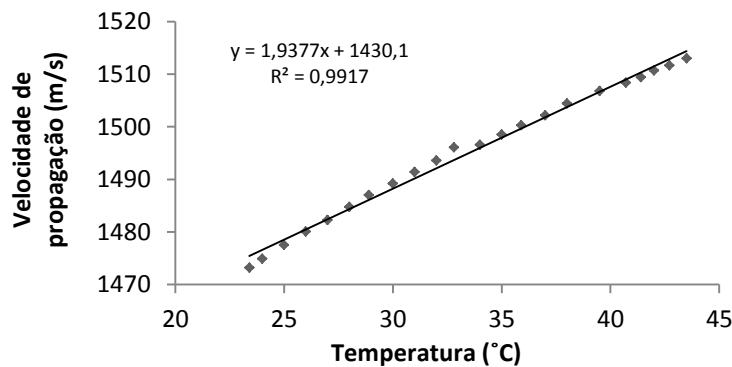


Figura 22. Velocidade de propagação em função da temperatura.

A partir dos valores experimentais e do ajuste linear feito à recta obtida, chegou-se à seguinte relação:

$$v_m = 1,94 \times T + 1430,1 \quad (4)$$

em que T é a temperatura da solução para a qual foi feita a análise. Através desta relação, e considerando uma temperatura de 26,5°C, a velocidade de propagação do meio de PBS é de 1481,5ms⁻¹. A região de interesse do cristalino para visualização do hemisfério anterior,

excluindo os sinais da placa de suporte tem um tamanho fixo de 1620 pontos, levando a um tamanho axial de 0,6mm. No entanto, esta região de interesse seleccionada varia para diferentes abordagens de análise, levando a diferentes tamanhos axiais da imagem reconstruída.

A velocidade de deslocamento do transdutor sobre o cristalino e a duração de cada aquisição são fixos (1cm s^{-1} e 1,5s respectivamente), levando a um tamanho lateral da imagem de 1,5cm. O número de linhas de A-scan adquiridas ao longo destes 1,5cm depende da frequência de emissão de pulsos, PRF (*Pulse Repetition Frequency*). O valor *standard* é de 10KHz, isto é, 10000 pulsos por segundo, o que corresponde a 15000 linhas de A-scan.

Aplicando a modulação da envolvente e fazendo os ajustes das dimensões da forma referida, obtém-se uma imagem típica como a representada na Figura 23. A Figura 24 representa uma linha de A-scan da região identificada na Figura 23 (tracejado vermelho). As setas verdes indicam os mesmos pontos de referência em ambas as figuras.

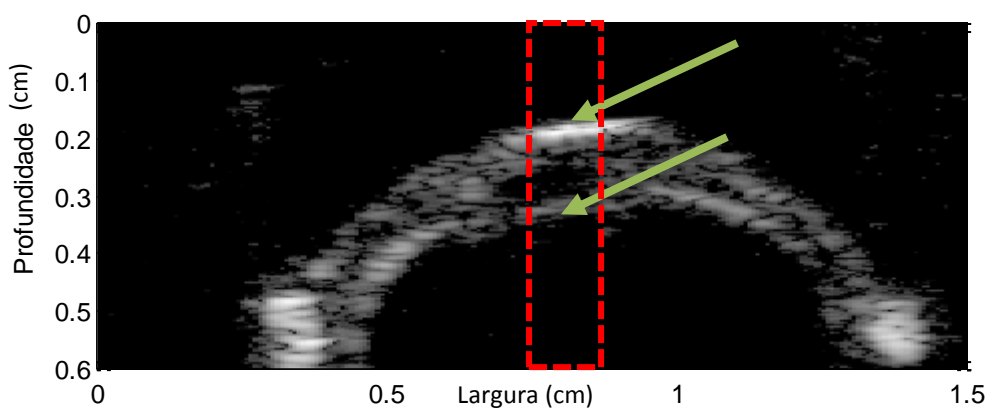


Figura 23. Representação de um B-scan de um cristalino com catarata.

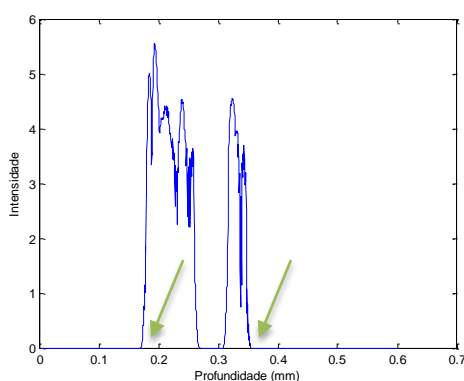


Figura 24. A-Scan da região identificada na Figura 23.

4.2.2 Processamento do ruído

O ruído é definido como um sinal indesejado que dificulta a interpretação de um dado sinal. O ruído contém informação relativa à fonte que o originou e ao meio pelo qual se propagou [87].

À semelhança de muitas outras técnicas de imagiologia médica, as imagens de ultrassonografia são afectadas pelo chamado “ruído misto”, que consiste na combinação de ruído tipo ‘*speckle*’ com ruído branco Gaussiano [88]. O ruído Gaussiano provém de muitas fontes naturais, tais como agitações térmicas nos condutores (ruído térmico) e factores inerentes à instrumentação e ao próprio ambiente envolvente. Caracteriza-se por ser um processo de ruído aleatório não correlacionado, de energia igual em todas as frequências. O ruído do tipo ‘*speckle*’, que é também conhecido por ruído multiplicativo, é provocado pela natureza coerente do fenómeno de *scattering* [88–90].

O *scattering* do feixe ocorre quando o comprimento de onda do feixe incidente é maior ou comparável às dimensões dos *scatterers* no tecido. Os sinais de *backscattering* gerados formam o chamado *speckle*, que geralmente exhibe um padrão granular de pontos claros e escuros na imagem modo B, que pode levar a perdas na qualidade da imagem e tornar a informação contida nos sinais difícil de identificar e interpretar [64], [88], [89]. No entanto, para além do *speckle* indesejado, os sinais de *backscattering* transportam também informação referente ao tamanho, forma e densidade dos *scatterers* do tecido. Esta informação contida nos sinais de *backscattering* pode ser perdida durante a aplicação das técnicas de filtragem [64], [91]. É por isso importante encontrar um bom rácio entre a remoção de ruído *speckle* e a preservação da informação contida no sinal [88], [89].

Vários métodos têm sido propostos para reduzir a influência do efeito do ruído na formação da imagem, geralmente baseados na filtragem espacial [90]. Neste trabalho foram analisados e testados três tipos de filtros: o filtro de limiar adaptativo, o filtro de correlação assistido por ruído e o filtro baseado em decomposição por *wavelets*. Todos eles foram implementados e aplicados aos dados em ambiente Matlab.

4.2.2.1 Filtro de limiar adaptativo

O filtro de limiar adaptativo é baseado na decomposição empírica de modos (DEM), assistido por aplicação de ruído branco artificial. Este método destaca-se na medida em que procura manter as características da forma de onda dos sinais não removidos pelo filtro, garantindo a manutenção da sua estatística [67], [92].

A decomposição empírica de modos é o passo central deste método de filtragem. Trata-se de um método de análise de dados não lineares e não estacionários, desenvolvido em 1998 por Huang *et al.* [46]. O sinal original é decomposto nas chamadas funções de modo intrínseco, que se caracterizam por permitirem o cálculo da frequência instantânea com significado físico, por meio da transformada de Hilbert [46]. A função de modo intrínseco (FMI) tem, por definição, um número de extremos (máximos e mínimos) e de zeros igual (ou, no máximo, diferente por um valor unitário) e um valor médio entre a envolvente inferior e superior igual a zero em qualquer ponto da função.

As FMI's são obtidas ao eliminar localmente as sobreposições das ondas de diferentes frequências e amplitudes e ao eliminar assimetrias do sinal relativamente à origem. O processo de decomposição é feito por meio de um procedimento iterativo que consiste na obtenção sucessiva das componentes através da subtração do valor médio entre as envolventes inferior

e superior da componente anterior. Este processo de subtração é denominado de '*sifting*' [46], [92]. O sinal de entrada do processo de *sifting* é o sinal original $s(t)$. O sinal $s_{i,k}(t)$ define uma componente do processo, que na primeira iteração corresponde a $s_{1,1}(t) = s(t)$. O processo de *sifting* resume-se nos seguintes passos:

1. extracção de máximos e mínimos locais a partir de $s_{i,k}(t)$;
2. determinação da envolvente inferior e superior por interpolação de $s_{i,k}(t)$ entre os máximos e mínimos locais identificados;
3. cálculo do valor médio $m_{i,k}(t)$ entre a envolvente inferior e superior, para cada ponto do sinal;
4. Subtração do sinal resultante $m_{i,k}(t)$ do sinal original $s_{i,k}(t)$; a próxima componente do processo de *sifting* passa assim a ser definida por $s_{i,k+1}(t) = s_{i,k}(t) - m_{i,k}(t)$;
5. Verificação se a componente $s_{i,k+1}(t)$ cumpre os critérios de FMI; caso contrário, o processo de *sifting* é repetido com $k = k + 1$ (passo 1 até ao passo 4);
6. Os passos anteriores são repetidos até o sinal resultante verificar os critérios de FMI, passando assim a ser considerado a FMI $c_i(t)$;
7. O processo de *sifting* seguinte é iniciado após a subtração da FMI extraída do sinal original: $r_i(t) = s_{i,k}(t) - c_i(t)$; o sinal $r_i(t)$ resultante é o sinal de entrada para o processo de *sifting* seguinte: $s_{i+1,k}(t) = r_i(t)$, em que $k = 1$;
8. O processo é repetido até que todas as FMI's sejam removidas do sinal original; a condição de paragem é o sinal resultante (o chamado residual $r_N(t)$) apresentar menos de 3 extremos.

O sinal original $s(t)$ pode ser expresso como a soma das FMI's $c_i(t)$ com o residual do processo de *sifting* $r_N(t)$: $s(t) = \sum_{i=1}^N c_i(t) + r_N(t)$. Fisicamente, o processo de decomposição empírica pode ser visto como uma extracção passo-a-passo das frequências de oscilação localmente mais elevadas, formando progressivamente as componentes de modo intrínseco [46].

O algoritmo relativo ao processo da DEM usado foi implementado em Matlab por Rilling, com base no trabalho publicado por Huang em 1998 [93], e é resumido no fluxograma apresentado no Anexo D1. A Figura 25 mostra a aplicação do algoritmo a um sinal de um cristalino com catarata (a), resultante em 10 funções de modo intrínseco (b), obtidas através dos sucessivos passos de *sifting* descritos.

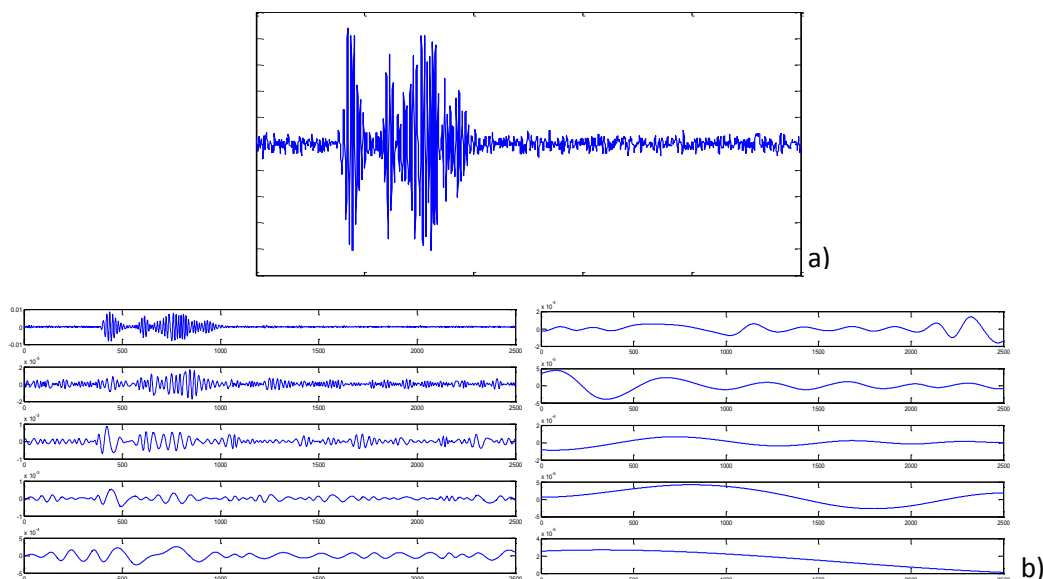


Figura 25. Sinal de um cristalino com catarata (a) e respectivas funções de modo intrínseco (b), obtidas por decomposição empírica de modos.

Para a aplicação deste método à filtragem de ruído de um sinal, o primeiro passo é a adição de ruído branco ao sinal original, que pode ser feita no Matlab, através da função *awgn* (*add white gaussian noise*). Esta função adiciona ruído branco Gaussiano numa razão sinal/ruído, SNR (*Signal to Noise Ratio*), especificada pelo utilizador. A SNR define o nível de remoção de ruído efectuado pelo filtro: valores mais baixos rejeitam sinais de *backscattering* de maior amplitude, enquanto que valores mais elevados permitem maior preservação. Estudos anteriores apontam para valores de SNR entre os 15 e os 25dB para uma filtragem efectiva do ruído. A análise empírica dos dados adquiridos levou à selecção de um valor SNR=17dB para um equilíbrio óptimo entre ruído removido e sinais preservados. Após adição do ruído, basta decompor o sinal da forma descrita, e tomar a primeira componente obtida como sinal filtrado. A Figura 26 representa o esquema ilustrativo da filtragem de um sinal através do filtro de limiar adaptativo.

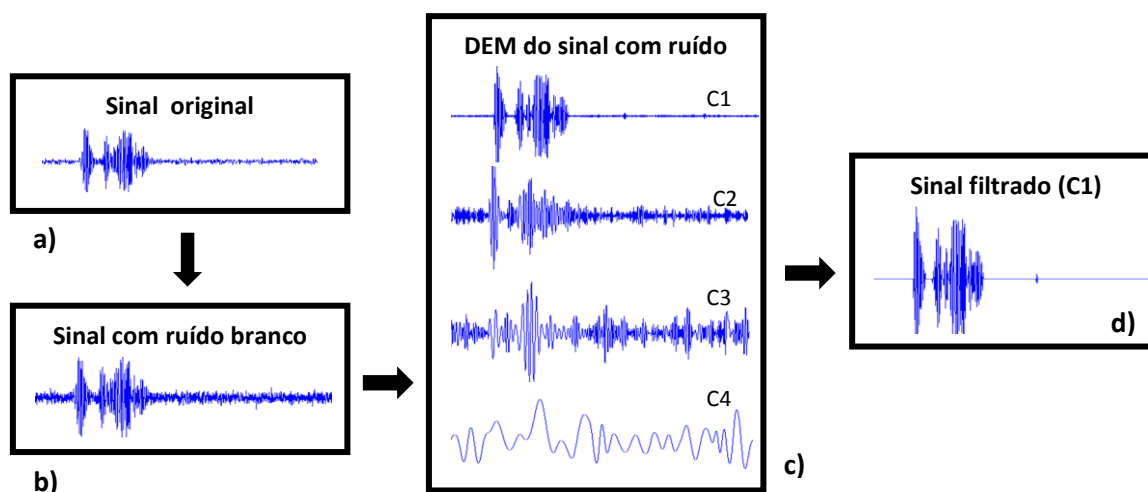


Figura 26. Esquema ilustrativo da aplicação do filtro de limiar adaptativo. a) Sinal adquirido; b) adição de ruído branco; c) decomposição empírica de modos do sinal com ruído (componentes C1 a C4); d) selecção da primeira FMI (C1), tomada como resultado final da filtragem.

Idealmente, o ruído branco tem uma largura de banda infinita, tendendo por isso a conter frequências fora da banda do sinal de interesse. Por isso, a adição do ruído concede à forma da onda original novos extremos locais. A adição de níveis apropriados de ruído branco aos dados originais altera a probabilidade de detecção de picos para as grandes e as pequenas amplitudes de onda do sinal. Para as oscilações de grande amplitude do sinal, a adição de ruído não tem efeito sobre a localização dos extremos detectados. No entanto, no caso de as oscilações serem de pequena amplitude, os extremos detectados no sinal são alterados pelo ruído adicionado. Assim, na primeira FMI (componente C1) obtida da DEM do sinal com ruído adicionado, a parte correspondente a amplitudes pequenas é substituída pela *baseline* da amplitude do ruído, enquanto que as ondas de maior amplitude não são afectadas pelo processo de *sifting*, mantendo a sua forma original [92].

4.2.2.2 Filtro de correlação assistido por ruído

O filtro de correlação assistido por ruído, NAC (*Noise Assisted Correlation*), foi desenvolvido para remover o ruído branco de imagens ultrassónicas, responsável pelo aparecimento de alguns artefactos, nomeadamente na imagem de Nakagami [91].

O algoritmo de remoção de ruído NAC baseia-se na aleatoriedade do ruído branco, e resume-se aos seguintes passos:

1. adição de ruído branco ao sinal original; este passo é executado duas vezes, com obtenção de dois novos sinais, S_1 e S_2 , com ruído adicional;
2. determinação do perfil de correlação entre os dois sinais com ruído;
3. aplicação de um limiar para o valor de correlação calculado; as regiões do sinal correspondentes a correlações inferiores ao limiar são colocadas a zero.

O ruído branco é adicionado aos dois sinais com igual SNR, utilizado a função *awgn* do Matlab. À semelhança do que foi dito para o método anterior, a definição da SNR define a quantidade de ruído filtrada. O valor óptimo para a SNR encontrado para os sinais em análise foi de 3dB, para um bom equilíbrio entre ruído removido e sinal preservado.

O perfil de correlação referido no passo 2 é obtido por meio de uma janela de análise que desliza simultaneamente ao longo dos dois sinais e dentro da qual são calculados os coeficientes de correlação, de acordo com:

$$\rho_{1,2}[n] = \frac{\sum_{k=1+(n-1)\Delta}^{L_0+n\Delta} (S_1[k] - \bar{S}_{1n}) \cdot (S_2[k] - \bar{S}_{2n})^*}{\sqrt{\sum_{k=1+(n-1)\Delta}^{L_0+n\Delta} (S_1[k] - \bar{S}_{1n})^2 \cdot \sum_{k=1+(n-1)\Delta}^{L_0+n\Delta} (S_2[k] - \bar{S}_{2n})^2}} \quad (5)$$

em que n é dado por:

$$n = 1 \dots \frac{N - L_w}{\Delta} + 1 \quad (6)$$

e onde $S_1[k]$ e $S_2[k]$ são os dois sinais com ruído adicionado e k é o índice das amostras dos dois sinais. O símbolo * indica o complexo conjugado, n o número da janela aplicada e N o número total de pontos. L_w é o número de amostras por janela e L_0 é o número de pontos de

sobreposição para a janela de deslizamento. Δ é dado pela diferença entre L_w e L_0 e \bar{S}_{1n} e \bar{S}_{2n} correspondem aos valores médios de S_1 e S_2 na janela n , respectivamente. De acordo com estudos anteriores, a largura da janela L_w deve ser igual à largura de pulso do transdutor [91].

De acordo com este método, as regiões para as quais o valor de ρ é inferior a um dado limiar correspondem a ruído, devendo ser substituídas pelo valor DC ideal. A escolha do valor de correlação, ρ , limite para o qual valores inferiores são removidos do sinal, deve ser feita com base numa análise caso a caso, de acordo com o valor óptimo que permita a remoção razoável de ruído e mantenha a quantidade máxima de informação possível. Valores na literatura apontam para $\rho \sim 80\%$ [91].

O método foi implementado em Matlab, usando uma janela de 80 pontos de largura ($L_w = 80$) e um overlap de 50% para a aplicação da janela ($L_0 = 0,5$). Relativamente ao valor de corte ρ , verificou-se uma grande oscilação do valor óptimo de caso para caso, entre 65 e 95%. O fluxograma ilustrativo do algoritmo base está representado no Anexo D2. A Figura 27 ilustra o processo de filtragem de ruído por este método.

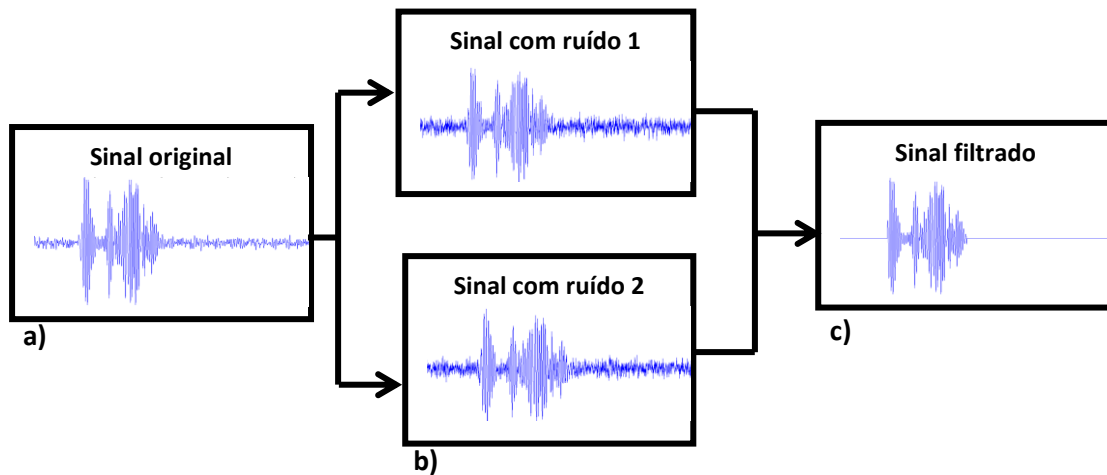


Figura 27. Esquema da aplicação do filtro de correlação assistido por ruído. a) Sinal original; b) adição de ruído ao sinal original, passo repetido duas vezes, com obtenção de dois novos sinais; c) resultado do sinal filtrado, após remoção dos sinais de amplitude inferior

4.2.2.3 Filtro baseado em *wavelets*

A transformada *wavelet* discreta (TWD) é uma ferramenta poderosa na área do processamento de sinais, devido às suas capacidades *multi-resolução*. Contrariamente à transformada de Fourier, a TWD pode ser adequadamente aplicada a sinais não estacionários com fenómenos transitórios, cuja resposta em frequência varia no tempo [94].

A *wavelet* é uma oscilação, de amplitude inicial e final igual a 0. Pode ser comprimida ou dilatada por um factor de escala a , e deslocada por um valor de posição, b , e é representada por:

$$\Psi_{a,b}(t) = \frac{1}{\sqrt{a}} \Psi\left(\frac{t-b}{a}\right) \quad (7)$$

em que Ψ define a *wavelet* mãe. Pelo facto de a escala da *wavelet* poder variar, esta tem a vantagem de poder processar simultaneamente dados no domínio do tempo e na frequência.

O resultado da aplicação da TWD são os coeficientes de detalhe e os coeficientes das aproximações. Os coeficientes representam uma medida da similaridade entre o conteúdo de frequências de um sinal e a função *wavelet* escolhida para análise; são determinados por convolução do sinal com diferentes escalas da função *wavelet*, que podem ser interpretadas como filtros passa-banda dilatados, devido ao facto de apresentarem um espectro semelhante ao de um passa-banda [94].

De um modo geral, a escala da *wavelet* deve corresponder aproximadamente à frequência do sinal. Numa escala reduzida (obtida por compressão da *wavelet*), podem ser analisados os detalhes de variação rápida do sinal, de informação mais refinada, ou seja, as altas frequências, dando origem aos detalhes. Numa escala elevada (obtida por dilatação da *wavelet*), são realçadas as características de variação lenta do sinal, ou seja, as baixas frequências, constituindo a informação mais global do sinal, as chamadas aproximações [87], [94]. A Figura 28 representa as aproximações e detalhes de um sinal exemplo.

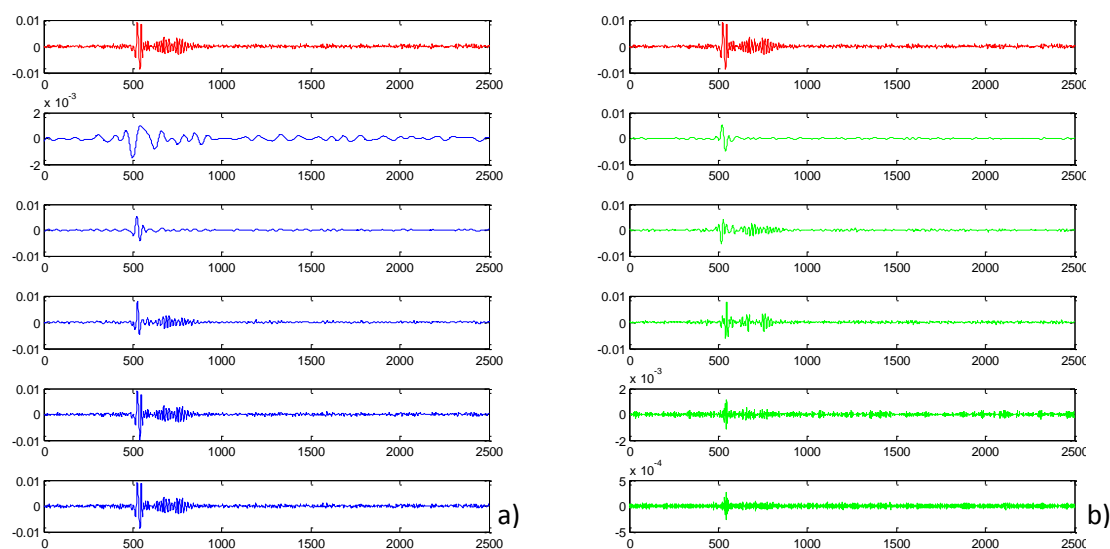


Figura 28. Decomposição por *wavelets* de um sinal, com obtenção das respectivas a) aproximações e (b) detalhes. Foi utilizada a *wavelet* mãe *db9*. Em ambas as imagens, a primeira linha corresponde ao sinal original e as seguintes aos 5 primeiros níveis de decomposição (5 até 1).

A utilização de *wavelets* na filtragem de ruído é relativamente recente, no entanto a sua aplicação tem vindo a aumentar nas últimas duas décadas [87],[90]. Neste método, o ruído é filtrado através da aplicação de limiares aos coeficientes de detalhe. A *Wavelet Toolbox* do Matlab permite fazer esta análise.

O primeiro passo é a escolha de uma *wavelet* mãe que melhor se adapte à aplicação dos sinais em estudo. Esta escolha deve ser feita por comparação com um sinal típico obtido com o transdutor utilizado [35]. Após uma análise das famílias existentes, foi escolhida a *wavelet* *db9*. A Figura 29 mostra a *wavelet* mãe seleccionada (a) e um sinal típico de um reflector plano de referência (b), obtido com o transdutor usado para a aquisição dos sinais.

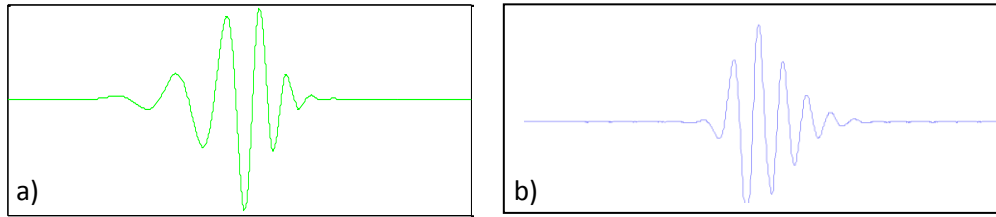


Figura 29. Comparação entre a *wavelet* mãe *db9* (a) e um sinal típico de um refletor de referência (b).

Para além da *wavelet* mãe, é necessária a escolha do nível de decomposições, N , até ao qual é feita a decomposição por *wavelets* do sinal. Este nível influencia a performance do filtro, devendo ser seleccionado empiricamente, caso a caso.

Uma vez decomposto o sinal nas suas aproximações e detalhes, o próximo passo é o *thresholding* dos coeficientes de detalhe. Para cada nível, de 1 até N , é seleccionado um valor de corte para posterior aplicação de *thresholding* aos coeficientes de detalhe. A selecção do melhor valor de corte é um passo essencial: um valor de corte demasiado baixo não filtra adequadamente o ruído, enquanto que um valor de corte demasiado elevado retira detalhes importantes e produz imagens desfocadas e com artefactos. Neste trabalho foi utilizado o *thresholding* universal para definição do valor de corte, proposto em 1994 por Donoho e Johnson [95]. Este método de *thresholding* assume que todos os coeficientes da transformada *wavelet* inferiores ao *threshold* universal, λ_u , correspondem a ruído, devendo ser eliminados. O valor de *threshold* universal é dado por:

$$\lambda_u = \sigma \sqrt{2 \log(n)}, \quad (8)$$

em que n é o número de pontos do sinal e σ o seu desvio padrão.

Após o *thresholding* dos coeficientes, o último passo é a reconstrução do sinal, que é feita com base nos coeficientes de aproximação do sinal original do nível N e dos coeficientes modificados de detalhe dos níveis 1 até N . A Figura 30 mostra o sinal original e o sinal reconstruído, resultado da filtragem de ruído utilizando a *wavelet* mãe *db9*, a um nível de decomposição igual a 10, com *thresholding* universal. O algoritmo de aplicação deste filtro é esquematizado no fluxograma do anexo D3.

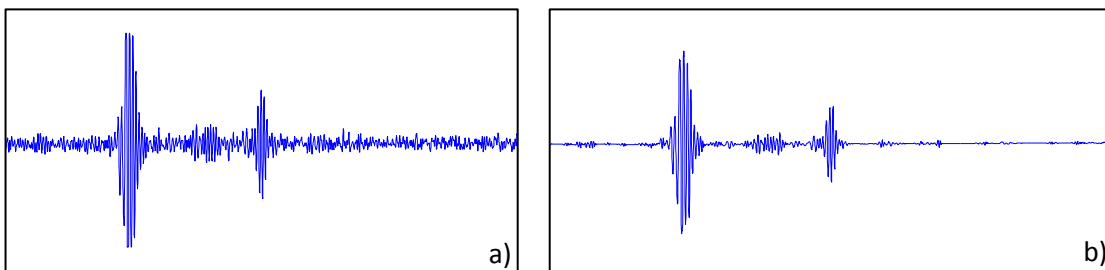


Figura 30. Sinal correspondente à zona central de um cristalino com catarata. Comparação do sinal original (a) com o sinal filtrado (b).

4.2.3 Normalização dos sinais

Sabe-se que, com o evoluir da catarata, a diferença de impedância do cristalino relativamente ao meio de imersão aumenta, levando a um aumento da amplitude do eco da cápsula anterior. No entanto, esta amplitude não é comparável para diferentes aquisições, uma vez que depende demasiado das condições de aquisição, de acordo com o que foi explicado na secção 4.1.3.2. Assim, optou-se por excluir a variabilidade induzida pelo método de aquisição, ao normalizar os sinais relativamente ao sinal máximo adquirido, correspondente à região central da cápsula anterior. Deste modo é desprezada a variação provocada pelo aumento da diferença de impedâncias, já que esta não constitui uma característica fiável para avaliação do estado do tecido do cristalino.

Esta normalização acaba por ser feita durante o passo da reconstrução da imagem modo B, aquando da conversão para escala de cinzentos. Assim, o ponto central da cápsula, correspondente à intensidade máxima do sinal, terá sempre o valor 255 na escala de amplitudes, enquanto que o fundo, de ruído removido, terá valor igual a 0.

4.3 Visualização do cristalino

As imagens paramétricas são geralmente utilizadas para fornecer um mapa espacial de um determinado parâmetro que caracterize o tecido. Este tipo de representação pode ter um contributo importante para uma ideia mais geral das características do tecido, e em particular das suas variações espaciais. Isto pode ter particular interesse no caso do cristalino, para identificação da localização espacial das opacidades ou regiões de maior dureza, o que pode ser relevante na identificação do tipo e extensão de catarata. Neste sentido, foi aplicada a distribuição de Nakagami descrita na secção 3.2.2 à caracterização do tecido, de modo a obter uma imagem paramétrica do parâmetro m da referida distribuição.

4.3.1 Distribuição de Nakagami na visualização do cristalino

A função de densidade de probabilidade da distribuição de Nakagami, $f(R)$, calculada a partir da envolvente dos sinais de *backscattering*, R , é dada por:

$$f(R) = \frac{2m^m 2^{m-1}}{\Gamma(m)\Omega^m} e\left(-\frac{m}{\Omega}R^2\right)U(R), \quad (9)$$

onde $\Gamma(\cdot)$ e $U(\cdot)$ são as funções *gamma* e degrau unitário, respectivamente [22], [64], [65]. O parâmetro de Nakagami m e o parâmetro de escala Ω , são calculados através de

$$m = \frac{[E(R^2)]^2}{E[R^2 - E(R^2)]^2} \quad (10)$$

e

$$\Omega = E(R^2), \quad (11)$$

onde $E(.)$ é a média estatística. O parâmetro m é particularmente útil para caracterizar as distribuições de probabilidade da envolvente dos sinais de *backscattering*, incluindo as condições estatísticas para distribuições pré-Rayleigh, Rayleigh e pós-Rayleigh. Quando a célula de resolução¹¹ contém *scatterers* para os quais os cortes transversais de *backscattering* variam aleatoriamente, com grau de variância relativamente elevada, a estatística da envolvente dos sinais de *backscattering* segue uma distribuição pré-Rayleigh. Quando a célula de resolução do transdutor contém um número elevado de *scatterers* aleatoriamente distribuídos, a estatística da envolvente dos sinais de *backscattering* obedece à distribuição de Rayleigh. No caso de a célula de resolução conter *scatterers* de localização periódica em associação com *scatterers* aleatoriamente distribuídos, a estatística da envolvente do sinal de *backscattering* segue uma distribuição pós-Rayleigh [22], [64], [65].

O parâmetro m varia de acordo com a distribuição da amplitude média dos sinais de *backscattering*, com valor compreendido entre 0 e 1 nos casos em que a distribuição é pré-Rayleigh. O valor pode ser aproximadamente 1 para uma distribuição Rayleigh e maior que 1 quando a distribuição é pós-Rayleigh [22], [64], [65]. A variação do aspecto da distribuição em função do parâmetro m é ilustrada na Figura 31.

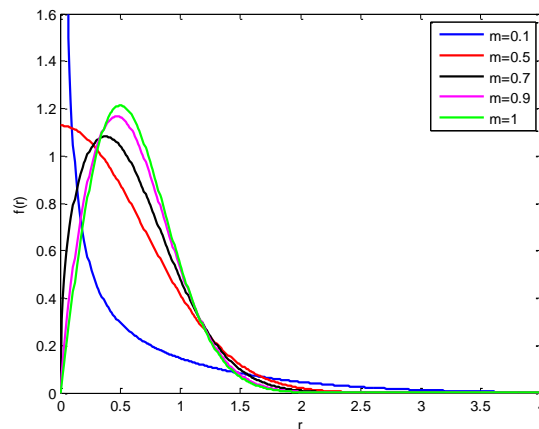


Figura 31. Distribuição de Nakagami para diferentes valores do parâmetro m .

Em tecidos biológicos, o parâmetro m apresenta valores inferiores a 1, e funciona como indicador da concentração de *scatterers*. A capacidade do parâmetro m de reflectir a variação de concentrações de *scatterers* no tecido pode ser otimizada por meio da compressão logarítmica do sinal, tal como referido na secção 3.2.2. Para tal as envolventes do sinal de *backscattering* devem ser comprimidas previamente à determinação dos parâmetros da distribuição, dando origem à envolvente comprimida, Z , de acordo com a equação (12). Ao aplicar a equação (10) a esta envolvente obtém-se o parâmetro de Nakagami comprimido, m_{log} , já anteriormente referido.

$$Z = \log_{10}(R + 1) \quad (12)$$

Usando as equações (9), (10), (11) e (12), o valor médio do parâmetro m de Nakagami pode ser determinado para um sinal. Para tal, é aplicada uma janela móvel a uma região de interesse do sinal. Esta região de interesse deve excluir o sinal referente às cápsulas de modo a

¹¹ Volume definido pelas dimensões correspondentes à resolução axial e lateral do transdutor.

que esta não interfira na estatística dos sinais da zona de interesse. O tamanho da janela aplicada é importante na resolução da imagem de Nakagami: quanto menor a janela, melhor a resolução da imagem. No entanto, uma janela pequena implica poucos pontos para a estimação do parâmetro m , podendo levar a resultados inconsistentes [20–22].

4.3.1.1 Imagem paramétrica de Nakagami

A imagem de Nakagami é construída a partir da imagem modo B, e corresponde a uma representação bidimensional dos valores obtidos do parâmetro de Nakagami m . Esta imagem é obtida usando uma janela móvel para processar a envolvente do sinal representado na imagem B-scan que, aplicada a cada ponto da imagem, permite obter um valor do parâmetro m . Neste trabalho usou-se uma largura da janela igual à largura de pulso do transdutor. A largura de pulso do transdutor usado na aquisição destes dados é aproximadamente $0,39\mu\text{s}$ o que, tendo em conta a frequência de amostragem de 200MHz , corresponde a uma largura da janela de 78 pontos. Esta janela é aplicada linha a linha (A-scan a A-scan) e dentro de cada linha ponto a ponto, correspondendo a um *overlap* de 99%. Deste modo é garantido que todos os pontos do sinal original tenham igual peso na determinação dos campos da imagem paramétrica. A janela é aplicada até ser percorrida toda a imagem, obtendo-se assim um mapa de valores do parâmetro de Nakagami m . A Figura 32 ilustra o processo de estimação do parâmetro m a partir de um sinal A-scan.

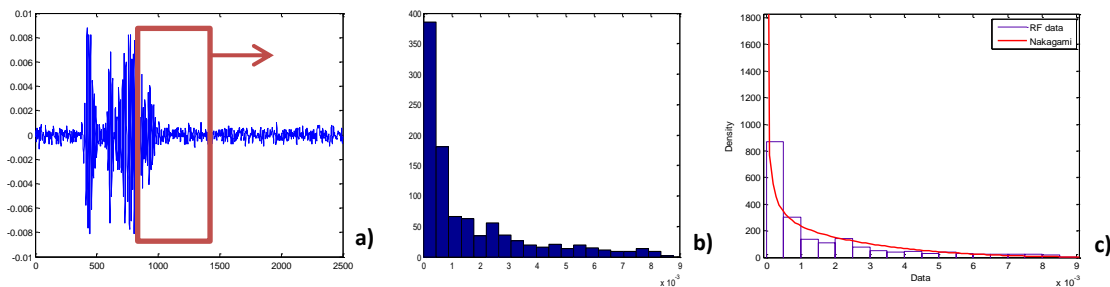


Figura 32. Representação esquemática da obtenção do valor do parâmetro m de Nakagami. a) Aplicação da janela, ponto a ponto, à região de interesse; b) obtenção do histograma da envolvente do sinal em cada janela; c) representação gráfica do histograma com o respectivo ajuste da distribuição de Nakagami.

A escala de cores usada na representação da imagem foi seleccionada de modo a maximizar a informação visível no que diz respeito à variação do parâmetro de Nakagami. A escala utilizada é a *jet*, definida no Matlab, na qual as cores são atribuídas numa escala que varia do azul ao vermelho, à medida que os valores aumentam de 0 para 1.

Apesar da boa aceitação como complemento às imagens B-scan, a imagem paramétrica de Nakagami tem alguns inconvenientes relativamente à quantificação da concentração de *scatterers*, nomeadamente devido à sua susceptibilidade a artefactos gerados pelo efeito do ruído em regiões do tecido com baixa ecogenicidade [91]. Para contornar este efeito, o ruído deve ser filtrado dos sinais antes da determinação da imagem de Nakagami, por um dos métodos referidos na secção 4.2.2. Os resultados obtidos pela aplicação dos diferentes métodos são apresentados e discutidos no Capítulo 5, na secção 5.3.

4.4 Caracterização do cristalino

4.4.1 Definição de regiões de interesse

A região de interesse, também designada por ROI (*Region of Interest*), é a região alvo do processamento, por possuir informação relevante para uma determinada análise. A região de interesse pode ser definida automaticamente a partir de parâmetros da própria imagem ou definida manualmente pelo utilizador. Neste trabalho, as regiões de interesse foram detectadas de forma semiautomática, para selecção de regiões correspondentes nas diferentes imagens adquiridas. Para diferentes abordagens de análise foram seleccionadas diferentes regiões de interesse.

Sabe-se que a espessura da cápsula do cristalino aumenta com a idade, variando de 15 a 30 μ m nos humanos [99]. Devido à importância que a manutenção da integridade da cápsula posterior do cristalino tem na cirurgia de remoção da catarata, esta região anatómica do cristalino tem sido alvo de investigação. Sabe-se hoje que o envelhecimento da cápsula anterior do cristalino está associado a uma perda progressiva da sua elasticidade. A cápsula jovem é elástica e altamente resistente, enquanto que a cápsula de um cristalino mais velho é mais espessa, menos extensível e muito mais frágil, apresentando uma resistência à ruptura marcadamente mais reduzida [99].

A espessura da cápsula já foi utilizada como característica para a avaliação do estado da catarata [46]. Efectivamente existe uma alteração da estrutura da cápsula com o evoluir da catarata, que se traduz num aumento da sua impedância acústica. No entanto, o sinal reflectido da cápsula tem uma amplitude muito superior aos ecos do interior do cristalino, o que dificulta o processo de análise sinais de *backscattering*, de menor amplitude, que permitem a caracterização da sua microestrutura. Considerou-se por este motivo importante separar o sinal correspondente à cápsula anterior do sinal correspondente ao interior do cristalino (região cortical e nuclear).

