



Inês Andreia Freitas do Vale
Licenciatura em Engenharia Biomédica

Novo *Software* para análise do epitélio nasal humano

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Professora Doutora Carla Maria Quintão Pereira, Professora auxiliar, FCT-UNL

Co-orientadores: Doutora Susana Lopes, Investigadora principal, CEDOC

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário
António Basto Forjaz
Secca

Arguentes: Prof. Doutor José
Manuel Fonseca

Vogais: Prof. Doutora Carla
Maria Quintão Pereira



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2014

Novo *software* para análise do epitélio nasal humano

Copyright © Inês Andreia Freitas do Vale, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Professora Carla Quintão e à Doutora Susana Lopes por esta oportunidade, por toda a disponibilidade para me guiar e esclarecer durante todo o trabalho.

Gostaria também de agradecer ao meu irmão, aos meus pais, aos meus amigos e a toda a minha família pelo apoio que me deram sempre.

Aos elementos do *cilia regulation and disease* do CEDOC pelo material disponibilizado e pelo *feedback* ao programa durante todo o seu desenvolvimento.

Resumo

A discinesia ciliar primária (DCP) resulta de disfunção ciliar no ser humano, estando associada a um conjunto de sintomas muito diversificados. É uma doença respiratória rara caracterizada por infecções respiratórias, *situs inversus*, infertilidade e hidrocefalia.

Em Portugal não existe nenhum centro de diagnóstico da doença. Mas a intenção de criar um surgiu, seguindo o método de centros de diagnóstico para DCP utilizado noutros países. Este diagnóstico consiste em recolher amostras dos cílios do nariz, através do método de escovagem nasal e obter a gravação do batimento das células ciliadas por uma câmara de alta velocidade acoplada a um microscópio com objectivas de alta resolução.

É possível estudar a DCP através da análise do comportamento físico dos cílios, e, para uma melhor abordagem, foi desenvolvido um programa executável, em C#, para análise destas amostras. Este, após a escolha de uma zona de interesse da sequência de imagens pelo utilizador (ROI), detecta as frequências do batimento ciliar, indicando uma lista com as percentagens das frequências obtidas e cria um mapa de frequências do ROI. A ferramenta permite ainda calcular o comprimento do cílio e realizar um estudo do movimento do mesmo, algo que ainda não foi abordado por outros programas.

O código desenvolvido permitirá, assim, obter um diagnóstico de DCP em Portugal, rápido e nalguns casos com um melhor desempenho do que a inspecção visual seguida noutros centros de diagnóstico.

Palavras-chave: Cílios, diagnóstico, DCP, *Software*

Abstract

Primary Ciliary Dyskinesia (PCD) results from a ciliary dysfunction associated to a number of diverse symptoms in human being. It is a rare respiratory disease characterized by respiratory infections, *situs inversus*, infertility and hydrocephalus.

In Portugal there is no center of diagnosis for PCD. But came up the intention of creating one, following the method of other countries centers. This diagnosis consists in collecting samples of cilia from the nose by the method of nasal brushing and acquiring the beating of the ciliated cells by a high-speed camera attached to a microscope with a high resolution objective.

It is possible to study the PCD by analyzing the physical behavior of cilium. For a better approach an executable program was developed in C# for the analysis of these samples. This program, after an area of interest has been chosen from the image sequence (ROI) by the user, detects the frequency of ciliary beating, indicates a list of the proportion of frequencies obtained and creates a frequency map of ROI. The tool allows to calculate the size of the cilium and make a study of the cilium movement, something that has not been developed by other programs.

The developed code will provide a diagnosis of PCD in Portugal, faster and in some cases with a better performance than the visual inspection followed in other diagnostic centers.

Keywords: cilium, diagnosis, PCD, software

Conteúdo

INTRODUÇÃO	1
1.1 - OBJECTIVOS.....	2
PRINCÍPIOS DE ANATOMIA	3
2.1 - CÍLIOS.....	3
2.2 - DISCINESIA CILIAR PRIMÁRIA.....	6
2.3 - MONITORIZAÇÃO E TRATAMENTO	8
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE DCP	11
3.1 - FORMAS DE ESTUDO DE DCP JÁ IMPLEMENTADAS.....	11
3.1.1 - <i>Meios Complementares de Diagnóstico de DCP</i>	11
3.1.2 - <i>Softwares já desenvolvidos:</i>	13
3.2 - RESULTADOS PUBLICADOS	14
MÉTODOS DE PRÉ-PROCESSAMENTO	16
4.1 - PROCESSAMENTO DE SINAL.....	16
4.1.1 - <i>FFT</i>	16
4.2 - PROCESSAMENTO DE IMAGEM	17
4.2.1 - <i>Filtro Sobel</i>	17
4.2.2 - <i>Filtro Roberts</i>	18
4.2.3 - <i>Binarização automática - Método Otsu</i>	18
4.2.4 - <i>Filtro Mediana</i>	19
DESENVOLVIMENTO DO SOFTWARE	20
5.1 - INÍCIO.....	20
5.2 - LINGUAGEM DE PROGRAMAÇÃO ESCOLHIDA.....	21
5.3 - INTRODUÇÃO AO PROGRAMA E SUA INTERFACE.....	21

5.4 - VISUALIZAÇÃO DO VÍDEO.....	24
5.5 - MÉTODOS.....	24
5.5.1 - <i>Frequência do batimento ciliar:</i>	25
5.5.2 - <i>Comprimento do cílio</i>	34
5.5.2.3 - <i>Tabela com as medidas do cílio</i>	42
5.5.3 - <i>Dinâmica do movimento:</i>	43
CARACTERÍSTICAS DO SOFTWARE.....	48
6.1 - OUTRAS APLICAÇÕES	49
6.2 - DIFERENÇAS EM RELAÇÃO A PROGRAMAS JÁ EXISTENTES.....	49
ASPECTOS A MELHORAR NO SOFTWARE	50
7.1 - ESTUDO DO MOVIMENTO DA BATIDA DO CÍLIO	50
7.2 - COMPRIMENTO DO CÍLIO	51
7.3 - ASPECTO GERAL DO PROGRAMA.....	51
CONCLUSÃO.....	52
BIBLIOGRAFIA.....	54
<i>Sites</i>	57
ANEXO	58

Lista de Figuras

FIGURA 2.1 - (A) ESTRUTURA DO CÍLIO ^[1] (B) REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA INTERNA DOS CÍLIOS, QUANDO TÊM 9+2 MICROTÚBULOS (NOVE MICROTÚBULOS DISPOSTOS CIRCULARMENTE E DOIS MICROTÚBULOS CENTRAIS) E 9+0 MICROTÚBULOS (NOVE MICROTÚBULOS DISPOSTOS CIRCULARMENTE E NENHUM CENTRAL) ^[28]	4
FIGURA 2.2 - BULBO OLFACTIVO ^[1] - PODE-SE IDENTIFICAR O EPITÉLIO NASAL OLFACTIVO/NASAL E AS RAMIFICAÇÕES DO NERVO OLFACTIVO.....	5
FIGURA 2.3 - DIRECÇÃO DO MOVIMENTO DOS CÍLIOS ^[15]	6
FIGURA 2.4 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DE (A) UMA PESSOA NORMAL COM ASSIMETRIA ESQUERDA-DIREITA E (B)(C)(D)(E)(F) TIPOS DE <i>SITUS INVERSUS</i> . ^[30]	7
FIGURA 3.1- (A) DIAGRAMA DO CÍLIO VIRTUALMENTE IMÓVEL, (B) DIAGRAMA DO PADRÃO DE BATIMENTO DO CÍLIO RÍGIDO, (C) DIAGRAMA DO BATIMENTO CILIAR CIRCULAR, (D) DIAGRAMA DO CÍLIO NORMAL ^[12]	15
FIGURA 4.1 - MATRIZ 3X3 A SER USADA PARA UM FILTRO, EM QUE CADA POSIÇÃO É UM PÍXEL DA IMAGEM.....	17
FIGURA 4.2 - MATRIZ 2X2 A SER USADA NUM FILTRO ROBERTS, EM QUE CADA POSIÇÃO É UM PÍXEL DA IMAGEM.....	18
FIGURA 4.3- NÚCLEOS A APLICAR NA CONVOLUÇÃO COM A IMAGEM ORIGINAL.	18
FIGURA 5.1 - EXEMPLO DE UM AVISO DE MÁ UTILIZAÇÃO DAS OPÇÕES DO PROGRAMA CILIARMOVE. "CORTE A IMAGEM OUTRA VEZ. A PARTIR DO TOPO ESQUERDO E DE SEGUIDA O CANTO INFERIOR DIREITO."	22
FIGURA 5.2 - INTERFACE DO <i>SOFTWARE</i> CILIARMOVE, QUANDO O MESMO É LIGADO.....	22
FIGURA 5.3 - PARTE DA INTERFACE PERMANENTE DURANTE TODO O ESTUDO COM A INFORMAÇÃO DA AMOSTRA ABERTA COM A IMAGEM DA PRIMEIRA <i>FRAME</i> . CONTÉM A HIPÓTESE DE SE VER A SEQUÊNCIA DE IMAGENS A CORRER, SABER A <i>FRAME</i> EM QUE SE ENCONTRA, ESCOLHER A VELOCIDADE PARA VER O VÍDEO E ESCOLHER E CORTAR O ROI NO TAMANHO QUE SE PRETENDE. ASSIM QUE É ABERTA A SEQUÊNCIA DE IMAGENS É POSSÍVEL VER O NÚMERO DE IMAGENS QUE CONTÉM A AMOSTRA, O NOME DO FICHEIRO, A VELOCIDADE DE GRAVAÇÃO (PRÉ-DEFINIDO PARA 500FPS PODE SER ALTERADA), A CONVERSÃO DE UM PÍXEL PARA MICRÓMETROS E AS COORDENADAS DO PÍXEL QUANDO SE PASSA O RATO POR CIMA DA IMAGEM. <i>SOFTWARE</i> CILIARMOVE.	23
FIGURA 5.4 - AVISO QUE INDICA QUE SE DEVE ESCOLHER A PRIMEIRA <i>FRAME</i> DA SEQUÊNCIA SEMPRE QUE SE PRETENDE ABRIR UMA NOVA SEQUÊNCIA. <i>SOFTWARE</i> CILIARMOVE.....	24
FIGURA 5.5 - DEMONSTRAÇÃO DO CORTE "CUSTOM" DO ROI NA IMAGEM E O QUE ORIGINA. PRIMEIRO CLIQUE EM X1 E SEGUNDO CLIQUE EM X2, DEPOIS DE CLICAR NO BOTÃO "CROP IMAGE". <i>SOFTWARE</i> CILIARMOVE.	25
FIGURA 5.6 - EXEMPLO DE UMA IMAGEM OBTIDA EM MATLAB SOBRE A IMAGEM ORIGINAL ENCONTRA-SE REPRESENTADA A DIFERENÇA, A CORES DE VERDE E ROSA, ENTRE DUAS <i>FRAMES</i> APÓS TER SIDO ALINHADA	