Para além do sinal da cápsula, também os restos da íris presentes na região equatorial do cristalino interferem com os sinais da região de interesse. Como estes sinais não fornecem qualquer informação para a caracterização do cristalino, a ROI é definida apenas para a região central do cristalino, garantindo assim a exclusão de sinais desta estrutura. Para além do sinal da cápsula e da íris, um outro parâmetro a considerar é a extensão da análise em profundidade. Por exemplo, em algumas abordagens, é necessária a detecção do sinal da cápsula posterior do cristalino.

Em suma, a definição concreta das regiões de interesse tem em conta a profundidade da extensão da região de análise e a inclusão ou exclusão das cápsulas e da íris, com algumas variantes para adaptação às diferentes abordagens de análise. A selecção da região de interesse é por isso feita caso a caso, de acordo com as metodologias descritas de seguida.

A Figura 33 mostra um exemplo de um B-scan original dos sinais adquiridos, em toda a sua extensão (a) e uma região seleccionada de (a), correspondente ao cristalino (b). Seguidamente é explicado em detalhe como, a partir da região (b), são obtidas as cinco regiões de interesse para posterior processamento.

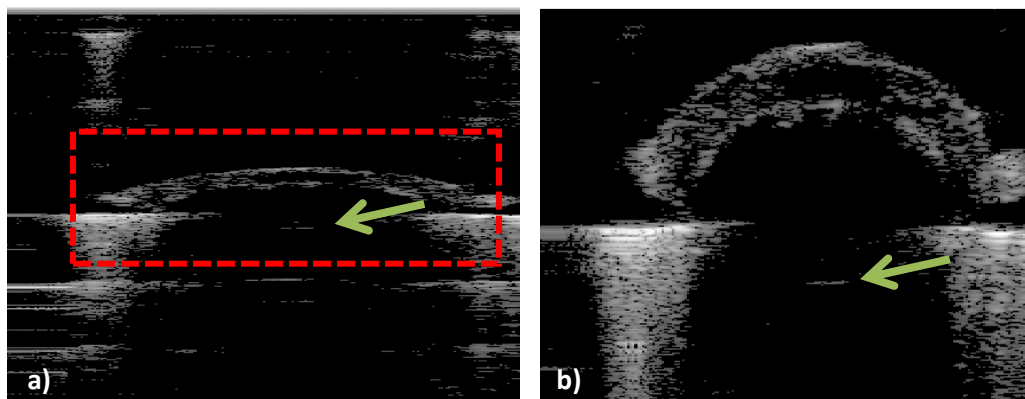


Figura 33. Realce de diferentes regiões da imagem modo B adquirida. a) B-scan completo dos dados adquiridos de um cristalino com catarata; b) ampliação da região seleccionada pelo rectângulo vermelho. As setas verdes indicam a cápsula posterior em ambas as imagens.

Região 1

A primeira região de interesse é obtida pela segmentação dos sinais adquiridos pelo sistema, representados na Figura 33 a), seleccionando apenas o hemisfério anterior do cristalino e removendo os sinais referentes ao suporte e ao reflector visíveis. Este passo do processamento é importante uma vez que os sinais de emissão, do suporte e do reflector são muito mais intensos que os ecos recebidos do interior do cristalino, dificultando assim a análise da sua microestrutura. É por isso seleccionada uma região que exclua todos estes sinais, mantendo apenas o sinal do lado anterior do cristalino. Esta selecção é feita de modo a manter uma janela igual para todas as amostras, de 1620 amostras em profundidade e de 200 linhas de A-scan em largura. A redução do número de linhas de A-scan é importante para os passos seguintes de processamento, por questões de redução de tempo computacional. A redução é feita através da selecção de apenas alguns índices, correspondentes a linhas de A-scan igualmente espaçadas entre si. O número elevado de aquisições por unidade de tempo, traduzido pela PRF, permite a aplicação deste método de redução de linhas sem que haja perda significativa de informação. A região obtida é representada na Figura 34. Esta região é utilizada essencialmente para representação visual do cristalino.

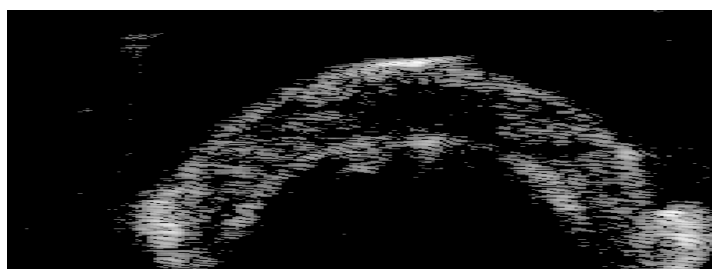


Figura 34. Imagem típica de um cristalino com catarata, correspondente à Região 1.

Região 2

Esta região de interesse é seleccionada a partir da anterior, mas de modo a manter apenas a região central do cristalino, excluindo a zona equatorial com sinais relativos à íris. O sinal da cápsula é incluído.

A região é obtida por construção de uma máscara binária para definição dos limites do cristalino. Para tal é calculado um valor médio da curvatura do cristalino com base em sinais de cristalinos com cataratas de estados mais avançados, em que a interface solução-cristalino é bem definida, ao longo de toda a extensão da cápsula. Assumindo que a curvatura da cápsula não sofre alterações com a evolução da catarata, esta máscara é aplicada aos sinais dos estados mais iniciais, em que muitas vezes os limites da interface solução/cristalino são ainda vagos. É incluída uma margem de segurança igual à largura de pulso (78 pontos) aos limites da cápsula detectados, de modo a evitar eventuais perdas do sinal da cápsula devidas a falhas na detecção dos seus limites. Ao longo do eixo horizontal, a selecção dos 9mm centrais do cristalino garantem a exclusão da íris na imagem. O resultado final é apresentado na Figura 35 a).

Região 3

Este caso é semelhante ao anterior, à excepção de que os sinais da cápsula são excluídos, realçando a informação do interior do cristalino. Ao longo do eixo horizontal, é usada a mesma região central que na definição da Região 1, de 9mm de largura.

Para cristalinos de suíno, a espessura média da cápsula de animais com cerca de 6 meses de idade é de $60\mu\text{m}$ [100]. Considerando uma velocidade média de 1700ms^{-1} , a espessura da cápsula corresponde temporalmente a $0,035\mu\text{s}$. Como a resolução do transdutor não permite a visualização de estruturas tão pequenas, considerou-se neste estudo que o sinal correspondente à cápsula tem comprimento igual à largura de pulso ($0,39\mu\text{s}$) o que, tendo em conta a frequência de amostragem considerada (200MHz), corresponde a 78 pontos na imagem modo B. O resultado final é apresentado na Figura 35 b).

Região 4

A definição desta região é semelhante à anterior, variando apenas na largura da região central considerada. Para alguns métodos de análise é importante que o sinal da cápsula anterior esteja bem definido, o que para cristalinos saudáveis e estados iniciais de catarata por vezes só acontece numa região pequena do centro. Assim, a Região 4 corresponde a uma região de apenas um milímetro de largura, no centro do cristalino. Em profundidade, esta ROI compreende todo o hemisfério anterior do cristalino. Um exemplo de uma região deste tipo é apresentado na Figura 35 c).

Região 5

Este caso é uma extensão do método anterior em que, para além da cápsula anterior, é necessária a identificação da cápsula posterior. Assim, a região é definida da mesma forma, para uma região central de 1mm de largura, mas para uma profundidade de cerca de 1cm, de modo a incluir também o sinal da cápsula posterior. Esta região é obtida a partir dos sinais apresentados na imagem (b) da Figura 33. O resultado é apresentado na Figura 35 d).

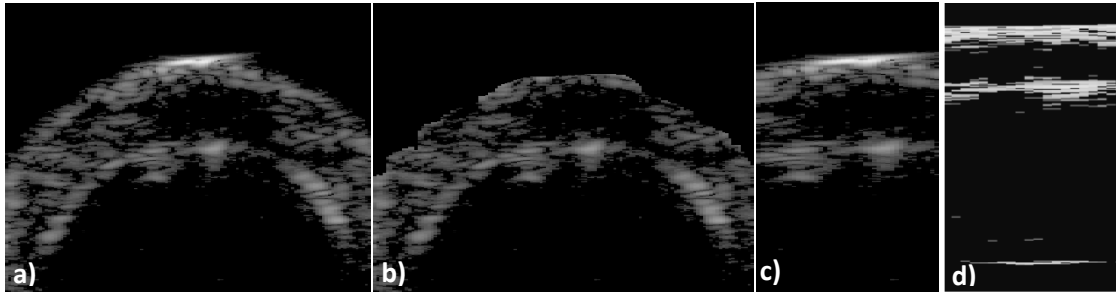


Figura 35. Representação das regiões de interesse 2 a 5. a) Região 2; b) Região 3; c) Região 4; d) Região 5.

4.4.2 Extracção de características

A extracção de características é o processo de definição de parâmetros descritivos para os dados referentes a um dado acontecimento. O objectivo deste passo de análise é a obtenção de parâmetros que permitam traduzir com menor dimensionalidade e de modo mais significativo a informação contida nos sinais originais. Nesta secção são descritos os diferentes métodos de extracção de características a partir dos sinais acústicos adquiridos, agrupados em quatro abordagens distintas: análise textural, análise espectral, análise estatística e análise de parâmetros acústicos.

4.4.2.1 Análise textural

A textura é uma das principais características na interpretação de imagens médicas, cuja análise tem muitas vezes como base a interpretação da aparência do tecido. Esta é geralmente descrita em termos de suavidade, granulidade, regularidade e homogeneidade. Estas características estão relacionadas com variações locais na intensidade dos sinais e podem ser quantificadas por meio de métricas de textura [101].

A textura é uma forma de representação de uma região seleccionada. Pode ser atribuída a pequenas áreas locais, a secções relativamente grandes da imagem, a regiões segmentadas ou ainda a regiões de interesse previamente definidas [101]. Neste estudo, e para esta abordagem de análise, a região de interesse para a extracção de características texturais engloba o hemisfério anterior do cristalino, excluindo a íris e a cápsula (Região 3, definida na secção 4.4.1). Para a caracterização da imagem foram extraídas métricas pela estatística de primeira ordem, segunda ordem e ordem superior, características espectrais obtidas pela transformada de Fourier e a dimensão fractal [101]. As diferentes características extraídas são de seguida explicadas em detalhe.

Estatísticas de primeira ordem

Uma região suave da imagem contém píxeis que variam numa pequena gama de valores, enquanto que uma região mais rugosa apresenta uma maior variabilidade de valores. Esta propriedade permite usar os momentos estatísticos do histograma de intensidades da região como métrica de textura. Devido ao facto de serem derivados do histograma, estes momentos estatísticos não contêm informação espacial, não fornecendo qualquer informação sobre a relação entre os píxeis [101].

Numa imagem com K níveis de cinzento, considerando uma região de valor médio μ , e o histograma $h(k)$ com k compreendido entre 0 e $K - 1$, o momento de ordem n é dado por:

$$m_n = \frac{1}{K} \sum_{k=0}^{K-1} (k - \mu)^n h(k) \quad (13)$$

Para $n = 1$, obtém-se a média do histograma, que representa a média dos níveis de cinzento presentes na imagem e está relacionada com o brilho da textura. O momento de ordem 2 é a variância, uma medida de textura comum. Correlaciona-se bem com a percepção visual de rugosidade e é pouco exigente a nível computacional. Os momentos 3 e 4, enviesamento (*skewness*) e achatamento (*kurtosis*), reflectem a assimetria e uniformidade do histograma, respectivamente, e estão relacionados com as variações de intensidade dentro da região em análise [101]. Outras características que podem ser extraídas são o desvio padrão, a moda e a mediana.

A. Estatísticas de segunda ordem

Ao contrário do que é o caso para as estatísticas de primeira ordem, as estatísticas de segunda ordem têm em conta a distribuição espacial de níveis de cinzento na imagem. O cálculo de muitas métricas de textura que contêm informação espacial é baseado na matriz de co-ocorrência de níveis de cinzento, GLCM (*Gray Level Co-occurrence Matrix*). A GLCM foi proposta por Haralick em 1973 [102] e consiste numa representação do número de combinações de valores de intensidade existentes numa imagem. Assim como a construção do histograma consiste num passo de pré-processamento que prepara os dados para obtenção das métricas da estatística de primeira ordem, a construção da matriz de co-ocorrência é um passo inicial de compilação de informação espacial e estatística para o cálculo de métricas de textura extraídas da estatística de segunda ordem [101].

A GLCM considera a relação entre dois píxeis de cada vez, o chamado píxel de referência e o píxel vizinho. O píxel vizinho pode ser considerado em qualquer orientação em relação ao píxel de referência. A vizinhança considerada pode também variar, não sendo necessariamente apenas igual a um píxel. Para a construção da matriz, cada píxel da imagem é considerado o píxel de referência, iniciando no canto superior esquerdo e procedendo até ao inferior direito. Os vários elementos da matriz podem assim ser denotados por $C_d^\theta(i, j)$, que corresponde ao número de píxeis na imagem de níveis de cinzento i e j , distanciados por d segundo a direcção θ . Desta forma, matriz de co-ocorrência prepara os dados para evidenciar as estruturas ou regiões numa dada direcção e de dimensão maior ou igual à distância d seleccionada [101].

Neste trabalho, quatro valores de θ (0° , 45° , 90° e 135°) foram utilizados como orientações. Para a distância, foi usado $d = 1$ para θ igual a 0° ou 90° e $d = \sqrt{2}$ quando θ é igual a 45° ou 135° , correspondentes aos valores tipicamente usados, por revelarem bom desempenho na posterior avaliação de texturas [101]. Uma vez construída a matriz de co-ocorrência, foram extraídas várias métricas de textura, enumeradas de seguida [101].

1. Energia

A energia quantifica a homogeneidade textural, e é dada por [101]:

$$Energia = \sum_{i=0}^{K-1} \sum_{j=0}^{K-1} C_{ij}^2 \quad (14)$$

Numa região homogénea, existem poucas transições de níveis de cinzento e a maioria dos pares de píxeis têm valores iguais ou muito próximos, levando a valores de C_{ij} elevados nessa região. Já uma imagem mais heterogénea tem muitas transições de cinzentos, levando a valores mais pequenos de C_{ij} . Assim, uma região heterogénea tem um valor de energia inferior ao de uma região homogénea. Esta métrica é sensível a transições de intensidade, mas não à magnitude dessas transições [101].

2. Inércia

A medida de inércia quantifica o contraste textural e é dada por [101]:

$$Inércia = \sum_{i=0}^{K-1} \sum_{j=0}^{K-1} (i - j)^2 C_{ij}, \quad (15)$$

que pesa cada elemento C_{ij} com a diferença de níveis de cinzento $(i - j)$ entre os píxeis considerados. Desta forma, transições mais elevadas são enfatizadas, tornando a métrica sensível a variações locais de contraste. A inércia terá valores baixos em regiões homogéneas e elevados para regiões heterogéneas de contraste elevado [101].

3. Entropia

A entropia quantifica o nível de aleatoriedade de níveis de cinzento na região, e é dada por:

$$Entropia = - \sum_{i=0}^{K-1} \sum_{j=0}^{K-1} C_{ij} \log C_{ij} \quad (16)$$

A entropia toma valor máximo quando todos os valores C_{ij} são iguais, o que acontece quando todas as transições de intensidade são igualmente presentes. A entropia pode ser usada para distinguir tecido de textura mais complexa (valores mais elevados de entropia) de tecido com menos estrutura, de textura mais simples (valores mais baixos de entropia) [101].

4. Correlação

A métrica de correlação mede a dependência linear entre os diferentes níveis de cinzento na imagem, e é dada por [101]:

$$Correlação = \frac{\sum_{i=0}^{K-1} \sum_{j=0}^{K-1} (ij) c_{ij} - \mu_x \mu_y}{\sigma_x \sigma_y} \quad (17)$$

em que μ_x , μ_y , σ_x e σ_y representam a média e desvio padrão das distribuições secundárias, derivadas da matriz do co-ocorrência, dadas por:

$$c_x(i) = \sum_{j=0}^{K-1} c_{ij} \quad \text{e} \quad y(j) = \sum_{i=0}^{K-1} c_{ij} \quad (18 \text{ e } 19)$$

Valores elevados de correlação estão associados à presença de elementos repetitivos nos elementos da textura.

5. Homogeneidade

A homogeneidade representa a proximidade da distribuição dos elementos em relação à diagonal da matriz GLCM, e é dada por:

$$Homogeneidade = \sum_{i=0}^{K-1} \sum_{j=0}^{K-1} \frac{c_{ij}}{1 - |i - j|} \quad (20)$$

Esta métrica quantifica a homogeneidade da imagem assumindo valores maiores para diferenças de níveis de cinzentos menores. É mais sensível à presença de elementos perto da diagonal da GLCM, possuindo valor máximo quando todos os elementos da imagem são iguais.

B. Estatísticas de ordem superior

As estatísticas de ordem superior podem ser extraídas da chamada matriz de comprimento de sequências de níveis de cinzento, GLRLM (*Gray Level Run Length Matrix*). A GLRLM foi introduzida em 1975 por Galloway [103], e consiste na contagem do número de sequências de píxeis com a mesma intensidade numa dada orientação. Píxeis consecutivos ao longo de uma dada orientação tendem a ter valores iguais em regiões lisas enquanto que os seus valores variam significativamente em regiões rugosas. A informação relativa ao comprimento da sequência é geralmente obtida usando as orientações $\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ e 135° . Para cada orientação θ , o número de sequências com um comprimento de píxeis j e um nível de cinzento i é obtido para formar a matriz de comprimento de sequências de entradas $p(i, j)$. A textura pode ser quantificada por análise dos histogramas de comprimento de sequências para diferentes orientações, através de diversas métricas. Neste trabalho foram usadas a SER (*Short Run Emphasis*), a LRE (*Long Run Emphasis*), a GLNU (*Gray Level Non-Uniformity*), a RP (*Run Percentage*), a RLNU (*Run Length Non-Uniformity*), a LGLRE (*Low Gray Level Run Emphasis*) e a HGLRE (*High Gray Level Run Emphasis*) [104], [105]. Uma breve explicação de cada uma das métricas e da sua forma de cálculo é dada na Tabela 1.

Tabela 1. Métricas extraídas da matriz de comprimento de seqüências de níveis de cinzento. M é o número total de níveis de cinzento, N o número máximo possível de comprimento de seqüências e n_r , o número de pixels da imagem ou região de interesse.

Equação	Descrição
$SRE = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N \frac{p(i,j)}{j^2}$	Mede a distribuição de seqüências curtas. Tem valores elevados para texturas regulares e suaves.
$LRE = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N p(i,j) * j^2$	Mede a distribuição de seqüências longas. Tem valores elevados para texturas estruturalmente rugosas.
$GLNU = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^M \left(\sum_{j=1}^N p(i,j) \right)^2$	Mede a similaridade dos valores de níveis de cinzento ao longo de uma imagem. Apresenta valores baixos para distribuições uniformes de níveis de cinzento.
$RP = \frac{n_r}{p(i,j)*j}$	Mede a homogeneidade e a distribuição das seqüências de uma imagem numa direcção específica. Apresenta um valor elevado quando o comprimento das seqüências é 1 para todos os níveis de cinzento para essa direcção.
$RLNU = \frac{1}{n_r} \sum_{j=1}^N \left(\sum_{i=1}^M p(i,j) \right)^2$	Mede a similaridade do comprimento das seqüências ao longo de uma imagem. Apresenta valores baixos quando a distribuição de comprimentos de seqüências é uniforme.
$LGLRE = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N \frac{p(i,j)}{i^2}$	Mede a distribuição de valores de níveis de cinzento baixos. Apresenta valores maiores para imagens com níveis de cinzento mais baixos.
$HGLRE = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N p(i,j)*j^2$	Mede a distribuição de valores de níveis de cinzento elevados. Apresenta valores maiores para imagens com níveis de cinzento mais elevados.

C. Características espectrais

As texturas que apresentam estrutura periódica ou aproximadamente periódica são particularmente adequadas à sua quantificação por meio da transformada de Fourier. A transformada de Fourier discreta (TFD) de uma imagem M por N , $f(x,y)$, é dada por:

$$F(u, v) = \frac{1}{MN} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) e^{-j2\pi(\frac{ux}{M} + \frac{vy}{N})} \quad (21)$$

e contém informação sobre a orientação da textura, granulosidade e contraste da imagem. A TFD é uma boa abordagem à quantificação de textura uma vez que padrões repetitivos a nível global são difíceis de descrever com técnicas espaciais, mas relativamente fáceis de representar por meio de picos no espectro. A amplitude da TFD é obtida por meio de:

$$S(u, v) = \sqrt{F(u, v)F^*(u, v)} \quad (22)$$

onde $F^*(u, v)$ é o complexo conjugado de $F(u, v)$. Este espectro de potência é expresso em coordenadas polares por meio de uma nova função $Q(r, \theta)$, em que cada píxel é referenciado por uma distância à origem $r = \sqrt{u^2 + v^2}$ e um ângulo $\theta = \tan^{-1}\left(\frac{v}{u}\right)$. A distância r é a frequência do píxel, e o ângulo θ a sua orientação no domínio do espaço. Para uma textura com uma dada periodicidade e direcção, o espectro exhibe um pico na frequência r e orientação θ correspondente. A presença de textura de uma dada periodicidade, em qualquer direcção, pode ser quantificada pela soma da frequência espacial correspondente, r_t , dada por:

$$T(r_t) = \sum_{\theta=0}^{\pi} Q(r_t, \theta) \quad (10)$$

A textura de qualquer tamanho, numa dada orientação θ_t , pode ser medida por meio de:

$$T(\theta_t) = \sum_{r=r_l}^{r_m} Q(r, \theta_t) \quad (23)$$

em que r_l e r_m são respectivamente o mínimo e o máximo que delimitam a frequência de interesse, que devem ser seleccionadas de modo a representar o maior e o menor tamanho e grão, respectivamente. As duas funções $T(r_t)$ e $T(\theta_t)$ obtidas ao variar os valores de r_t e θ_t seleccionados fornecem informação abrangente sobre a textura na região analisada. A análise estatística destas duas funções permite retirar características tais como a periodicidade e orientação predominante (dadas pelos seus valores máximos) ou valores globais de periodicidade e orientação (dadas pelos seus valores médios). Também a variância e outros momentos estatísticos destas funções podem ser usadas como descritores [101].

D. Dimensão fractal

A teoria dos fractais introduzida em 1983 por Mandelbrot [106] consiste numa abordagem à análise de figuras geométricas complexas, relativamente à sua rugosidade, que pode ser quantificada através da dimensão fractal. Considerando um objecto geométrico num espaço de dimensão N , em que N é o menor inteiro que permite ao espaço conter o objecto, o número de pequenas esferas (ou cubos) de diâmetro (ou aresta) ϵ necessários para preencher o objecto, é dado por:

$$n(\epsilon) = a\epsilon^{-D} \quad (24)$$

em que a é uma constante e D é a dimensão de Hausdorff. A dimensão fractal tem sido usada na análise de textura de imagens médicas: texturas rugosas levam a valores elevados de D , enquanto que texturas lisas levam a valores mais reduzidos [101].

4.4.2.2 Análise espectral dos sinais

A análise no domínio da frequência de sinais acústicos oferece melhorias na imagiologia médica e caracterização de tecidos, pois permite extrair maior informação sobre a interacção dos ultrassons com a microestrutura dos tecidos [47]. Nas últimas duas décadas, os investigadores têm usado métodos de análise espectral para caracterização de sinais (ou a

respectiva envolvente), a fim de extrair informação quantitativa sobre a estrutura do tecido, de modo a obter uma ferramenta de diagnóstico mais eficaz [84], [85], [107], [108].

As características de amplitude, fase e atenuação em frequência dos sinais refletem a estrutura, homogeneidade, densidade e morfologia do tecido. Esta informação é útil na interpretação de segmentos de tecido em termos das suas estruturas determinísticas e estocásticas. Muitas estruturas determinísticas produzem picos espectrais periódicos, o chamado “*pricklepattern*”. Estruturas estocásticas contêm grandes quantidades de pequenos *scatterers* de localização aleatória [47].

A. Parâmetros extraídos da densidade espectral de potência

A função Densidade Espectral de Potência, PSD (*Power Spectral Density*), de um sinal define a densidade de potência por unidade de banda em função da frequência desse sinal. A PSD é geralmente representada em dB/Hz. Existem vários parâmetros acústicos que podem ser derivados a partir da densidade espectral de potência dos sinais. As características extraídas neste trabalho foram o declive espectral, a ordenada na origem e o ajuste na banda central, o coeficiente de backscattering integrado e a frequência central [84], [107].

1. Coeficiente de *backscattering* integrado

O coeficiente de backscattering integrado, IBS (*Integrated Backscatter*) dá uma estimativa da energia do sinal de *backscattering*, e tem sido muito utilizado como medida de caracterização de tecido [84]. Este parâmetro é dado por:

$$IBS = \sum_{LB} PSD(f) \quad (25)$$

em que a PSD é estimada a partir da transformada de Fourier discreta e o somatório é realizado sobre a largura de banda (LB).

2. Frequência central

A frequência central (FC) é obtida pela média da PSD ao longo da largura de banda, e é calculada de acordo com a equação (26).

$$FC = \frac{\sum_{LB} f \cdot PSD(f)}{IBS} \quad (26)$$

A variação da FC está relacionada com a atenuação do sinal em função da sua frequência, que leva ao chamado *downshift* da frequência central. Este fenómeno ocorre devido ao facto de nos tecidos, bem como na generalidade dos materiais, a atenuação aumentar com a frequência. Esse facto faz com que o valor médio da frequência central sofra um desvio no sentido das baixas frequências.

3. Declive espectral, ordenada na origem e ajuste na banda central

O declive espectral e a ordenada na origem são parâmetros geralmente utilizados para caracterizar o espectro, e são obtidos através do ajuste linear feito no espectro ao longo da

largura de banda. O ajuste na banda central corresponde ao valor da regressão linear para frequência central.

O declive espectral é afectado pela atenuação e está relacionado com as dimensões efectivas dos *scatterers* do tecido. A ordenada na origem não é afectada pela atenuação; está relacionada com as dimensões efectivas, concentrações e impedâncias acústicas relativas dos *scatterers*. O *fit* na banda central é afectado pela atenuação e está, de um modo geral, relacionado com as propriedades do tecido já referidas [107].

B. Parâmetros extraídos do espectro de Hilbert

A determinação de parâmetros espectrais com significado físico requer alguns pressupostos relativamente às características do sinal. Em particular, o sinal deve ser estacionário ou de conteúdo periódico dentro da janela em análise; caso contrário o espectro obtido terá pouco significado físico. Os sinais obtidos dos cristalinos são, no entanto, não estacionários. Por isso, os métodos convencionais para a determinação da densidade espectral de energia, por meio da transformada de Fourier, não são os mais adequados. Foi com base no pressuposto da estacionaridade e linearidade dos sinais, que surgiu um novo método de representação em tempo-frequência para análise de sinais, a transformada de Hilbert-Huang, HHT (*Hilbert Huang Transform*). Este método pode ser aplicado a sinais não lineares e não estacionários, tendo por isso encontrado aplicabilidade na área da engenharia biomédica [109].

Para a representação dos sinais em tempo-frequência através da HHT, o primeiro passo é a decomposição empírica de modos do sinal, já descrita na secção 4.4.2. Após a decomposição, o sinal original $x(t)$ pode ser expresso da seguinte forma:

$$x(t) = \sum_{j=1}^n c_j(t) + r_n(t) \quad (27)$$

em que n é o número de FMI's, $r_n(t)$ o resíduo final e $c_j(t)$ as FMI's. Após a decomposição, as FMI's obtidas são submetidos à transformada de Hilbert, definida por:

$$y(t) = \frac{1}{\pi} P \int \frac{x(t')}{t - t'} dt \quad (28)$$

em que P é o valor principal de Cauchy. Segundo esta definição, $x(t)$ e $y(t)$ formam um par de complexos conjugados, permitindo definir o sinal analítico $z(t)$ como:

$$z(t) = x(t) + iy(t) = a(t)e^{-i\theta t} \quad (29)$$

com

$$a(t) = \sqrt{x^2(t) + y^2(t)} \quad \text{e} \quad \theta(t) = \tan^{-1} \left(\frac{y(t)}{x(t)} \right) \quad (30 \text{ e } 31)$$

A frequência instantânea do espectro de Hilbert é definida como:

$$\omega(t) = \frac{d\theta t}{dt} \quad (32)$$

A partir das várias FMI's do sinal e das respectivas frequências instantâneas, é possível obter o chamado espectro de Hilbert, a partir do qual podem ser extraídos os mesmos parâmetros descritos para o espectro de potência tradicional, obtido através da transformada de Fourier.

4.4.2.3 Análise estatística dos sinais de *backscattering*

O sinal de *backscattering* resulta da interferência dos ultrassons com a microestrutura do tecido, sendo por isso importante para a caracterização do seu estado [84], [110]. Os sinais obtidos são resultado de fenómenos de interferência construtiva e destrutiva das ondas com estruturas de tamanho inferior ao comprimento de onda. Assim, mesmo não sendo possível diagnosticar ou visualizar microestruturas, a amplitude do sinal pode indicar patologia. Como os sinais são fruto de várias contribuições, é aconselhável fazer a sua caracterização em termos estatísticos [110].

A abordagem geral de análise estatística dos sinais consiste no ajuste de uma distribuição que melhor se adapte ao histograma do sinal de *backscattering*. Como o tecido do cristalino é ainda pouco estudado, a distribuição ideal para a análise deste tipo de dados não é ainda conhecida. Na literatura foram apenas encontradas referências da aplicação da distribuição de Nakagami à caracterização do tecido do cristalino [22], [57], [67]. No entanto, verificou-se que a distribuição Gama também se ajusta relativamente bem aos dados adquiridos. Neste trabalho foram usadas as duas distribuições para a caracterização do tecido.

A. Distribuição Gama

A distribuição Gama é uma distribuição de probabilidade contínua, modelada por dois parâmetros: o parâmetro de forma, α , e o parâmetro de taxa, β , de acordo com:

$$g(x; \alpha, \beta) = \frac{\beta^\alpha x^{\alpha-1} e^{-\beta x}}{\Gamma(\alpha)} \quad (33)$$

com $x \geq 0$ e $\alpha, \beta > 0$. Sabe-se que a distribuição Gama descreve com precisão o espaçamento entre *scatterers*. Denotando \bar{x} a média do espaçamento entre os *scatterers*, a distribuição dos espaçamentos é descrita pela distribuição Gama, através do seu parâmetro de taxa $\beta = \bar{x} / \alpha$. Para valores de α elevados, o espaçamento entre os *scatterers* é constante; para $\alpha=1$ os *scatterers* são distribuídos aleatoriamente; quando $\alpha < 1$ os *scatterers* encontram-se aglomerados [111].

B. Distribuição de Nakagami

A distribuição de Nakagami tem-se revelado útil na caracterização da distribuição de *scatterers* no tecido, como já referido anteriormente. É descrita pelos parâmetros de forma, m , e de escala, Ω , introduzidos na secção 4.3.1.

Nesta abordagem de extracção de características optou-se por utilizar os quatro parâmetros extraídos dos ajustes destas duas distribuições (Gama e Nakagami) ao histograma dos dados relativo às diferentes classes estudadas. Para cada amostra, as características são extraídas da Região 3, correspondente à região central do cristalino, excluindo a cápsula. A distribuição é ajustada à envolvente dos sinais, por janelas de análise de comprimento igual à largura de

pulso, com um *overlapping* igual a 99%. O ajuste da distribuição é feito linha a linha, tomando como resultado final o valor médio obtido para todas as linhas da região de análise.

4.4.2.4 Análise de parâmetros acústicos

A. Velocidade de propagação

Existem vários métodos descritos na literatura para o cálculo da velocidade de propagação dos ultrassons em tecidos. Para a análise dos dados adquiridos pelo método experimental descrito na secção 4.3.1, optou-se pelo cálculo do valor da velocidade através da utilização de um reflector plano. Este método foi utilizado em trabalhos anteriores [72]. A Figura 36 representa o esquema da configuração experimental com os parâmetros usados para o cálculo da velocidade.

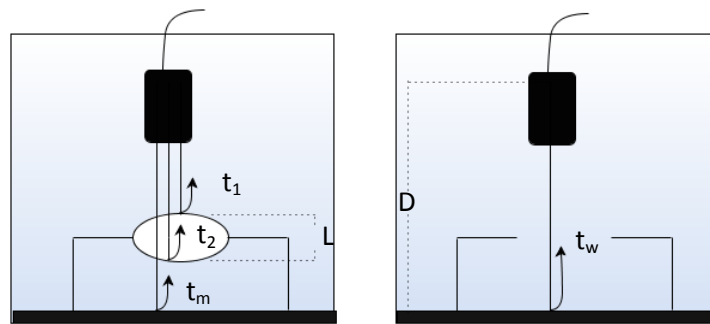


Figura 36. Representação da configuração experimental e dos parâmetros usados para o cálculo da velocidade.

Da Figura 36 derivam as seguintes relações:

$$v = \frac{2L}{\Delta t} \Leftrightarrow L = \frac{v(t_2 - t_1)}{2} \quad (34)$$

$$2D = ct_w \Leftrightarrow D = \frac{ct_w}{2} \quad (35)$$

$$t_m = \frac{2(D - L)}{c} + \frac{2L}{v} \quad (36)$$

onde os valores t_m e t_w representam o tempo de propagação (ida e volta) entre o transdutor e o reflector, com e sem cristalino respectivamente; t_1 e t_2 são os tempos de propagação entre o transdutor e a cápsula anterior e posterior do cristalino, respectivamente; D é a distância entre o transdutor e o reflector e c a velocidade de propagação no meio de imersão. A partir destas relações é possível obter o valor da velocidade de propagação no meio:

$$v = c \left(\frac{t_m - t_w}{t_1 - t_2} + 1 \right) \quad (37)$$

A região do interesse para a qual é possível calcular o valor da velocidade é a Região 4, definida na secção 4.6.1. A Figura 37 mostra um sinal típico dessa região de interesse, da qual são extraídos os valores dos tempos e das distâncias referidos.

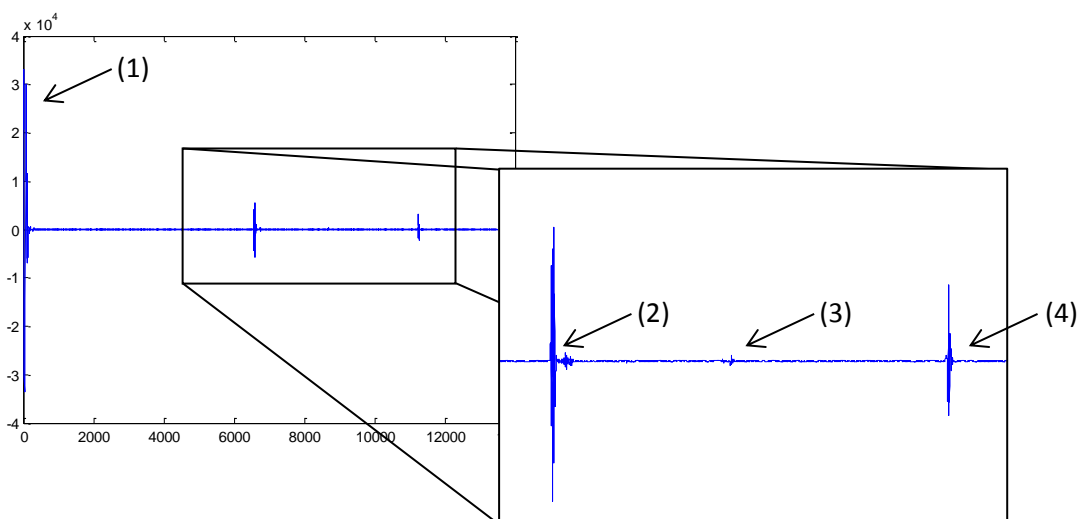


Figura 37. Sinal típico adquirido da região central de um cristalino. As setas indicam os sinais referentes ao sinal de emissão (1), às cápsulas anterior (2) e posterior (3) e ao reflector (4).

B. Coeficiente de atenuação

A atenuação dos ultrassons é provocada pela absorção e dispersão do feixe, à medida que este penetra no tecido. A atenuação é tanto maior quanto maior for a frequência usada. A amplitude do sinal A , em função da distância percorrida, é expressa da seguinte forma:

$$A = A_0 e^{-\alpha x} \quad (38)$$

onde α é o coeficiente de atenuação do meio de propagação, A_0 a amplitude inicial gerada pelo transdutor e x a distância percorrida no meio.

No trabalho realizado, o cálculo da atenuação foi realizado com recurso a um reflector plano, como ilustrado na Figura 38. Nesta abordagem o reflector é usado para comparar os sinais do seu eco, com e sem o cristalino inserido no meio de propagação, com vista ao cálculo da atenuação do cristalino.

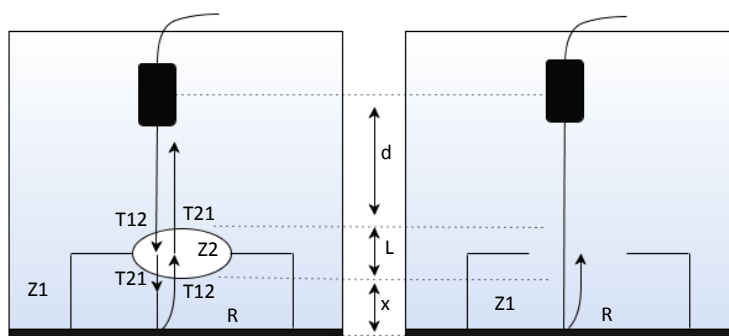


Figura 38. Representação da configuração experimental e dos parâmetros necessários ao cálculo do valor da atenuação: Z1 representa a impedância do meio envolvente, Z2 a impedância do cristalino, d, L e x os percursos de propagação e T12 e T21 são os coeficientes de transmissão dos meios envolvidos.

O sinal do eco obtido do reflector sem a presença do cristalino funciona como sinal de referência e é dado por:

$$A1 = I_0 R e^{-2\alpha_a(x-L+d)} \quad (39)$$

O sinal adquirido com o cristalino no suporte é traduzido por:

$$A2 = I_0 T_{12} T_{21} R T_{12} T_{21} e^{-2\alpha_a x} e^{-2\alpha_c L} e^{-2\alpha_a d} \quad (40)$$

onde α_a representa a atenuação na água e α_c a atenuação no cristalino. Relacionando as equações (39) e (40) é possível obter a atenuação do cristalino α_c em função das restantes variáveis:

$$\alpha_c = \frac{20}{2L} \log \left(\frac{A1}{A2} (T_{12} T_{21})^2 \right) - \alpha_a \quad (41)$$

Os coeficientes de transmissão podem ser apresentados em função das impedâncias, de acordo com:

$$(T_{12} T_{21})^2 = \left(\frac{2Z_2}{Z_1 + Z_2} \frac{2Z_1}{Z_1 + Z_2} \right)^2 = \left(\frac{4Z_2 Z_1}{(Z_1 + Z_2)^2} \right)^2 \quad (42)$$

O valor de impedância do cristalino, Z_2 , encontra-se referenciado na bibliografia como sendo $1,72 \times 10^6 \text{ kgm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, e o da água, Z_1 , $1,48 \times 10^6 \text{ kgm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ [37].

4.4.3 Análise de outliers

Um *outlier* é definido como um ponto estatisticamente inconsistente, ou seja, que apresenta um afastamento dos restantes dados. É a medição deste afastamento que define se o valor deve ou não ser considerado um *outlier*. Para que os *outliers* sejam identificados correctamente, deve ser feita uma análise estatística cuidada [112]. Existem vários métodos que são usados para definir quais os valores considerados *outliers* numa determinada amostra. Neste trabalho a análise de *outliers* foi feita com base nas características extraídas, aplicando a técnica modificada de Thompson Tau. Esta técnica permite decidir se um possível *outlier* deve ou não ser excluído. Os dados são analisados característica a característica. Para cada amostra é calculado o desvio absoluto da média, dado por:

$$\delta_i = |x_i - \bar{x}| \quad (43)$$

em que x_i é o valor da amostra i , para uma dada características, e \bar{x} o valor médio dessa característica para todas as amostras. O valor de τ é calculado a partir do valor crítico da PDF da distribuição t de *student*, e é por isso função do número de pontos da amostra. τ é dado por:

$$\tau = \frac{t_{\alpha/2} \cdot (n - 1)}{\sqrt{n}} \sqrt{n - 2 + t_{\alpha/2}^2} \quad (44)$$

onde n é o número de pontos e $t_{\alpha/2}$ é o valor crítico de t de *student*, baseado em $\alpha = 0,05$ e $df = n - 2$. Uma vez calculado o valor de τ , a decisão se o possível *outlier* deve ser removido ou não é tomada de acordo com a sua relação com o desvio absoluto calculado em (43):

- se $\delta_i > \tau$, i é um *outlier* e deve ser removido;

- se $\delta_i \leq \tau$, i não é um *outlier* e deve ser mantido.

Com base nesta metodologia, foram determinados os *outliers* de cada uma das 93 características extraídas nas diferentes abordagens descritas. Para a decisão se uma amostra deve ou não ser classificada como *outlier*, foi definido o parâmetro de decisão N , igual ao número de características que classificam a amostra como *outlier*, a partir do qual a amostra deve ser removida. Verificou-se que, para as quatro classes de estudo (controles e três tempos de indução), nenhuma das amostras foi classificada como *outlier* por mais do que 20 características. Assim, definiu-se N no intervalo de 1 até 20.

Naturalmente, quanto menor o parâmetro de decisão N , maior será o número de amostras identificadas como *outlier*. Um maior número de *outliers* removidos melhora o resultado da classificação, mas ao mesmo tempo reduz o tamanho da amostra para análise, o que traz outros inconvenientes. O gráfico da Figura 39 mostra a dependência do número de *outliers* identificados com o parâmetro de decisão N , para cada uma das quatro classes.

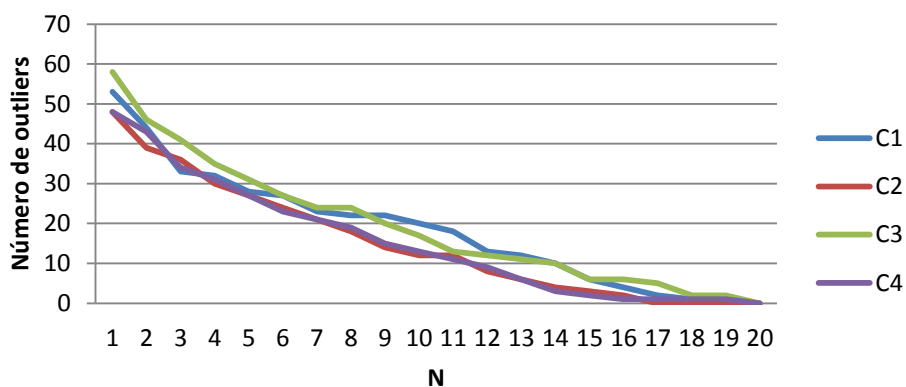


Figura 39. Número de *outliers* identificado em função do parâmetro N . C1, C2, C3 e C4 correspondem às quatro classes (controle, e três tempos de imersão).

Para a determinação do melhor valor para o parâmetro de decisão N , foi feito um estudo da sua influência na variância das amostras das diferentes classes: o objectivo é seleccionar o maior valor de N possível que permita a menor variância de valores. Esta análise foi feita para cada uma das quatro classes, sendo o resultado apresentado no gráfico da Figura 40.

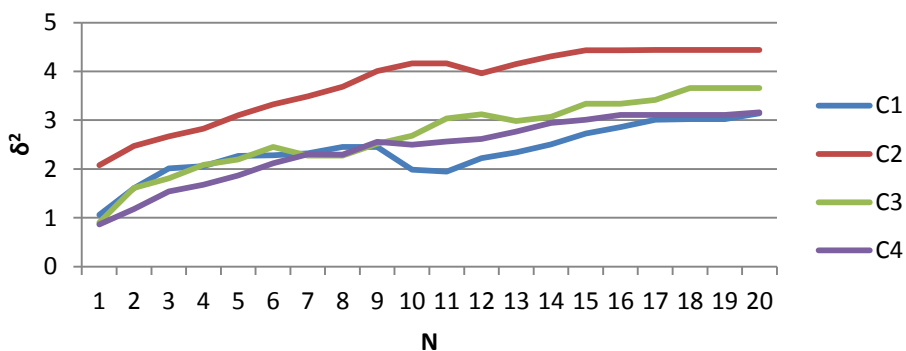


Figura 40. Gráfico que representa a variância entre os dados de cada classe, em função do parâmetro de decisão N . C1, C2, C3 e C4 correspondem às quatro classes (controle, e três tempos de imersão).

A análise do gráfico permite concluir que, para um valor de $N \sim 12$, existe uma pequena quebra na dependência, correspondendo ao menor rácio variância/ N . Assim, decidiu-se remover as amostras (cristalinos) no caso de terem sido identificadas como *outliers* em mais de 12 das características analisadas, o que leva a um valor médio de 10 amostras removidas por classe.

4.4.4 Construção do sistema de classificação

O reconhecimento de padrões inerente aos sistemas de classificação automáticos é essencial para o estabelecimento de relações complexas entre os dados recolhidos. A sua aplicação permite a separação da informação relevante da irrelevante, e estabelecer relações directas entre características dos dados e os padrões que se pretende identificar. A obtenção de um classificador que possa ser aplicado na detecção precoce ou subclínica da patologia e que seja capaz de discriminar com elevada precisão os seus diferentes estádios de evolução, representa uma ajuda concreta tanto no diagnóstico como no tratamento. É esta capacidade que está na base do conceito “*computer assisted diagnosis*”, cada vez mais usado no apoio ao diagnóstico e tratamento de doenças de natureza multifactorial [113].

4.4.4.1 Selecção de características

A elevada dimensionalidade dos dados torna muitas vezes necessário o desenvolvimento de procedimentos específicos e adaptados para a sua análise. A questão central neste processo é a identificação das características que são mais relevantes para a caracterização do sistema de classificação [113]. No contexto deste trabalho, o objectivo nesta secção foi encontrar as características que melhor permitissem discriminar as diferentes classes, neste caso os diferentes estádios de evolução da catarata.

A selecção de características não é em si necessária na construção de um bom modelo de classificação. No entanto, quando o tamanho da amostra é pequeno quando comparado com o número de características, os métodos de selecção podem ser fundamentais para evitar um fenómeno conhecido por *overfitting*. Diz-se que ocorre *overfitting* quando os dados são ajustados ao modelo de forma tão rígida que este acaba por perder a flexibilidade necessária para classificar correctamente novos dados [113], [114].

Tipicamente é aceite que o número de amostras (n) deve ser muito maior que o quadrado da dimensão do problema (d), isto é $n \gg d^2$ [115]. Neste trabalho o tamanho da amostra condiciona o número de características a considerar na construção dos classificadores. Assim, para evitar *overfitting*, as características foram seleccionadas de modo a serem ajustadas ao tamanho da amostra.

Após um breve estudo dos métodos de selecção de melhor desempenho no contexto da análise realizada, optou-se por aplicar três diferentes métodos de selecção de características: o teste *Wilcoxon rank-sum*, a selecção de características através da pesquisa aleatória de subconjuntos e a redução de dimensionalidade através da análise de componentes principais, PCA (*Principal Component Analysis*).

O teste *Wilcoxon rank-sum*, seleccionado para este estudo, insere-se nos critérios baseados em testes de hipótese, que avaliam as características de acordo com o resultado e significância de um determinado teste estatístico. Neste método as características são ordenadas pelo valor de significância (*p-value*) do teste *Wilcoxon rank-sum*. Quanto menor o valor de significância obtido, maior a certeza de a diferença entre as duas classes encontrada para uma dada característica não ser devida ao acaso. Este é um método não paramétrico, que testa a hipótese nula de as medianas de cada classe serem iguais para uma dada característica [116].

Um outro método de selecção de características usado neste trabalho foi a pesquisa aleatória de subconjuntos, reforçada pela classificação através do algoritmo k-vizinhos mais próximos, KNN (*K-Nearest Neighbors*). Este método procura identificar um conjunto ideal de características entre diferentes subconjuntos, reforçando a identificação através dos resultados obtidos na classificação. Cada subconjunto é avaliado pelo erro da classificação; apenas os melhores subconjuntos são mantidos, e combinados num único conjunto final [116].

Para além das abordagens de selecção de características, que se baseiam nas características originais, o problema da dimensionalidade dos dados pode ser resolvido através da chamada construção de características. Este processo consiste na geração de novas características por combinação de características existentes, na tentativa de combinar a informação dada por elas e assim melhorar a capacidade discriminatória [116]. Neste trabalho foi aplicada a análise de componentes principais, que é um dos métodos mais usados na construção de características. Este método projecta dados de elevada dimensionalidade num subespaço de dimensão inferior, de modo a maximizar a variância contida nos dados projectados, através de projecções lineares não correlacionadas. É de notar que características obtidas por este método já não correspondem às características inicialmente extraídas, mas sim a novas características construídas a partir de projecções lineares não correlacionadas das iniciais sobre um novo espaço.

4.4.4.2 Normalização dos dados

Um dos passos fundamentais no processo de classificação é assegurar que todas as características extraídas dos dados têm o mesmo peso relativo no estudo das amostras. Neste trabalho, esta condição foi assegurada através da normalização dos dados, característica a característica. O método de normalização aplicado é traduzido pela relação (45):

$$y_i = \frac{x_i - \min(x)}{\max(x) - \min(x)} \quad (45)$$

em que x_i são os valores das amostras para a característica e y_i o novo valor normalizado para essa amostra. Aplicando esta normalização a cada característica, todas as características ficam confinadas a um intervalo compreendido entre 0 e 1, correspondendo 0 sempre ao valor mínimo tomado por esta característica, e 1 ao valor máximo.

4.4.4.3 Construção do classificador

A. Divisão em grupos de treino e de teste

Para validação dos resultados, a amostra é geralmente dividida em grupo de treino e grupo de teste. O classificador é treinado com base o conjunto de treino, e depois testado com os dados definidos para grupo de teste. Existem vários métodos para separar os dados de estudo em grupo de teste e grupo de treino. Optou-se por utilizar o método $k - folds$, que se insere nos métodos de partição e consiste na divisão do conjunto de dados em k subconjuntos, sendo o classificador treinado com $k - 1$ desses subconjuntos e testado com o restante. O processo é repetido trocando o subconjunto que não é incluído no treino. O resultado final corresponde ao valor médio de desempenho dos k testes efectuados [114], [117]. O valor de k deve ser seleccionado de modo a encontrar um bom equilíbrio entre os tamanhos da amostra de treino e de teste. Um grupo de treino demasiado pequeno aumenta o risco de obter um classificador pouco fiável, e um grupo de teste pequeno não permite uma avaliação fiável do desempenho do classificador. A vantagem deste método reside no facto de apresentar uma variância geralmente inferior aos restantes métodos de partição. Isto é particularmente relevante quando o conjunto de dados disponíveis é reduzido, pois torna-o menos sensível ao processo de partição [114], [117].

Para o tamanho da amostra deste trabalho, optou-se por um valor de $k = 10$, seleccionando assim 9 décimos dos dados para treino, e o restante para teste. Para garantir maior fiabilidade dos resultados, o processo de partição foi repetido 200 vezes, sendo a precisão final obtida pela média dos 200 valores de desempenho obtidos.

B. Classificadores usados

1. Classificador de Bayes

A classificação *Bayesiana* é baseada no teorema de probabilidades de Bayes, sendo também conhecido como classificador Naive Bayes. Este algoritmo tem como objectivo calcular para cada classe a probabilidade de uma amostra desconhecida lhe pertencer, para no fim lhe atribuir a classe de probabilidade máxima, isto é, prever a sua classificação mais provável [117], [118].

2. K-vizinhos mais próximos

Este método baseia-se na definição de um número (k) de pontos que existem numa dada região centrada num vector de características x . Estes pontos serão os k vizinhos mais próximos de x . As amostras de entrada são classificadas de acordo com as respectivas classes dos k vizinhos mais próximos, determinadas a partir do conjunto de dados usados para treino do classificador [117], [118].

3. Discriminante linear de Fisher

O discriminante linear de Fisher, FLD (*Fisher Linear Discriminant*), é um método de classificação no qual são identificadas as combinações lineares das variáveis observadas que melhor separem as classes de estudo. Os dados de elevada dimensionalidade são projectados sobre uma dimensão que permita, para as combinações lineares obtidas, maximizar a distância entre

as médias das duas classes, e ao mesmo tempo minimizar a variância entre elas. A classificação é feita neste novo espaço, de dimensão igual a um [117], [118].

4. *Support Vector Machines*

Considerando um conjunto de dados dividido por duas classes linearmente separáveis, um SVM mapeia o espaço de entrada e encontra o hiperplano óptimo que maximize a margem de separação entre classes. Os pontos situados sobre os extremos da margem máxima determinada pelo hiperplano óptimo são denominados de vectores de suporte. No entanto, nem sempre os problemas são linearmente separáveis. Nesse caso, o hiperplano e os vectores de suporte são obtidos através de um problema de optimização, por mapeamento não linear dos dados para uma dimensão espacial superior, que permita a separação espacial. Este mapeamento é feito através da chamada função *kernel*, que pode ser de diferentes tipos (linear, polinomial, funções de base radial, entre outros) [117], [118].

C. Sistema binário

Após a selecção das características mais discriminativas, de acordo com os métodos descritos, foi feita a classificação dos dados com os diferentes classificadores descritos. Dois classificadores binários (CB1 e CB2) foram usados para classificar os cristalinos em três categorias: tecido normal, catarata inicial, e catarata no estado avançado. A Figura 41 representa a combinação dos dois classificadores binários usados.

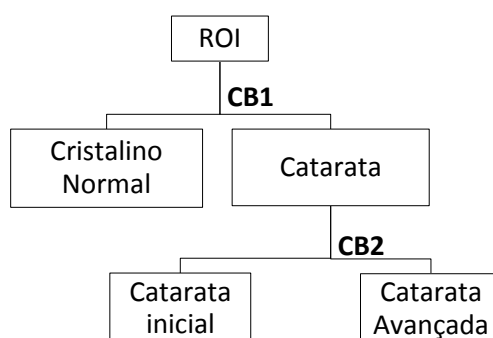


Figura 41. Representação esquemática da combinação de dois classificadores binários para classificação das amostras em três grupos.

D. Sistema multiclasse

Uma abordagem alternativa a esta forma de classificação é a chamada classificação multiclasse, que consiste na classificação de amostras em mais do que duas classes. Neste trabalho foi feita a classificação através da chamada abordagem *one against all* na qual, para um problema com k classes, são gerados k classificadores binários. Cada um desses classificadores é treinado de forma a distinguir a classe i das restantes. É escolhido como resultado da classificação a classe devolvida pelo classificador que produz maior saída.

Foram construídos dois classificadores multiclasse baseados em *support vector machines*: um para discriminação entre três das classes de estudo (controlo, 60 minutos e 120 minutos),

CM1, e outro para a discriminação entre as quatro classes de estudo (controlo, 60 minutos, 120 minutos e 180 minutos), CM2.

4.4.4.4 Avaliação da performance da classificação

A. Classificação binária

Relativamente à avaliação dos resultados do desempenho dos classificadores desenvolvidos, foram usadas várias medidas, baseadas no número de verdadeiros positivos, falsos positivos, verdadeiros negativos e falsos negativos, que podem ser organizados na chamada matriz de confusão, apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Representação genérica da matriz de confusão para o caso binário. Legenda: VP – verdadeiro positivo; FP – falso positivo; FN – falso negativo; VN – verdadeiro negativo.

		Classificação Verdadeira	
		Positivo	Negativo
Classificação obtida	Positivo	VP	FP
	Negativo	FN	VN

Os parâmetros usados neste trabalho para avaliar a performance dos classificadores foram a especificidade, a sensibilidade, a precisão, a exactidão e a *F-measure*, calculados a partir da matriz de confusão e a AUC (*Area Under Curve*), que é obtida a partir da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP} \quad (46)$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN} \quad (47)$$

$$\text{Precisão} = \frac{VP}{VP + FP} \quad (48)$$

$$\text{Exactidão} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \quad (49)$$

$$F \text{ measure} = 2 \times \frac{\text{Precisão} \times \text{Sensibilidade}}{\text{Precisão} + \text{Sensibilidade}} \quad (50)$$

1. Curvas ROC

A curva ROC representa uma forma mais eficiente de demonstrar a relação normalmente antagónica entre a sensibilidade e a especificidade de um determinado teste. Constitui uma ferramenta poderosa para medir e especificar problemas no desempenho do diagnóstico médico, permitindo o estudo da variação da sensibilidade em função da especificidade. Neste trabalho, a curva ROC é usada como medida de avaliação do desempenho do classificador, por meio da sua característica AUC. Esta corresponde à área sob a curva, e é um indicador importante uma vez que fornece uma medida da precisão total. Um valor da área inferior a 0,5

(abaixo da diagonal) não tem validade, pois corresponde à classificação aleatória entre positivos e negativos. Um valor igual a 1 (ou 100%) corresponde a uma classificação perfeita, com 100% de especificidade e 100% de sensibilidade. A Curva ROC é assim um gráfico de sensibilidade (ou taxa de verdadeiros positivos) vs. taxa de falsos positivos (Figura 42). Geralmente a precisão de um teste ou da capacidade de identificar correctamente uma condição é avaliada usando o parâmetro AUC, de acordo com a escala representada Tabela 3.

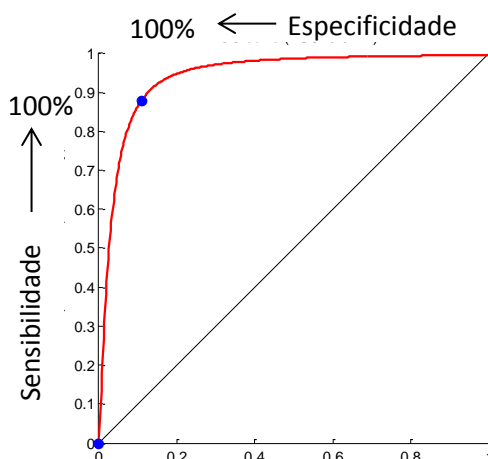


Figura 42. Representação genérica de uma curva ROC.

Tabela 3. Escala para a avaliação do desempenho de um classificador através do parâmetro AUC.

Valor AUC	Avaliação da classificação
>0,9	Excelente
0,8-0,9	Boa
0,7-0,8	Regular
0,6-0,7	Má
0,5-0,6	Reprovada

B. Classificação multiclasse

Para a avaliação do desempenho da classificação multiclasse, é possível estender alguns dos conceitos descritos para a classificação binária. Nomeadamente a *F-measure* e a exactidão, que são as mais utilizadas, mas também as restantes medidas extraídas da matriz de confusão (exactidão, sensibilidade e especificidade). Para tal a matriz de confusão é agora construída para m classes, com $m > 2$, ao invés das duas classes, positiva e negativa, consideradas no caso anterior, de acordo com o que é representado na Tabela 4 (exemplo com $m = 3$). Através desta matriz, é possível extrair os verdadeiros positivos, falsos negativos, verdadeiros negativos e falsos positivos, de acordo com o que é representado na Tabela 5 [119].

Tabela 4. Representação genérica da matriz de confusão para o caso multiclasse.

		Classificação Verdadeira		
		C1	C2	C3
Classificação obtida	C1	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>g</i>
	C2	<i>b</i>	<i>e</i>	<i>h</i>
	C3	<i>c</i>	<i>f</i>	<i>i</i>

Tabela 5. Obtenção dos valores de VP, VN, FN e FP a partir da matriz de confusão da Tabela 4.

		Classe		
		C1	C2	C3
VP	<i>a</i>	<i>e</i>	<i>i</i>	
FP	<i>d + g</i>	<i>b + h</i>	<i>c + f</i>	
FN	<i>b + c</i>	<i>d + f</i>	<i>g + h</i>	
VN	<i>e + f + h + i</i>	<i>a + g + c + i</i>	<i>a + b + d + e</i>	

A aplicação das métricas de desempenho tradicionais à classificação multiclasse pode ser feita através de dois tipos de média: micro-média e macro-média. No primeiro caso, são calculados os valores das métricas a nível global, somando os VP, FP, VN e FN obtidos para cada classe. No cálculo da macro-média, as métricas são calculadas localmente, para cada classe, à semelhança do que é feito no caso binário. No final, as métricas utilizadas correspondem ao valor médio calculado para as diferentes classes. Neste trabalho foi utilizada a abordagem macro-média. O cálculo das métricas é feito de acordo com as seguintes equações [119]:

$$macro\ Exactidão = \frac{\sum_{i=1}^m Exactidão_i}{m} \quad (51)$$

$$macro\ Precisão = \frac{\sum_{i=1}^m Precisão_i}{m} \quad (52)$$

$$macro\ Sensibilidade = \frac{\sum_{i=1}^m Sensibilidade_i}{m} \quad (53)$$

$$macro\ Especificidade = \frac{\sum_{i=1}^m Especificidade_i}{m} \quad (54)$$

$$macro\ Fmeasure = \frac{\sum_{i=1}^m F\ measure_i}{m} \quad (55)$$

Os valores de exactidão, precisão, sensibilidade, especificidade e *F-measure* são calculados de acordo com as equações (46) a (50), para cada uma das classes em estudo.

Apresentação e discussão dos resultados

5.1 Sinais adquiridos

Neste estudo foram enucleados 120 cristalinos. Devido à elevada sensibilidade que este tipo de tecido apresenta a factores tais como choques térmicos, choques mecânicos ou elevada temperatura ambiente registada durante as aquisições no período de verão, muitos cristalinos desenvolveram opacidades durante o processo de transporte, preparação ou análise. Alguns cristalinos apresentavam catarata sutural logo após enucleados, não podendo por isso ser incluídos para o estudo. Os cristalinos foram rastreados para a presença de catarata, antes da sua inclusão na amostra de estudo, sendo excluídos todos os cristalinos que apresentassem qualquer uma das alterações descritas. Após terem sido retirados os cristalinos que não cumpriram o critério de inclusão, foi obtido um grupo de 75 cristalinos.

Foram feitas as aquisições dos 75 cristalinos, que constituíram o grupo controlo. Após a aquisição dos sinais do cristalino normal, foi iniciado o processo de indução da catarata através da imersão do cristalino na solução indutora de etanol e água desionizada. Foi adquirido um total de 201 sinais, distribuídos pelos três tempos de imersão: 64 com 60 minutos de imersão, 71 com 120 e 66 com 180 minutos de imersão.

Durante a fase de processamento e extracção de características, alguns dos sinais apresentaram irregularidades que impossibilitaram a sua inclusão no processo de análise. O grupo de controlo foi assim reduzido de 75 para 64 amostras, e o grupo de estudo de 201 para 181. Feitas as aquisições, foram excluídos os *outliers* dos quatro grupos adquiridos, de acordo com a metodologia descrita na secção 4.4.3. Os detalhes relativos ao número de sinais excluídos ao longo dos diferentes passos do estudo são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Descrição do número de amostras restantes após as diferentes etapas do estudo.

Fase do estudo	Número de amostras			
	Controlo	60 minutos	120 minutos	180 minutos
Aquisição de dados	75	64	71	66
Processamento dos dados	64	59	65	57
Exclusão dos <i>outliers</i>	51	53	55	48

5.2 Métodos de indução da catarata

Tal como referido na secção 4.1.2, foram utilizados dois métodos de indução de catarata *in vitro*. Ambos consistem em soluções que induzem catarata pelas vias de oxidação e desnaturação proteica. Os dois métodos variam apenas na composição das soluções: um consiste numa solução de etanol, propanol e formalina, numa proporção 3:3:4, e o outro numa solução de etanol com água desionizada, na proporção de 1:2.

Os sinais foram adquiridos sistematicamente com a solução de etanol e água desionizada, com obtenção de um conjunto de 156 sinais de cristalinos com catarata, de acordo com o que foi referido na secção 5.1. Para validação dos resultados obtidos por este método, foram também adquiridos 15 sinais de cristalinos com catarata induzidas com o método tradicionalmente referido na literatura, de etanol, propanol e formalina. A Figura 43 mostra imagens modo B relativas aos 3 tempos de imersão estudados (60, 120 e 180 minutos), comparando entre os dois métodos de indução aplicados. Para complementar a informação dada pelas imagens modo B, foram construídas as imagens de Nakagami. De acordo com o que foi dito na secção 3.3.2, a imagem de Nakagami é insensível a variações de intensidade do sinal provocadas por variações na configuração experimental (tais como opções de ganho ou energia) ou por factores inerentes à própria aquisição dos sinais (tais como o ângulo de incidência da onda sobre o tecido), devido ao facto de se basear nas relações entre intensidades, e não nas intensidades em si. Para além disso, o parâmetro extraído do ajuste da distribuição de Nakagami aos dados reflecte as características dos *scatterers* contidos no tecido, constituindo por isso um método objectivo de caracterizar o cristalino. As imagens de Nakagami obtidas para os dois métodos, para os diferentes tempos de imersão, são apresentadas na Figura 44.

Visualmente existe uma boa correspondência entre os estados de catarata provocados pelos dois métodos de indução, para os três tempos estudados. No entanto, a evolução da catarata com o primeiro método parece ser ligeiramente mais rápida, podendo promover, para os mesmos tempos de imersão, estádios de catarata mais avançados.

Para uma comparação objectiva dos resultados obtidos pelos dois métodos, foi calculado um valor médio para cada uma das características extraídas (apresentadas na secção 5.5.1), para cada tempo de imersão. A consistência entre as duas abordagens foi avaliada pelo Coeficiente de Correlação Intraclasse, ICC (*Intraclass Correlation Coefficient*), calculado para os referidos valores médios das características, para os dois métodos de indução e para os tempos de imersão correspondentes. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos.

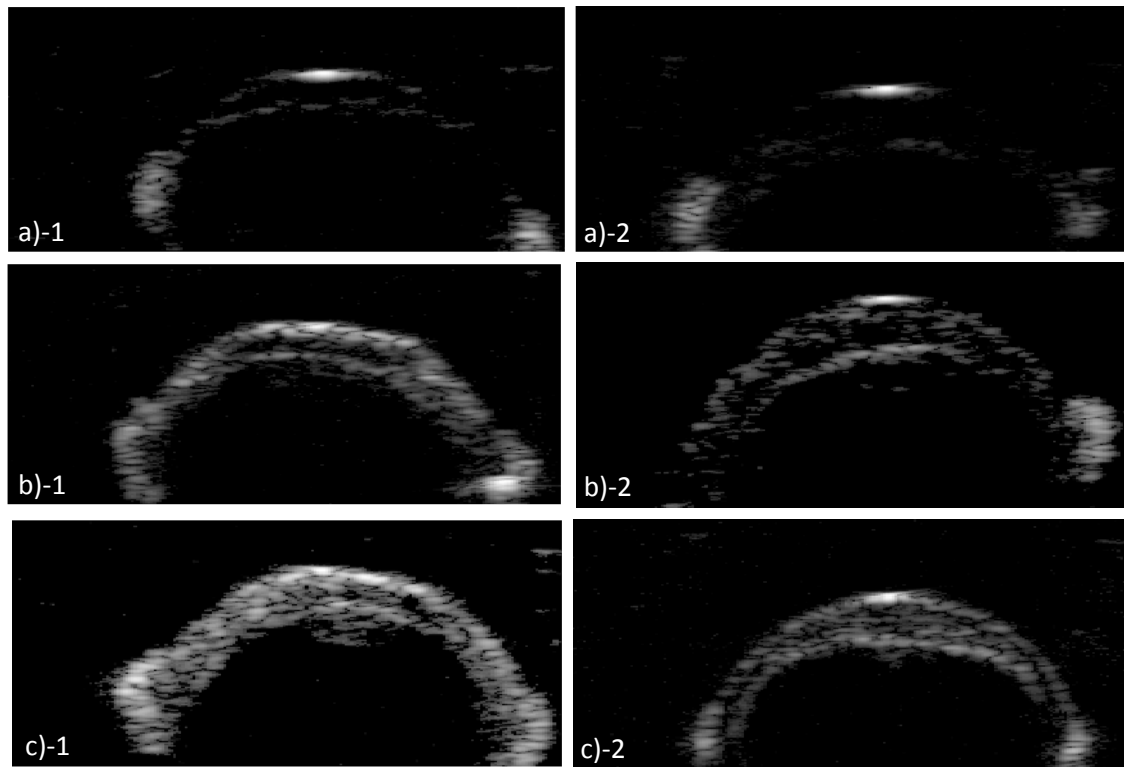


Figura 43. Imagens modo B comparativas entre os dois métodos de indução usados. As imagens da primeira coluna (1) correspondem à indução de catarata pela solução de etanol-propanol-formalina, e as da segunda (2) à indução pela solução de etanol e água desionizada. a) 60 minutos; b) 120 minutos; c) 180 minutos de imersão.

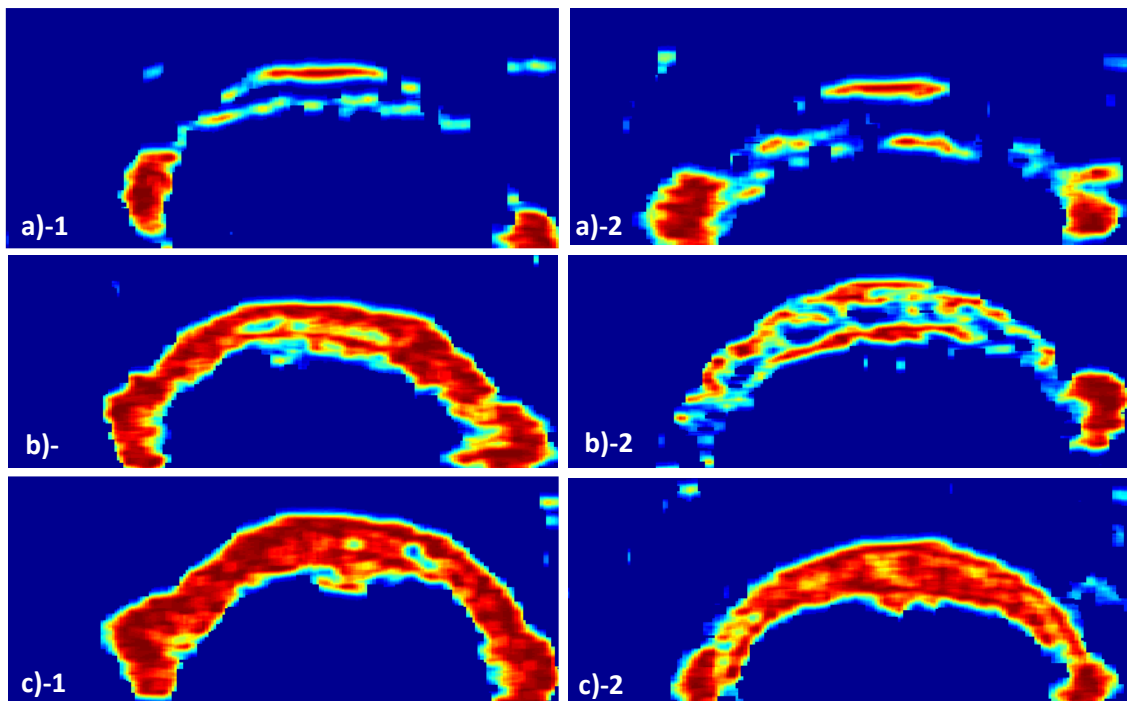


Figura 44. Imagens paramétricas de Nakagami para comparação dos dois métodos de indução usados, para os 3 tempos de imersão. A primeira coluna corresponde ao primeiro método (solução de etanol-propanol-formalina), e a segunda ao segundo método (solução de etanol e água desionizada). As três linhas (a, b e c) correspondem a 60, 120 e 180 minutos de imersão respectivamente.

Tabela 7. Valores do ICC obtidos da comparação entre os dois métodos de indução de catarata para os três tempos de imersão. As três abordagens de extração de características são discriminadas. Os valores foram calculados com um nível estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

	Tipo de análise	ICC
Grupo I (60min)	Textural	1,000
	Espectral	0,999
	Estatística	0,925
	Parâmetros acústicos	0,997
Grupo II (120min)	Textural	1,000
	Espectral	0,999
	Estatística	0,816
	Parâmetros acústicos	0,992
Grupo III (180min)	Textural	1,000
	Espectral	0,999
	Estatística	0,700
	Parâmetros acústicos	0,995
		$\overline{ICC} = 0,952$

Na Tabela 7 é possível observar que, de um modo geral, existe uma boa concordância entre os dois métodos de indução de catarata utilizados, sendo o valor médio de ICC para todos os grupos de 0,95 ($p < 0,001$). Verifica-se ainda que as características texturais foram as que apresentaram maior concordância para os dois métodos (ICC~1 para todos os tempos de imersão). As características extraídas pela abordagem estatística apresentam o menor valor de concordância, decrescendo à medida que o tempo de imersão aumenta.

5.3 Pré-processamento dos dados

Para além de dificultar a interpretação das imagens modo B, o ruído misto, referido a secção 4.2.2, interfere grandemente no processo de obtenção da imagem de Nakagami. Esta secção do trabalho é dedicada ao processamento do ruído, que se revelou um passo importante de pré-processamento para a posterior análise dos dados, tanto para a sua visualização como para a sua classificação.

As regiões de baixa ecogenicidade não contêm *scatterers* que possam produzir sinais de *backscattering*, pelo que os sinais destas regiões são compostos apenas por ruído branco. Apesar de serem facilmente identificáveis em imagens B-scan, estas regiões de baixa ecogenicidade são difíceis de distinguir das estruturas relativas a elevadas concentrações de *scatterers* na imagem de Nakagami. Isto acontece devido ao facto de a envolvente do ruído branco modulado, expressa na imagem de Nakagami, seguir uma distribuição de Rayleigh, levando assim a um parâmetro m próximo de 1 [91]. Como valores elevados de m correspondem na imagem a tons de vermelho intenso, o efeito de degradação da imagem pela presença do ruído é elevado (Figura 45 a).

Idealmente, a imagem de Nakagami não revela qualquer informação nestas regiões de baixa ecogenicidade, uma vez que não existem ecos de *backscattering* provocados por *scatterers*. Para uma visualização mais clara das imagens de Nakagami, sem o efeito do ruído descrito, foram aplicados aos dados os métodos de filtragem de ruído apresentados na Secção 4.2.2, com o objectivo de remover o ruído branco dos sinais obtidos. Na presente secção são

apresentados os resultados obtidos da aplicação dos três filtros e é feita uma análise comparativa para decisão do melhor método de remoção do ruído para o caso em estudo. A Figura 45 b) mostra uma imagem de Nakagami típica, após filtragem do ruído pelo método baseado em *wavelets*.

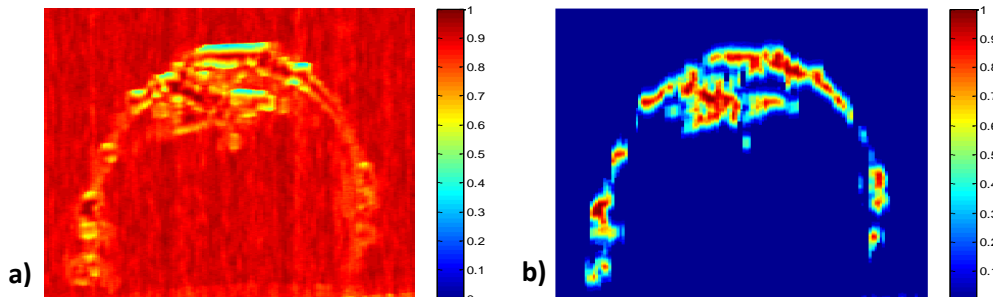


Figura 45. Representação da imagem de Nakagami. a) Imagem obtida antes da filtragem do ruído; b) imagem obtida após a filtragem do ruído.

Comparando uma linha de A-scan de um sinal típico de um cristalino com catarata, antes e após a aplicação dos diferentes filtros, é possível analisar melhor o efeito dos filtros sobre o sinal original. A Figura 46 mostra um sinal típico de um cristalino (a) e o mesmo sinal filtrado usando o filtro de limiar adaptativo (b), filtro baseado em *wavelets* (c) e filtro de correlação NAC (d).

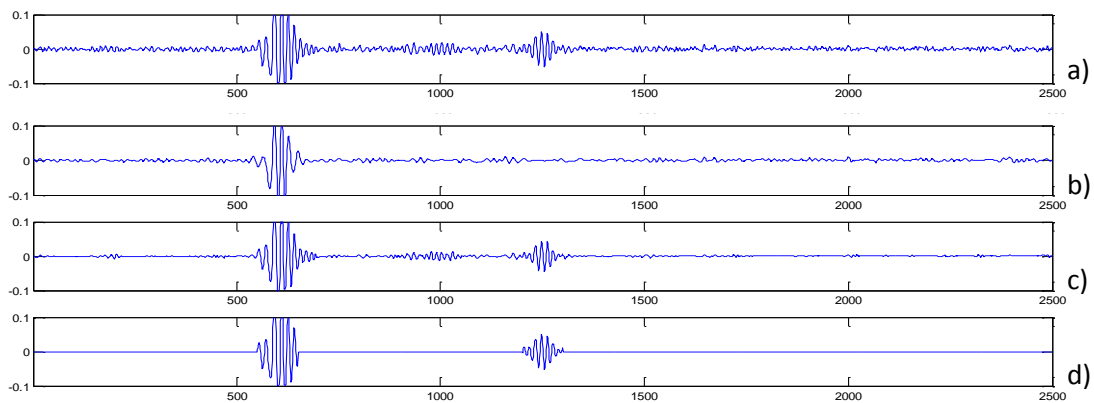


Figura 46. Aplicação dos diferentes filtros a um sinal. a) Sinal original; b) resultado da aplicação do filtro de limiar adaptativo; c) resultado da filtragem por *wavelets*; d) filtragem pelo filtro NAC.

O primeiro pico dos sinais apresentados na Figura 46 corresponde à cápsula anterior. Na região anterior à cápsula, o sinal obtido é relativo ao meio de imersão do cristalino, correspondente a uma região de baixa ecogenicidade. Também as zonas profundas do cristalino, das quais não são obtidos sinais de *backscattering*, correspondem a regiões de baixa ecogenicidade.

Observando o resultado dos diferentes filtros, é fácil perceber que o filtro baseado em *wavelets* é o que melhor preserva o formato do sinal original. No entanto, preserva também algum ruído em torno da origem nas regiões de baixa ecogenicidade descritas. O filtro de limiar adaptativo mantém em grande parte o ruído, para além de alterar significativamente a forma de onda do sinal original. O filtro NAC altera ligeiramente o sinal na zona de limiar a partir da qual o ruído é removido e mantém apenas os ecos de maior amplitude.

O filtro NAC é o único que remove completamente os sinais de baixa amplitude, correspondentes a ruído. Para os restantes dois, apesar de a amplitude do ruído que permanece nos sinais ser baixa, o seu efeito na imagem de Nakagami é grande, levando a valores de m elevados, com efeitos na imagem semelhantes ao que é representado na Figura 45 a). Por isso, após a primeira filtragem do sinal, é aplicado um valor de corte a estas pequenas amplitudes, removendo-as, e permitido assim obter as regiões de baixa ecogenicidade, uniformes e de amplitude igual a zero. A Figura 47 mostra os sinais da Figura 46 após aplicação deste novo limiar.

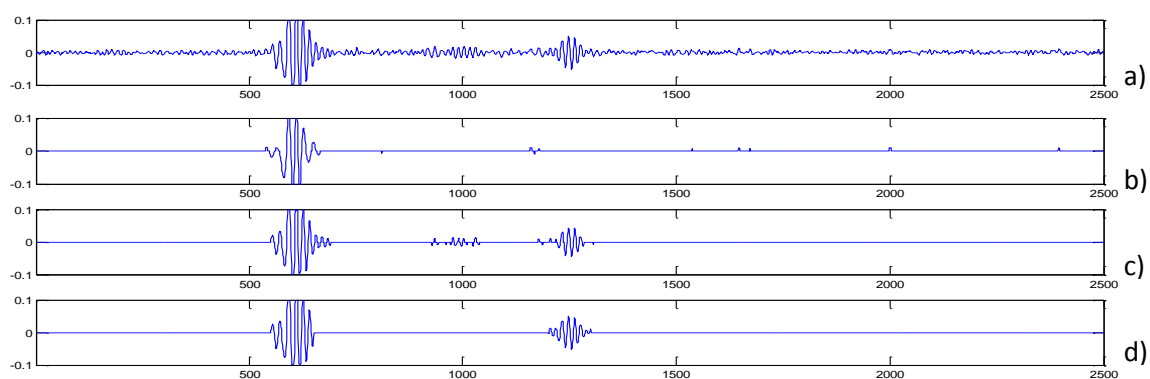


Figura 47. Sinais após aplicação de um valor de corte aos sinais filtrados. a) Sinal original, sem filtragem do ruído; sinal filtrado por a) limiar adaptativo, (b) wavelets; (c) NAC, após aplicação do valor de corte.

Aplicando agora o algoritmo para cálculo do parâmetro de Nakagami ao sinal original e aos sinais filtrados, de acordo com a metodologia descrita na secção 4.3.1, obtêm-se os sinais representados na Figura 48. O gráfico a) mostra o parâmetro m para o sinal original, com os valores próximos de 1, devido à presença do ruído branco.

Após a aplicação do filtro de limiar adaptativo, parte dos valores elevados é removida (Figura 48 b). No entanto, há ainda valores de Nakagami elevados na região profunda do cristalino, da qual já não foram obtidos ecos e onde, por conseguinte, o valor de Nakagami deveria ser zero. Para os outros dois filtros (baseado em wavelets e filtro NAC, Figura 48 b) e c) respectivamente), após aplicação do valor de corte para remoção de ruído de baixa amplitude, já não aparecem valores de m diferentes de zero nas zonas de baixa ecogenicidade descritas. No entanto, é visível que o filtro baseado em *wavelets* permitiu preservar valores Nakagami que o filtro NAC removeu.