PELO MÉTODO DE REGISTO DE IMAGENS. PODE-SE OBSERVAR QUE CONTINUA A EXISTIR MOVIMENTO NA ZONA CELULAR.....	29
FIGURA 5.7 - EXEMPLO DE UMA REPRESENTAÇÃO DO MAPA DE FREQUÊNCIAS APÓS ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS DO ROI ESCOLHIDO PELO UTILIZADOR NO <i>SOFTWARE</i> CILIARMOVE. A) IMAGEM OBTIDA COMO MAPA DE FREQUÊNCIAS. O <i>DÉGRADÉ</i> DE CORES COMEÇA NO AZUL ESCURO PARA FREQUÊNCIAS MAIS BAIXAS, PASSA PELO VERDE, AMARELO E ACABA NO VERMELHO PARA FREQUÊNCIAS ELEVADAS. B) INDICADOR DE FREQUÊNCIAS QUANDO SE PASSA O RATO SOBRE OS PÍXEIS DO MAPA DE FREQUÊNCIAS.	30
FIGURA 5.8 - EXEMPLO DE UM FFT ASSOCIADO A UM PÍXEL ESCOLHIDO NO MAPA DE FREQUÊNCIAS PELO UTILIZADOR NO <i>SOFTWARE</i> CILIARMOVE. (A) FFT COMPLETA, (B) ZOOM DA FFT A)	30
FIGURA 5.9 - DEMONSTRAÇÃO DE UM EXEMPLO DE UMA TABELA QUE APARECE NA INTERFACE DO PROGRAMA CILIARMOVE COM TODAS AS FREQUÊNCIAS ENCONTRADAS APÓS ANÁLISE DE FREQUÊNCIAS DO ROI ESCOLHIDO PELO UTILIZADOR.	31
FIGURA 5.10 - DEMONSTRAÇÃO DE UM EXEMPLO DE UM HISTOGRAMA DE FREQUÊNCIAS QUE APARECE NA INTERFACE DO PROGRAMA CILIARMOVE. (A) HISTOGRAMA COM UMA ESCALA ELEVADA. (B) MESMO HISTOGRAMA COM UMA ESCALA MAIS PEQUENA, ONDE SE PODE OBSERVAR TODOS OS PONTOS DA FREQUÊNCIA LIGADOS.....	31
FIGURA 5.11 - OPÇÃO DISPONÍVEL NA INTERFACE NA PARTE DA ANÁLISE DE FREQUÊNCIAS QUE PERMITE AO UTILIZADOR FAZER UM ESTUDO MAIS APROFUNDADO DO HISTOGRAMA OU TABELA DE FREQUÊNCIAS.....	32
FIGURA 5.12 - EXEMPLO DE COMO A AMOSTRA DEVE ESTAR POSICIONADA PARA REALIZAR O MODO AUTOMÁTICO DE MEDIÇÃO DE CÍLIO NO <i>SOFTWARE</i> CILIARMOVE. (A) POSIÇÃO ORIGINAL. (B) POSIÇÃO APÓS TER RODADO 90º	36
FIGURA 5.13 - EXEMPLO DE UMA TENTATIVA DE CALCULAR O COMPRIMENTO DO CÍLIO ATRAVÉS DO MAPA DE FREQUÊNCIAS OBTIDO PELO MÉTODO DE ANÁLISE DE FREQUÊNCIAS. AS LINHAS DE DIVERSAS CORES AJUDARAM A LOCALIZAR MANUALMENTE OS CÍLIOS E A CÉLULA, DE FORMA A VERIFICAR O MELHOR TRATAMENTO PARA IMAGEM E A DESCOBRIR OS CÍLIO E AUTOMATICAMENTE. (A) ROI DE UMA AMOSTRA DE EXEMPLO. (B) MAPA DE FREQUÊNCIAS DE ROI A). (C) BINARIZAÇÃO AUTOMÁTICA DE B). (D) MEDIANA DE C) PARA RETIRAR OS <i>OUTLIERS</i>	37
FIGURA 5.14 - EXEMPLO DE APLICAÇÃO DA TENTATIVA DA MÉDIA DA DIFERENÇA DE INTENSIDADES PARA UMA LINHA DE UM ROI IDENTIFICADO EM C). (A) REPRESENTA O GRÁFICO EM FUNÇÃO DA POSIÇÃO DO PÍXEL. (B) PARTE DE UM QUIMÓGRAFO DE UMA LINHA DO ROI, COM A REPRESENTAÇÃO DE ONDE SE ENCONTRA O CÍLIO.....	38
FIGURA 5.15 - EXEMPLO DE APLICAÇÃO DA TENTATIVA DE DESVIO PADRÃO DAS INTENSIDADES AO LONGO DAS <i>FRAMES</i> PARA UMA LINHA DE UM ROI IDENTIFICADO EM C). (A) REPRESENTA O GRÁFICO EM FUNÇÃO DA POSIÇÃO DO PÍXEL. (B) PARTE DE UM QUIMÓGRAFO DE UMA LINHA DO ROI, COM A REPRESENTAÇÃO DE ONDE SE ENCONTRA O CÍLIO.....	39
FIGURA 5.16 - GRÁFICOS FFT DE UM PÍXEL (A) PERTENCENTE À CÉLULA, (B) AO CÍLIO, E (C) AO FUNDO, DA AMOSTRA EM ESTUDO NO <i>SOFTWARE</i> CILIARMOVE. AS SETAS REPRESENTAM A FREQUÊNCIA ESCOLHIDA AUTOMATICAMENTE PELO PROGRAMA PARA ASSOCIAR AO PÍXEL EM ESTUDO. AS CAIXAS A TRACEJADO REPRESENTAM TODAS AS FREQUÊNCIAS COM VALORES TRÊS VEZES SUPERIORES À FREQUÊNCIA FUNDAMENTAL, QUE SERÃO UTILIZADAS PARA CALCULAR O COMPRIMENTO DO CÍLIO NO MÉTODO AUTOMÁTICO DO <i>SOFTWARE</i>	40
FIGURA 5.17 - EXEMPLO DA APLICAÇÃO DE "MÉDIA DAS FREQUÊNCIAS SUPERIORES À PRINCIPAL DETECTADA". (A) ONDE SE PODE VERIFICAR NO GRÁFICO, O COMPRIMENTO DO CÍLIO SERÁ ENTRE O PONTO 18 E 89. (B) REPRESENTAÇÃO DO ROI MEDIDO, A AZUL ENCONTRA-SE O PONTO 18 A 89.	41

FIGURA 5.18 - EXEMPLO DA UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE MEDIÇÃO DO CÍLIO. (A) ROI NAS CONDIÇÕES PRETENDIDAS CÉLULA, CÍLIO E FUNDO. (B) TABELA COM VALORES MEDIDOS NO MODO MANUAL. (C) VALOR OBTIDO PELO MÉTODO AUTOMÁTICO. (D) TABELA COM A INFORMAÇÃO DAS MEDIDAS DO CÍLIO PARA O ROI EM ESTUDO. ...	43
FIGURA 5.19 - EXEMPLO DE UMA REPRESENTAÇÃO DO MOVIMENTO DE UM CÍLIO VISTO DE LADO. OS NÚMEROS INDICAM A SEQUÊNCIA DO MOVIMENTO. A SETA REPRESENTA A DIRECÇÃO DO MUCO. ^[27]	44
FIGURA 5.20 - REPRESENTA A INTERFACE DO <i>SOFTWARE</i> CILIARMOVE PARA O MÉTODO DE ESTUDO DA DINÂMICA DO MOVIMENTO. (A) ROI EM ESTUDO NAS CONDIÇÕES PRETENDIDAS. (B) DEMONSTRAÇÃO DA ZONA DE MOVIMENTO DOS CÍLIOS PARA TODAS AS <i>FRAMES</i> . (C) DEMONSTRAÇÃO DA ZONA DE MOVIMENTO DOS CÍLIOS PARA UMA BATIDA DOS CÍLIOS, DE ACORDO COM A INFORMAÇÃO DADA PELO UTILIZADOR DA FREQUÊNCIA DA AMOSTRA. (D,E) REPRESENTAÇÃO DO LIMAR DO MOVIMENTO DE TODAS AS <i>FRAMES</i> EM CONJUNTO E SUA RESPECTIVA REPRESENTAÇÃO EM GRÁFICO. (F,G) REPRESENTAÇÃO DO LIMAR DO MOVIMENTO DE TODAS AS <i>FRAMES</i> ATRAVÉS DO MÉTODO DE OBTENÇÃO DO COMPRIMENTO DO CÍLIO E SUA RESPECTIVA REPRESENTAÇÃO EM GRÁFICO.	47
FIGURA 7.1 - (A) EXEMPLO DE UM QUIMÓGRAFO DE UMA AMOSTRA CILIAR. (B) QUIMÓGRAFO A) DEPOIS DE APLICADO UM FILTRO SOBEL E UMA BINARIZAÇÃO AUTOMÁTICA.	51

Lista de Tabelas

TABELA 2.1 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DE DISCINESIA CILIAR PRIMÁRIA ^[21]	10
TABELA 5.1- COMPARAÇÃO DE VALORES DE FREQUÊNCIA OBTIDOS MANUALMENTE COM A FREQUÊNCIA COM MAIOR AMPLITUDE DE UM PÍXEL OBTIDA AUTOMATICAMENTE, PARA ALGUMAS AMOSTRAS. (A) EXEMPLO DE UMA FREQUÊNCIA SUPERIOR À NORMAL. (B) EXEMPLO DE UMA FREQUÊNCIA ASSOCIADA AO MOVIMENTO DA AMOSTRA.....	27
TABELA 5.2 - EXEMPLO DE UMA TABELA OBTIDA NO FIM DO ESTUDO DE TRÊS AMOSTRAS DIFERENTES, COM DIFERENTES ROI'S. NESTE EXEMPLO APRESENTAM-SE 2 CASAS DECIMAIS, POIS FOI POSTERIORMENTE TRATADA, MAS O PROGRAMA OFERECE MAIS CASAS DECIMAIS, DEIXANDO AO CRITÉRIO DO UTILIZADOR.....	33

ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Adenosina trifosfat

BMP - *Bitmap*

CBF - *Ciliar Beat Frequencie* (Frequência do batimento ciliar)

CEDOC - Centro de Estudos de Doenças Crônicas

DCP - Discinesia Ciliar Primária

DNA - *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

FFT - *Fast Fourier Transform* (Transformada de Fourier rápida)

fps - *frames per second* (*frames* por segundo)

HSM - Hospital de Santa Maria

IGC - Instituto Gulbenkian de Ciência

IMM - Instituto de Medicina Molecular

NO - Óxido Nítrico

PCD - Primary Ciliary Dyskinesia

PNG - *Portable Network Graphics*

RAM - *Random-access memory*

ROI - *Region of Interest* (Região de interesse)

TIFF - *Tagged Image File Format*



Introdução

A definição de Diagnóstico é, em Dicionário Priberam da Língua Portuguesa, 2008-2013, Priberam, a determinação de uma doença através dos seus sintomas.

É fácil obter-se um diagnóstico quando os sintomas são facilmente observáveis. Por vezes, os sintomas são facilmente detectáveis mas o diagnóstico final é complicado de se obter.

Um grande conjunto de pessoas encontra-se neste impasse, por vezes, devido à falta de meios de diagnóstico que lhes indique a sua situação. Os doentes de discinesia ciliar são um deles. Têm muitos sintomas, muito diversificados que para um médico sem os meios certos podem levar à tentativa de cura de algo inexistente. É uma área complicada de se obter um diagnóstico concreto, uma vez que ainda se encontra em fase de estudo.

Em Portugal não há nenhum centro de diagnóstico para esta doença, mas a ideia de criar um já surgiu e, com ela, a ideia de criar um *software* que ajude no diagnóstico.

Neste momento os únicos testes são feitos por via da contagem de batimentos de cílios de forma manual, tal como acontece noutros centros referenciados e por óxido nítrico, no Centro de Estudos de Doenças Crónicas (CEDOC@IGC), Hospital de Santa Maria (HSM) e Instituto de Medicina Molecular (IMM). Impôs-se então criar uma ferramenta que o faça de uma forma mais automática e objectiva, a qual será apresentada nos próximos capítulos.

O novo *software*¹ que é apresentado nesta dissertação, foi criado com o intuito de ajudar a obter um diagnóstico concreto e rápido e que permita aceder também a novas informações, para complemento do diagnóstico.

Será explicado no capítulo 5 como se chegou à versão final do *software* e como este funciona. O *software* encontra-se neste momento completamente operacional, todavia está ainda aberto a possíveis actualizações, de forma a melhorar o seu desempenho ou a introduzir novos métodos.

1.1 - Objectivos

De forma a ajudar na criação de um centro de diagnóstico de Discinesia Ciliar Primária (DCP) em Portugal, o objectivo desta dissertação é criar um programa informático que identifique de forma rápida e eficaz o padrão dos batimentos dos cílios do epitélio nasal dos doentes através da análise de sequência de imagens. Para isso, o programa terá disponível uma série de **métodos manuais e automáticos de identificação da frequência, medida do comprimento do cílio e movimento do cílio ao longo do tempo**, deixando sempre margem para o utilizador do programa elaborar o melhor diagnóstico possível e estudar novos padrões desconhecidos relacionados com a doença.

¹ *software* - Conjunto de processos relativos ao funcionamento de um conjunto de tratamento de informação.