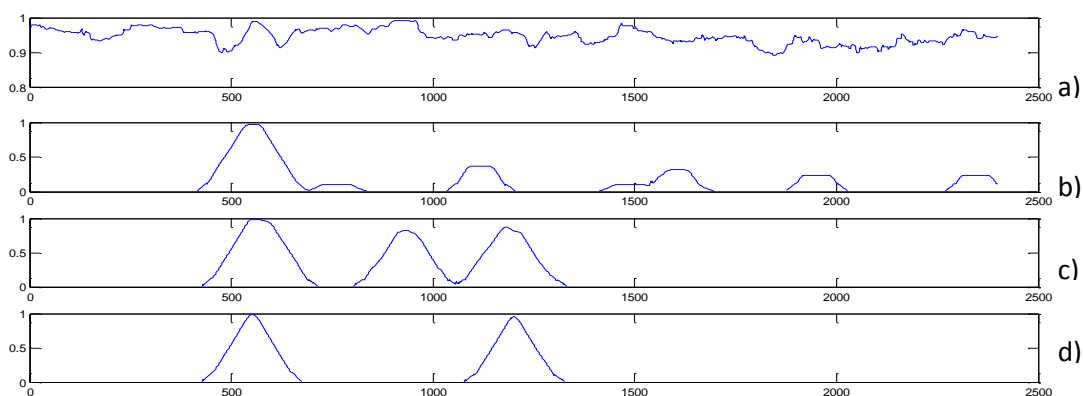


Figura 48. Parâmetro de Nakagami obtido para os sinais Figura 47. Parâmetro de Nakagami para (a) sinal original; (b) sinal obtido pelo filtro de limiar adaptativo; (c) filtro baseado em *wavelets*; (d) filtro NAC.

Comparando os três filtros, o filtro baseado em *wavelets* foi o que apresentou melhor desempenho, uma vez que preservou regiões do sinal original, as quais foram removidas tanto pelo filtro de limiar adaptativo como pelo filtro NAC.

As imagens (a) e (b) da Figura 49 mostram a imagem de Nakagami antes e após a aplicação do filtro baseado em *wavelets*. Para efeitos de imagiologia, este método de obtenção da imagem de Nakagami pode ser utilizado uma vez que, mais do que os valores absolutos do parâmetro m , é importante a forma como eles variam espacialmente em diferentes regiões do cristalino. Comparando as duas imagens, antes e após a aplicação do filtro, verifica-se que a relação entre os valores se mantém espacialmente, havendo apenas uma variação do valor absoluto. Os valores do parâmetro m de Nakagami são subestimados após a aplicação do filtro, em aproximadamente 25% relativamente aos valores obtidos para o sinal original.

Já para a utilização do valor absoluto do parâmetro de Nakagami na caracterização do estado da catarata, esta abordagem de processamento não deve ser utilizada. Apesar de as imagens obtidas reflectirem a evolução do parâmetro m com o evoluir da catarata, a estimação não foi feita sobre os sinais originais, sendo por isso apenas uma aproximação. É por isso proposto um método alternativo, baseado na combinação da estatística dos sinais originais com a informação obtida pelo filtro, relativamente às zonas de ruído branco em regiões de baixa ecogenicidade. O objectivo é a determinação do parâmetro de Nakagami a partir dos dados originais, com o resultado típico semelhante ao exemplificado pela Figura 49 a). Com a garantia de que a estatística destes sinais não foi alterada, é possível remover a posteriori o ruído da imagem de valor m próximo de 1 correspondente às zonas de baixa ecogenicidade, usando como máscara a imagem resultante do filtro baseado em *wavelets*, exemplificada em b). É deste modo obtida a imagem representada em c), na qual é apresentada a informação inalterada da imagem de Nakagami representada em a) e o fundo azul corresponde às regiões filtradas pelo filtro *wavelet*, representadas em b). Ao contrário do que acontece no cálculo do parâmetro após a aplicação dos filtros, usando esta metodologia já não ocorre subestimação do parâmetro m . Expandindo a escala de cores da imagem para facilitar a análise do resultado obtido (Figura 49 d), e comparando com a imagem obtida após aplicação do filtro (Figura 49 b), é evidente a distribuição e a relação espacial semelhante das zonas de maior e menor concentração de *scatterers*.

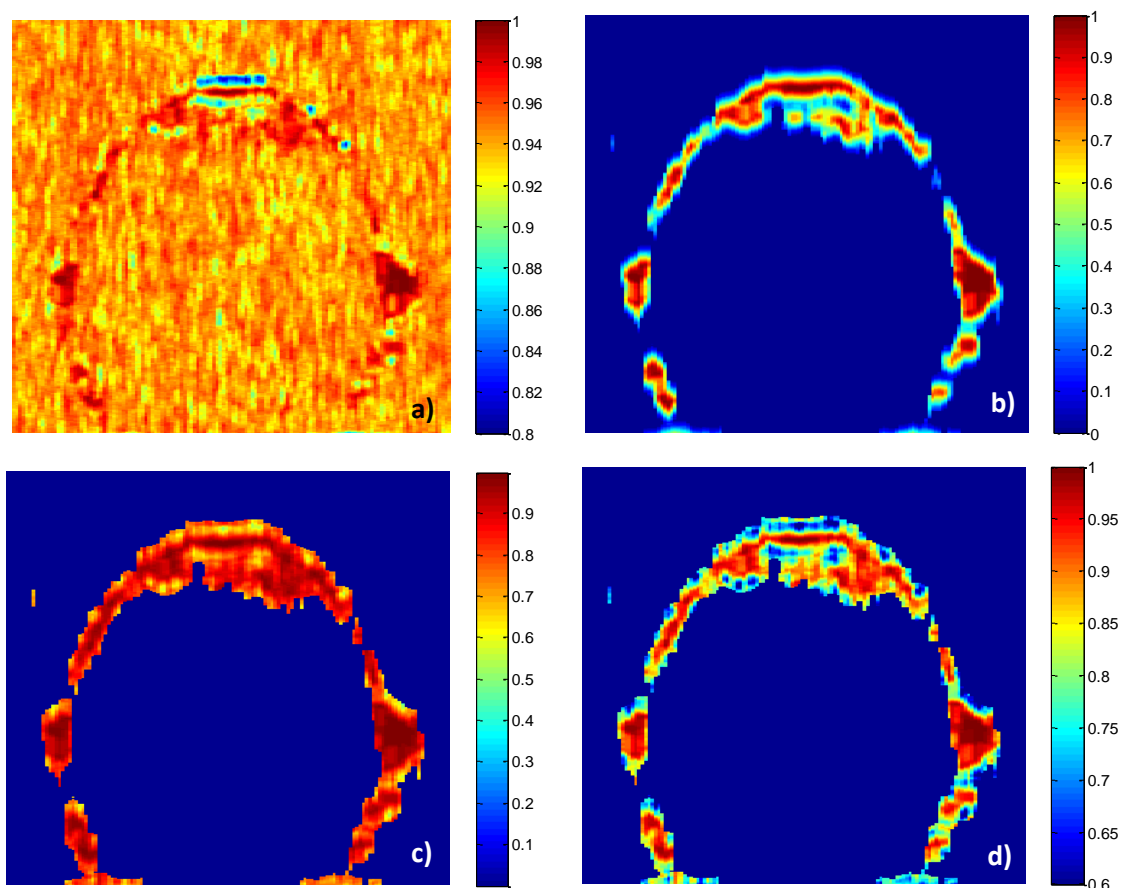


Figura 49. Imagens de Nakagami para os diferentes passos do processamento. a) Imagem de Nakagami do parâmetro m do sinal original, afectada pelo ruído; b) imagem de Nakagami após a remoção do ruído pelo filtro baseado em *wavelets*; c) estatística de Nakagami da imagem em a), com remoção do ruído com base na informação contida em b); d) imagem obtida a partir de c), por expansão da escala de cores.

5.4 Visualização do cristalino

A análise dos cristalinos feita pelas duas abordagens (ultrassons e microscopia óptica) teve como objectivo a visualização do tecido nas diferentes fases de desenvolvimento da catarata, permitindo a distinção objectiva entre o tecido normal e patológico, bem como dos diferentes estádios de evolução da catarata. Os resultados dessa análise são apresentados nesta secção.

5.4.1 Visualização por ultrassons

O objectivo desta parte do trabalho foi a obtenção de um método de imagiologia que permitisse visualizar o tecido do cristalino e deste modo possibilitasse a diferenciação do cristalino normal do cristalino com catarata, bem como a distinção visual dos diferentes estados de evolução da catarata. As formas de visualização do cristalino obtidas a partir dos sinais adquiridos pela inspecção por ultrassons foram a imagem modo B e a imagem paramétrica de Nakagami. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos nesta secção.

5.4.1.1 O cristalino saudável

Para o estado normal do cristalino, apenas a cápsula é visível nas imagens B-scan e de Nakagami, indicando que o interior do cristalino é homogêneo, sem variações de densidade e com ausência de *scatterers*, o que está em concordância com a homogeneidade celular do tecido descrita na secção 2.2.3, conseguida pelo regular espaçamento e arranjo estrutural das suas fibras. O eco obtido da cápsula é muitas vezes ténue, uma vez que o cristalino saudável apresenta uma impedância muito semelhante à da água, constituindo assim uma ruptura de impedância baixa para gerar ecos detectáveis e bem definidos. No entanto, na região central do cristalino, onde a incidência do feixe é perpendicular, a cápsula provoca sempre um eco bem definido. A Figura 50 mostra a imagem modo B e de Nakagami representativas de um cristalino saudável.

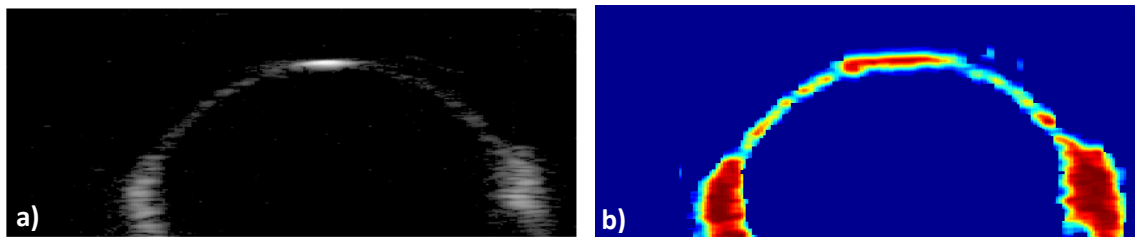


Figura 50. Imagens representativas do grupo de controlo. a) Imagem modo B; b) imagem de Nakagami.

5.4.1.2 Padrão de evolução da catarata

De acordo com os procedimentos descritos na secção 4.1.2 e 4.1.3, os cristalinos enucleados foram imersos na solução indutora de catarata durante 60, 120 ou 180 minutos, com posterior aquisição dos sinais para cada tempo. A Figura 51 mostra o padrão de evolução da catarata, representativo dos dados adquiridos para os quatro tempos de imersão (incluindo o grupo controlo, correspondente a 0 minutos de imersão), representado sob a forma de imagens modo B.

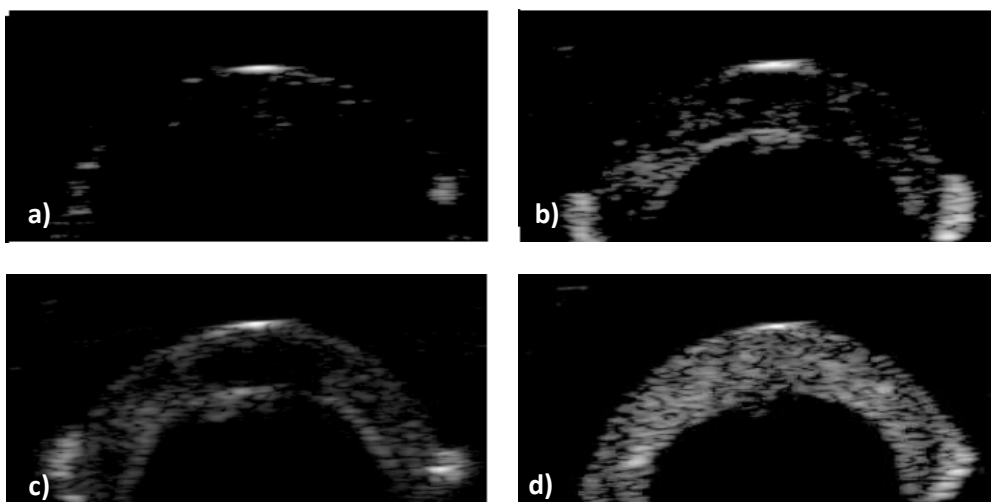


Figura 51. Imagens modo B do padrão de evolução da catarata observado. a) Cristalino saudável; b) cristalino com 60 minutos de imersão, c) 120 minutos de imersão; d) 180 minutos de imersão.

Imagem de Nakagami

Devido à sensibilidade a variações nas condições de aquisição, tais como o ganho, a energia e o próprio posicionamento do cristalino relativamente ao feixe de ultrassons, as imagens modo B acabam por servir apenas de meio qualitativo de caracterização do tecido. De modo a compensar esta limitação da representação tradicional dos sinais acústicos, foi construída a imagem paramétrica do parâmetro m da distribuição de Nakagami. O processo de construção desta imagem é descrito em detalhe na secção 4.3. Os resultados obtidos para os diferentes tempos de imersão são apresentados na Figura 52, e são referentes aos mesmos sinais apresentados na Figura 51.

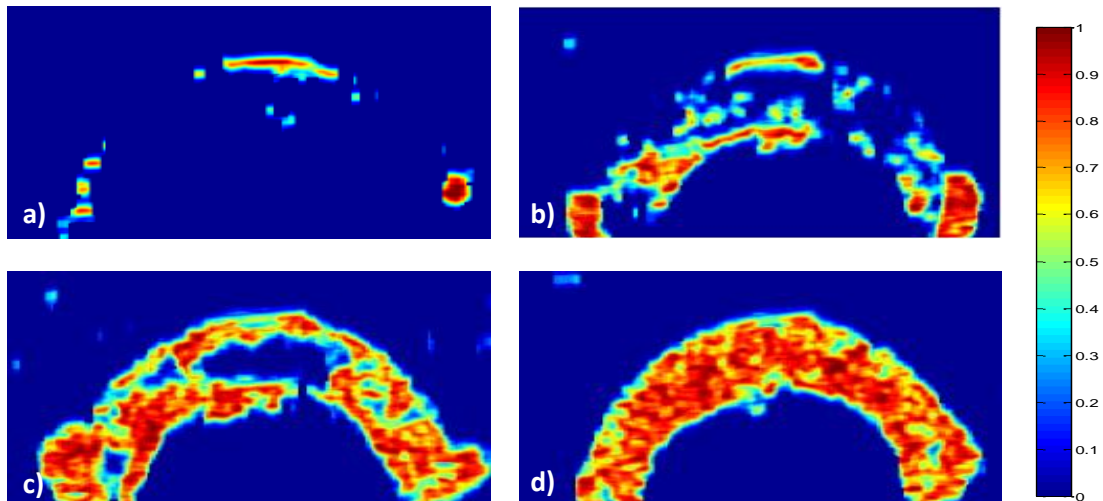


Figura 52. Imagens de Nakagami obtidas para os diferentes tempos de imersão. a) Cristalino saudável; b) cristalino com 60 minutos de imersão; c) 120 minutos de imersão; d) 180 minutos de imersão.

Do mesmo modo como foi obtida a imagem paramétrica de Nakagami para o parâmetro de forma m , pode ser obtida a imagem para o parâmetro de escala Ω (Figura 53 b). Este parâmetro, de acordo com que foi explicado na secção 4.3, reflecte a intensidade média do sinal de *backscattering*, não acrescentando por isso informação à imagem modo B (Figura 53 a).

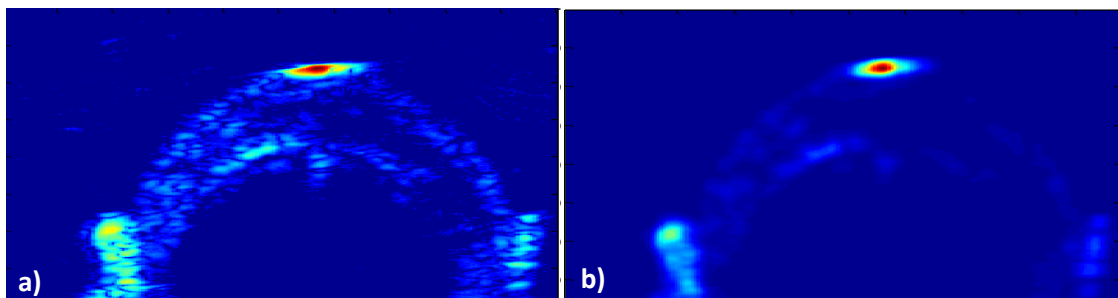


Figura 53. Comparação entre a imagem modo B e a imagem paramétrica de Nakagami do parâmetro Ω . a) imagem modo B representada em pseudocor; b) imagem de Nakagami do parâmetro Ω .

Relativamente à susceptibilidade da intensidade dos sinais de *backscattering* às condições de aquisição, a Figura 54 ilustra como variações na posição do cristalino podem levar a imagens modo B (a e b) com níveis de intensidade muito diferentes, podendo transmitir a ideia errada da presença de *scatterers* de maior tamanho e/ou concentração em (a), devido aos valores de

intensidade mais elevados (indicados pelos valores mais elevados na escala de cores). Obtendo a imagem de Nakagami para as duas imagens modo B, representadas em c) e d), é possível observar que, na realidade, as características de concentração de *scatterers* são bastante semelhantes, evidenciado pela mesma gama de valores do parâmetro *m* de Nakagami. Este exemplo ilustra bem a contribuição da imagem paramétrica de Nakagami na caracterização objectiva da catarata. De notar que nas imagens modo B apresentadas (Figura 54 a e b), é apenas representada a região de interesse correspondente à Região 3 (ver secção 4.4.1); esta região exclui os sinais de amplitudes elevadas relativos à cápsula e à íris, permitindo assim discriminar melhor as diferenças de amplitude observadas para os sinais do interior do cristalino.

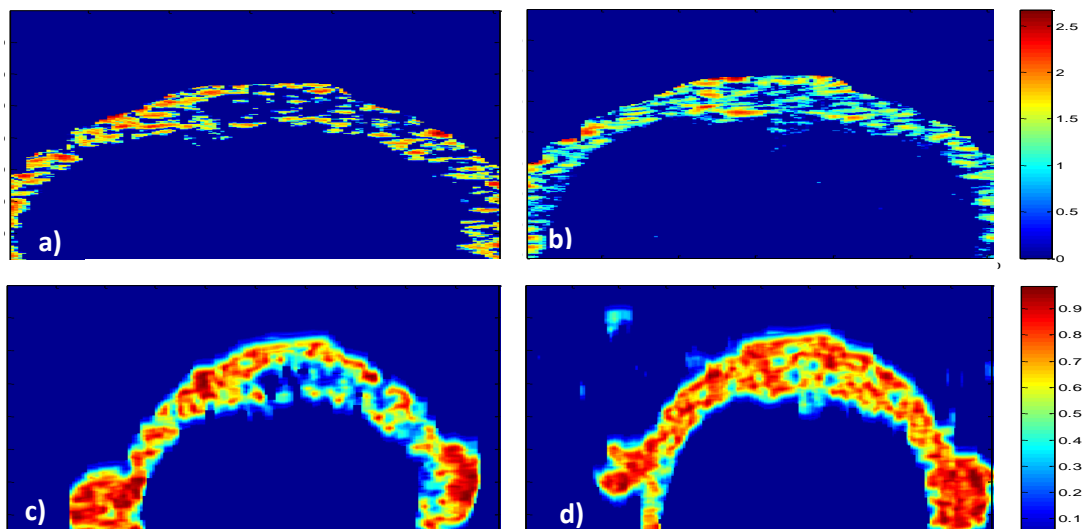


Figura 54. Diferentes representações do mesmo cristalino no mesmo estado de catarata. a) e b) Representação de duas imagens modo B. As figuras excluem a região da cápsula. c) e d) Imagem de Nakagami das aquisições representadas em a) e b).

Analisando as imagens de tempos de indução consecutivos (Figura 51 e Figura 52), e comparando com o esquema relativo à macroestrutura anatómica do cristalino apresentado na Figura 55, verifica-se que a opacificação começa a surgir na zona da interface córtex/núcleo, propagando-se pelo córtex à medida que a catarata evolui para uma forma madura. As opacificações vão crescendo como uma rede, que vai ficando mais compacta até ser atingido um estado de completa opacificação, correspondente à compactação máxima das fibras. Este efeito é bem ilustrado nas imagens da Figura 56.

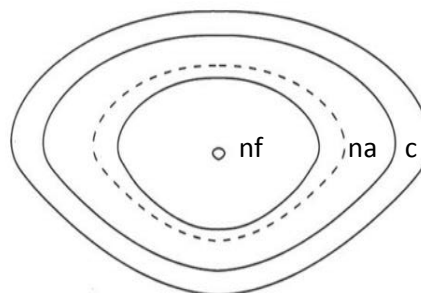


Figura 55. Diagrama da anatomia macroscópica do cristalino. É representado o núcleo fetal (*nf*), o núcleo adulto (*na*) e o córtex (*c*). Adaptado de [14].

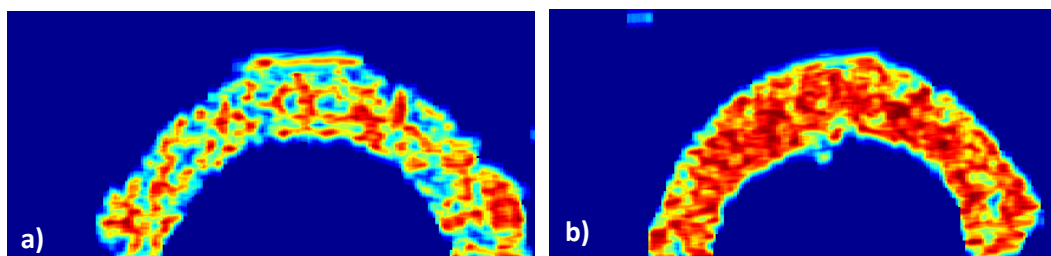


Figura 56. Imagem de Nakagami ilustrativa da compactação das fibras. a) Cristalino com catarata intermédia (120 minutos de imersão); b) cristalino com catarata avançada (180 minutos de imersão).

Estes resultados estão de acordo com estudos realizados em 1987 por Willekens *et al.* [120] que, através de estudos morfológicos, mostraram que em cristalinos humanos com catarata senil as opacidades começam na região cortical profunda, na zona de interface entre o córtex e o núcleo, progredindo em direcção aos polos anterior e posterior. Os autores formularam a hipótese de o córtex superficial profundo ser mais vulnerável a danos oxidativos. Estudos posteriores, realizados em 1989 por Huizinga *et al.* [121], mostraram que o córtex apresenta uma grande variação local no conteúdo de água, e que é precisamente na zona de interface entre o córtex e o núcleo que o conteúdo em água é menor. A diminuição rápida do conteúdo em água do córtex profundo quando comparado com regiões superficiais pode estar associada à maturação das fibras jovens predominantes nesta região [121].

Relativamente à caracterização da região nuclear do cristalino, não foi possível detectar desta região sinais de *backscattering* de razão sinal ruído suficiente que os permitissem distinguir do ruído de fundo. Os sinais de frequências mais elevadas foram sendo atenuados ao longo da região cortical, e os de frequências mais baixas que penetram até regiões mais profundas não têm a resolução necessária à caracterização dos *scatterers* do tecido. Para além da atenuação das altas frequências, é referenciada na literatura uma barreira em torno do núcleo, que se forma à medida que o cristalino envelhece [14]. Esta barreira justifica, *in vivo*, a maior susceptibilidade do núcleo à catarata, devido ao facto de impedir a livre difusão dos agentes antioxidantes e assim a protecção do núcleo contra os danos oxidativos. Nos estudos *in vitro* realizados neste trabalho, esta barreira parece provocar uma ruptura de impedância que contribui para a dificuldade de aquisição de sinais de *backscattering* para lá dos seus limites. Esta teoria é corroborada pelos resultados obtidos pela análise por microscopia óptica (ver secção 5.4.2)

5.4.1.3 Catarata madura

A catarata é chamada madura quando todas as fibras do cristalino se tornaram opacas. Dependendo do processo patofisiológico que provoca a opacificação das fibras, este tipo de catarata pode estar associado a diferentes graus de esclerose nuclear. Nos casos relacionados com a idade, ocorre esclerose nuclear significativa e um aumento da dureza do cristalino. Noutras etiologias de catarata, como é o caso da catarata diabética, a catarata madura pode desenvolver-se num período de tempo relativamente curto. Nestes casos verifica-se pouca esclerose nuclear, e o cristalino tende a apresentar valores menores de dureza [122]. Neste trabalho verificou-se, por seccionamento dos cristalinos com catarata madura, que o nível de esclerose nuclear atingido foi relativamente baixo, quando comparado com a região cortical.

Isto justifica-se pela rápida indução da catarata quando comparado com o processo natural de formação e com o próprio método pelo qual a catarata foi induzida: ao ser imerso numa solução indutora de catarata, a opacificação do cristalino ocorre do exterior para o interior, à medida que os agentes antioxidantes difundem através do tecido. Naturalmente, a zona exterior, correspondente ao córtex, será sempre mais afectada quando comparada com a região nuclear, mais interna.

Apesar de a identificação da catarata madura ser clinicamente simples, com recurso a lâmpada de fenda, o seu estudo pode ainda assim ter interesse clínico, para determinação do valor da dureza do cristalino e da distribuição espacial das zonas de maior densidade. Este conhecimento é de grande importância na preparação da cirurgia de remoção da catarata por facoemulsificação, bem como na decorrência de um quadro pós-cirúrgico sem complicações, tal como anteriormente referido.

A catarata madura ou total é facilmente induzida *in vitro*, aumentando o tempo de imersão na solução indutora de catarata atrás descrita. A Figura 57 mostra a representação modo B e a imagem de Nakagami de um cristalino com catarata total. A imagem de Nakagami apresenta uma distribuição homogénea de valores do parâmetro m muito elevados (~ 1), indicando uma concentração elevada de *scatterers*.

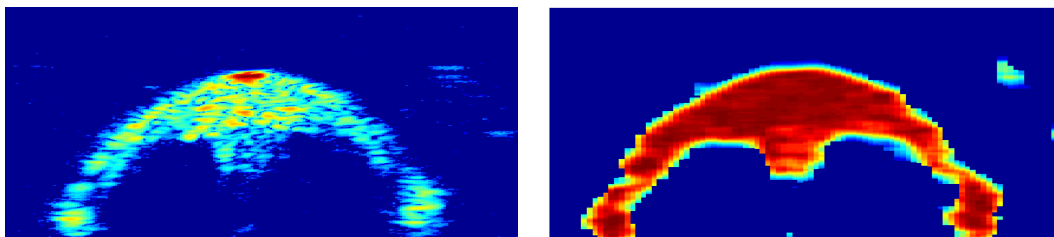


Figura 57. Representação de um cristalino com catarata madura, obtido por aumento do tempo de imersão na solução indutora. a) Imagem modo B, representada em pseudocor; b) imagem de Nakagami.

5.4.1.4 Catarata Sutural

Devido à dificuldade em conseguir cristalinos frescos e sem danos de transporte e/ou extracção, a catarata sutural estava muitas vezes presente nas amostras analisadas (Figura 58).

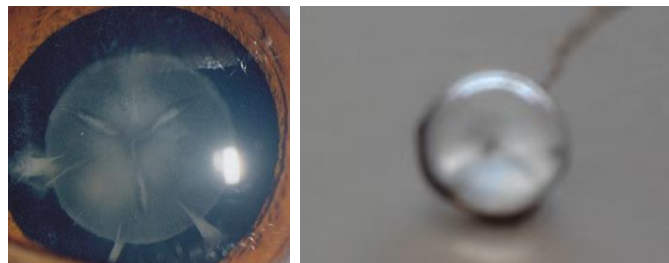


Figura 58. Representação da catarata sutural. a) Imagem de uma catarata sutural; b) imagem de um cristalino enucleado com as suturas visíveis. Adaptado de [123].

Devido às alterações consideráveis provocadas por esta característica, as amostras não puderam ser comparadas com os cristalinos normais, pelo que foram analisadas num grupo à

parte. A Figura 59 representa imagens modo B obtidas de cristalinos com catarata sutural, para os quatro tempos de imersão considerados. A Figura 60 representa as mesmas aquisições, representadas sob a forma de imagem de Nakagami. Após a análise das imagens obtidas verificou-se, ao contrário do que era o caso para os cristalinos íntegros, ser possível obter sinais da região nuclear do cristalino com SNR suficientemente elevado para permitir a sua análise. Isto acontece devido ao facto de, numa situação patológica de catarata, as suturas constituírem um meio de separação entre a normal organização das fibras que constituem o tecido neste estado.

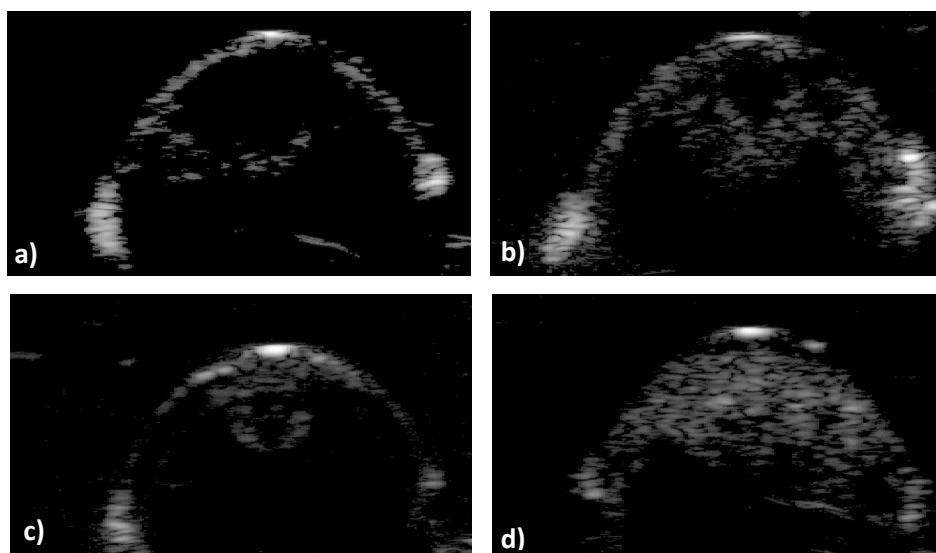


Figura 59. Imagens B-scan do padrão de evolução obtido para cristalinos com catarata sutural, para os quatro tempos de imersão. a), b), c) e d) correspondem a 0, 60, 120 e 180 minutos de imersão respectivamente.

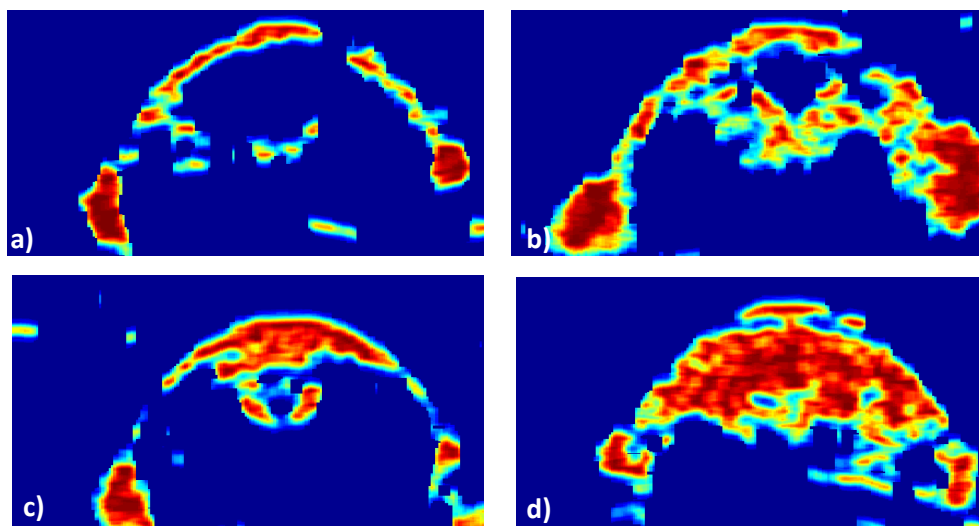


Figura 60. Imagens de Nakagami do padrão de evolução obtido para cristalinos com catarata sutural, correspondentes às imagens modo B representadas na Figura 59.

Nas imagens da Figura 59 e da Figura 60 é possível observar como a alteração da estrutura do cristalino pelas suturas influencia o padrão de formação e evolução da catarata: deixa de haver a separação clara entre a região cortical e a região nuclear, e a catarata já não apresenta a evolução homogênea ao longo do tecido verificada para o caso dos cristalinos íntegros.

5.4.1.5 Lado anterior vs. lado posterior do cristalino

A aquisição e análise dos sinais foi sempre feita para o lado anterior do cristalino, uma vez que é esse o lado por onde a luz penetra *in vivo*. No entanto, sabe-se que os lados anterior e posterior não são simétricos, nem anatômica nem estruturalmente. As principais diferenças residem no facto de a face anterior do cristalino ser mais plana e de conter uma camada de células epiteliais que está ausente na face posterior. Para comparação dos resultados, foram feitas aquisições do lado posterior do cristalino, para os quatro tempos de imersão. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 61.

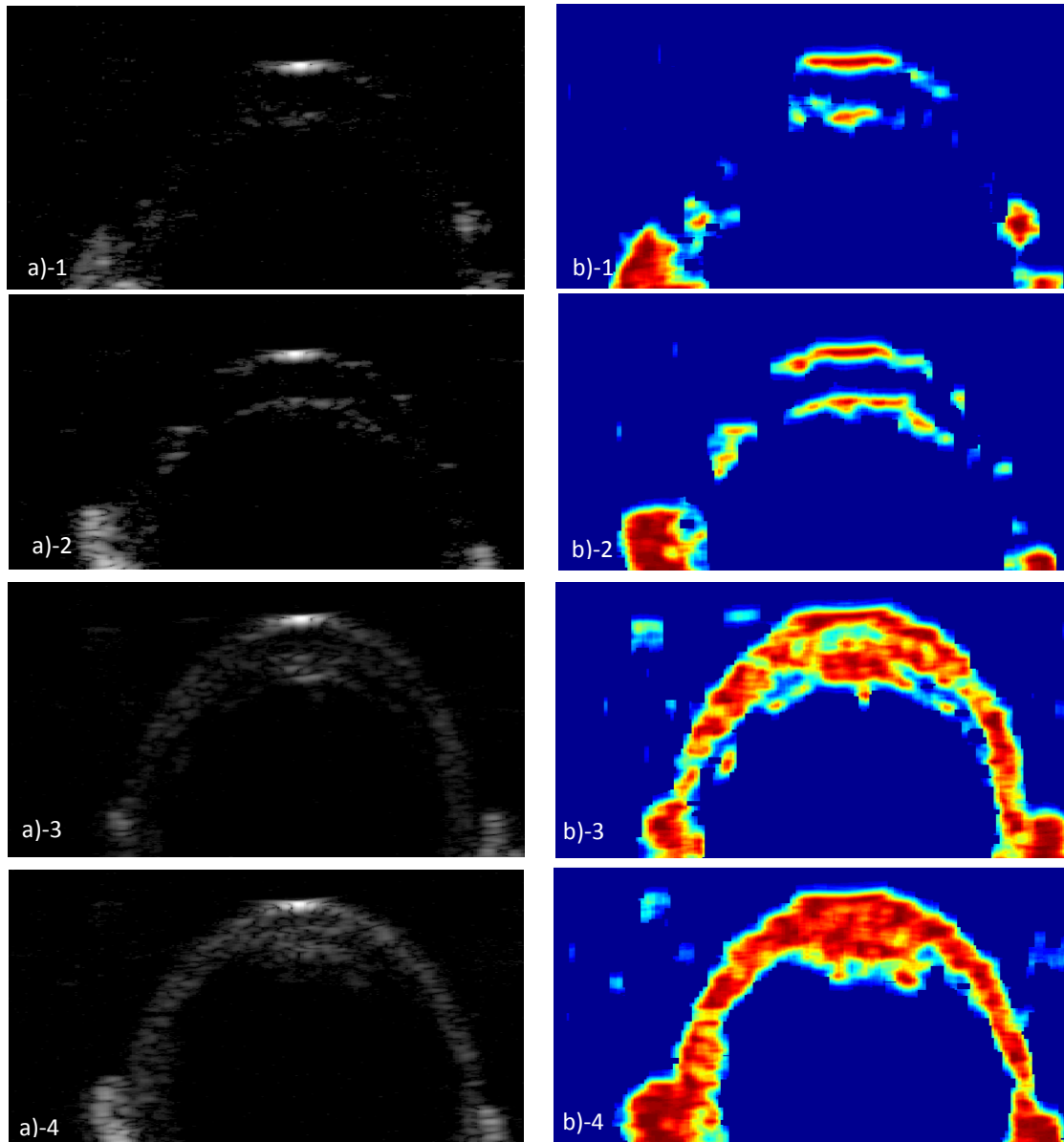


Figura 61. Sequência de imagens modo B e de Nakagami correspondentes ao lado posterior do cristalino, para os quatro tempos de imersão. a) e b) correspondem à imagem modo B e de Nakagami, respectivamente. A primeira, segunda, terceira e quarta linhas correspondem aos tempos de imersão 0, 60, 120 e 180 minutos.

As imagens obtidas do lado posterior do cristalino apresentaram um padrão de evolução semelhante às aquelas obtidas do lado anterior, representadas na Figura 51 e na Figura 52, levando a concluir que a presença da camada de células epiteliais não tem influência relevante no processo de formação e evolução da catarata. Para além disso, os resultados obtidos

mostram que, para cataratas de evolução homogênea, a caracterização do lado anterior permite inferir sobre o estado do tecido do lado posterior, de mais difícil análise por ultrassons devido à maior profundidade de penetração exigida.

5.4.2 Microscopia óptica

De acordo com os métodos descritos na secção 4.1.4, foram obtidos slices da região cortical (Figura 62) e da região nuclear do cristalino (Figura 63), para cristalinios normais e para os três tempos de imersão considerados.

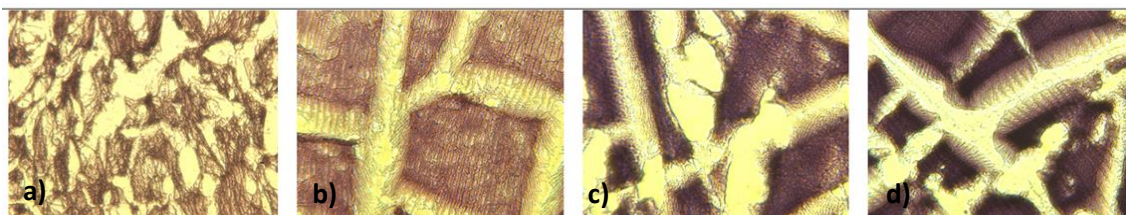


Figura 62. Imagens obtidas por microscopia óptica de cristalinios da região cortical para as diferentes classes de estudo. a) Controle; b) 60 minutos de imersão; c) 120 minutos de imersão; 180 minutos de imersão.

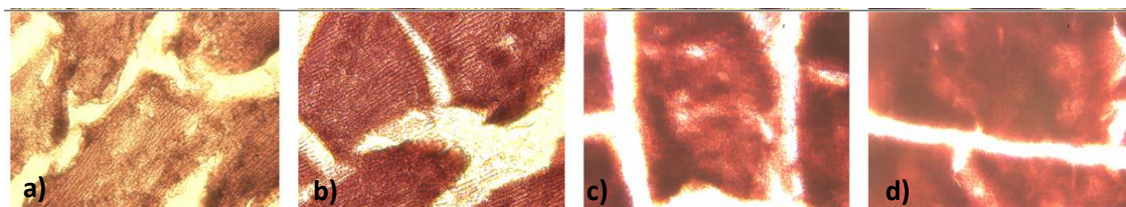


Figura 63. Imagens obtidas por microscopia óptica de cristalinios da região nuclear para as diferentes classes de estudo. a) Controle; b) 60 minutos de imersão; c) 120 minutos de imersão; 180 minutos de imersão.

Os *slices* obtidos contêm várias camadas de aglomerados proteicos, tecido conectivo e fibras de colagénio. As áreas mais escuras da imagem correspondem a áreas de maiores concentrações de agregados proteicos. Para tempos de imersão sucessivos, o aumento da tinação revelou uma maior aglomeração proteica durante o processo de formação da catarata.

A Figura 64 representa uma imagem obtida por microscopia óptica referente a um cristalino com catarata correspondente a 60 minutos de imersão. As imagens obtidas permitiram confirmar estruturalmente as características observadas nas imagens acústicas, essencialmente a variação das características do tecido ao passar da região cortical para a nuclear. A variação do tecido visível nesta zona (indicada pela seta vermelha) é a causa da variação de impedância acústica responsável pela linha de separação entre as duas regiões visível nas imagens modo B e de Nakagami obtidas.



Figura 64. Imagem obtida de um cristalino com catarata correspondente a 60 minutos de imersão. A seta vermelha indica a zona de passagem da região cortical para a região nuclear.

5.5 Classificação

5.5.1 Características extraídas

De acordo com os métodos descritos na secção 4.4.2, foi extraído um total de 93 características, usando quatro abordagens: análise textural, análise espectral, análise estatística e análise dos parâmetros acústicos, dando assim origem a quatro grupos distintos. As características de cada um dos grupos são sintetizadas nas tabelas 8 a 11.

Tabela 8. Características extraídas da análise textural.

Nº	Grupo de características	Descrição	Região	Dados base
1-7	Estatística de primeira ordem	Métricas extraídas pela estatística de primeira ordem	3	B-scan
8-14	Estatística de primeira ordem	Métricas extraídas pela estatística de primeira ordem	3	Imagem de Nakagami
15-34	GLCM	Obtido da matriz de co-ocorrência	3	B-scan
35-54	GLCM	Medidas obtido da matriz de co-ocorrência	3	Imagem de Nakagami
55	Dimensão fractal	Dimensão de Hausdorff	3	B-scan
63	Dimensão fractal	Dimensão de Hausdorff	3	Imagem de Nakagami
56-62	GLRLM	Medidas extraídas da matriz de comprimento de sequências de níveis de cinzento	3	B-scan
63-69	GLRLM	Medidas extraídas da matriz de comprimento de sequências de níveis de cinzento	3	Imagem de Nakagami
70-77	Medidas espectrais	Medidas extraídas da transformada de Fourier bidimensional (valor máximo, média, variância)	3	B-scan

Tabela 9. Características extraídas da análise espectral.

Nº	Nome	Descrição da característica	Região	Dados base
1	IBS	Coeficiente de <i>backscattering</i> integrado	4	Sinais A-scan
2	FCM	Frequência central média	4	Sinais A-scan
3	Frequência média	Média das frequências	4	Sinais A-scan
4	Frequência máxima	Frequência de máxima amplitude no espectro	4	Sinais A-scan
5	Declive espectral	Valor do declive do ajuste linear feito na banda central	4	Sinais A-scan
6	Ordenada na origem	Valor da ordenada na origem do ajuste linear feito na banda central	4	Sinais A-scan
7	Ajuste na banda central	Valor obtido pelo ajuste feito na banda central, correspondente ao valor de frequência máxima	4	Sinais A-scan

Tabela 10. Características extraídas da análise estatística.

Nº	Nome	Descrição da característica	Região	Dados base
1	α	Parâmetro α da distribuição Gama	3	Sinais A-scan
2	β	Parâmetro β da distribuição Gama	3	Sinais A-scan
3	m	Parâmetro m da distribuição de Nakagami	3	Sinais A-scan
4	Ω	Parâmetro Ω da distribuição de Nakagami	3	Sinais A-scan

Tabela 11. Características extraídas dos parâmetros acústicos.

Nº	Nome	Descrição da característica	Região	Dados base
1	Velocidade média	Média das velocidades calculadas para as linhas A-scan	5	Sinais A-scan
2	Variância da velocidade	Variância calculada para os valores de velocidade obtidos	5	Sinais A-scan
3	Atenuação média	Média das atenuações calculadas para as linhas A-scan	5	Sinais A-scan
4	Variância da atenuação	Variância calculada para os valores de atenuação obtidos	5	Sinais A-scan

A análise textural permitiu concluir que as imagens modo B de controlos apresentam uma textura mais homogénea, enquanto que as de cristalinos com catarata apresentam regiões mais heterogéneas e de contraste elevado, indicado pelas características de homogeneidade, contraste e energia. O parâmetro de entropia indicou uma textura mais estruturada para os controlos, e uma perda progressiva da estrutura com o evoluir da catarata. De um modo geral, as características extraídas indicam texturas mais lisas para os controlos, e mais rugosas para os cristalinos com catarata. A Figura 65 mostra o *boxplot* para duas das características extraídas através da análise textural. O parâmetro LGRE (*Low Gray Level Run Emphasis*), relacionado com a distribuição de valores de níveis de cinzento baixos, apresenta boa capacidade discriminativa entre controlos e casos com catarata (a). O contraste da imagem mostra um comportamento crescente à medida que aumenta o nível de evolução da catarata (b).

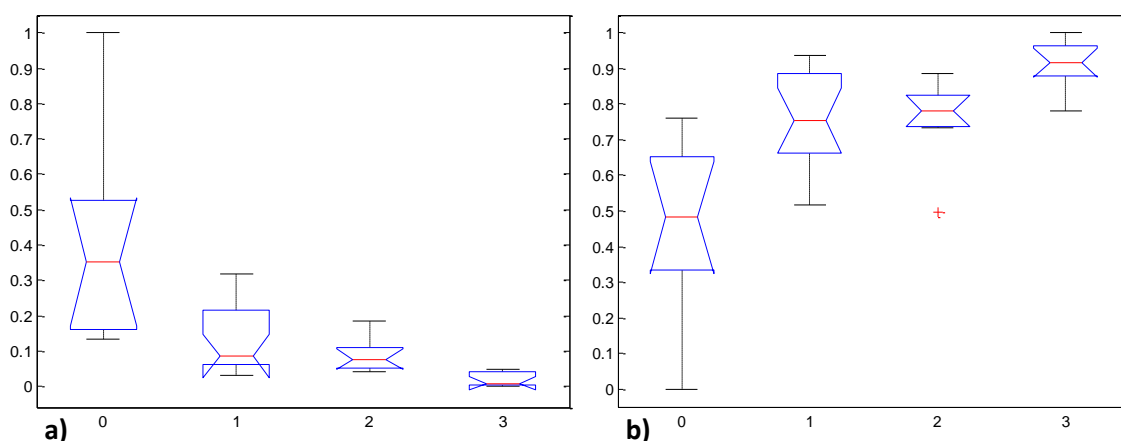


Figura 65. Características extraídas por análise textural. a) *Boxplot* para o parâmetro LGLRE, extraído da GLRLM; b) *boxplot* para o valor de contraste, extraído da GLCM. As quatro classes representam os grupos de estudo (controlo, 60 minutos, 120 minutos e 180 minutos de imersão). Os valores encontram-se normalizados.

Relativamente à análise espectral, observou-se de um modo geral uma diminuição do valor da frequência central, indicando maior atenuação das frequências mais elevadas para estados de evolução da catarata mais avançados. O declive espectral e a ordenada na origem variam de forma consistente, indicando variações nas dimensões efectivas dos *scatterers*, bem como nas suas concentrações e impedâncias acústicas relativas. A Figura 66 representa a variação do declive espectral e do valor da ordenada na origem obtidos para o ajuste linear feito ao espectro.

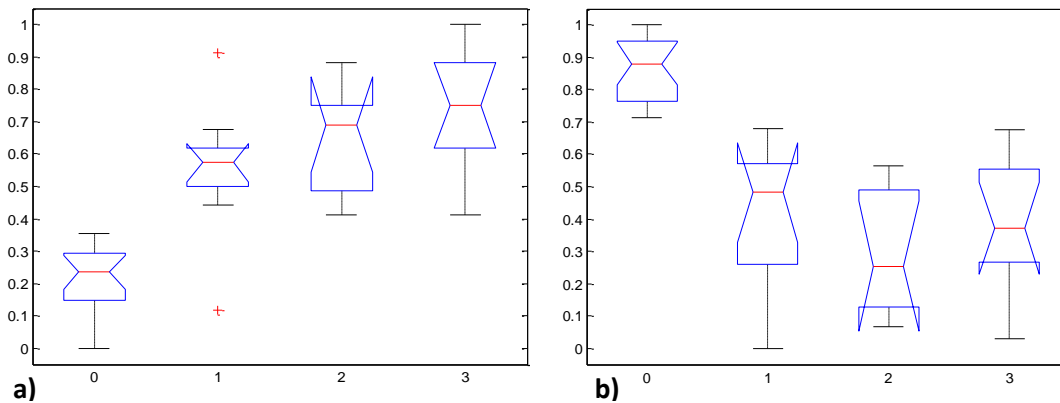


Figura 66. *Boxplots* ilustrativos da variação do valor de características de acordo com a classe de estudo. a) Declive espectral; b) ordenada na origem. As quatro classes representam os grupos de estudo (controlo, 60 minutos, 120 minutos e 180 minutos de imersão). Os valores encontram-se normalizados.

Os resultados obtidos pela análise estatística dos sinais, confirmaram o aumento do parâmetro m da distribuição da Nakagami com a evolução da catarata, indicando um aumento da concentração de *scatterers* presentes no tecido. Para além disso, também o parâmetro de forma da distribuição Gama, β , mostrou um aumento com o evoluir da catarata. Ambos os parâmetros são apresentados na Figura 67.

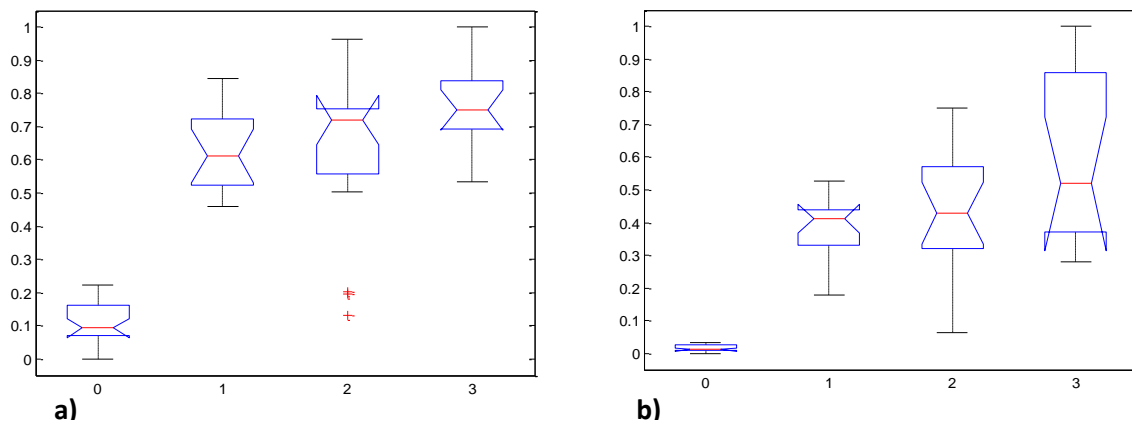


Figura 67. Características extraídas por análise estatística. a) *Boxplot* para o parâmetro β da distribuição Gama; b) parâmetro m da distribuição de Nakagami. Os valores encontram-se normalizados.

A análise dos parâmetros acústicos permitiu confirmar os resultados obtidos em estudos anteriores, isto é, à medida que a catarata evolui, verifica-se um aumento dos valores de velocidade de propagação e atenuação. A Figura 68 mostra os *boxplots* referentes a esses dois parâmetros. Torna-se evidente que o parâmetro da atenuação apresenta uma capacidade

discriminativa das diferentes classes muito superior quando comparado à velocidade de propagação.

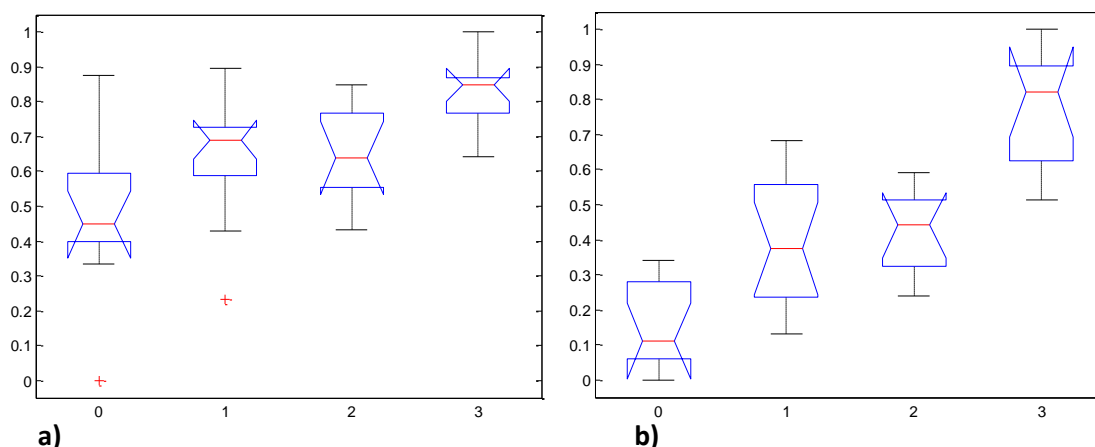


Figura 68. *Boxplots* de características extraídas por análise de parâmetros acústicos, para as quatro classes de estudo. a) Velocidade de propagação; b) coeficiente de atenuação. Os valores encontram-se normalizados.

5.5.2 Descrição geral do estudo

Para a classificação dos dados obtidos, com vista a discriminação entre diferentes casos de estudo, dividiu-se o problema em duas partes.

A primeira parte da classificação, apresentada na secção 5.5.3, foi feita usando uma abordagem binária. Foram implementados dois classificadores binários: um para a discriminação entre cristalinos normais (grupo controlo) e cristalinos com diferentes estádios de evolução da catarata (três tempos de imersão distintos), que foi designado CB1, e outro para a discriminação entre fases iniciais da catarata (60 minutos de imersão) e estados mais avançados (120 minutos de imersão), designado CB2. Antes da classificação propriamente dita, foram aplicados os diferentes métodos de selecção (descritos na secção 4.4.4.1) às características extraídas. Para além dos quatro grupos de características extraídas pelas quatro abordagens, foi considerado um quinto grupo, resultante da combinação dos outros quatro. Cada um dos classificadores foi treinado e testado com cada um dos cinco grupos de características seleccionadas. Assim, através da classificação sequencial dos dados usando os dois classificadores, é possível discriminar entre cristalinos saudáveis, cristalinos com estágio inicial de catarata e cristalinos com estádios intermédios de evolução da catarata. Nesta fase do trabalho não foi incluído o grupo de estudo correspondente à catarata em estádios avançados de evolução (180 minutos de imersão). Para além de simplificar o problema de classificação, ao serem consideradas apenas três classes, o estado de catarata avançada tem pouco interesse clínico, uma vez que é facilmente identificável por inspecção visual.

Na segunda parte da classificação, apresentada na secção 5.5.4, foi aplicada uma abordagem multiclasse ao problema. Numa primeira fase considerou-se apenas três classes (controlos, fases iniciais (60 minutos) e fases intermédias (120 minutos)), classificadas pelo primeiro classificador, CM1, passando, numa segunda fase, à classificação multiclasse para discriminação entre os quatro grupos estudados: controlos, fases iniciais (60 minutos), fases intermédias (120 minutos) e fases avançadas (180 minutos), através de um segundo

classificador, CM2. Os dois classificadores foram treinados e testados com o quinto grupo de características (combinação das quatro abordagens de extracção), após a selecção das mais discriminativas.

5.5.3 Classificação binária

Esta secção é dividida em três partes. A primeira diz respeito à aplicação dos 3 tipos de métodos de selecção aos 5 grupos de características em análise, de acordo com o que foi dito na secção 5.5.2. Na segunda e terceira partes são treinadas e testadas as classificações binárias CB1 e CB2, respectivamente, com apresentação das métricas de desempenho calculadas. Para ambas as classificações foram usadas como entrada os grupos de características seleccionadas na primeira parte. Cada uma das classificações binárias foi testada para quatro tipos de classificadores: Bayesiano, Discriminante Linear de Fisher, K vizinhos mais próximos e *Support Vector Machines*.

5.5.3.1 Selecção de características

Para as classificações binárias realizadas, o número de amostras para treino foi sempre superior a 120. De modo a respeitar a relação entre o número de dados e o número de características, $n \gg d^2$ (enunciada na secção 4.4.4.1), considerando $n = 120$, o número de características (d), não deve ser superior a 4 para evitar fenómenos de *overfitting*. No entanto, sabe-se que a selecção de características deve ser feita de acordo com o classificador usado, uma vez que desta forma é possível otimizar o seu desempenho para a tarefa de classificação para a qual foi construído. Assim, para cada método de selecção de características, avaliou-se o efeito do maior ou menor número de características seleccionadas no desempenho final do classificador. A selecção final do número de características a usar em cada caso foi feita de modo a otimizar o desempenho, mas ao mesmo tempo beneficiando sempre o uso de um número menor de características de modo a reduzir a probabilidade de ocorrência de *overfitting* do classificador e, conseqüentemente, de obter classificações erradas quando testado com novos dados.

A. Selecção das características obtidas pela análise textural

1. Selecção de características pelo teste *Wilcoxon Rank-Sum*

Neste método de selecção de características, é avaliada a capacidade discriminativa de cada característica através do nível de significância (*p-value*) do teste de hipóteses relativo à diferença de medianas da característica para as duas classes em estudo. A Figura 69 representa os *p-values* do teste *Wilcoxon rank-sum* calculados para as diferentes características extraídas pela análise textural, para as duas classes a discriminar por cada uma das classificações binárias, CB1 e CB2.

O primeiro passo da selecção de características é a remoção daquelas que apresentam um valor de significância superior a 0,05, uma vez que a probabilidade de estas características permitirem a distinção entre as duas classes consideradas é reduzida. As restantes características são ordenadas de ordem crescente de valor de significância, para de seguida ser

analisado o efeito do número de características incluídas na classificação, no desempenho do classificador. O resultado é apresentado na Figura 70. As variações observáveis indicam um desempenho máximo para 4 e 9 características seleccionadas, para a CB1 e para a CB2, respectivamente.

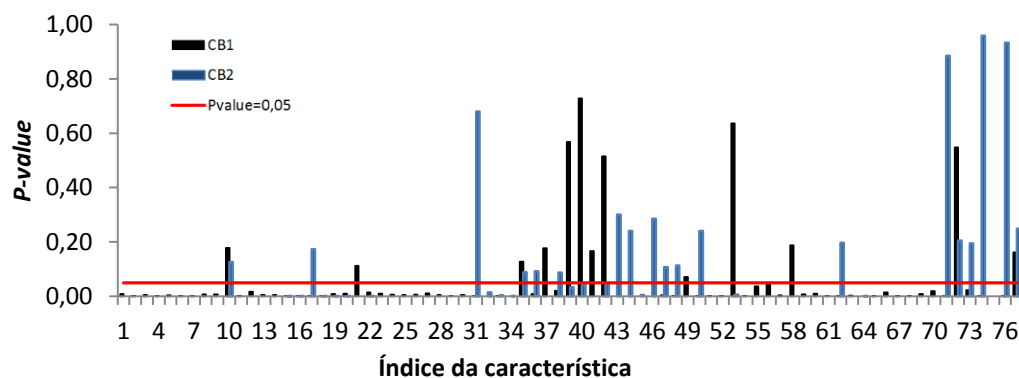


Figura 69. Gráfico dos *p-values* do teste *Wilcoxon rank-sum* calculados para as diferentes características, para ambos os casos de classificação. A linha vermelha representa o limiar para uma diferença estatística entre as medianas das duas classes para a característica em causa.

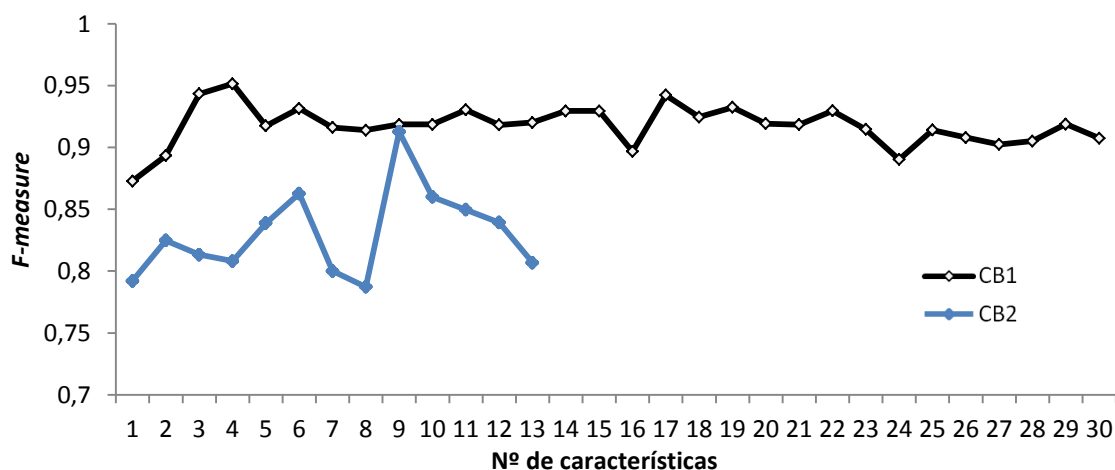


Figura 70. Variação do parâmetro *F-measure* com o número de características seleccionadas.

2. Selecção de características por pesquisa aleatória de subconjuntos

Neste método de selecção, as características em análise são testadas para o problema de classificação em causa, através do algoritmo KNN. O resultado final é apresentado sob a forma de uma lista de características ordenadas pelo seu grau de relevância na tarefa de classificação. De modo a seleccionar o número óptimo de características a incluir a partir desta lista ordenada, foi mais uma vez avaliada a influência do número de características incluídas no sistema de classificação no desempenho obtido para cada uma das classificações binárias, CB1 e CB2. O gráfico da Figura 73 representa os resultados obtidos, sugerindo a selecção das primeiras 11 características para a CB1, e das primeiras quatro para a CB2.

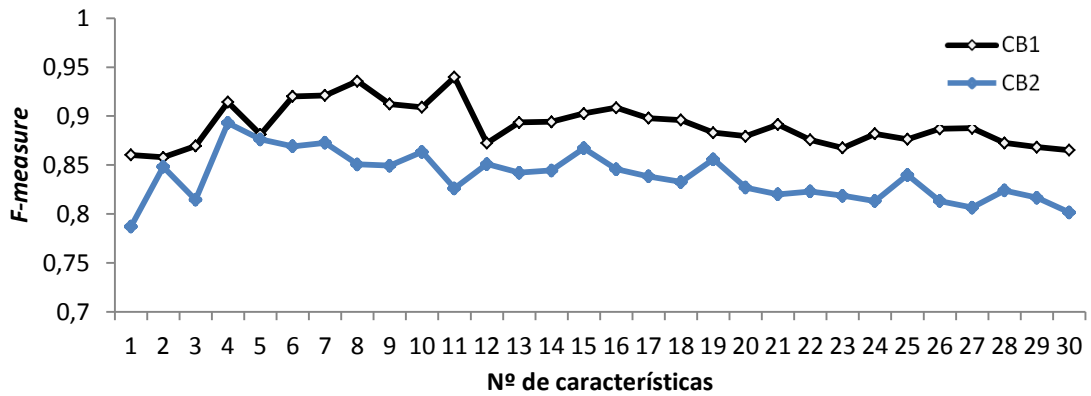


Figura 71. Variação do parâmetro *F-measure* com o número de características seleccionadas.

3. Selecção de características por PCA

Neste método de selecção de características, os dados são projectados ao longo de um número de dimensões predefinidas pelo utilizador, usando a análise de componentes principais. De modo a determinar o número óptimo de dimensões para a projecção dos dados, o número de dimensões é variado entre 1 e 30 e o valor para o parâmetro *F-measure* é calculado para cada conjunto de características resultantes. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 72, indicando um número óptimo de dimensões de 4 e 5, para o classificador 1 e 2, respectivamente.

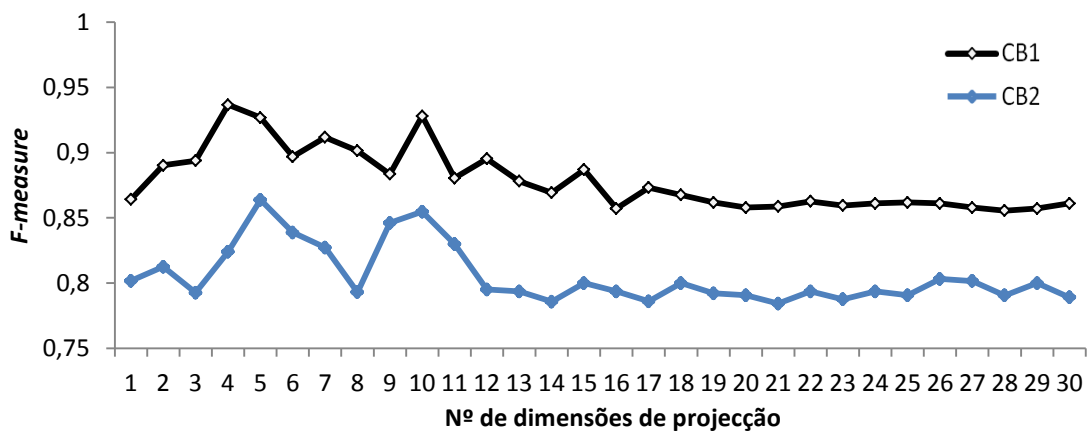


Figura 72. Variação do parâmetro *F-measure* com o número de dimensões de projecção utilizadas para a PCA.

B. Selecção das características obtidas pela análise espectral

1. Selecção de características pelo teste *Wilcoxon Rank-Sum*

À semelhança do que foi feito para a selecção de características extraídas pela análise textual, foi determinado o *p-value* para cada característica extraída pela análise espectral. Os resultados são apresentados na Figura 73.

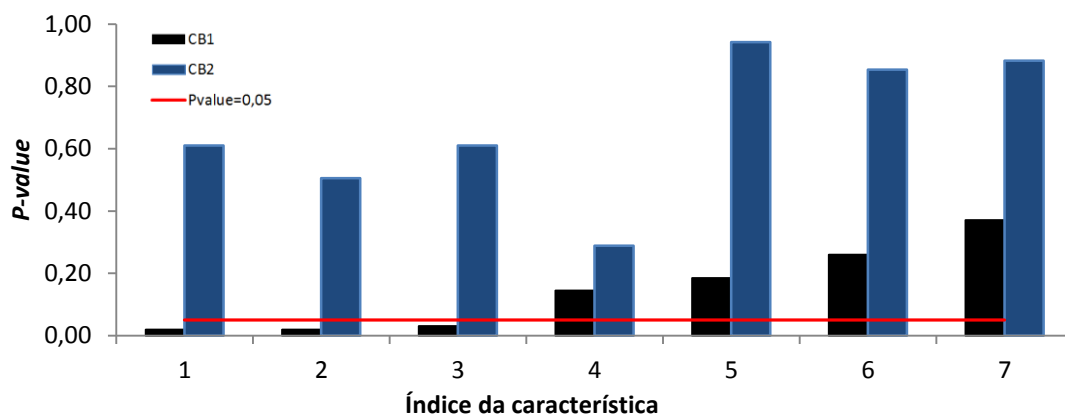


Figura 73. Gráfico que representa os *p-values* do *Wilcoxon rank-sum test* calculados para as diferentes características. A linha vermelha representa o limiar para uma diferença estatística entre as medianas das duas classes para a característica em causa.

Para a classificação CB2, nenhuma das características cumpre o critério de inclusão $p < 0,05$, não sendo por isso incluídas em posteriores classificações. Relativamente à classificação CB1, 3 das características satisfazem o critério $p < 0,05$. O número que deve ser incluído na classificação é avaliado através do estudo da influência da sua variação no desempenho do classificador, à semelhança do que foi feito anteriormente. O resultado é apresentado no gráfico da Figura 74, indicando um valor ligeiramente superior para a classificação com 3 características.

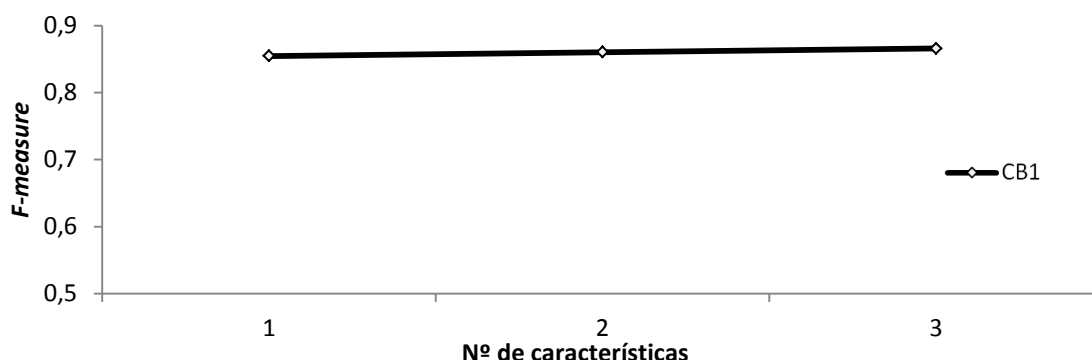


Figura 74. Variação do parâmetro *F-measure* com o número de características seleccionadas.

2. Selecção de características por pesquisa aleatória de subconjuntos

Este método de selecção funciona com base na geração aleatória de subconjuntos de características a partir do conjunto inicial. Por isso, este método restringe-se à aplicação a grupos de maior tamanho, geralmente acima das 20 características. Como apenas foram extraídas sete características pela análise espectral, este método de selecção não foi aplicado.

3. Selecção de características por PCA

De modo semelhante ao que foi feito para as características extraídas pela análise textural, o número de dimensões de projecção na PCA foi variado entre 1 e 7, para poder avaliar qual o

número óptimo de dimensões para maximização do desempenho da classificação. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 75.

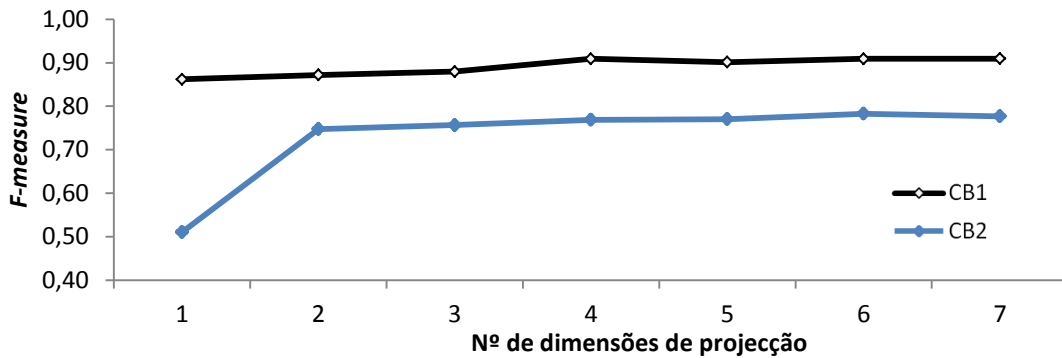


Figura 75. Variação do parâmetro *F-measure* com o número de dimensões de projecção utilizadas para a análise PCA.

Por observação do gráfico da Figura 75, conclui-se que a performance óptima é conseguida com uma projecção sobre um espaço de 4 dimensões para ambos os sistemas de classificação.

C. Selecção das características obtidas pela análise estatística

1. Selecção de características pelo teste *Wilcoxon Rank-Sum*

À semelhança do que foi feito para a selecção de características extraídas pela análise textural e espectral, foi determinado o *p-value* para cada característica extraída pela análise estatística. Os resultados são apresentados na Figura 76.

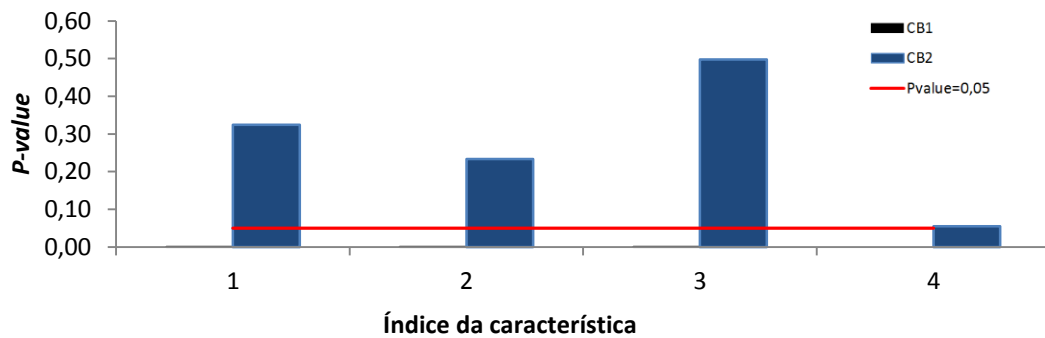


Figura 76. Gráfico que representa os *p-values* do *Wilcoxon rank-sum test* calculados para as diferentes características. A linha vermelha representa o limiar para uma diferença estatística entre as medianas das duas classes para a característica em causa.

Para o primeiro classificador, todas as características apresentam um *p-value* inferior a 0,001, indicando diferenças estatísticas significativas. São por isso incluídas todas as características para posterior avaliação do desempenho em função do número de características incluídas. A variação da *F-measure* em função do número de características seleccionadas é ilustrada no gráfico da Figura 77, indicando um desempenho ligeiramente superior para um número de características igual a dois. Já para a classificação CB2, nenhuma das características cumpre o critério de inclusão $p < 0,05$. Este grupo de características é por isso excluído nas classificações posteriores.

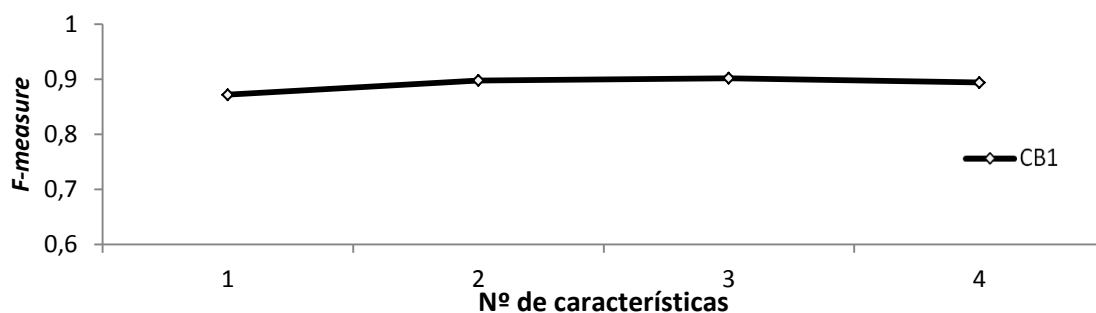


Figura 77. Variação do parâmetro *F-measure* com o número de características seleccionadas.

2. Selecção de características por pesquisa aleatória de subconjuntos

Devido ao reduzido número de características extraído por esta abordagem, e à semelhança do que foi dito para as características obtidas pela análise espectral, o método de selecção por pesquisa aleatória de subconjuntos não foi aplicado às características extraídas pela análise estatística.

3. Selecção de características por PCA

De modo semelhante ao que foi feito para os outros grupos de características, foi estudada a dependência do desempenho dos sistemas de classificação com o número de dimensões de projecção definido para a análise de componentes principais. Os resultados são apresentados no gráfico da Figura 78, sugerindo que a performance óptima é conseguida com uma projecção sobre um espaço de 3 dimensões para a CB1 e de 2 dimensões para a CB2.

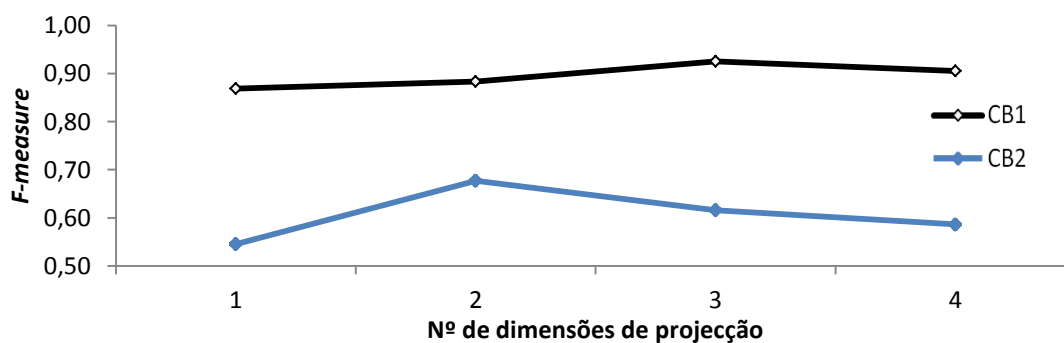


Figura 78. Variação do parâmetro *F-measure* com o número de dimensões de projecção utilizadas para a PCA.

D. Selecção das características obtidas dos parâmetros acústicos

1. Selecção de características pelo teste *Wilcoxon Rank-Sum*

Mais uma vez foi realizado o teste *Wilcoxon Rank-sum* para determinar a capacidade discriminativa das características. No gráfico da Figura 79 são apresentados os resultados obtidos, sendo possível observar que apenas 3 das características estão abaixo do valor limite de $p\text{-value}=0,05$ para a CB1, e 2 para a CB2. Estas características foram seleccionadas para análise posterior na influência do desempenho, sendo os resultados apresentados no gráfico da Figura 80. Os valores sugerem a selecção de duas características para a primeira classificação binária, e de apenas uma para a segunda.

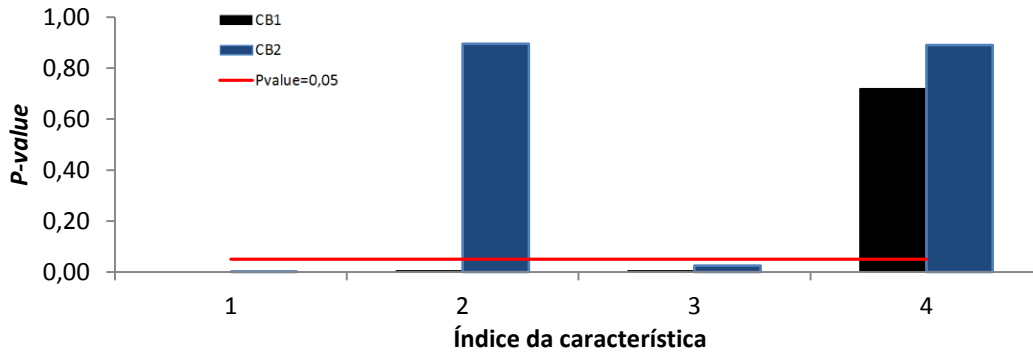


Figura 79. Gráfico que representa os *p-values* do *Wilcoxon rank-sum test* calculados para as diferentes características. A linha vermelha representa o limiar para uma diferença estatística entre as medianas das duas classes para a característica em causa.

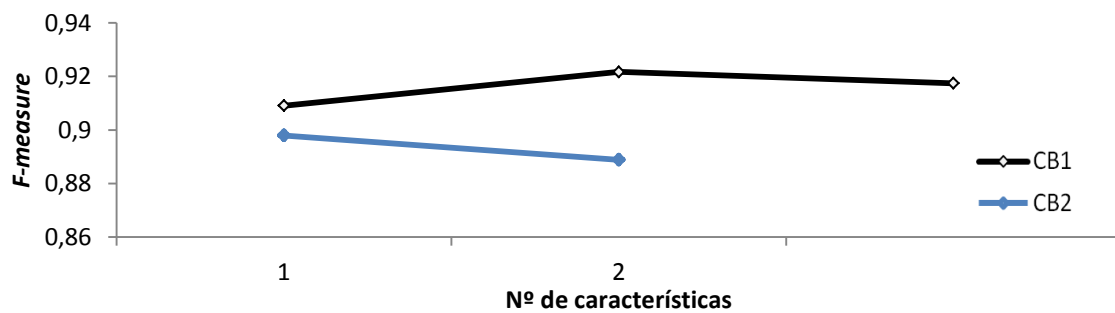


Figura 80. Variação do parâmetro *F-measure* com o número de características seleccionadas.

2. Selecção de características por pesquisa aleatória de subconjuntos

Devido ao reduzido número de características extraído por esta abordagem, e à semelhança do que foi dito para as características obtidas pela análise espectral e pela análise estatística, o método de selecção por pesquisa aleatória de subconjuntos não foi aplicado às características obtidas dos parâmetros acústicos.

3. Selecção de características por PCA

O resultado do desempenho do classificador obtido pela projecção das 4 características extraídas sobre espaços de diferentes dimensões é apresentado na Figura 81. Os resultados sugerem um número de dimensões óptimo igual a 4 para a primeira classificação e 2 para a segunda.

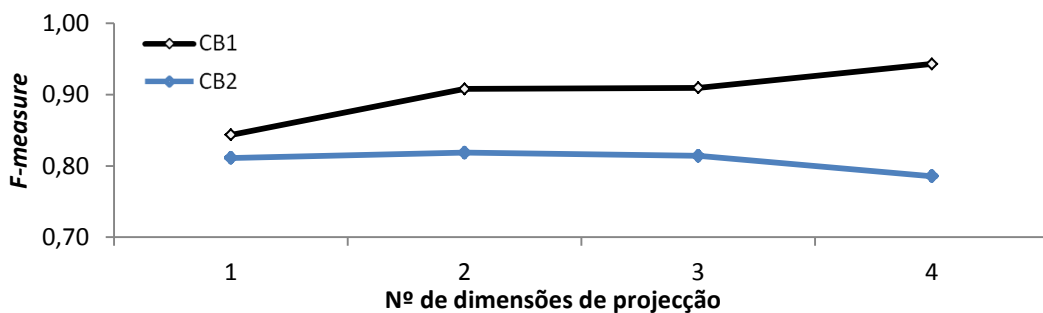


Figura 81. Variação do parâmetro *F-measure* com o número de dimensões de projecção utilizadas para a PCA.

E. Selecção das características obtidas pela combinação de todas as abordagens

1. Selecção de características pelo teste *Wilcoxon Rank-Sum*

A Figura 82 representa os valores de significância do teste *Wilcoxon rank-sum* calculados para as diferentes características extraídas, para as duas classes a discriminar em cada uma das classificações binárias. Depois de removidas as características que apresentam um valor de significância superior a 0,05, as restantes foram analisadas relativamente ao seu efeito no desempenho do classificador. O resultado é apresentado na Figura 83. As variações observáveis sugerem um número óptimo de 5 características para ao CB1 e 8 para aCB2.