Princípios de Anatomia

2.1 - Cílios

Os **cílios** são organelos distintos da membrana plasmática com uma membrana ciliar própria cujo movimento se assemelha ao de um chicote. Cada célula poderá ter apenas um ou centenas deles. Os conjuntos de cílios da zona respiratória têm cerca de 10µm de comprimento. São caracterizados por um movimento próprio e é frequente encontrá-los em células epiteliais. Estas células formam o tecido epitelial que reveste e protege as superfícies externas e internas do corpo humano. [1]

Os cílios são constituídos por membrana ciliar, corpo basal e axonema. O corpo basal é um centríolo modificado localizado na base do cílio ainda no citoplasma da célula e serve de nucleador dos microtúbulos do axonema contendo *gamma* tubulina. O axonema é a estrutura interna que contém dupletos de microtúbulos, braços de dineína internos e externos, pontes de nexina e projeções radiais^[2]. Os microtúbulos estão dispostos por 9 + 2 microtúbulos (nove microtúbulos dispostos circularmente e dois microtúbulos centrais) originando um cílio motor, ou 9 + 0 microtúbulos (nove microtúbulos dispostos circularmente e nenhum central) originando um cílio primário^[3] no caso de não ter braço de dineína, se o tiver será um cílio nodal, móvel. Os dupletos estão ligados entre si e deslizam uns sobre os outros com gastos de Adenosina trifosfato

(ATP) devido às proteínas que constituem os braços de dineína e às projecções radiais.^[1] (Figura 2.1)

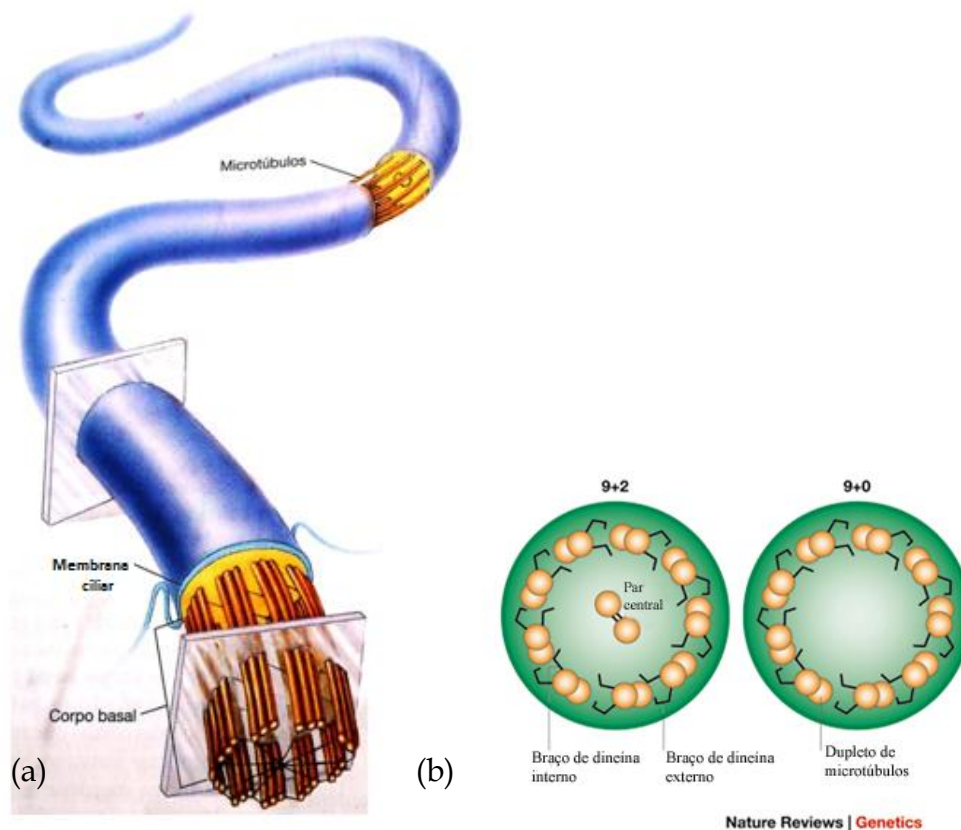


Figura 2.1 - (a) Estrutura do cílio^[1] (b) Representação da estrutura interna dos cílios, quando têm 9+2 microtúbulos (nove microtúbulos dispostos circularmente e dois microtúbulos centrais) e 9+0 microtúbulos (nove microtúbulos dispostos circularmente e nenhum central)^[28]

As membranas ciliares nasais contêm receptores específicos que iniciam as vias de sinalização, que controlam a quimio-sensação e mecano-sensação no nariz.^[3] São uma extensão de vesículas olfáticas que por sua vez se estendem para neurónios olfactivos (Figura 2.2). As moléculas com odor, odorantes, transportadas pelo ar dissolvem-se no muco nasal, onde se ligam às moléculas quimio-receptoras que fazem desencadear potenciais de acção nos neurónios olfactivos através de despolarização, ou seja, ultrapassa o limiar de estimulação na membrana tornando o seu interior menos negativo e assim o sinal é transportado pelo axónio até ao bulbo olfactivo, onde é processada a informação.^[1]

Os cílios podem ser primários ou móveis. Os cílios do nariz são móveis e têm função motora, deslocando materiais através da superfície da célula, e a função sensorial no nariz, detectando odores.