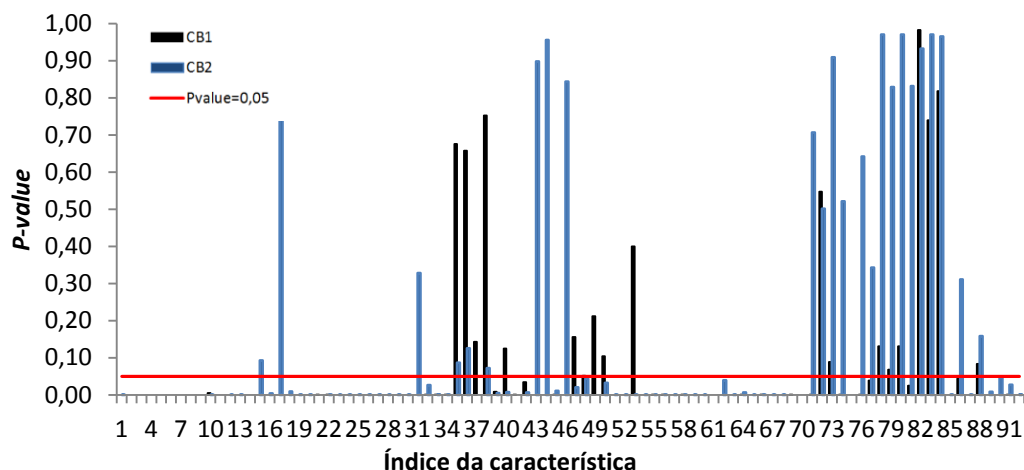


Figura 82. Gráfico que representa os *p-values* do *Wilcoxon rank-sum test* calculados para as diferentes características. A linha vermelha representa o limiar para uma diferença estatística entre as medianas das duas classes para a característica em causa.

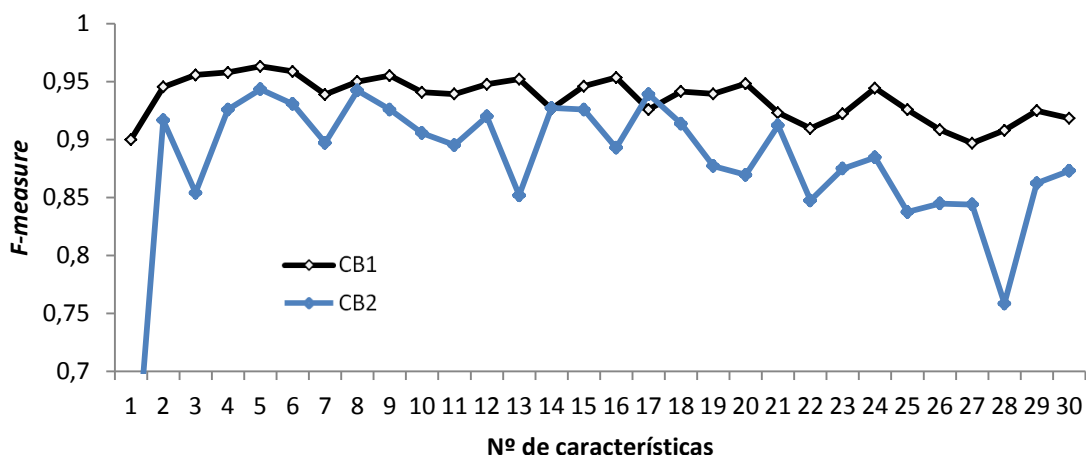


Figura 83. Variação do parâmetro *F-measure* com o número de características seleccionadas.

2. Selecção de características por pesquisa aleatória de subconjuntos

De modo a seleccionar o número óptimo de características para as duas classificações binárias, foi obtido o *ranking* das características através da pesquisa aleatória de subconjuntos, à semelhança do que foi feito para as características extraídas por análise textural. Foi avaliada a influência do número de características incluídas no sistema de classificação sobre o seu

desempenho, sendo os resultados apresentados no gráfico da Figura 84. Os dados sugerem a selecção das primeiras 10 características para a CB1, e das primeiras 4 para a CB2.

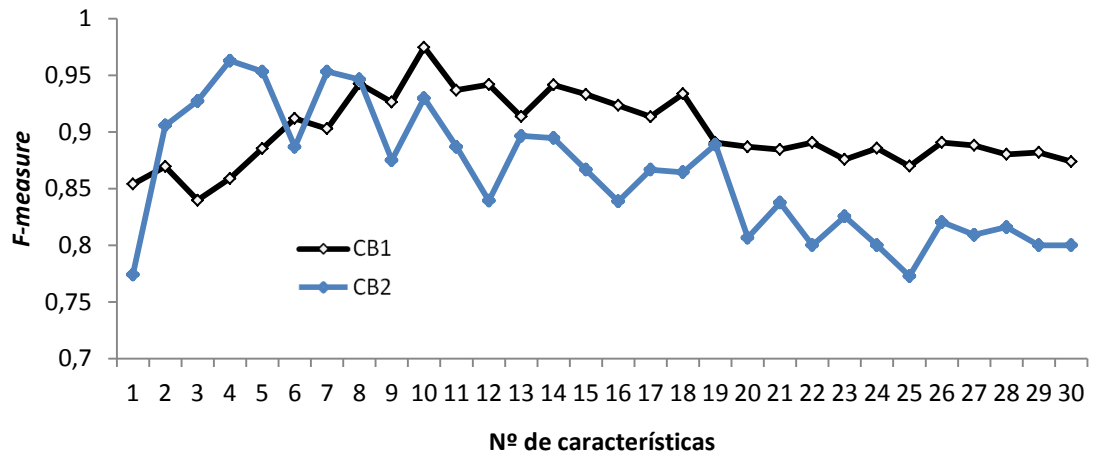


Figura 84. Variação do parâmetro *F-measure* com o número de características seleccionadas.

3. Selecção de características por PCA

Mais uma vez foi estudada a relação entre a *F-measure* e o número de dimensões de projecção. Para o conjunto de todas as características foi encontrado um valor óptimo de 2 dimensões de projecção para a CB1 e nove dimensões para a CB2. Os resultados são apresentados no gráfico da Figura 85.

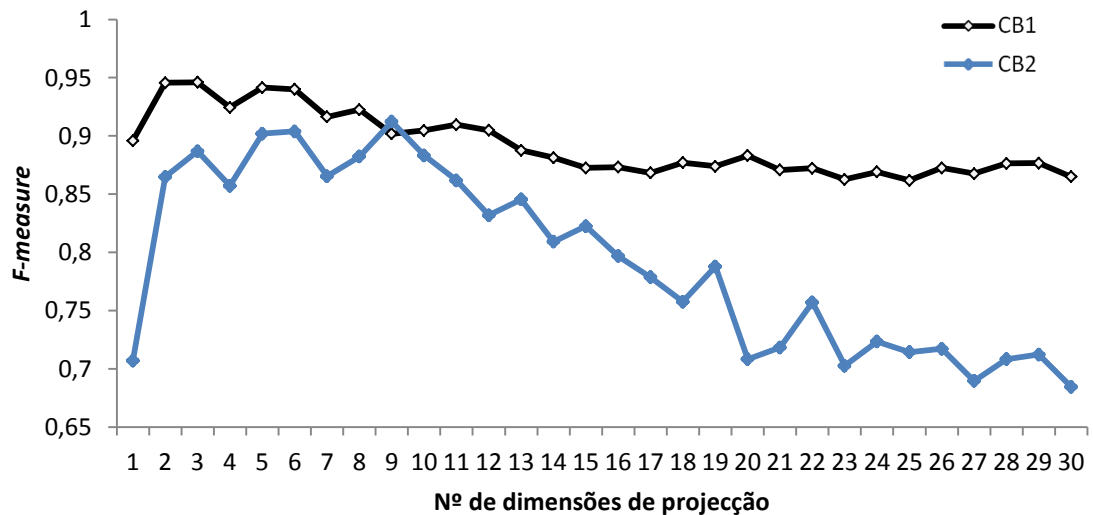


Figura 85. Variação do parâmetro *F-measure* com o número de dimensões de projecção utilizadas para a PCA.

5.5.3.2 Classificador binário I (controlo vs. catarata)

Nesta secção são apresentados os resultados obtidos para a classificação binária entre cristalinos saudáveis e com catarata em diferentes estádios de evolução. Foram treinados quatro tipos de classificadores binários, com os diferentes grupos de características seleccionadas na secção 5.5.3.1. Os resultados são apresentados nas Tabelas 12 a 15.

Tabela 12. Resultados obtidos para a classificação das amostras através do classificador binário de Bayes. São apresentados os resultados da classificação para os grupos de características obtidos pela combinação das diferentes abordagens de extração com os diferentes métodos de selecção.

Abordagem de extração	Método de selecção	Precisão (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Exactidão (%)	F-Measure (%)	AUC (%)
A	1	96,12	88,68	88,08	88,23	91,93	94,07
	2	93,32	78,92	95,91	91,74	94,60	93,44
	3	92,96	77,39	92,08	88,62	92,52	91,11
B	1	86,47	68,18	68,42	68,36	76,39	69,73
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	96,99	92,75	79,24	82,66	87,22	93,00
C	1	96,80	92,10	83,11	85,43	89,43	94,11
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	96,25	90,71	82,71	84,77	88,97	93,06
D	1	98,59	96,07	89,34	90,99	93,74	98,02
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	94,00	81,75	93,27	90,44	93,63	93,25
E	1	98,74	96,58	88,49	90,49	93,34	98,15
	2	94,77	83,79	96,38	93,26	95,56	95,10
	3	92,36	76,06	94,04	89,63	93,19	91,64

Tabela 13. Resultados obtidos para a classificação das amostras através do classificador binário KNN. São apresentados os resultados da classificação para os grupos de características obtidos pela combinação das diferentes abordagens de extração com os diferentes métodos de selecção.

Abordagem de extração	Método de selecção	Precisão (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Exactidão (%)	F-Measure (%)	AUC (%)
A	1	92,88	78,53	91,33	88,18	92,10	91,16
	2	88,96	64,04	94,48	86,99	91,64	87,97
	3	90,37	69,49	93,21	87,38	91,77	88,94
B	1	90,65	73,93	85,40	82,50	87,95	85,71
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	90,29	71,60	86,64	82,92	88,43	85,52
C	1	89,89	70,46	90,78	85,56	90,33	87,77
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	89,79	70,16	90,91	85,57	90,35	87,74
D	1	92,32	76,22	93,53	89,26	92,92	91,43
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	84,16	46,76	92,56	81,27	88,16	81,04
E	1	96,98	91,04	93,56	92,94	95,23	96,70
	2	94,04	82,06	95,26	89,98	93,30	93,07
	3	95,28	85,55	95,71	93,20	95,49	95,42

Tabela 14. Resultados obtidos para a classificação das amostras através do classificador binário FLD. São apresentados os resultados da classificação para os grupos de características obtidos pela combinação das diferentes abordagens de extração com os diferentes métodos de selecção.

Abordagem de extração	Método de selecção	Precisão (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Exactidão (%)	F-Measure (%)	AUC (%)
A	1	91,96	75,29	87,72	84,78	89,79	87,80
	2	92,12	76,85	87,60	84,97	89,80	88,40
	3	92,30	76,57	87,86	85,17	90,02	88,43
B	1	95,60	92,36	55,40	64,66	70,15	81,73
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	99,50	99,10	58,99	69,02	74,07	96,79
C	1	95,40	90,30	70,50	75,63	81,08	86,73
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	95,30	89,96	70,22	75,28	80,86	86,27
D	1	99,31	98,52	68,74	76,04	81,24	96,61
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	95,66	87,44	90,60	89,82	93,06	94,43
E	1	99,17	98,02	77,13	82,25	86,77	97,21
	2	92,40	77,32	90,27	87,08	91,32	90,12
	3	94,90	85,14	90,56	89,22	92,68	93,45

Tabela 15. Resultados obtidos para a classificação das amostras através do classificador binário SVM. São apresentados os resultados da classificação para os grupos de características obtidos pela combinação das diferentes abordagens de extração com os diferentes métodos de selecção.

Abordagem de extração	Método de selecção	Precisão (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Exactidão (%)	F-Measure (%)	AUC (%)
A	1	95,32	86,37	90,56	89,53	92,88	93,96
	2	87,75	58,30	97,89	88,12	92,54	88,74
	3	87,48	56,41	95,11	85,90	91,14	86,06
B	1	89,81	71,11	85,64	81,98	87,67	84,62
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	93,53	81,66	89,23	87,33	91,33	91,38
C	1	93,70	82,31	92,41	89,79	93,05	93,10
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	91,81	76,34	92,12	88,05	91,96	90,47
D	1	89,69	65,89	97,69	89,81	93,52	90,64
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	87,67	57,93	97,46	87,75	92,31	88,31
E	1	98,56	95,69	96,36	96,19	97,45	98,69
	2	90,90	70,19	97,47	90,74	94,07	91,68
	3	93,19	78,74	94,99	90,99	94,08	92,97

5.5.3.3 Classificador binário II (catarata inicial vs. catarata avançada)

Nesta secção é feita a classificação binária entre cristalinos com catarata inicial e com catarata mais avançada, correspondente a 120 minutos de imersão, seguindo uma abordagem semelhante à da secção anterior. Foram treinados quatro tipos de classificadores binários, com os diferentes métodos de selecção de características. Os resultados são apresentados nas Tabelas 16 a 19.

Tabela 16. Resultados obtidos para a classificação das amostras através do classificador binário de Bayes. São apresentados os resultados da classificação para os grupos de características obtidos pela combinação das diferentes abordagens de extracção com os diferentes métodos de selecção.

Abordagem de extracção	Método de selecção	Precisão (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Exactidão (%)	F-Measure (%)	AUC (%)
A	1	77,14	87,33	44,50	66,34	56,44	82,86
	2	60,44	48,05	82,92	65,10	69,92	73,49
	3	65,75	71,45	56,19	63,92	60,60	61,23
B	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	67,72	20,05	91,76	66,40	77,93	72,53
C	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	70,45	27,82	94,45	70,84	80,70	77,20
D	1	81,45	82,56	41,71	56,12	55,17	72,60
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	78,24	79,76	39,58	53,74	52,57	66,14
E	1	63,91	55,43	81,70	68,34	71,72	75,18
	2	61,75	51,03	82,17	66,30	70,51	73,93
	3	71,25	71,09	73,73	72,39	72,47	75,76

Tabela 17. Resultados obtidos para a classificação das amostras através do classificador binário KNN. São apresentados os resultados da classificação para os grupos de características obtidos pela combinação das diferentes abordagens de extração com os diferentes métodos de selecção.

Abordagem de extração	Método de selecção	Precisão (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Exactidão (%)	F-Measure (%)	AUC (%)
A	1	69,88	68,87	75,00	71,88	72,35	75,47
	2	59,26	60,39	58,48	59,44	58,87	57,23
	3	62,18	61,49	65,57	63,49	63,83	63,96
B	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	64,86	74,47	49,19	62,07	55,92	56,84
C	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	60,50	62,16	59,53	60,86	60,01	59,00
D	1	81,18	85,56	64,05	75,05	71,60	78,67
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	62,00	67,97	54,55	61,40	58,04	57,61
E	1	59,29	50,64	73,17	61,80	65,50	66,14
	2	61,20	60,15	65,87	62,94	63,45	63,30
	3	70,14	69,00	75,21	72,06	75,59	75,70

Tabela 18. Resultados obtidos para a classificação das amostras através do classificador binário FLD. São apresentados os resultados da classificação para os grupos de características obtidos pela combinação das diferentes abordagens de extração com os diferentes métodos de selecção.

Abordagem de extração	Método de selecção	Precisão (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Exactidão (%)	F-Measure (%)	AUC (%)
A	1	80,70	59,94	77,98	72,25	79,32	73,93
	2	76,97	59,63	72,97	68,29	74,92	69,55
	3	80,26	58,96	77,86	71,85	79,04	73,42
B	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	67,08	47,05	58,87	54,70	62,71	52,28
C	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	71,24	40,20	80,75	66,44	75,70	69,03
D	1	84,51	83,94	47,60	60,39	60,89	64,22
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	91,45	94,06	35,00	55,98	50,63	80,26
E	1	79,62	61,08	82,41	74,91	80,99	77,98
	2	64,40	56,11	82,23	68,94	72,23	75,88
	3	78,28	78,26	81,40	79,80	79,81	85,12

Tabela 19. Resultados obtidos para a classificação das amostras através do classificador binário SVM. São apresentados os resultados da classificação para os grupos de características obtidos pela combinação das diferentes abordagens de extração com os diferentes métodos de selecção.

Abordagem de extração	Método de selecção	Precisão (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Exactidão (%)	F-Measure (%)	AUC (%)
A	1	86,11	86,23	82,22	84,19	84,12	90,06
	2	83,94	82,96	84,33	83,66	84,13	89,41
	3	80,32	79,72	78,97	79,34	79,64	84,24
B	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	66,01	15,87	87,41	62,48	75,22	67,54
C	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	71,00	29,50	93,43	70,97	80,68	76,70
D	1	69,34	24,23	93,42	69,00	79,60	75,22
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	68,65	22,02	92,97	67,96	78,98	74,19
E	1	95,86	95,98	90,04	92,96	92,86	98,07
	2	94,10	93,81	95,71	94,78	94,90	98,03
	3	84,05	80,59	98,30	89,62	90,62	94,90

5.5.3.4 Desempenho do sistema binário

Para a classificação binária CB1, apresentada na secção 5.5.3.2, entre controlos e cristalinos com catarata, todos os classificadores tiveram desempenho bom ou excelente (de acordo com o valor de AUC obtido), para todos os conjuntos de características determinados. Verificou-se que o conjunto de todas as características combinadas permitiu, de um modo geral, a obtenção de valores superiores de desempenho quando comparados com os desempenhos obtidos pela classificação dos grupos separados pela sua abordagem de extração. De entre todos os classificadores, aquele que apresentou os melhores valores de desempenho foi o SVM, quando combinado com as características seleccionadas pelo teste *Wilcoxon rank-sum*. Para esta classificação, todas as métricas de desempenho apresentaram valores superiores a 95%.

Para a classificação binária CB2, apresentada na secção 5.5.3.3, entre os estados iniciais de evolução da catarata e os estados intermédios, a classificação apresentou valores de desempenho inferiores àqueles obtidos para a primeira classificação binária descrita, tal como seria de esperar. Para vários grupos de características seleccionadas foi obtido um desempenho fraco ou mesmo mau na classificação dos dados. No entanto, o classificador SVM permitiu obter resultados bons e excelentes para as características obtidas pela análise textural e pela combinação das características de todas as abordagens de análise. Os melhores resultados foram obtidos com as características extraídas pelo teste *Wilcoxon rank-sum* e pela pesquisa aleatória de subconjuntos, com valores superiores a 90% em todas as métricas de desempenho calculadas.

Na sequência da análise de desempenho feita para cada um dos classificadores binários, optou-se por usar o classificador SVM para ambas as classificações binárias. Para a classificação entre controlos e cristalinos com catarata foi usado o grupo de características obtido por selecção através do teste *Wilcoxon Rank-sum*, e para a discriminação entre estados iniciais e estados avançados, dentro do grupo de cristalinos identificados como casos com catarata, aplicou-se a selecção por pesquisa aleatória de subconjuntos. Ambos os classificadores binários resultaram em valores de AUC superiores a 90%, correspondente a uma avaliação excelente do seu desempenho. Os valores de desempenho discriminados para os dois classificadores são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Métricas de desempenho relativas aos dois métodos de classificação seleccionados para as duas tarefas de classificação.

Classificação	Precisão (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Exactidão (%)	<i>F-Measure</i> (%)	AUC (%)
CB1	98,56	95,69	96,36	96,19	97,45	98,69
CB2	94,10	93,81	95,71	94,78	94,90	98,03

Da combinação dos dois classificadores binários desenvolvidos resulta um sistema de classificação que permite, de modo sequencial, diferenciar entre cristalinos de controlo, cristalinos com catarata no seu estado inicial e cristalinos com catarata de estado mais avançado. O desempenho final da classificação entre as 3 classes é dado pela combinação dos desempenhos das duas classificações individuais, CB1 e CB2. Combinando os dois desempenhos através da chamada regra do produto, obtém-se uma classificação correcta entre as três classes de análise em 91% dos casos, correspondente a um valor de *F-measure* de 92,5%.

5.5.4 Classificação multiclasse

Esta secção é dividida em quatro subsecções. Ao contrário do que foi feito para a classificação binária, na classificação multiclasse já não são analisados os grupos individuais de características, sendo apenas analisado o quinto grupo, correspondente à combinação das características extraídas pelas diferentes abordagens (textural, espectral, estatística e acústica), e que permitiu a obtenção de melhores resultados na classificação binária. Na primeira secção, 5.5.4.1, é feita a selecção das características mais relevantes para a tarefa de classificação, que é abordada nas duas secções seguintes. Na secção 5.5.4.2 é treinado e testado o classificador CM1, que discrimina entre três classes (controlo, estados iniciais de evolução de catarata e estados mais avançados); na secção 5.5.4.3 é feito o mesmo estudo para discriminação entre as quatro classes de estudo deste trabalho (controlo, estados iniciais, estados intermédios e estados avançados), através do classificador CM2. Na quarta e última secção, 5.5.4.4 são resumidos e discutidos os valores de desempenho obtidos pelos classificadores CM1 e CM2.

5.5.4.1 Selecção de características

À semelhança do que foi feito para a classificação binária, antes de treinar o classificador foram seleccionadas as melhores características. Como o teste paramétrico que está na base da selecção pelo teste *Wilcoxon rank-sum* é apenas aplicável à avaliação da capacidade discriminativa entre duas classes, nesta etapa foram apenas aplicados os métodos de selecção por pesquisa aleatória de subconjuntos e por análise de componentes principais.

A. Selecção de características através de pesquisa aleatória de subconjuntos

De modo a seleccionar o número óptimo de características para cada problema de classificação, foi obtido o *ranking* das características através da pesquisa aleatória de subconjuntos. Tal como foi feito anteriormente, foi avaliada a influência do número de características incluídas no sistema de classificação sobre o seu desempenho, sendo os resultados apresentados no gráfico da Figura 86. Os dados sugerem a selecção das primeiras 12 características para o classificador CM1, e das primeiras 20 para o CM2.

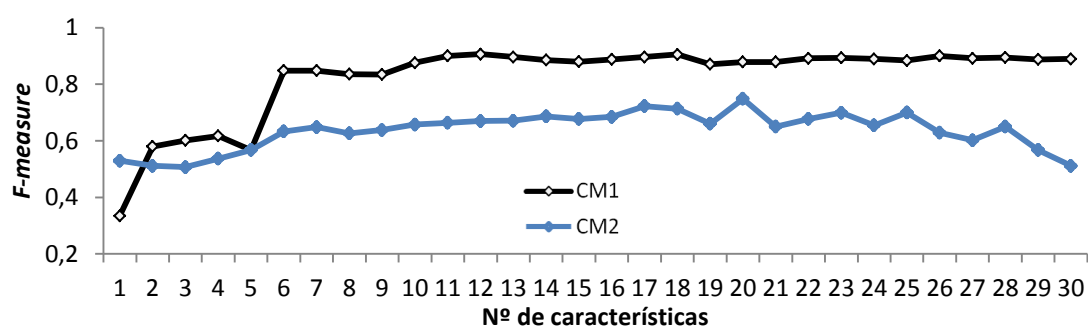


Figura 86. Variação do desempenho do classificador em função do número de características, para os dois classificadores multiclasse.

B. Selecção de características através de PCA

As características em estudo foram submetidas à análise de componentes principais, variando o número de dimensões do novo subespaço sobre as quais são projectadas. Para cada número de dimensões foi estimado o desempenho dos dois classificadores, através da medida *F-measure*, sendo os resultados apresentados no gráfico da Figura 87. Os resultados obtidos sugerem um número de dimensões de projecção óptimo de 15 para o classificador CM1 e 13 para o CM2.

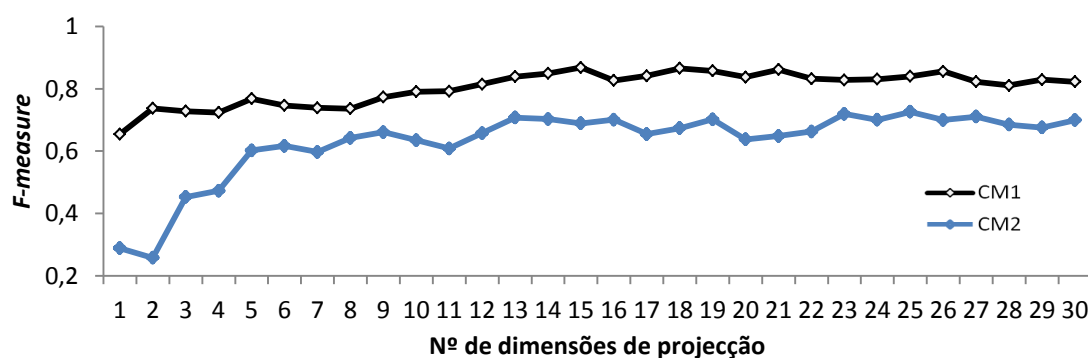


Figura 87. Variação do desempenho do classificador em função do nº de dimensões de projecção para os dois classificadores multiclasse.

5.5.4.2 Classificador multiclasse I (controlo, estado inicial e estado intermédio)

De acordo com o que foi apresentado na secção anterior, relativa à selecção de características, foram obtidos dois grupos de características seleccionadas para a discriminação entre a classe controlo, a classe correspondente ao estado inicial de evolução de catarata (60 minutos de imersão) e a classe correspondente a um estado mais avançado (120 minutos de imersão). O grupo 1 foi obtido através da análise de componentes principais, e grupo 2 através da pesquisa aleatória de subconjuntos. Nesta secção foi treinado um classificador SVM multiclasse, CM1, para as três classes referidas e para cada um dos dois grupos. Os resultados são apresentados na Tabela 21 e na Tabela 22.

Tabela 21. Matriz de confusão relativa aos resultados obtidos pela classificação com o grupo de características seleccionadas através da análise PCA (a) e respectivas métricas de desempenho calculadas (b).

		Classe verdadeira		
		C1	C2	C3
Classe Obtida	C1	882	5	93
	C2	14	1194	115
	C3	125	141	761
	Classe			
	C1	C2	C3	
VP	882	1194	761	
FP	98	129	266	
FN	139	146	208	
VN	2211	1861	2095	
Precisão	0,90	0,90	0,74	
Sensibilidade	0,86	0,89	0,79	
Especificidade	0,96	0,94	0,89	
Exactidão	0,93	0,92	0,86	
F-measure	0,88	0,90	0,76	

Tabela 22. Matriz de confusão relativa aos resultados obtidos pela classificação com o grupo de características seleccionadas através da pesquisa aleatória de subgrupos (a) e respectivas métricas de desempenho calculadas (b).

		Classe verdadeira		
		C1	C2	C3
Classe Obtida	C1	910	32	67
	C2	10	1199	65
	C3	98	114	830
	Classe			
	C1	C2	C3	
VP	910	1199	830	
FP	99	75	212	
FN	108	146	132	
VN	2208	1905	2151	
Precisão	0,90	0,94	0,80	
Sensibilidade	0,89	0,89	0,86	
Especificidade	0,96	0,96	0,91	
Exactidão	0,94	0,94	0,90	
F-measure	0,90	0,91	0,83	

5.5.4.3 Classificador multiclasse II (controlo, estado inicial, estado intermédio e estado avançado)

À semelhança do que foi feito para o primeiro classificador multiclasse, os dois grupos de características obtidos pelos métodos de selecção foram usados para treinar e testar um segundo classificador SVM, CM2, para discriminar entre as quatro classes de estudo: controlo, estado inicial (60 minutos), estado intermédio (120 minutos) e estado avançado (180 minutos). Os resultados são apresentados na Tabela 23 e na Tabela 24.

Tabela 23. Matriz de confusão (a) e métricas de desempenho (b) obtidos para a classificação do grupo 1 (PCA).

		Classe verdadeira			
		C1	C2	C3	C4
Classe Obtida	C1	851	16	31	76
	C2	27	1077	106	52
	C3	12	74	410	226
	C4	131	191	528	598
	Classe				
	C1	C2	C3	C4	
VP	851	1077	410	598	
FP	123	185	312	850	
FN	170	281	665	354	
VN	3262	2863	3019	2604	
Precisão	0,87	0,85	0,57	0,41	
Sensibilidade	0,83	0,79	0,38	0,63	
Especificidade	0,96	0,94	0,91	0,75	
Exactidão	0,93	0,89	0,78	0,73	
F-measure	0,85	0,82	0,46	0,50	

Tabela 24. Matriz de confusão e métricas de desempenho obtidos para a classificação do grupo 2.

		Classe verdadeira			
		C1	C2	C3	C4
Classe Obtida	C1	897	16	69	60
	C2	13	1123	81	45
	C3	10	24	306	210
	C4	103	181	596	654
	Classe				
	C1	C2	C3	C4	
VP	897	1123	306	654	
FP	145	139	244	880	
FN	126	221	746	315	
VN	3220	2905	3092	2539	
Precisão	0,86	0,89	0,56	0,43	
Sensibilidade	0,88	0,84	0,29	0,67	
Especificidade	0,96	0,95	0,93	0,74	
Exactidão	0,94	0,92	0,77	0,73	
F-measure	0,87	0,86	0,38	0,52	

5.5.4.4 Desempenho do sistema multiclasse

De acordo com os métodos descritos na secção 4.4.4.4 foram calculadas as medidas de desempenho globais para classificadores multiclasse CM1 e CM2 para cada um dos grupos de características seleccionadas, sendo os resultados apresentados na Tabela 25.

Tabela 25. Desempenho os classificadores multiclasse, para os dois grupos de características seleccionadas. O primeiro grupo corresponde à selecção por PCA e o segundo por pesquisa de subconjuntos reforçada por classificação.

Classificador	Características	Precisão (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Exactidão (%)	F-Measure (%)
CM1	Grupo 1	88,7	88,8	94,2	93,2	88,7
	Grupo 2	85,9	85,7	93,7	90,6	85,3
CM2	Grupo 1	67,5	65,8	89,0	83,3	65,8
	Grupo 2	68,5	67,0	89,5	84,0	65,8

Comparando os resultados obtidos pelas duas classificações, é possível concluir que as características seleccionadas pela análise de componentes principais permitiu obter valores de desempenho ligeiramente superiores à selecção por pesquisa aleatória de subconjuntos. No entanto, ambas as abordagens apresentam bons valores de desempenho relativamente à discriminação entre as três classes.

A adição de uma quarta classe ao problema de classificação reduziu bastante o desempenho global obtido pelo sistema de classificação. No entanto, o grau de dificuldade da tarefa de discriminação entre quatro classes é elevado, pelo que o resultado obtido para o valor *da F-measure* parece razoável.

Conclusões

O objectivo deste trabalho foi dar continuidade aos estudos realizados na área da caracterização do tecido do cristalino saudável e com alterações provenientes do processo de formação e evolução da catarata. Neste sentido, foi dada particular ênfase a dois aspectos: a aplicabilidade dos ultrassons para a obtenção de imagens do interior do cristalino e classificação das mesmas com vista à discriminação entre cristalinos saudáveis e com diferentes fases de evolução da catarata, usando técnicas de aprendizagem supervisionada.

Relativamente à visualização do cristalino, foi otimizada uma metodologia de aquisição de sinais A-scan do cristalino para melhorar a reconstrução da imagem modo B, reflectindo a intensidade dos sinais de *backscattering* adquiridos. No entanto, sabe-se que a avaliação da intensidade destes sinais não constitui um método objectivo para a caracterização das estruturas analisadas. Isto acontece devido ao facto de existir alguma susceptibilidade da intensidade dos sinais reflectidos às configurações experimentais do sistema, tais como definições de ganho ou de energia emitida, em conjunto com a própria variabilidade inter-operador e entre aquisições. Para contornar estes inconvenientes inerentes ao processo de aquisição, optou-se por caracterizar os sinais de *backscattering* adquiridos usando a distribuição estatística de Nakagami, insensível aos factores descritos. Através desta metodologia, foi possível obter a chamada imagem paramétrica de Nakagami, que não está associada à amplitude dos sinais medidos, mas sim à forma como essa amplitude varia localmente. A imagem de Nakagami está assim associada às características dos *scatterers* presentes no tecido, reflectindo o seu tamanho e a sua concentração média.

A combinação da imagem modo B com a imagem paramétrica de Nakagami permitiu correlacionar as zonas de maior ecogenicidade com aquelas de maior concentração de *scatterers*, tornando visualmente mais claro o padrão de formação e de evolução da catarata no tecido do cristalino. Os dados adquiridos permitiram, deste modo, identificar o aparecimento dos primeiros sinais de opacificação na região da interface entre o córtex e o

núcleo. Com a evolução do processo de formação da catarata, as imagens adquiridas permitiram observar um alastramento dessas opacificações, através da formação e compactação de uma estrutura em rede. Este padrão de evolução da catarata está em concordância com o processo biológico inerente, relativo à compactação e precipitação proteica, tendo sido comprovado pelo estudo histológico feito em *slices* de cristalinos para estados sucessivos de evolução da catarata. O método de imagiologia *ex-vivo* desenvolvido para o cristalino permitiu, através da análise visual, diferenciar claramente o cristalino saudável do cristalino com catarata, através da identificação dos primeiros sinais de opacificação. O método de imagem desenvolvido permitiu ainda discriminar os diferentes graus de severidade da catarata e perceber o seu padrão de progressão. O método de imagem desenvolvido poderá assim representar uma plataforma para o desenvolvimento de um sistema não invasivo de caracterização *in-vivo* de qualquer tipo e estágio de catarata.

A revisão bibliográfica que foi feita identificou apenas uma referência na literatura relativa à aplicação de técnicas por ultrassons à visualização do cristalino, com e sem catarata. No entanto, o referido estudo faz uso de uma frequência de análise de 35MHz, superior à utilizada neste trabalho (25MHz), permitindo apenas a visualização de uma região muito superficial do cristalino. Para além disso, o método apresentado não permite fazer uma distinção clara entre diferentes estados de evolução da catarata. Os resultados obtidos neste trabalho constituem, por conseguinte, um avanço nas técnicas de visualização existentes para este tipo de tecido.

Relativamente à aplicação de técnicas de aprendizagem supervisionadas com vista à classificação de cristalinos saudáveis e com catarata, foram desenvolvidos para o efeito vários classificadores. Um vasto conjunto de características foi extraído por diferentes abordagens de análise a partir das imagens B-scan, nomeadamente: análise textural, análise espectral, análise estatística e análise de parâmetros acústicos. Da análise comparativa entre cada um destes grupos de características de forma individual, e o grupo resultante da combinação das características das diferentes abordagens, concluiu-se que são obtidos melhores desempenhos usando a combinação de características. Os classificadores binários desenvolvidos permitiram discriminar cristalinos com catarata de cristalinos normais em 96% dos casos, e os cristalinos com catarata em estados iniciais (60 minutos de imersão) dos cristalinos com estados mais avançados (120 minutos de imersão) em 95% dos casos. Para ambos os casos binários, os melhores desempenhos foram obtidos com o classificador SVM. Relativamente à abordagem multiclasse, foi obtido um valor *F-measure* de 88% para a classificação envolvendo controlos, cristalinos com estados iniciais (60 minutos) e cristalinos com estados mais avançados (120 minutos). Os resultados obtidos mostram que a aplicação de técnicas de classificação supervisionada à análise do cristalino por ultrassons permite, de facto, a classificação automática da catarata, bem como a discriminação entre os seus diferentes graus de severidade.

A visualização do cristalino através das imagens modo B juntamente com a interpretação dos dados paramétricos da imagem de Nakagami, e a combinação desta informação com a análise dos parâmetros extraídos pela análise dos sinais acústicos constitui um avanço no estudo da catarata.

Numa perspectiva orientada para o futuro, há duas questões importantes a considerar. Por um lado, a caracterização do tecido normal para que seja possível identificar as mais ligeiras alterações, assim que detectáveis, para fins de rastreio e detecção precoce da catarata e, segundo, a caracterização da catarata madura para fins de preparação da cirurgia de facoemulsificação. A combinação dos métodos de visualização do cristalino apresentados (imagem em modo B complementada com a imagem paramétrica de Nakagami) com os métodos de classificação desenvolvidos, podem contribuir para ambas as questões.

Trabalho futuro

Apesar de serem distinguíveis os diferentes estados de evolução da catarata, o método usado no presente trabalho permitiu apenas analisar a região cortical do cristalino. De modo a ultrapassar esta limitação, deverá ser feito um estudo de optimização da frequência dos ultrassons a usar para a análise deste tipo de tecido, encontrando um compromisso entre a profundidade de análise e resolução, de forma a permitir a caracterização do tecido para regiões mais profundas.

Relativamente à visualização do cristalino, o próximo passo deverá ser a obtenção de um mapa de atenuações, que complemente a informação contida na imagem B-scan e na imagem de Nakagami. A combinação da informação dada pelos três métodos poderá contribuir para a identificação de regiões de maior dureza do cristalino e, assim, servir de base para um estudo de correlação com a energia óptima de facoemulsificação e da sua aplicação localizada, contribuindo assim para redução de complicações resultantes da cirurgia, devidas a aplicações de valores de energia demasiado elevados.

Em relação à tarefa de classificação automática da catarata, apesar de se ter conseguido um número considerável de aquisições, seria importante continuar a completar a base de dados construída, de modo a melhorar a consistência da informação extraída pela análise efectuada. Apesar de a tendência da evolução dos parâmetros ser clara, a maior parte das características apresenta valores de desvio padrão elevados, indicando elevada variabilidade nas amostras. Um maior número de aquisições permitiria maior transparência na distinção entre variações inerentes ao processo de formação da catarata e de factores intrínsecos às características individuais do cristalino em causa. Para além da necessidade do aumento do tamanho da amostra, para a obtenção de um sistema de classificação aplicável na prática clínica, será fundamental o estudo de sinais adquiridos *in vivo*, em condições mais próximas da realidade. Assim, induzindo cataratas corticais, nucleares, subcapsulares posteriores ou mesmo opacificações locais, induzidas em modelos animais, seria possível avaliar de modo mais realista a aplicabilidade do método ao diagnóstico e classificação da catarata. Superando estas duas limitações impostas no presente trabalho (tamanho relativamente pequeno da amostra de estudo e impossibilidade de indução de diferentes tipos de catarata), espera-se que o trabalho realizado possa no futuro servir de base à construção de sistemas de classificação mais complexos para a identificação de diferentes tipos de catarata nos seus diferentes estádios de evolução, que permitam a detecção precoce e classificação objectiva da catarata. Para além da detecção e classificação, a análise e compreensão das alterações apresentadas pelos diferentes parâmetros poderá ser fundamental para estabelecer fenótipos de progressão

desta patologia, contribuindo naturalmente para um prognóstico mais alicerçado do tratamento da doença.

Para a aplicação de técnicas não invasivas por ultrassons ao diagnóstico clínico da catarata e, de modo a que seja possível o seguimento do paciente ao longo da progressão da doença, seria fundamental uma técnica de alinhamento precisa e reprodutível, de modo a obter imagens sequenciais e fazer comparações válidas. *In vitro* esta questão é facilmente resolvida, mantendo o cristalino imóvel no seu suporte à medida que a catarata evolui na solução indutora e os sinais são adquiridos. *In vivo* esta questão pode constituir um problema, uma vez que o cristalino não apresenta quaisquer pontos de referência, contrariamente ao que acontece na retina, por exemplo. A análise de toda a extensão do cristalino parece ainda ser a única forma possível de garantir, em ambiente clínico, a validade das comparações feitas entre diferentes aquisições, para avaliar a evolução da catarata.

Em conclusão, e tendo em conta a inexistência de métodos eficazes para prevenir ou retardar evolução da catarata, é importante continuar o trabalho nesta área, para o desenvolvimento de métodos de detecção precoce da catarata e avaliação da sua progressão, que possam ajudar a controlar a patologia através do seu diagnóstico precoce.

Referências

- [1] World Health Organization, "Vision 2020: The right to sight," *Action Plan 2006-2011*.
- [2] "10 facts about blindness and visual impairment," *World Health Organization*. [Online]. Available: <http://www.who.int/features/factfiles/blindness/en/>. [Accessed: 01-Dec-2012].
- [3] D. S. Grewal and S. P. S. Grewal, "Clinical applications of Scheimpflug imaging in cataract surgery," *Saudi Journal of Ophthalmology*, vol. 26, no. 1, pp. 25–32, Jan. 2012.
- [4] A. Antunes, M. V Safatle, P. S. M. Barros, and L. Morelh, "An X-ray vision of cataract," pp. 1–4, 2008.
- [5] N. A. Brown, A. J. Bron, W. Ayliffe, J. Sparrow, and A. R. Hill, "The objective assessment of cataract.," *Eye (London, England)*, vol. 1 (Pt 2), pp. 234–46, Jan. 1987.
- [6] P. Heyworth, G. M. Thompson, H. Tabandeh, and S. McGuigan, "The relationship between clinical classification of cataract and lens hardness.," *Eye (London, England)*, vol. 7 (Pt 6), pp. 726–30, Jan. 1993.
- [7] T. Shinohara, H. White, M. L. Mulhern, and H. Maisel, "Cataract: window for systemic disorders.," *Medical hypotheses*, vol. 69, no. 3, pp. 669–77, Jan. 2007.
- [8] C. E. Willoughby, D. Ponzin, S. Ferrari, A. Lobo, K. Landau, and Y. Omid, "Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function - a review," *Clinical & Experimental Ophthalmology*, vol. 38, no. May, pp. 2–11, Aug. 2010.
- [9] J. J. Kanski and B. Bowling, *Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach*. 2011.
- [10] G. Commission, R. Protection, and S. Reasoning, "Radiation-Induced Cataracts," 2009.
- [11] Glaucoma Research Foundation, "Eye Anatomy," 2012. [Online]. Available: <http://www.glaucoma.org/glaucoma/anatomy-of-the-eye.php>. [Accessed: 07-Jul-2013].
- [12] V. L. Taylor, K. J. al-Ghoul, C. W. Lane, V. a Davis, J. R. Kuszak, and M. J. Costello, "Morphology of the normal human lens.," *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 37, no. 7, pp. 1396–410, Jun. 1996.
- [13] G. Duncan, I. M. Wormstone, and P. D. Davies, "The aging human lens: structure, growth, and physiological behaviour.," *The British journal of ophthalmology*, vol. 81, no. 10, pp. 818–23, Oct. 1997.
- [14] R. Michael and a J. Bron, "The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing.," *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, vol. 366, no. 1568, pp. 1278–92, Apr. 2011.
- [15] J. R. Kuszak, R. K. Zoltoski, and C. E. Tiedemann, "Development of lens sutures.," *The International journal of developmental biology*, vol. 48, no. 8–9, pp. 889–902, Jan. 2004.
- [16] G. Duncan, I. M. Wormstone, and P. D. Davies, "The aging human lens : structure , growth , and physiological behaviour," no. Fig 1, pp. 818–823, 1997.

- [17] N. P. Brown, "Mechanisms of cataract formation.," no. Figure 5, pp. 27–33.
- [18] H. Gira, "Cholesterol Oxides Accumulate in Human Cataracts," pp. 645–652, 1998.
- [19] L. M. Meyer, X. Dong, A. Wegener, and P. Söderberg, "Dose dependent cataractogenesis and Maximum Tolerable Dose (MTD(2.3:16)) for UVR 300 nm-induced cataract in C57BL/6J mice.," *Experimental eye research*, vol. 86, no. 2, pp. 282–9, Feb. 2008.
- [20] Z. Hashim and S. Zarina, "Osmotic stress induced oxidative damage: possible mechanism of cataract formation in diabetes.," *Journal of diabetes and its complications*, vol. 26, no. 4, pp. 275–9, 2012.
- [21] J. Kaur, S. Kukreja, A. Kaur, N. Malhotra, and R. Kaur, "The oxidative stress in cataract patients.," *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, vol. 6, no. 10, pp. 1629–32, Dec. 2012.
- [22] P.-H. Tsui, C.-C. Huang, Q. Zhou, and K. K. Shung, "Cataract measurement by estimating the ultrasonic statistical parameter using an ultrasound needle transducer: an in vitro study.," *Physiological measurement*, vol. 32, no. 5, pp. 513–22, May 2011.
- [23] I. M. Wormstone and M. a Wride, "The ocular lens: a classic model for development, physiology and disease.," *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, vol. 366, no. 1568, pp. 1190–2, Apr. 2011.
- [24] C. J. Waudby, R. L. Berg, J. G. Linneman, L. V Rasmussen, P. L. Peissig, L. Chen, and C. a McCarty, "Cataract research using electronic health records.," *BMC ophthalmology*, vol. 11, no. 1, p. 32, Jan. 2011.
- [25] K. Pesudovs and D. B. Elliott, "Cataract morphology, classification, assessment and referral." [Online]. Available: http://www.rila.co.uk/issues/free/001/2001/v4n2/p55_60/p55_60.html. [Accessed: 08-Nov-2012].
- [26] B. Hodd, "Eye conditions and terminology." [Online]. Available: <http://www.nfburnetthodd.com/conditions.php#>. [Accessed: 26-Jan-2013].
- [27] H. Li, J. H. Lim, J. Liu, D. W. K. Wong, N. M. Tan, S. Lu, Z. Zhang, and T. Y. Wong, "Computerized Systems for Cataract Grading," *2009 2nd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics*, pp. 1–4, 2009.
- [28] P. A. Asbell, I. Dualan, J. Mindel, D. Brocks, M. Ahmad, and S. Epstein, "Age-related cataract.," *Lancet*, vol. 365, no. 9459, pp. 599–609, Jan. 2005.
- [29] B. Thylefors, L. T. Chylack, K. Konyama, K. Sasaki, R. Sperduto, H. R. Taylor, and S. West, "A simplified cataract grading system.," *Ophthalmic epidemiology*, vol. 9, no. 2. pp. 83–95, Apr-2002.
- [30] "Cataract Diagnosis - Cataract Health Information - NY Times Health." [Online]. Available: <http://health.nytimes.com/health/guides/disease/ataract/diagnosis.html>. [Accessed: 08-Nov-2012].
- [31] M. Karbassi, P. M. Khu, D. M. Singer, and L. T. Chylack, "Evaluation of lens opacities classification system III applied at the slitlamp.," *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry*, vol. 70, no. 11, pp. 923–8, Nov. 1993.
- [32] L. T. Chylack, J. K. Wolfe, J. Friend, P. M. Khu, D. M. Singer, D. McCarthy, J. del Carmen, and B. Rosner, "Quantitating cataract and nuclear brunescence, the Harvard and LOCS systems.,"

Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry, vol. 70, no. 11, pp. 886–95, Nov. 1993.

- [33] J. a Davison and L. T. Chylack, “Clinical application of the lens opacities classification system III in the performance of phacoemulsification,” *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, vol. 29, no. 1, pp. 138–145, Jan. 2003.
- [34] G. Bencić, M. Zorić-Geber, D. Sarić, M. Corak, and Z. Mandić, “Clinical importance of the lens opacities classification system III (LOCS III) in phacoemulsification.,” *Collegium antropologicum*, vol. 29 Suppl 1, pp. 91–4, Jan. 2005.
- [35] P. Wang, Y. Shen, and Q. Wang, “Gaussian wavelet based dynamic filtering (GWDF) method for medical ultrasound systems.,” *Ultrasonics*, vol. 46, no. 2, pp. 168–76, May 2007.
- [36] W. R. Hendee and E. R. Ritenour, *Medical Imaging Physics*. Wiley-Liss, 2002, p. 536.
- [37] H. Azhari, *Basics of Biomedical Ultrasound for Engineers*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- [38] M. J. Lizak, M. B. Datiles, A. H. Aletras, P. F. Kador, and R. S. Balaban, “MIR of the Human Eye Using Magnetization Transfer Contrast Enhancement,” vol. 41, no. 12, pp. 3878–3881, 2000.
- [39] “Slit-Lamp Exam - Tests, Test Results & Diagnosis - NY Times Health Information.” [Online]. Available: <http://health.nytimes.com/health/guides/test/slit-lamp-exam/overview.html>. [Accessed: 08-Nov-2012].
- [40] P. Artal, A. Benito, G. M. Pérez, E. Alcón, A. De Casas, J. Pujol, and J. M. Marín, “An objective scatter index based on double-pass retinal images of a point source to classify cataracts.,” *PLoS one*, vol. 6, no. 2, p. e16823, Jan. 2011.
- [41] M. Shen, M. R. Wang, Y. Yuan, F. Chen, C. L. Karp, S. H. Yoo, and J. Wang, “SD-OCT with prolonged scan depth for imaging the anterior segment of the eye.,” *Ophthalmic surgery, lasers & imaging : the official journal of the International Society for Imaging in the Eye*, vol. 41 Suppl, pp. S65–9.
- [42] I. Grulkowski, M. Gora, M. Szkulmowski, I. Gorczynska, D. Szlag, S. Marcos, A. Kowalczyk, and M. Wojtkowski, “Anterior segment imaging with Spectral OCT system using a high-speed CMOS camera.,” *Optics express*, vol. 17, no. 6, pp. 4842–58, Mar. 2009.
- [43] S. Chalfin, J. Ziriak, S. Dodd, R. Garay, and J. D’Andrea, “High Fidelity 3D Model of the Baboon Eye Derived From High Resolution MRI,” *ARVO Meeting Abstracts*, vol. 46, no. 5, p. 4265, May 2005.
- [44] Medizinische Universität Wien, “Full range complex OCT,” *Center for Medical Physics and Biomedical Engineering*. [Online]. Available: <http://www.zmpbmt.meduniwien.ac.at/index.php?id=331>. [Accessed: 07-Jun-2013].
- [45] H. Li, J. H. Lim, J. Liu, and T. Y. Wong, “Towards automatic grading of nuclear cataract.,” *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference*, vol. 2007, pp. 4961–4, Jan. 2007.
- [46] R. Jurkonis, “The Empirical Mode Decomposition and the Discrete Wavelet Transform for Detection of Human Cataract in Ultrasound Signals,” vol. 16, no. 4, pp. 541–556, 2005.

- [47] A. Paunksnis and S. Kurapkienė, "Ultrasound Quantitative Evaluation of Human Eye Cataract," vol. 18, no. 2, pp. 267–278, 2007.
- [48] T. Y. Wong, "Automatic opacity detection in retro-illumination images for cortical cataract diagnosis," in *2008 IEEE International Conference on Multimedia and Expo*, 2008, pp. 553–556.
- [49] H. Li, J. H. Lim, J. Liu, D. W. K. Wong, Y. Foo, Y. Sun, and T. Y. Wong, "Automatic detection of posterior subcapsular cataract opacity for cataract screening.," *Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference*, vol. 2010, pp. 5359–62, Jan. 2010.
- [50] C. Y. Cheung, H. Li, E. L. Lamoureux, P. Mitchell, J. J. Wang, A. G. Tan, L. K. Johari, J. Liu, J. H. Lim, T. Aung, and T. Y. Wong, "Validity of a new computer-aided diagnosis imaging program to quantify nuclear cataract from slit-lamp photographs.," *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 52, no. 3, pp. 1314–9, Mar. 2011.
- [51] H. Tabandeh, M. Wilkins, G. Thompson, D. Nassiri, and a Karim, "Hardness and ultrasonic characteristics of the human crystalline lens.," *Journal of cataract and refractive surgery*, vol. 26, no. 6, pp. 838–41, Jun. 2000.
- [52] Y. Oguchi, G. W. van Marle, F. Eijskoot, and H. E. Henkes, "Study of the ultrasonic characteristics of the lens.," *Bibliotheca ophthalmologica : supplementa ad ophthalmologica*, no. 83, pp. 252–8, Jan. 1975.
- [53] C.-C. Huang, Q. Zhou, H. Ameri, D. W. Wu, L. Sun, S.-H. Wang, M. S. Humayun, and K. K. Shung, "Determining the acoustic properties of the lens using a high-frequency ultrasonic needle transducer.," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 33, no. 12, pp. 1971–7, Dec. 2007.
- [54] C.-C. Huang, H. Ameri, C. Deboer, A. P. Rowley, X. Xu, L. Sun, S.-H. Wang, M. S. Humayun, and K. K. Shung, "Evaluation of lens hardness in cataract surgery using high-frequency ultrasonic parameters in vitro.," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 33, no. 10, pp. 1609–16, Oct. 2007.
- [55] C. Huang, R. Chen, P. Tsui, Q. Zhou, M. S. Humayun, and K. Shung, "Measurements of attenuation coefficient for evaluating the hardness of a cataract lens by a high-frequency ultrasonic needle transducer.," vol. 54, no. 19, pp. 5981–5994, 2010.
- [56] R. Waldron and T. Aaberg, "A-Scan Biometry," 2012. [Online]. Available: <http://emedicine.medscape.com/article/1228447-overview#showall>. [Accessed: 03-Mar-2013].
- [57] C. Huang, P. Tsui, Q. Zhou, M. S. Humayun, and K. K. Shung, "In situ measurements of attenuation coefficient for evaluating the hardness of cataract lens by a high frequency ultrasonic needle transducer," in *2009 IEEE International Ultrasonics Symposium*, 2009, pp. 240–243.
- [58] A. Oksala and A. Lehtinen, "Measurement of the velocity of sound in some parts of the eye," *Acta Ophthalmologica*, no. 36, pp. 633–639, 1958.
- [59] Y. Yamamoto, R. Namiki, M. Baba, and M. Kato, "A study on the measurement of ocular axial length by ultrasonic echography," *Japanese J. ophth.*, no. 5, pp. 134–139, 1961.
- [60] F. Jansson and E. Kock, "Determination of the velocity of ultrasound in the human lens and vitreous," *Acta Ophthalmologica*, vol. 40, no. 4, pp. 420–433, May 1962.

- [61] Y. Sugata, K. Murakami, M. Ito, T. Shiina, and Y. Yamamoto, "An application of ultrasonic tissue characterization to the diagnosis of cataract.," *Acta ophthalmologica. Supplement*, no. 204, pp. 35–9, Jan. 1992.
- [62] C. L. de Korte, A. F. van der Steen, and J. M. Thijssen, "Acoustic velocity and attenuation of eye tissues at 20 MHz.," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 20, no. 5, pp. 471–80, Jan. 1994.
- [63] D. Jesus, E. Velte, M. Caixinha, M. Santos, and J. Santos, "Using of the ultrasound frequency dependent attenuation and Nakagami distribution for cataract evaluation .," *IEEE 3rd Portuguese Meeting in Bioengineering*, no. 1, pp. 1–4, 2013.
- [64] H. Tsui and C. C. Chang, "Imaging local scatterer concentrations by the Nakagami statistical model.," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 33, no. 4, pp. 608–19, Apr. 2006.
- [65] P. H. Tsui, C. C. Huang, C. C. Chang, S. H. Wang, and K. K. Shung, "Feasibility study of using high-frequency ultrasonic Nakagami imaging for characterizing the cataract lens in vitro.," *Physics in medicine and biology*, vol. 52, no. 21, pp. 6413–25, Nov. 2007.
- [66] P. Tsui and S. Wang, "Use of Nakagami Distribution and Logarithmic Compression in Ultrasonic Tissue Characterization," vol. 26, no. 2, pp. 69–73, 2006.
- [67] P. H. Tsui, C. C. Chang, M. C. Ho, Y. H. Lee, Y. S. Chen, C. C. Chang, N. E. Huang, Z. H. Wu, and K. J. Chang, "Use of nakagami statistics and empirical mode decomposition for ultrasound tissue characterization by a nonfocused transducer.," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 35, no. 12, pp. 2055–68, Dec. 2009.
- [68] M. Ho, J. Lin, Y. Shu, C. Chen, K. Chang, C. Chang, and P. Tsui, "Using ultrasound Nakagami imaging to assess liver fibrosis in rats," *Ultrasonics*, vol. 52, no. 2, pp. 215–222, 2012.
- [69] P. hsiang Tsui, C. K. Yeh, and C. cheng Chang, "Noise Effect on the Performance of Nakagami Image in Ultrasound Tissue Characterization," *Journal of Medical and Biological Engineering*, vol. 28, no. 4, pp. 197–202, 2008.
- [70] P. Mohana Shankar, "A general statistical model for ultrasonic backscattering from tissues.," *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, vol. 47, no. 3, pp. 727–36, Jan. 2000.
- [71] P. M. Shankar, "Ultrasonic tissue characterization using a generalized Nakagami model," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 48, no. 6, pp. 1716–1720, 2001.
- [72] D. Jesus, "Caracterização objetiva da catarata com recurso a técnicas por ultrassons," Coimbra, 2012.
- [73] S. Nagaraj, "The Role of Pattern Recognition in Computer-Aided Diagnosis and Computer-Aided Detection in Medical Imaging : A Clinical Validation," vol. 8, no. 5, pp. 1–5, 2010.
- [74] I. Kononenko, "Machine Learning for Medical Diagnosis: History , State of the Art and Perspective Historical overview," pp. 1–25, 2001.
- [75] W.-C. Yeh, S.-W. Huang, and P.-C. Li, "Liver fibrosis grade classification with B-mode ultrasound," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 29, no. 9, pp. 1229–1235, Sep. 2003.
- [76] D. Balasubramanian, P. Srinivasan, and R. Gurupatham, "Automatic classification of focal lesions in ultrasound liver images using principal component analysis and neural networks.," *Conference*

proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference, vol. 2007, pp. 2134–7, Jan. 2007.

- [77] R. Ribeiro and J. Sanches, "Fatty Liver Characterization and Classification by Ultrasound," *IbPRIA '09 Proceedings of the 4th Iberian Conference on Pattern Recognition and Image Analysis*, vol. 5524, pp. 354–361, Jun. 2009.
- [78] U. R. Acharya, S. V. Sree, R. Ribeiro, G. Krishnamurthi, R. T. Marinho, J. Sanches, and J. S. Suri, "Data mining framework for fatty liver disease classification in ultrasound: a hybrid feature extraction paradigm.," *Medical physics*, vol. 39, no. 7, pp. 4255–64, Jul. 2012.
- [79] C. L. De Korte, a F. Van Der Steen, J. M. Thijssen, J. J. Duindam, C. Otto, and G. J. Puppels, "Relation between local acoustic parameters and protein distribution in human and porcine eye lenses.," *Experimental eye research*, vol. 59, no. 5. pp. 617–27, Nov-1994.
- [80] Z. Kyselova, "Different experimental approaches in modelling cataractogenesis: An overview of selenite-induced nuclear cataract in rats.," *Interdisciplinary toxicology*, vol. 3, no. 1, pp. 3–14, Mar. 2010.
- [81] N. K. Nair, K. Patel, and T. Gandhi, "Effect of Aqueous Extract of Embelica officinalis on Selenite Induced Cataract in Rats," vol. 9, no. June 2009, pp. 147–152, 2010.
- [82] G. Congelosi, M. D. Mcdonald, and K. S. Morgan, "Cataract Induction in Robbits with the Nd-YAG Loser," no. 7, pp. 1037–1040.
- [83] R. G. Waldron, "Ultrasound Principles: A-scan Biometry," *Medscape*, 2012. [Online]. Available: <http://emedicine.medscape.com/article/1228447-overview#showall>. [Accessed: 04-Feb-2013].
- [84] J. Noble and P. N. T. Wells, "Ultrasound image segmentation and tissue characterization," *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, vol. 224, no. 2, pp. 307–316, Feb. 2010.
- [85] F. L. Lizzi, E. J. Feleppa, S. Kaisar Alam, and C. X. Deng, "Ultrasonic spectrum analysis for tissue evaluation," *Pattern Recognition Letters*, vol. 24, no. 4–5, pp. 637–658, Feb. 2003.
- [86] T. Bowen, W. G. Connor, R. L. Nasoni, E. P. A., and R. R. Sholes, "Measurement of the temperature dependence of the velocity of ultrasound in soft tissues," *Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization Held at the National Bureau of Standards, Gaithersburg, Maryland*, no. June 13–15, p. 362, 1977.
- [87] A. E. V.- Luna, A. Jaramillo-nuñez, D. Sanchez-lucero, C. M. Ortiz-lima, J. G. Aguilar-soto, A. Flores-gil, and M. May-alarcon, "De-Noising Audio Signals Using MATLAB Wavelets Toolbox." .
- [88] S. Janaki and M. Brinda, "Denoising Of Mixed Noise in Ultrasound Images," vol. 8, no. 4, pp. 517–523, 2011.
- [89] P. Tsakalides, A. Achim, and A. Bezerianos, "Wavelet-based ultrasound image denoising using an alpha-stable prior probability model B."
- [90] K. Karthikeyan, "Speckle Noise Reduction of Medical Ultrasound Images using Bayesshrink Wavelet Threshold," vol. 22, no. 9, pp. 8–14, 2011.
- [91] P. H. Tsui, C. K. Yeh, and C. C. Huang, "Noise-assisted correlation algorithm for suppressing noise-induced artifacts in ultrasonic Nakagami images.," *IEEE transactions on information*

technology in biomedicine : a publication of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, vol. 16, no. 3, pp. 314–22, May 2012.

- [92] P. H. Tsui, Y. L. Wan, C. C. Huang, and M. C. Wang, "Effect of Adaptive Threshold Filtering on Ultrasonic Nakagami Parameter to Detect Variation in Scatterer Concentration," *Ultrasonic Imaging*, vol. 32, no. 4, pp. 229–242, Oct. 2010.
- [93] N. E. Huang, Z. Shen, S. R. Long, M. C. Wu, H. H. Shih, Q. Zheng, N.-C. Yen, C. C. Tung, and H. H. Liu, "The empirical mode decomposition and the Hilbert spectrum for nonlinear and non-stationary time series analysis," *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 454, no. 1971, pp. 903–995, Mar. 1998.
- [94] E. Hostálková and A. Procházka, "Wavelet signal and image denoising," no. 1. .
- [95] D. L. DONOHO and J. M. JOHNSTONE, "Ideal spatial adaptation by wavelet shrinkage," *Biometrika*, vol. 81, no. 3, pp. 425–455, Sep. 1994.
- [96] P.-H. Tsui, C.-K. Yeh, Y.-Y. Liao, C.-C. Chang, W.-H. Kuo, K.-J. Chang, and C.-N. Chen, "Ultrasonic Nakagami imaging: a strategy to visualize the scatterer properties of benign and malignant breast tumors.," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 36, no. 2, pp. 209–17, Feb. 2010.
- [97] A. Larrue and J. A. Noble, "Nakagami imaging with small windows," pp. 887–890, 2011.
- [98] I. Introduction, "An Approach Based on Strain-compounding Technique and Ultrasound," vol. 25, no. Bhi, pp. 515–518, 2012.
- [99] S. Krag, T. Olsen, and T. T. Andreassewf, "Biomechanical Characteristics of the Human Anterior Lens Capsule in Relation to Age," vol. 38, no. 2, 1997.
- [100] S. KRAG and T. T. ANDREASSEN, "Biomechanical Measurements of the Porcine Lens Capsule," *Experimental Eye Research*, vol. 62, no. 3, pp. 253–260, Mar. 1996.
- [101] I. N. Bankman, *Handbook of Medical Imaging*. Academic Press, 2000, pp. 215–230.
- [102] R. M. Haralick, K. Shanmugam, and I. Dinstein, "Textural Features for Image Classification," *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, vol. 3, no. 6, pp. 610–621, Nov. 1973.
- [103] M. M. Galloway, "Texture analysis using gray level run lengths," *Comput. Graphics Image Process.*, vol. 4, no. June, pp. 172–179, 1975.
- [104] M. Haidekker, *Advanced Biomedical Image Analysis (Google eBook)*. John Wiley & Sons, 2011, p. 528.
- [105] X. Tang, "Texture information in run-length matrices.," *IEEE transactions on image processing : a publication of the IEEE Signal Processing Society*, vol. 7, no. 11, pp. 1602–9, Jan. 1998.
- [106] B. B. Mandelbrot, *The Fractal Geometry of Nature*. 1983.
- [107] A. Kalisz, "Statistical framework for ultrasonic spectral parameter imaging," vol. 13, no. 9, 1997.
- [108] C. B. Machado, W. C. D. A. Pereira, M. Meziri, and P. Laugier, "Characterization of in vitro healthy and pathological human liver tissue periodicity using backscattered ultrasound signals.," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 32, no. 5, pp. 649–57, May 2006.

- [109] H. Xie and Z. Wang, "Mean frequency derived via Hilbert-Huang transform with application to fatigue EMG signal analysis," vol. 2, pp. 114–120, 2006.
- [110] M. Luminita and O. Laura, "Computer phantom simulation," vol. 18, no. 1, pp. 134–139, 2012.
- [111] R. Smolíková, M. P. M. P. Wachowiak, and J. M. J. M. Zurada, "An information-theoretic approach to estimating ultrasound backscatter characteristics," *Computers in biology and medicine*, vol. 34, no. 4, pp. 355–70, Jun. 2004.
- [112] J. M. Cimbala, "Outliers," no. September. pp. 1–5, 2011.
- [113] T. Warren Liao, "Feature extraction and selection from acoustic emission signals with an application in grinding wheel condition monitoring," *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, vol. 23, no. 1, pp. 74–84, Feb. 2010.
- [114] A. R. Webb, *Statistical Pattern Recognition Statistical Pattern Recognition Second Edition*, vol. 9. 2002, pp. 0–470.
- [115] S. J. Raudys and A. K. Jain, "Small sample size effects in statistical pattern recognition: recommendations for practitioners," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 13, no. 3, pp. 252–264, Mar. 1991.
- [116] M. Hauskrecht, R. Pelikan, and M. Valko, "Feature Selection and Dimensionality Reduction in Genomics and Proteomics," no. 1.
- [117] J. P. M. de Sá, *Pattern Recognition: Concepts, Methods and Applications*, First. Springer, 2001, p. 328.
- [118] R. O. Duda, P. E. Hart, and D. G. Stork, *Pattern classification*. 2001.
- [119] A. Özgür, L. Özgür, and T. Güngör, "Text categorization with class-based and corpus-based keyword selection," *Computer and Information Sciences - ISCIS*, vol. 3733, pp. 606–615, Oct. 2005.
- [120] B. Willekens, J. Kappelhof, and G. Vrensen, "Morphology of the aging human lens: I. Biomicroscopy and biometrics.," *Lens and eye toxicity research*, no. 4, p. 207:230, 1987.
- [121] A. Huizinga, A. C. Bot, F. F. de Mul, G. F. Vrensen, and J. Greve, "Local variation in absolute water content of human and rabbit eye lenses measured by Raman microspectroscopy.," *Experimental eye research*, vol. 48, no. 4, pp. 487–96, Apr. 1989.
- [122] H. Tabandeh, G. M. Thompson, and P. Heyworth, "Lens hardness in mature cataracts.," *Eye (London, England)*, vol. 8 (Pt 4), pp. 453–5, Jan. 1994.
- [123] V. Vanita, J. R. Singh, D. Singh, R. Varon, and K. Sperling, "A mutation in GJA8 (p.P88Q) is associated with 'balloon-like' cataract with Y-sutural opacities in a family of Indian origin," Jun. 2008.
- [124] J. D. Spurrier, "On the null distribution of the Kruskal–Wallis statistic," *Journal of Nonparametric Statistics*, vol. 15, no. 6, pp. 685–691, Dec. 2003.

Anexo A - Using of the ultrasound frequency dependent attenuation and Nakagami distribution for cataract evaluation

Danilo Jesus, Elena Velte
Department of Physics
University of Coimbra
Coimbra, Portugal

Miguel Caixinha, Mário Santos, Jaime Santos
Department of Electrical and Computers Eng.
University of Coimbra, Portugal
jaime@deec.uc.pt

Abstract — *Cataract is a clouding or opacity of the normally transparent crystalline lens of the eye. The cataract formation is associated with the increase of both inner fiber compaction and protein aggregation, which can be characterized by ultrasound backscattering. In this study, the tissue scatterers changing with cataract formation was investigated, and their influence in the frequency dependent attenuation such as in the Nakagami distribution was analyzed. For this purpose, cataracts were induced in twenty porcine lenses. A 25 MHz focused transducer was used to estimate the ultrasound attenuation considering the spectral ratio between echo signals from a reflector with and without lenses inserted. A power-law frequency dependence model was used to study the frequency dependent attenuation. The analyzed signals showed high backscattering and also a variation of the Nakagami parameter with cataract formation, indicating a scatter size increase. This conclusion could be important to assess the cataract hardness and to provide the correct information about its type and severity.*

Keywords - *ultrasounds; lens hardness; scattering.*

INTRODUCTION

Cataract affects more than 20 million people worldwide and it is the leading cause of vision loss. Generally, cataracts are a natural result of aging, or could be in some cases caused by eye injuries, medications and diseases like alcoholism and diabetes [1]. The current method used to classify the cataract hardness degree shows a high inter-observers variability [2, 3]. Ultrasound techniques have increasingly been used as an alternative approach to assess the cataract hardness and provide information about its severity and type, due essentially to their non-invasive and non-ionizing nature [4]. Acoustic parameters of biologic tissues are described by the ultrasound velocity and the attenuation coefficient. In soft tissues the attenuation is assumed to be linear with frequency – high frequency components of echoes are more attenuated than lower frequency components [5]. Ultrasound pulses are attenuated as the result of absorption (transference into thermal energy) and dispersion (due to scattering) mechanisms, as they propagate through the tissue. The scattering is related with the particle size and the ultrasound wavelength, thus the frequency

dependent attenuation will be lower as the particle size increases. Normal lens is acoustically homogeneous and clear. Its characteristics change with the cataract hardness, which is due to changes in tissue density and structure (i.e., molecular weight and size). The crystalline proteins are the main structure of the human lens, representing approximately 90% of this structure. Their structural function is to assist in maintaining the appropriate refractive index of the lens and its transparency. Their molecular weights are: α -crystallins over 200kDa; β -crystallins 40-160kDa; and γ -crystallins about 20kDa [6]. Oxidative damage of the lens proteins is the major cause of cataract formation. The aggregation of the lens proteins, randomly distributed, is thought to produce sufficient fluctuation in protein density, accounting for opacification. Protein aggregation gives rise to the development of high molecular weight aggregates of sufficient size to promote ultrasound scattering. To understand the influence of protein aggregation on the frequency dependent attenuation, the linear and a non-linear frequency dependence approaches were studied. The scatterers distribution through a probability function as Nakagami distribution was also studied.

METHODS AND MATERIALS

Attenuation

The frequency dependent attenuation has been estimated using the setup shown in Figure 1, where the signals of interest are obtained from a planar reflector. Thus, the attenuation is expressed by (1),

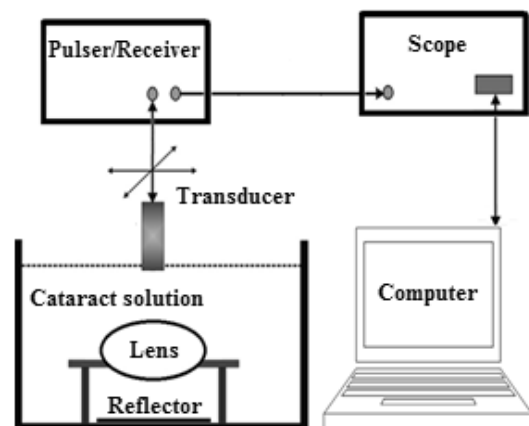


Figure 1. Experimental setup for the attenuation calculation.

$$\alpha(f) = \frac{20}{2d} \log_{10} \left(\frac{A_1(f)}{A_2(f)} (T_{12} T_{21})^2 \right) - \alpha_s \quad (1)$$

where d is the crystalline lens thickness; $A_1(f)$ and $A_2(f)$ are the amplitude spectra from the echoes received from the reflector in the solution and from the reflector with the crystalline lens inserted, respectively; T_{12} and T_{21} are the transmission coefficients observed in the lens boundaries and α_s is the attenuation in the solution path corresponding to the lens thickness. The transmission coefficients as well as the α_s factor are important attenuation correction parameters that were taken into account in this study.

Power-law

For biological soft tissue the pressure and temperature can be assumed to be constant and therefore the attenuation coefficient can be described by a model, which only takes the frequency into account. Some experimental methods have been used to estimate the cataract hardness by determining the attenuation coefficients [7]. A good approximation for the frequency dependent attenuation for most soft tissue is given by,

$$\alpha = \beta f^n \quad (2)$$

where β is the attenuation coefficient and n is the parameter that describe the frequency dependence attenuation. Some studies describe n as a value ranging from 1 to 2 for most soft tissues [8].

Nakagami Distribution

Ultrasound backscattering is essentially a random process, and therefore the statistical analysis of the ultrasound backscattered signals might provide some useful information about the scatter properties. The Nakagami parameter is related to the shape of the Nakagami distribution and determines the statistical distribution of the ultrasound backscattered envelope, as given by [9],

$$f(r, m, \Omega) = \frac{2m^m r^{2m-1}}{\Gamma(m)\Omega^m} \exp\left(-\frac{m}{\Omega} r^2\right) U(r) \quad (3)$$

where Γ and U are the gamma function and the unit step function, respectively. Let E denote the statistical mean; then the scaling parameter Ω and the Nakagami parameter m , associated with the Nakagami distribution can be respectively obtained from

$$\Omega = E(R^2) \quad (4)$$

where R is the random variable of the Nakagami distribution, and

$$m = \frac{[E(R^2)]^2}{E[R^2 - E(R^2)]^2} \quad (5)$$

The scaling parameter means the average power of the backscattered envelope. On the other hand, a variation of the Nakagami parameter from 0 to 1 means a change in the envelope statistics from a pre-Rayleigh to a Rayleigh distribution. According to previous studies, the probability density function (*pdf*) of the backscattered-signal envelope should follow a Rayleigh distribution when the resolution cell of the ultrasound transducer contains a large number of randomly distributed scatterers. If the resolution cell contains scatterers that have randomly varying scattering cross sections with a comparatively high degree of variation, the envelope statistics conforms to pre-Rayleigh distributions. If the resolution cell contains periodically located scatterers in addition to randomly distributed scatterers, the envelope statistics follow a post-Rayleigh distribution [9].

Lens samples

Twenty porcine eyes have been used. Cataract was induced by an ethanol:2-propanol:formalin solution at the ratio 3:3:4 [10]. The lens average thickness measured by a caliper was 8.3 ± 0.4 mm.

Experimental procedure

A 25 MHz transducer with a 3.5 cm focus and 5mm active diameter was used. The lenses were placed on a perspex holder having a circular hole suited to the lens (see Figure 1). Both the transducer and the lens were immersed in a temperature controlled solution. The measurements were taken every 20 min ranging from 0 to 180 minutes (total cataract). A Pulser/Receiver with a 35 MHz bandwidth (PR5800, Olympus NDT Inc., Waltham, MA, USA) was used in a pulse echo configuration. The received signals were displayed by a digital oscilloscope (Tektronix TDS 3032) and transferred to the computer for processing.

Statistical Analysis

To compare the different values used to analyze the frequency dependent attenuation in lenses with and without induced cataract (i.e. with different lens hardness), the non-parametric *Kruskal-Wallis* and *Wilcoxon* tests were used (SPSS version 17.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). All statistical values were considered significant for p values smaller than 0.05 [124].

RESULTS

The echo signals collected by using the setup shown in Fig.1 present a clear downshift of the central frequency of the posterior and anterior capsule echoes. In particular the central frequency of the posterior signal has decreased 17% for the immersion time ranging from baseline (0 minutes) to 180 minutes. Figure 2 shows the evolution of the signal spectra for the different immersion times considered. The attenuation calculated by (1), showed a significant increase with the immersion time ($p < 0.001$), i.e., with lens hardness. Such behavior is illustrated in Fig. 3.

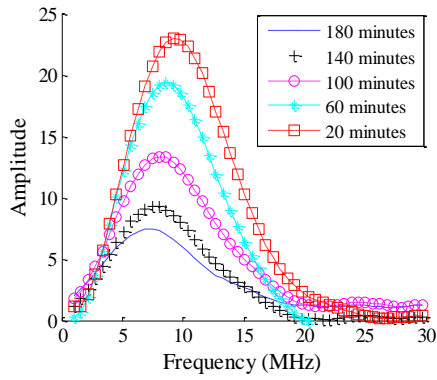


Figure 2. Signal spectra obtained using setup shown in fig.1.

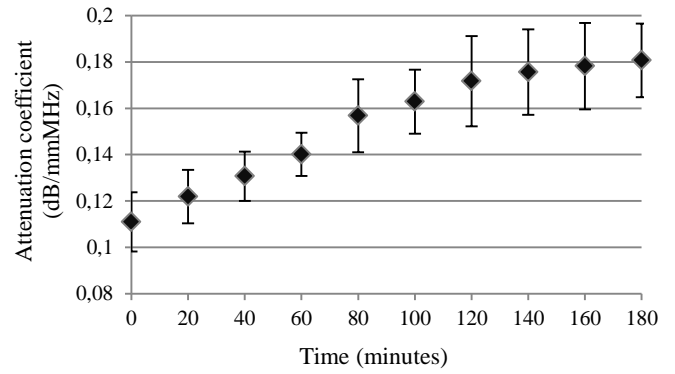


Figure 4. Frequency dependent attenuation for the used methodology.

Considering a linear frequency dependent attenuation ($n=1$ in Eq. 2), the attenuation coefficient was obtained by a linear regression. Fig. 4 shows the attenuation coefficient for the immersion time range. It is observed a significant increase of the attenuation till 120 minutes of immersion time. For higher times the attenuation assumes an almost constant value ($p>0.05$).

It is well known that the crystalline lens characteristics are changed by cataract formation. The cataract process is characterized by protein precipitation and aggregation, which contributes to a large variation of the scatterers size. To understand how the scatterers size affects the attenuation values, the frequency dependency was analyzed. For that, a power-law regression was applied in the range of interest (5-20MHz), and the parameter n and the attenuation coefficient β were extracted by (2). As represented in Fig. 5, the frequency dependent attenuation factor (n) ranged from 2.1 to 0.8 for lenses without and with cataracts, respectively. Also, the attenuation coefficient β increases with the immersion time, when the new calculated values for n are considered (see Fig. 6). The scatterers distribution was also analysed by the Nakagami approach. The averaged Nakagami parameter m , calculated by (5), versus the immersion time is shown in Fig. 7. It is observed that the Nakagami parameter increases from 0.63 to 0.88 for the immersion time range, corresponding to an increasing rate of 0.0013 min^{-1} .

This result indicates that the statistics of the backscattered envelope varied from a pre-Rayleigh distribution to a Rayleigh distribution as the immersion time increased. Fig. 8 shows also the scaling parameter Ω as function of immersion time. It describes how the backscattering intensity values changed with cataract formation. The results showed that the scaling parameter did not have a consistent variation along the cataract formation process, varying significantly only in the early stages of cataract formation (0 to 40 minutes). Thus, the experimental results in figure 8 showed that the intensity estimation seems to be useless for scatterers characterization. The increase in tissue hardness indicates that the tissue tends to be incompressible. However, this does not mean that the scatterers have the ability to produce stronger echoes. The results showed that the backscattered statistics with a short immersion time have a pre-Rayleigh distribution (i.e. $m<1$), suggesting that little protein aggregation and fiber compaction are present in the initial stage of cataract formation. For cataracts induced by long immersion times, the backscattered statistics gradually approached to a Rayleigh distribution (i.e. $m=1$), representing a stronger protein aggregation and fiber compaction.

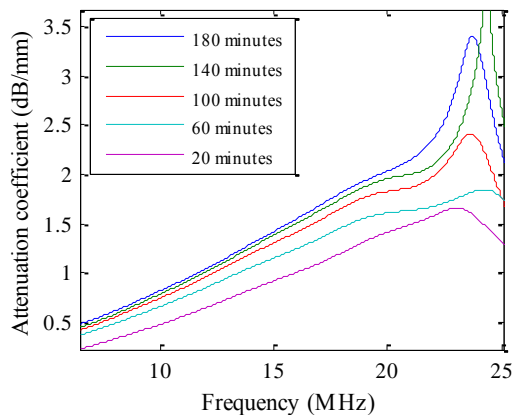


Figure 3. Attenuation for the used methodology.

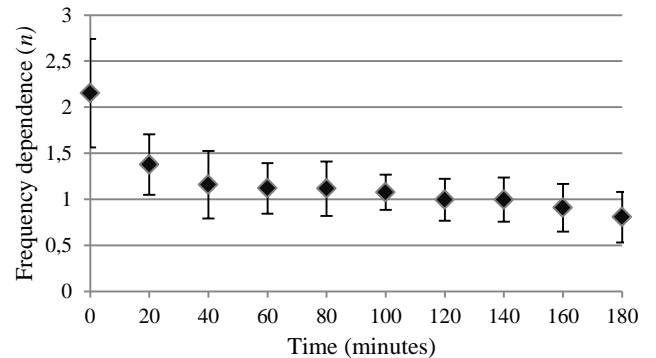


Figure 5. Parameter n for all tested lenses.

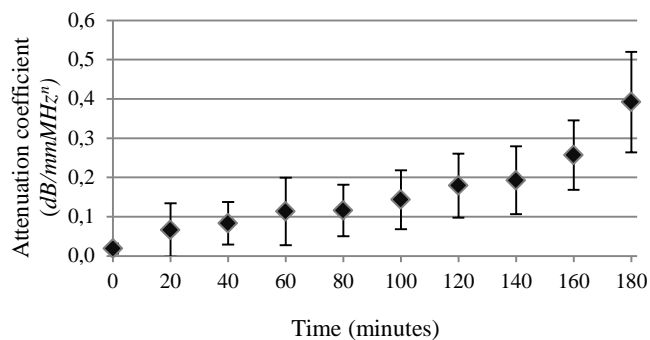


Figure 6. Attenuation coefficient (β) for all tested lenses considering a non-linear dependence.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In this work, we evaluated the ultrasound attenuation behavior in the cataract formation. It was observed higher attenuation values as the hardness of cataracts increased. This is due to the changing in the scatterers size. The parameter n calculated for the considered immersion time range explain that behavior. The backscattering signals were also analyzed by the Nakagami distribution. The Nakagami parameter reflected changes in the arrangement, distribution and concentration of scatterers in the lens through cataract formation. In conclusion, the process of cataract formation is associated with increasing in the hardness and opacity of the lens due to the increasing in both protein aggregation and inner fiber compaction. Thus, cataract formation may be treated as a process of change in the spatial arrangement and concentration of the scatterers, resulting from fiber compaction, proteins size and distribution, and therefore we can indirectly estimate the scatterer concentration and distribution in tissue by estimating the Nakagami parameter. The scaling parameter results suggest that the backscattering intensity measured by 25MHz focused transducer could not be used to distinguish variations in the scatterers size. However, more investigations on the frequency dependent attenuation should be carried out before using this parameter to characterize cataract hardness. Our next goal is to establish a relationship between the frequency dependence and the scatterers size using phantoms that will simulate the eye cataract formation.

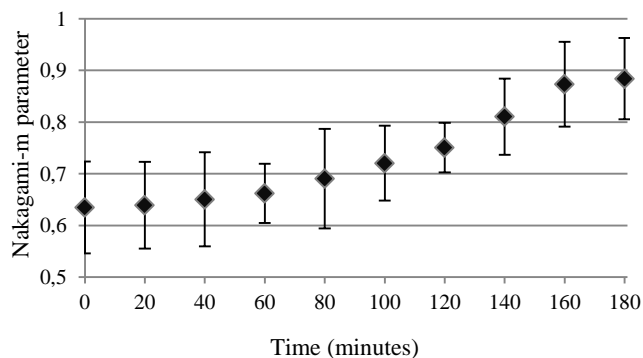


Figure 7. Nakagami-m parameter as function of immersion time.