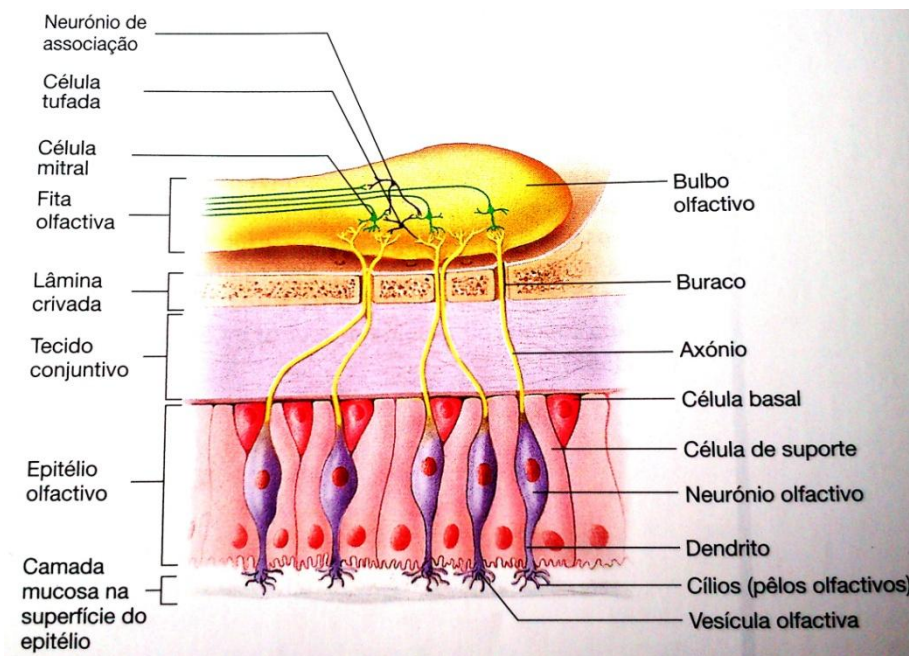


Figura 2.2 - Bulbo olfativo^[1] - Pode-se identificar o epitélio nasal olfativo/nasal e as ramificações do nervo olfativo.

Nos animais, pode-se encontrar cílios móveis em diferentes órgãos: nas vias respiratórias, no aparelho reprodutor feminino e masculino e noutras superfícies celulares^[1], como o epêndima no cérebro.

O seu movimento é normalmente coordenado. Pode ser distinguido em duas fases, cada uma com uma direcção: fase activa, movimento no sentido da direcção do fluído, e fase reversa, movimento no sentido oposto para voltar à posição inicial (Figura 2.3). A dinâmica deste movimento permite, quando necessário, que o fluído deslocado avance numa única direcção^[1]. Por exemplo, no nariz, os cílios estão revestidos de muco que agarram as poeiras que são inspiradas. Os cílios, com a ajuda dos braços de dineína, realizam um movimento na direcção da garganta ou do exterior de forma a deslocar o muco com impurezas para fora do organismo.

A quantidade, o comprimento, o tipo de batimento e o padrão do movimento dos cílios são características importantes para o muco se movimentar e

não permitir a entrada de microrganismos, absorvendo tudo o que não é suposto entrar para ser expelido, definindo assim a depuração mucociliar, que permite ter os pulmões limpos.

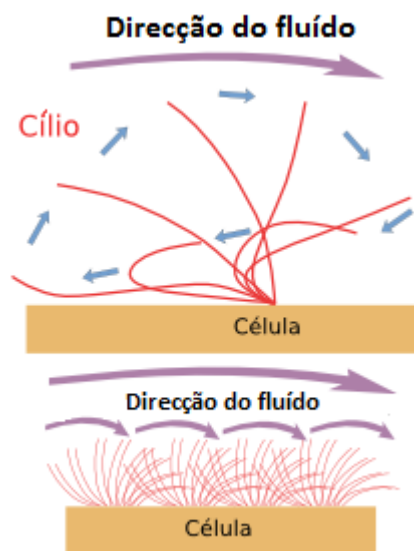


Figura 2.3 - Direcção do movimento dos cílios^[15]

2.2 - Discinesia ciliar primária

A discinesia ciliar primária (DCP) resulta da disfunção ciliar^[2], ou seja, tem origem em mutações que levam à imobilidade ou movimento descoordenado dos cílios^[3]. Trata-se de uma doença heterogénica rara e hereditária^[4a] autossómica recessiva, ou seja, que apenas se manifesta se tiver dois genes mutantes, um do pai e outro da mãe, tendo assim apenas 25% de hipótese de desenvolver a doença no caso de ambos os pais terem o gene de DCP^[5]. Baseia-se, também, no facto dos pacientes disporem de um número de axonemas que incluem ligações de nexina e de projecções radiais defeituosas, microtúbulos ausentes ou desordenados, ou braços de dineína anormais. Estima-se que 1 em cada 10 000 a 20 000 indivíduos seja afectado por DCP^[13]. Sendo as mutações no gene *DNAH5* e *DNAI1* a causa mais comum.^[29]

A DCP pode-se apresentar em qualquer órgão cuja a função dependa do funcionamento dos cílios móveis. É caracterizada por infecções respiratórias recorrentes, por vezes acompanhadas de infertilidade, hidrocefalia, *situs inversus*², otites, doença cardíaca congénita, defeitos graves na função esofágica, entre muitos outros problemas^[9]. No caso particular do transporte muco-ciliar, se este for realizado de forma irregular, podem surgir inflamações crónicas, bronquiectasias, rinite crónica e sinusite^[13]. A tabela 2.1 apresenta algumas das doenças associadas à DCP. No que respeita ao síndrome de *Kartagener*, este está associado à doença com *situs inversus*^[20], uma condição na qual os órgãos são dispostos de forma inversa, como um espelho do eixo normal, durante a sua formação (Figura 2.4).

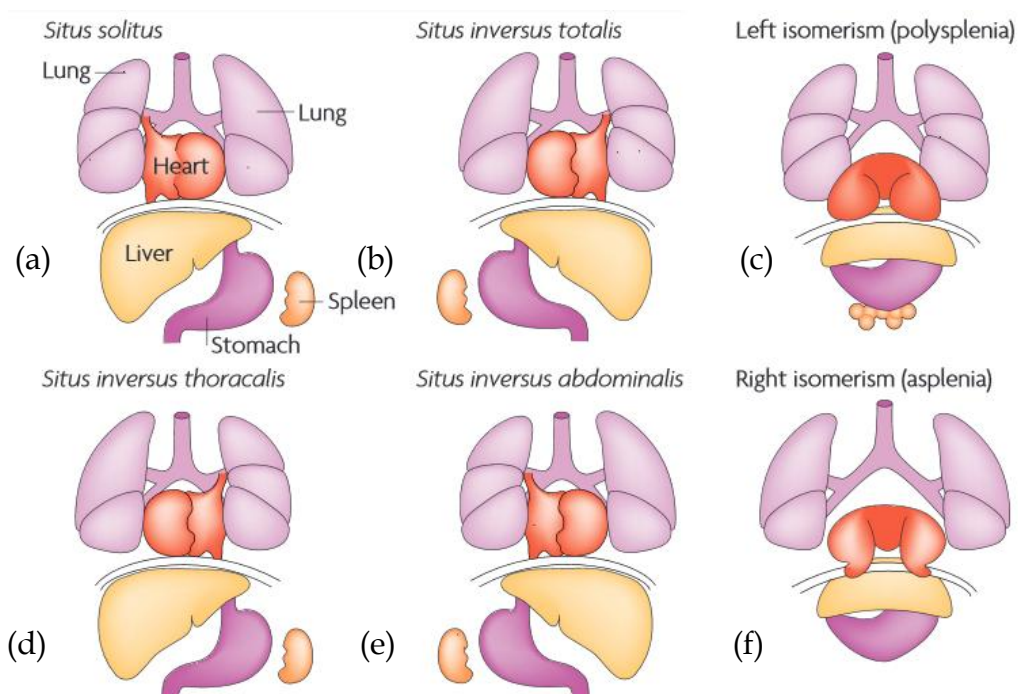


Figura 2.4 - Ilustração esquemática de (a) uma pessoa normal com assimetria esquerda-direita e (b)(c)(d)(e)(f) tipos de *situs inversus*.^[30]

Não há estágios definidos para a doença. As primeiras manifestações iniciam logo em bebé, com problemas respiratórios e tosse. Em criança têm muitas infecções. Nos jovens, as infecções são menos frequentes, no caso de terem um

² *situs inversus* - inversão da posição normal de uma ou mais vísceras.

tratamento em curso, mas nos adultos as infecções são recorrentes, pois trata-se de uma doença progressiva.

Em caso de doença, os cílios têm habitualmente um batimento com frequência (CBF) anormal. Podem estar paralisados, não existirem ou terem um padrão de batimento irregular^[7,8,11,12] .

2.3 - Monitorização e Tratamento

Não há cura definida para este tipo de doença, apenas tratamentos agressivos e realizados com base no tratamento de cada infecção manifestada no paciente^[5].

É realizada uma monitorização ao paciente ao longo do tempo, de forma a evitar infecções graves ou inesperadas.

Alguns exemplos de tipos de monitorizações para DCP são^[5]:

- Cultura de escarro ou de drenagem dos ouvidos como rotina (de 6 ou 12 meses) onde é possível identificar micro-organismos que podem provocar infecções ou já estar a provocar.

- Teste à função pulmonar (espirometria) que permite o registo de vários volumes e fluxos de ar. É um método não invasivo e indolor, basta respirar pela boca através de um tubo ligado ao computador.

- TAC para detectar bronquiectasia.

- Raios-X para detectar pneumonia.

- Broncoscopia que mostra uma perspectiva directa do interior das vias respiratórias para detectar, por exemplo, bronquiectasia, ou para desobstruir as vias.

São utilizados tratamentos existentes para outras doenças de forma a diminuir o efeito das infecções, a progressão da doença e prolongar o bem-estar do paciente^[5]:

- Depuração das vias respiratória, retira a acumulação de muco, através de fisioterapia respiratória (nas crianças é o mais comum, diariamente feito pelos pais que aprendem).

- Mucolíticos, diminui a viscosidade das secreções, de forma a ser mais fácil respirar a secreção.

- Broncodilatadores, expandem as vias respiratórias, ajudando a relaxar as paredes das vias respiratórias.

- Antibióticos, para as infecções e esteróides para as inflamações.

- Lavagem nasal, ajuda com o congestionamento do seio nasal.

- Miringotomia, uma pequena incisão feita no tímpano por meio de uma cirurgia, para aliviar a pressão causada pela acumulação excessiva de fluido. É colocado um tubo de modo a prolongar o efeito de descompressão.

Tabela 2.1 - Manifestações clínicas de discinesia ciliar primária^[21]

Pulmão	Outras doenças
<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de dificuldade respiratória, pneumonia, atelectasia (período neonatal) • Tosse crónica produtiva • Broncorreia • Episódios recorrentes de pneumonia • “Asma brônquica” grave e/ou atípica, com ausência de resposta à terapêutica convencional • Bronquiectasias • Hipocratismo digital 	<ul style="list-style-type: none"> • Cardiopatia congénita complexa • Doença poliquística renal e/ou hepática • Atresia biliar • Atresia esofágica • Refluxo gastroesofágico grave • Hidrocefalia • Retinite pigmentosa
Ouvido médio	Fertilidade
<ul style="list-style-type: none"> • Otite média serosa crónica • Hipoacusia de transmissão • Otorreia persistente após timpanostomia 	<ul style="list-style-type: none"> • Infertilidade masculina • Diminuição da fertilidade feminina e gravidez ectópica
Seios perinasais e fossas nasais	Lateralização de órgãos
<ul style="list-style-type: none"> • Rinossinusite crónica • Polipose nasal • Rinorreia mucopurulenta contínua (início no período neonatal) 	<ul style="list-style-type: none"> • Situs inversus total • Heterotaxia - isomerismo esquerdo (poliesplenia) - isomerismo direito (asplenia)

Métodos de diagnóstico de DCP

A falha no reconhecimento da DCP pode levar a tratamentos inadequados ou cirurgias desnecessárias^[12]. Verifica-se que a DCP é, frequentemente, subdiagnosticada devido à falta de um teste de triagem simples^[6].

3.1 - Formas de estudo de DCP já implementadas

Ao longo do tempo, tem existido a necessidade de rastreio para a detecção de DCP. Existem vários métodos em estudo e alguns deles já se encontram em utilização em alguns países, mas nenhum é simultaneamente fácil e fiável^[6].

Vejamos de seguida.

3.1.1 - Meios Complementares de Diagnóstico de DCP

- *Análise de Haplótipo*, um teste genético para identificar um conjunto de segmentos de DNA relacionados entre eles, utilizando um marcador. É baseado no estudo do genótipo, constituição genética do paciente, e de 60 polimorfismos de nucleótidos únicos, uma mudança numa base da sequência de DNA, de pacientes com mutações no homocigoto. Esta análise é realizada em famílias com vários elementos com histórico de DCP. Sendo assim, é mais utilizada para diagnóstico^[16,2].