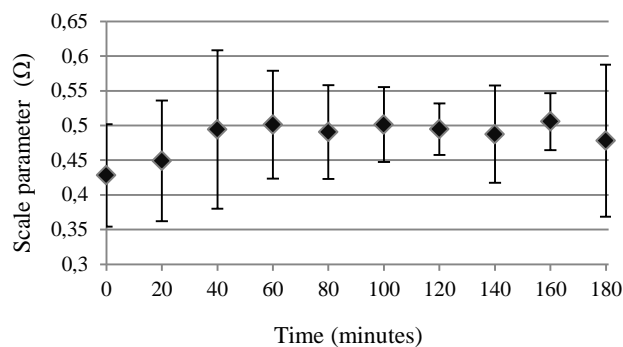


Figure 8. Nakagami scale parameter as function of immersion time.

REFERENCES

1. J. J. Kanski, *Clinical diagnosis in ophthalmology*, 1st ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2006.
2. M. Esmacelpour Hajyar et al., "Three-Dimensional 1060-nm OCT: Choroidal Thickness Maps in Normal Subjects and Improved Posterior Segment Visualization in Cataract Patients," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 51, no. 10, pp. 5260-5266, 2010.
3. D. R. Nixon, "Preoperative cataract grading by Scheimpflug imaging and effect on operative fluidics and phacoemulsification energy," *Journal of cataract and refractive surgery*, vol. 36, no. 2, pp. 242-246, 2010.
4. C.-C. Huang et al., "Evaluation of lens hardness in cataract surgery using high-frequency ultrasonic parameters in vitro," *Ultrasound in medicine biology*, vol. 33, no. 10, pp. 1609-1616, 2007.
5. C.-C. Huang et al., "Determining the acoustic properties of the lens using a high-frequency ultrasonic needle transducer," *Ultrasound in medicine biology*, vol. 33, no. 12, pp. 1971-1977, 2007.
6. A. Paunksnis et al., "Evaluation of Ultrasound Attenuation Characteristics of Human Cataract." *Informatica*, 14(4), pp. 529-540, 2003.
7. C.-C. Huang et al., "Measurements of attenuation coefficient for evaluating the hardness of a cataract lens by a high-frequency ultrasonic needle transducer" *Phys Med Biol.* vol. 54, no.19, pp. 5981-5994, 2009.
8. Szabo T. L., and Wu J., 2000, "A model for longitudinal and shear wave propagation in viscoelastic media," *J. Acoust. Soc. Am.*, 107(5), pp. 2437-2446.
9. M.-C. Ho et al, "Using ultrasound Nakagami imaging to assess liver fibrosis in rats," *Ultrasonics* Vol. 52 no. 2 pp.215-222, 2012
10. Sugiura T, Kurosaks D, Uezuki Y, Eguchi S, Obata H, Takahashi T. Creating cataract in pig eye. *J Cataract Refract Surg* 1999;25:615-621.
11. K. G. Tournoy et al., "The value of endoscopic ultrasound after bronchoscopy to diagnose thoracic sarcoidosis," *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, vol. 35, no. 6, pp. 1329-35, Jun. 2010.
12. J. D. Spurrier, "On the null distribution of the Kruskal-Wallis statistic," *Journal of Nonparametric Statistics*, vol. 15, no. 6, pp. 685-691, Dec. 2003

Anexo B - Characterization of scatterers concentration in cataractous lens using Nakagami distribution by ultrasounds

Miguel Caixinha, Danilo Jesus, Mário Santos, Jaime Santos

Department of Electrical and Computers Engineering
University of Coimbra, Portugal
jaime@deec.uc.pt

Elena Velte
Department of Physics
University of Coimbra
Coimbra, Portugal

Abstract — Cataract affects more than 20 million people in the world. Its formation is associated with the increase of protein aggregation in the eye lens. In the early stages the protein aggregates act as light scatterers and in the advanced stages these aggregates increase in size preventing the light propagation through the eye. This work aims to analyze the protein aggregates and its spatial distribution, for different stages of cataract formation. Cataract was induced in porcine lenses by immersion in an ethanol:2-propanol:formalin solution. Slices of 50 μm in thickness were obtained from the nucleus and the cortex, to locally analyze the frequency dependent attenuation and the Nakagami m parameter. The slices were stained and imaged with an inverted microscope. With cataract formation a significant increase was found for the ultrasound velocity ($p < 0.001$), the frequency dependent attenuation ($p < 0.001$), the backscattering signals intensity – B-Scan images and the Nakagami m parameter ($p < 0.001$). The increase of the Nakagami m parameter in the cortex was in agreement with the increasing of the protein aggregates observed in the slices in this region, for different stages of cataract formation. The same was not observed for the nucleus, due to the higher compaction of the fibers in the nucleus in the advanced stages of the cataract, leading to weak backscattering signals. The results suggest that the interpretation of backscattering signals by the Nakagami distribution, when combined with the knowledge of the physical scatter properties are challenging for obtaining a distribution map of cataract hardness by a noninvasive method.

Keywords- *ultrasound; Cataract; Nakagami distribution; backscattering.*

INTRODUCTION

Cataract affects more than 20 million people worldwide [1]. Its formation is associated with the increase of protein aggregation in the eye lens. The lens transparency is highly dependent on the well-ordered arrangement of the crystalline proteins, which are present in high concentration and represent almost the entire composition of the lens. Their structural

function is to assist in maintaining the appropriate lens refractive index and its transparency. The molecular weights of the α , β , and γ -crystallins are: α -crystallins over 200kDa; β -crystallins 40-160kDa; and γ -crystallins about 20kDa [2]. With cataract formation the molecular weights of the α , β , and γ -crystallins increases significantly, and in the case of α -crystallins this increase can be over 1000 kDa [3].

Since the crystalline proteins represent almost the entire composition of the lens, the disruption of crystalline protein arrangement, as a result of protein aggregation and precipitation, leads to cataract formation [2]. The protein aggregation can be described as scatterers, and then the process of cataract can be therefore considered as a three-dimensional arrangement of scatterers. Depending on the type and cataract severity, and thus the size of the protein aggregates, may cause scattering of light or prevent their passage through the eye.

Non-invasive ultrasound techniques have increasingly been used as an alternative approach to assess objectively the cataract hardness and to provide information about its severity and type [4, 5, 6]. However, most of the used methods neither allow the characterization of the regional hardness nor the establishment of a correlation with the protein aggregation in the cataractous lens. New methodologies are therefore needed to assess the regional cataract hardness and to correlate it with the protein aggregation. In the field of medical ultrasounds, the Nakagami statistical distribution has received considerable attention because the associated Nakagami m parameter can be applied to backscattered signals, making possible the scatterers characterization in biological tissues [7].

This work aims to analyze the scatterers spatial distribution, concentration, and average dimension, for different stages of cataract formation, and to explore their impact in the ultrasound attenuation. Porcine eyes were used in this work for estimating velocity and frequency dependent attenuation in crystalline lenses because they represent a good animal model [6, 8, 9, 10].

MATERIALS AND METHODS

A. Lens Samples

Fifty lenses from porcine eyes were collected in a

slaughterhouse. The lenses were carefully extracted and prepared to clean iris remains and adhering vitreous preserving the lens capsule. The lenses mean diameter was 8.4 ± 0.4 mm. Cataract was induced by lens immersion over time in an ethanol:2-propanol:formalin solution [11] - from zero (lens without cataract), 60 min (lens with initial cataract), 120 min (lens with advanced cataract) to 180 min (lens with total cataract). Slices of 50 μ m in thickness were obtained from two different regions of the lenses (nucleus and cortex), to locally analyze the scatterers (i.e., protein aggregates), distribution and concentration.

B. Ultrasound Velocity and Attenuation

The ultrasound velocity and the frequency dependent attenuation were estimated using the setup shown in Fig. 1.

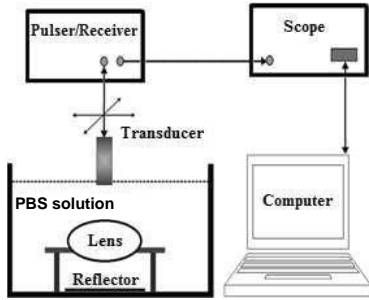


Fig. 1. Experimental setup.

The ultrasound velocity (V) was estimated based on the time of flight (Δt) considering the anterior and posterior capsule echoes, according to,

$$V = 2d/\Delta t \quad (1)$$

where d is the lens thickness and Δt is the time of flight.

The frequency dependent attenuation was estimated using a planar reflector, according to,

$$\alpha(f) = \frac{20}{2d} \log_{10} \left(\frac{A_1(f)}{A_2(f)} (T_{12} T_{21})^2 \right) - \alpha_s \quad (2)$$

where d is the lens thickness; $A_1(f)$ and $A_2(f)$ are the amplitude spectra from the echoes received from the reflector in the solution and from the reflector with the lens inserted, respectively; T_{12} and T_{21} are the transmission coefficients observed in the lens boundaries and α_s is the attenuation in the solution path corresponding to the lens thickness.

C. Nakagami Distribution

The backscattering signals from the lens tissue are essentially random, even when they result from the lens without cataract. Therefore the statistical analysis of the backscattering signals might provide useful information about the scatter properties of the tissue. The Nakagami m parameter, which is related to the shape of the Nakagami distribution, determines the statistical distribution of the ultrasound backscattered envelope, and is given by,

$$f(r, m, \Omega) = \frac{2m^m r^{2m-1}}{\Gamma(m)\Omega^m} \exp\left(-\frac{m}{\Omega} r^2\right) U(r) \quad (3)$$

where Γ , U and Ω are the gamma function, the unit step function and the scaling parameter, respectively. Let E denote the statistical mean; then the Nakagami m parameter, associated with the Nakagami distribution can be obtained from,

$$m = \frac{[E(R^2)]^2}{E[R^2 - E(R^2)]^2} \quad (4)$$

where R is the random variable of the Nakagami distribution. The Nakagami m parameter ranges from 0 to 1 meaning a change in the envelope statistics from a pre-Rayleigh to a Rayleigh distribution [12].

D. Experimental procedure

1) *Backscattering Signals*: A 25 MHz focused (3.5 cm) transducer with a 5 mm active diameter was used in a pulse echo configuration. The lenses were placed on a perspex holder having a circular hole suited to the lens. Both the transducer and the lens were immersed in a temperature controlled phosphate buffer solution (PBS) (see Fig. 1). The measurements were taken for the referred lens immersion times (0 min – no cataract, 60 min, 120 min and 180 min – total cataract). A Pulsar/Receiver with a 35 MHz bandwidth (PR5800, Olympus NDT Inc., Waltham, MA, USA) was used. The received signals were displayed in a digital oscilloscope (Tektronix TDS 3032, Tektronix, Inc., TX, USA), and then transferred to the computer for processing. The velocity and attenuation were calculated taking the average of 10 A-Scan lines obtained over the central portion of the lens. The backscattering signals were used to estimate the frequency dependent attenuation (2), to construct B-Scan images using its intensity, and to compute the Nakagami m parameter (4).

2) *Slices of the nucleus and cortex*: Slices with 50 μ m in thickness were obtained from the different regions of the lenses. The lenses were first frozen at -40°C in an embedding resin, Cryomatrix medium (Thermo Scientific Shandon Ltd, WA, USA). Cuts were made transversally with a glass knife using a Leica Microsystems CM3350S cryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3) *Tissue Staining and Imaging*: To stain the lens proteins, connective tissue and collagen, the Hematoxylin and Eosin (H&E) staining protocol was used. The stained slices from the nucleus and the cortex were imaged using an inverted microscope with a digital image capture system. The images were acquired with magnifications of 40x for the slices in the cortex and the nucleus region, and 4x for the slices of the nucleo-cortex region, and the same amounts of light and exposure times. The information provided by these images was correlated with the Nakagami and B-Scan images.

E. Statistical Analysis

To compare the ultrasound parameters in lens with and without induced cataract (i.e. with different lens hardness), the non-parametric *Kruskal-Wallis* and *Wilcoxon* tests were used (SPSS version 17.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Statistical values were considered significant for $p \leq 0.05$.

RESULTS

A. Ultrasound Velocity and Attenuation

The ultrasound velocity and the frequency dependent attenuation showed a statistically significant increase over cataract formation, i.e. over lens' hardness ($p < 0.001$, Fig. 2). The ultrasound velocity increased from 1600 ± 5 m/s in lens without cataract to 1652 ± 2 m/s in lens with total cataract (i.e., after 180 minutes) ($p < 0.001$; Fig. 2 (a)). The frequency dependent attenuation increased from 0.10 ± 0.01 dB/mmMHz in lenses without cataract to 0.17 ± 0.02 dB/mmMHz in lenses with total cataract ($p < 0.001$; Fig. 2 (b)).

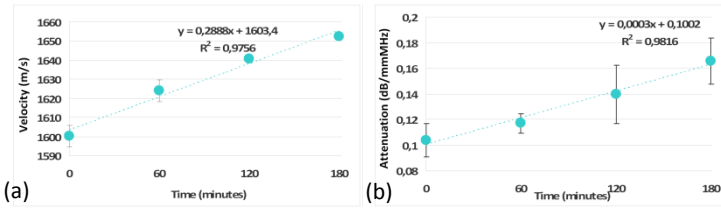


Fig. 2. Ultrasound velocity (a) and frequency dependent attenuation (b) over cataract formation.

B. B-Scan Images

The B-Scan images showed an increase of the relative echo intensity with cataract formation (Fig. 3). Also, as the cataract formation progresses the backscattering signals are collected deeper in the lens (see Fig. 3), revealing the presence of larger and dispersed protein aggregates, from the capsule to the nucleus.

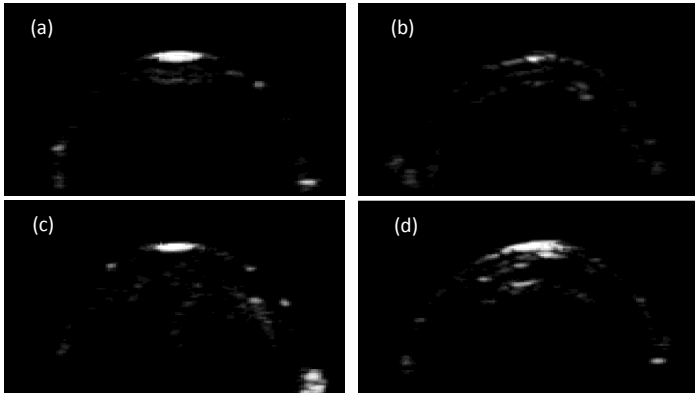


Fig. 3. B-mode images of lens: (a) without cataract; (b) 60 minutes, (c) 120 minutes, (d) and 180 minutes of immersion time.

C. Nakagami Images

The Nakagami images showed an increase of the m parameter with cataract formation (Fig. 4). With the purpose of removing the contribution of the iris, the mean Nakagami m parameter was estimated in a region of interest. The mean

value of m parameter increased from 0.32 for lenses without cataract (0 min) to 0.80 for lenses with total cataract (180 min) ($p < 0.001$). For the 60 and the 120 min the mean Nakagami m parameter was respectively: 0.48 and 0.51. No statistically differences were found between these two immersion times, $p = 0.650$. The m parameter behavior, indicates that the scatterers distribution evolves from a pre-Rayleigh to a Rayleigh distribution as the severity of the cataract increases. With cataract formation the Nakagami m parameter increases for deeper regions of the lens, as shown in Fig. 4, revealing the presence of a larger number of scatterers from the anterior capsule to the nucleus. When a total cataract is present (i.e. for an immersion of 180 min.) an increase of the Nakagami m parameter is observed between the anterior capsule of the lens and the beginning of the adult nucleus, as illustrated in Fig. 4 (d). It was also found that the Nakagami images do not identify scatterers in fetal and embryonic nucleus. This is due to the larger compaction of the fibers in this region of the lens for advanced stages of cataract formation, and to the attenuation suffered in the cortex, which cause a substantial attenuation of the ultrasounds for the frequency of analysis. The result is very weak or inexistent backscattering signals coming from that depth.

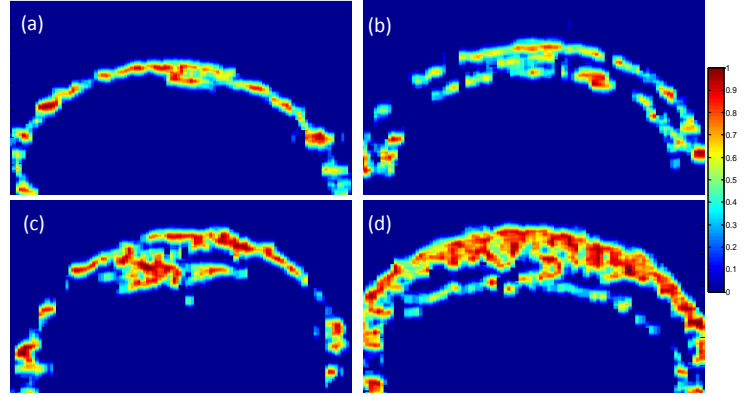


Fig. 4. Nakagami images: (a) without cataract; (b) 60 minutes; (c) 120 minutes, (d) and 180 minutes of immersion time.

D. Nucleus and Cortex protein aggregates

The $50 \mu\text{m}$ slices contain several layers of proteins in agglomerates, connective tissue and collagen fibers. Since these structures alone represent some nanometers, in accordance with the conditions of image acquisition and with the protein and connective tissue staining protocol, the darker areas of the microscopy images (Fig. 5 and Fig. 6) represent areas of higher protein aggregate concentrations. Fig. 5 shows the difference in the concentration of protein aggregates between the nucleus and cortex (from bottom to top).

For the nucleus and cortex regions (see Fig. 6) even more marked dyeings are visible along the different immersion times denoting a clear increase in protein aggregates during the process of cataract formation. Moreover, for all immersion times the nucleus region showed a higher dyeing than the cortex one, indicating the presence of more protein aggregates in this region of the lens.



Fig. 5. Microscopy image of a transversal slice of the nucleo-cortex region.

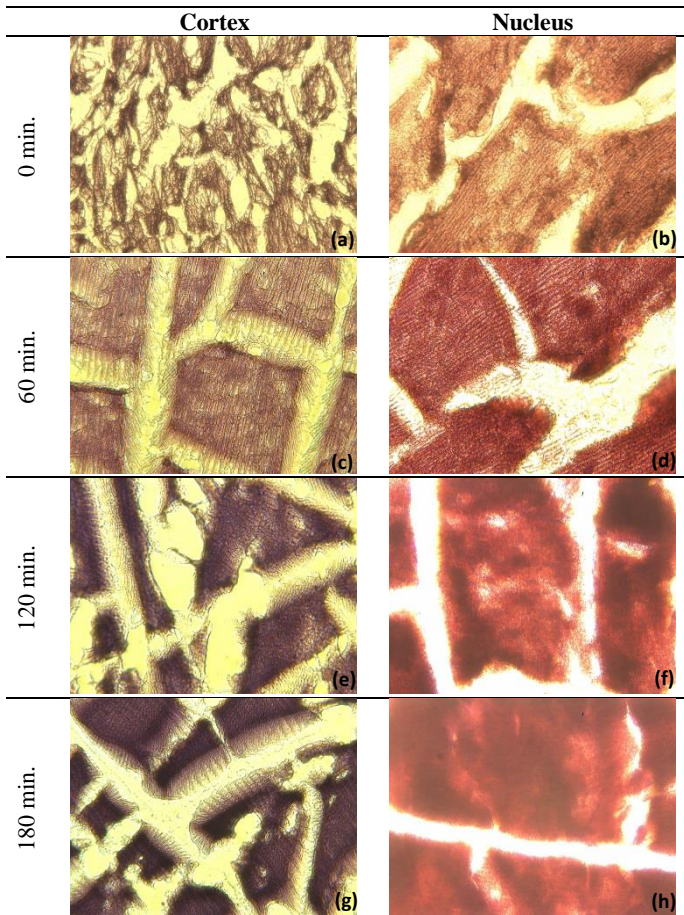


Fig. 6. Microscopy images: without cataract (cortex (a) and nucleus (b)); 60 minutes (cortex (c) and nucleus (d)); 120 minutes (cortex (e) and nucleus (f)); 180 minutes (cortex (g) and nucleus (h)).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

It was shown in previous study that the ultrasound velocity and frequency dependent attenuation increases as the cataract hardness increase, due to changes in the scatterers size [10]. While these parameters provide cataract hardness information about the entire lens globally, the Nakagami m parameter presents as a promising parameter, capable to visualize and quantify locally the cataract formation since this parameter reflects changes in the arrangement, distribution and concentration of scatterers in the lens through cataract formation [10]. In this study it was possible to show that both the backscattering signals intensity (B-Scan) and the Nakagami m parameter vary spatially in the lens, increasing with cataract formation for deeper regions in the lens. The images of the slices obtained for the nucleus and the cortex

regions revealed the presence of protein aggregates that increased with the cataract formation. The increase of the proteins aggregates, for the different stages of cataract formation, was found to be in agreement with the increase of the Nakagami m parameter in the cortex. For the nucleus no correlation was found due to the higher compaction of the fibers in that region of the lens for the advanced stages of cataract, where the backscattering signals are very weak or inexistent. Additional study using different frequency values should be used to clarify these results. In summary, the results suggest that the interpretation of backscattering signals by the Nakagami distribution, when combined with the knowledge of the physical scatter properties are challenging. A distribution map of cataract hardness is the next goal, because it could play an important role assessing it.

ACKNOWLEDGMENT

This research is sponsored by CEMUC - Centro de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra, FEDER/COMPETE-Programa Operacional Factores de Competitividade, and FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia, under the project PTDC/DTP-PIC/0419/2012.

REFERENCES

- [1] J.J. Kanski. *Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach*. Butterworth-Heinemann, 2006.
- [2] H. Ecroyd and J. Carver. Crystallin proteins and amyloid fibrils. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 66(1):62–68, 2009.
- [3] A.J. Kiss, A.Y. Mirarefi, S. Ramakrishnan, C.F. Zukoski, A.L. DeVries, and C.H.C. Cheng. Cold-stable eye lens crystallins of the antarctic nototheniid toothfish *dissostichus mawsoni* norman. *The Journal of Experimental Biology*, 207:4633–4649, 2004.
- [4] A. Paunksnis, S. Kurapkiene, A. Maciulis, and Paunksniene M.L. Evaluation of ultrasound attenuation characteristics of human cataract. *Informatica*, 14(4):529–540, 2003.
- [5] A. Paunksnis, S. Kurapkiene, A. Maciulis, A. Kopustinskas, and M. Paunksniene. Ultrasound quantitative evaluation of human eye cataract. *Informatica*, 18(2):267–278, 2007.
- [6] CL. de Korte, AF. van der Steen, and JM. Thijssen. Acoustic velocity and attenuation of eye tissues at 20 mhz. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 20(5):471–480, 1994.
- [7] P.M. Shankar. A general statistical model for ultrasonic backscattering from tissues. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 47(3):727–736, 2000.
- [8] CC.. Huang, R. Chen, P. Tsui, Q. Zhou, MS. Humayun, and KK. Shung. Measurements of attenuation coefficient for evaluating the hardness of a cataract lens by a high-frequency ultrasonic needle transducer. *Physics in Medicine and Biology*, 54(19):5981–5994, 2009.
- [9] D. Jesus, M. Caixinha, M. Santos, and J. Santos. Ultrasound techniques for lens hardness characterization: A comparison study. In *IEEE Conference Publications, editor, 2012 IEEE International Ultrasonics Symposium, Dresden, 2012*.
- [10] D. Jesus, E. Velte, M. Caixinha, M. Santos, and J. Santos. Using of the ultrasound frequency dependent attenuation and nakagami distribution for cataract evaluation. In *IEEE Conference Publications, editor, Bioengineering (ENBENG), 2013 IEEE 3rd Portuguese Meeting*, pages 1–4, 2013.
- [11] T. Sugiura, D. Kurosaka, Y. Uezuki, S. Eguchi, H. Obata, and T. Takahashi. Creating cataract in a pig eye. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 25(5):615–621, 1999.
- [12] P.M. Shankar. Ultrasonic tissue characterization using a generalized nakagami model. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 48(6):1716–1720, 2001.

Anexo C – Protocolo de aquisição

1. Descrição

Pretende-se especificar pormenorizadamente o processo de recolha de sinais ultrassónicos de cristalinos de suínos, de forma a tornar a aquisição o mais sistemática, rápida e coerente possível.

2. Equipamento

A aquisição dos sinais ultrassónicos é feita sobre uma linha meridional do cristalino, estando este depositado numa placa metálica com um furo de posicionamento e imerso em soro apropriado. O equador do cristalino deve estar, tanto quanto possível, paralelo à placa metálica de suporte.

Para tal o setup, representado na Por outro lado permite também acondicionar o sinal de receção, fazendo um amplificação e filtragens adequadas.

- (1) Termómetro digital para medir a temperatura da solução indutora de catarata.

Observações:- O sistema de posicionamento e o sistema de aquisição estão em PCs separados.- A placa de aquisição dispõe de software de aquisição (DAQ Pilot) que permite guardar em tempo real os dados adquiridos à frequência máxima de 200 MHz.

, dispõe-se de:

- (2) Sistema de posicionamento XYZ, marca Biosonic Micro-Controle, ref. ITL09.
- (3) Placa de aquisição em PC com frequência de amostragem até 200 Ms/s (200 MHz), com 14 bits de resolução e 1 canal. Marca Adlink, modelo PCIe-9842.
- (4) Sensor piezoelétrico de emissão de pulsos e receção de ecos, com frequência central de 25MHz e distância focal de 3 cm.
- (5) Gerador de sinais (Panametrics 5800R) que permite definir o “pulse rate frequency” (PRF) do sinal de excitação a fornecer ao sensor piezoelétrico. Por outro lado permite também acondicionar o sinal de receção, fazendo um amplificação e filtragens adequadas.
- (6) Termómetro digital para medir a temperatura da solução indutora de catarata.

Observações:- O sistema de posicionamento e o sistema de aquisição estão em PCs separados.- A placa de aquisição dispõe de software de aquisição (DAQ Pilot) que permite guardar em tempo real os dados adquiridos à frequência máxima de 200 MHz.

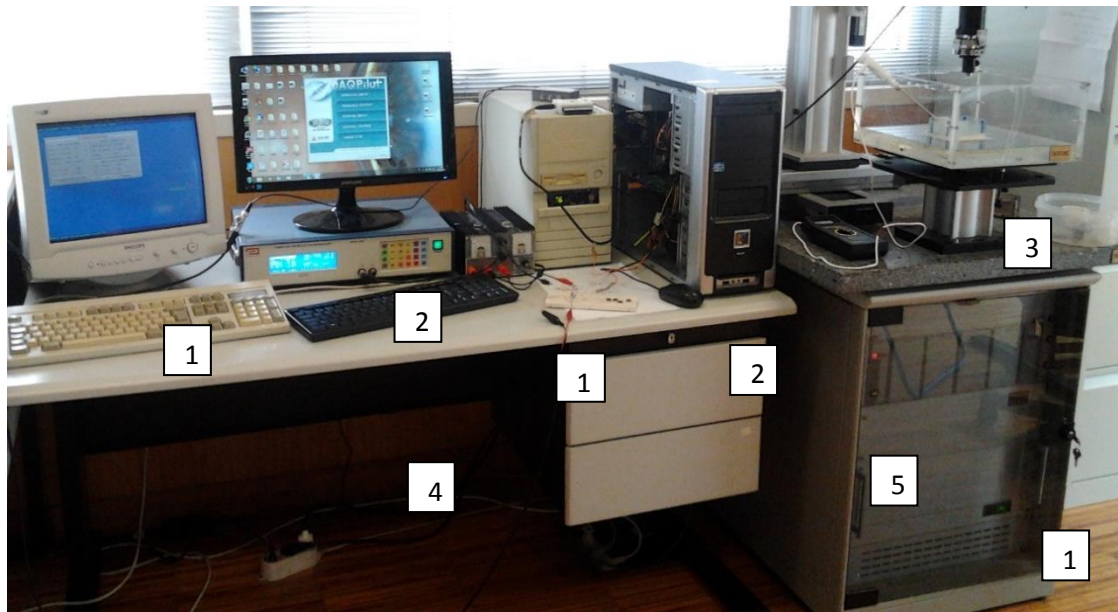


Ilustração 1. Setup utilizado na aquisição de sinais ultrassônicos. 1- Instrumentação associada ao sistema de posicionamento, 2 - Instrumentação associada à aquisição, 3 - Sensor piezoelétrico, 4 - Gerador de sinais, 5 - Termómetro.

3. Montagem

Para a aquisição construiu-se uma tina com o formato paralelepípedo onde se imerge um refletor metálico, um suporte metálico para o cristalino e o cristalino para teste. A Ilustração 2 e Ilustração 3 representam o dispositivo. A tina é fixada a uma base para fácil reposicionamento. O sistema de posicionamento é atuado para que o sensor fique a cerca de 30 mm do cristalino e perpendicular à sua face anterior. A aquisição é feita em simultâneo com o deslocamento lateral do sensor (eixo dos xx). O início do deslocamento do sensor serve de “trigger” do sistema de aquisição que adquire os dados num intervalo especificado.

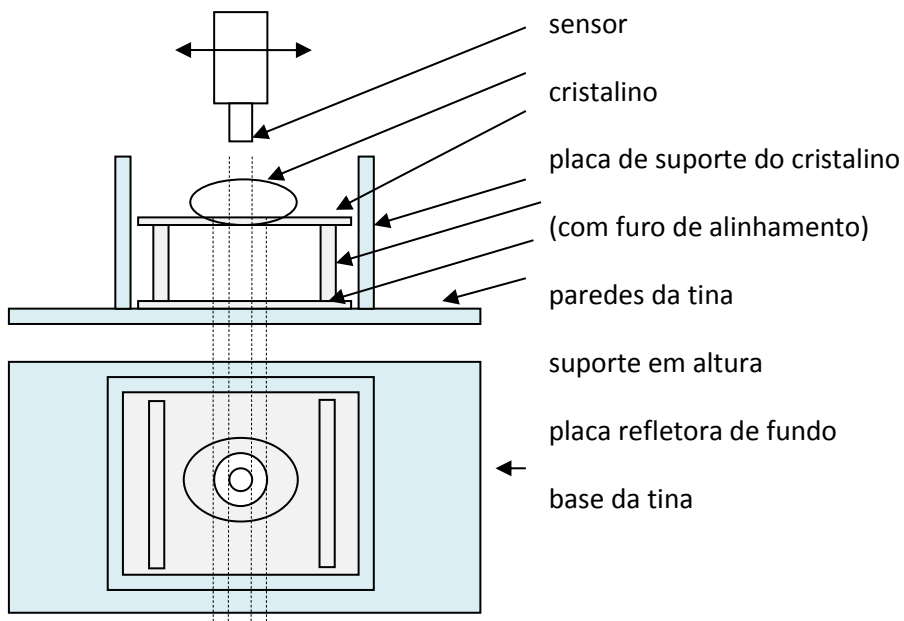


Ilustração 2. Dispositivo para a aquisição.

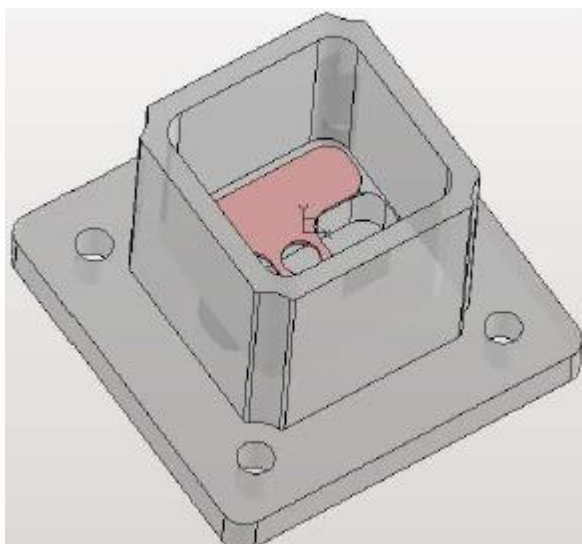


Ilustração 3. Representação 3D do dispositivo de aquisição.

4. Variáveis de aquisição

A aquisição é feita mediante as seguintes variáveis:

EYE: Identificação da posição e referência para o cristalino a testar (acompanhada de 2 dígitos).

Nomenclatura:

a: Aquisição realizada com o lado anterior do cristalino mais próximo do sensor.

p: Aquisição realizada com o lado posterior do cristalino mais próximo do sensor.

FS: Frequência de amostragem

Valor: 200 MHz.

PRF: Frequência de emissão de pulsos:

Valor por omissão: 10KHz

Obs: com este valor teremos 10000 pulsos/ecos por segundo no sensor.

V: Velocidade de deslocamento da sonda sobre o cristalino

Valor por omissão: 10 mm/s

Obs: como o deslocamento é de cerca de 10 mm, significa que uma aquisição corresponde a guardar 200M amostras de 16 bits (com 14 bits de resolução).

A: aspeto do cristalino, segundo uma escala subjetiva com cerca de 3 valores onde 0 significa excelente.

CAT: tempo de sujeição do cristalino na solução de indução de catarata.

Valor: minutos de imersão, onde 0 significa cristalino sem tratamento.

T: temperatura (°C) da solução onde é imerso o cristalino.

C: Tipo de catarata induzida no cristalino

Valores: 0: sem catarata

1: uniforme

Obs: O cristalino é imerso numa solução indutora de catarata.

2: nuclear

3: cortical

4: Sutural

Além das variáveis referidas anteriormente, a aquisição terá de ser realizada de acordo com as especificações ilustradas na Ilustração 4.



Ilustração 4. Ecrã de controlo do gerador de sinais (valores por omissão).

Em cada aquisição é necessário:

1. Posicionar o sistema num extremo do cristalino.
2. Colocar o sistema de aquisição pronto a receber o “trigger” de começo.
3. Definir a velocidade de deslocamento segundo o eixo X e começar o deslocamento.
4. Transferir o ficheiro de dados gerado com o **seguinte nome**, onde as letras minúsculas indicam dígitos:

EYEzzAxPRFppVvvCATbbbTnnCcc.dat

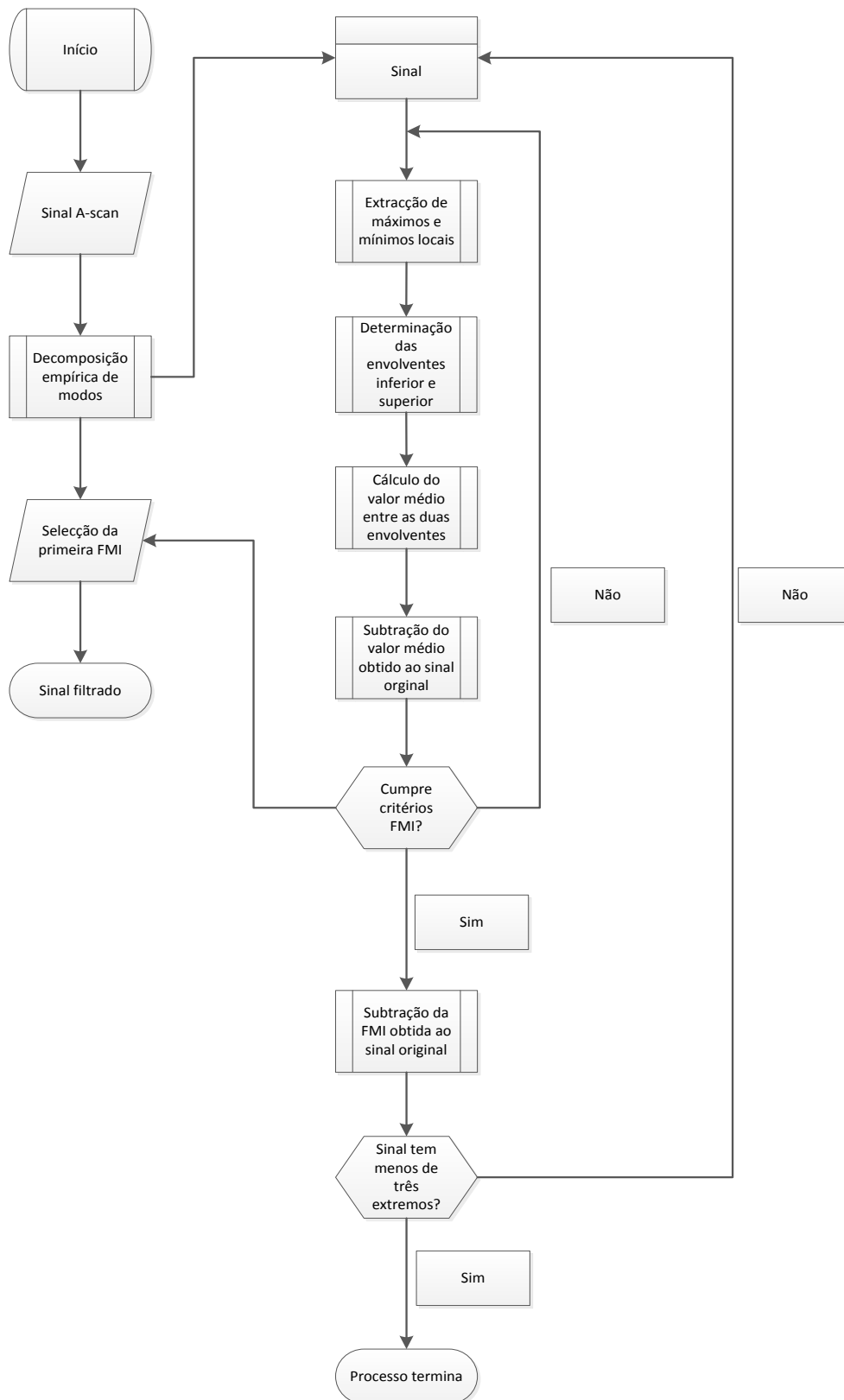
Por exemplo, o ficheiro:

EYE05A0PRF10V01CAT000T22C0.dat

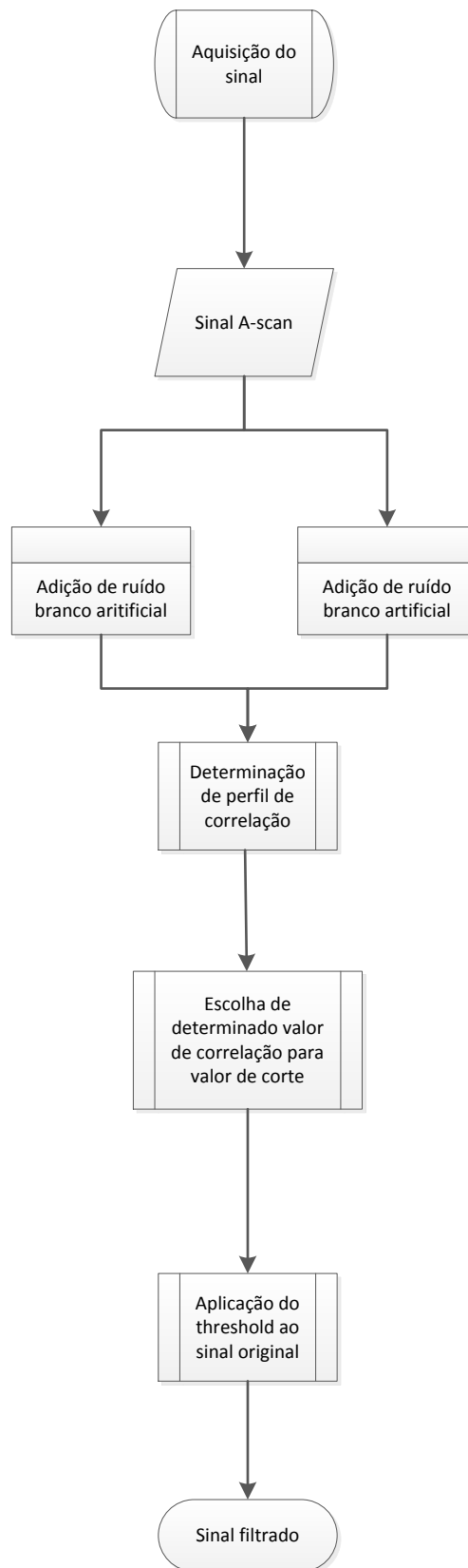
Significa que a aquisição se refere ao olho nº5 com especto excelente, PRF de 10Kz, velocidade de 10 mm/s; cristalino intacto (sem tratamento), à uma temperatura de 22 graus Celcius e sem catarata. A data do ficheiro indica quando foi feita aquisição e a sua dimensão indica o tempo de aquisição. Os ficheiros têm um “header” de 60 bytes.

Além dos ficheiros com dados do cristalino, deverá ser adquirido regularmente (1 ou mais por dia) um sinal de referência, onde todas as condições se mantêm, exceto a ausência de cristalino. Estes sinais de referência servem para calibração do processo de aquisição no seu todo.

Anexo D1 - Fluxograma referente ao processo de filtragem por meio do filtro de limiar adaptativo



Anexo D2 - Fluxograma referente à filtragem pelo filtro de correlação assistido por ruído



Anexo D3 - Fluxograma referente à filtragem do ruído pelo filtro baseado em *wavelets*