- *Análise de mutações*, que é feita através do isolamento do DNA^[13]. As mutações mais prováveis que dão origem ao DCP são encontradas nos

3.1 Formas de estudo de DCP já implementadas Métodos de Diagnóstico de DCP

genes DNAH5 e DNAI1, que codificam as proteínas que compõem os braços de dineína [5,29], mas existem também mutações associadas a, pelo menos, mais de 21 genes.[29]

-Análise de cDNA da mutação 1730G>C, que é obtida após isolar o RNA de células epiteliais respiratórias[13].

- Estudo das células respiratórias epiteliais por imunofluorescência[13].

- Óxido Nítrico (NO) que é um teste não invasivo e simples, mas é necessário equipamento e conhecimento especializado. O NO é medido a partir da cavidade nasal por meio de um analisador de quimiluminescência no paciente, onde é avaliado o seu nível no ar exalado no momento [6].

- O teste da sacarina é um processo mais barato e fácil para rastreio, mas necessita de outros testes para comprovação do diagnóstico, através de escovagem nasal. Este teste consiste na colocação de sacarina no interior do nariz. Se finda uma hora e o paciente não sentir o sabor da mesma, terá que passar ao próximo teste para confirmar DCP[9]. Mas encontra-se em desuso na Europa.

- A utilização de um microscópio eletrônico de transmissão, permite observar amostras da estrutura interna dos cílios. Examina os defeitos nos microtúbulos e nos braços de dineína [5, 12].

Com base no batimento ciliar:

- No método do fotomultiplicador (*photomultiplier method*) mede-se a frequência dos cílios através da gravação do seu movimento com um microscópio de fotómetro. São gerados sinais de tensão pelo movimento dos cílios quando interrompe a passagem de luz e depois analisados num programa. É medido o intervalo de tempo correspondente a dez batimentos ao longo de cada zona ciliada e comparado com os valores considerados normais[11].

- No método do fotodíodo são analisados sinais através de um programa informático. Estes são gerados assim que o cílio em movimento passa pelo fotodíodo. Também são realizadas, normalmente, 10 medidas em cada amostra[11].

3.1 Formas de estudo de DCP já implementadas Métodos de Diagnóstico de DCP

- Uso de uma **câmara de alta velocidade** acoplada a um microscópio com objectivas de alta resolução. Este dispositivo permite obter um vídeo das células epiteliais do nariz. Posteriormente, é possível analisar o vídeo *frame a frame* e observar o movimento dos cílios^[20]. A frequência e o batimento ciliar podem ser avaliados por observação directa ou com ajuda de *software*^[10].

Para este tipo de métodos manuais de contagem dos batimentos usa-se a seguinte fórmula para se obter o valor da frequência do batimento ciliar (CBF):

$$CBF = \frac{\text{número de frames por segundo da gravação}}{\text{número de frames para 10 batimentos}} \times \text{número de medidas (Hz)}$$

Equação 3.1

O valor final do teste será a média de 10 valores obtidos. As amostras necessárias para a realização destes testes a partir de células epiteliais do nariz, são obtidas por **escovagem nasal**. Esta técnica utiliza uma escova nasal específica, que ao passar pelas paredes do nariz do paciente durante 2 a 3 segundos, arrasta consigo uma amostra de boa qualidade com um elevado número de células ciliadas intactas. Os pacientes não podem ter tido infecções nas 4 a 6 semanas anteriores à recolha^[6, 10].

3.1.2 - Softwares já desenvolvidos:

Hoje em dia, a tentativa de diagnóstico definitivo passa pela microscopia electrónica de transmissão ou videomicroscopia de alta velocidade pois são equipamentos que obtêm imagens com muito boa qualidade para análise.

- O Doutor Won-Jin Yi desenvolveu um programa que divide toda a *frame*³ em zonas de 2x2 píxeis, soma as intensidades de cada zona ao longo de todo o vídeo, realiza a transformada de Fourier associada e escolhe a frequência

³ *frame* - uma imagem de uma sequência de imagens que pode produzir um vídeo.

de maior amplitude. Com esta informação cria um mapa de frequências. Mas está limitado ao número de *frames*, 128, e não obtém a informação de toda a imagem, uma vez que trabalha com matrizes de 2x2 e soma as intensidades dos quatro píxeis. Não refere a sua linguagem de programação. [17]

- O *ciliaFA* trabalha com o ImageJ e o Microsoft Excel. Trabalha com ROI's de 40x40 píxel. De seguida guarda os valores das intensidades dos píxeis e trata a informação no Excel, realizando a transformada de Fourier. O facto de usar duas plataformas diferentes para processar os dados torna complicado para o utilizador aprender a manejar duas ferramentas. [18]

- O SAVA é um programa que não é de livre acesso, desenvolvido em LabView. Foi criado para analisar amostras de cílios dos pulmões. Trata a informação de várias e pequenas regiões de interesse da mesma forma que o *ciliaFA*. Fornece a informação sobre o vídeo, número de *frames*, tempo e outras características. Consegue também tratar o vídeo por completo e criar um mapa de frequências e amplitude. [19]

3.2 - Resultados publicados

Em relação à frequência dos cílios, para indivíduos sem patologia associada, é tipicamente de 11-16 Hz, mas pode variar com o país, ou mesmo com a região do país ou pelas condições de aquisição das imagens da amostra. Os pacientes com DCP têm, geralmente, uma frequência de batimento ciliar menor^[9].

Em doentes com DCP encontraram-se cílios:

- Imóveis ou com movimentos subtis temporários^[20];
- Rígidos, com baixa amplitude ou batimentos incompletos^[20];
- Com batimentos circulares com frequência normal ^[20];
- Com batimento de frequência menor que 11Hz ^[9,11];
- Hipercinéticos^[14].
- Inexistentes ^[20].

- Com padrão diferente do normal. Destes, foram descritos três tipos de batimentos:

* Cílio virtualmente imóvel - quando têm um movimento pouco amplo, lento e rígido. Com frequência de batimento ciliar (CBF) entre 0,8 e 2,3 Hz ^[12] (Figura 3.1a);

* Padrão de batimento dos cílios rígidos - com amplitude reduzida e movimento anormal, forte e rígido. Com CBF entre 6,0 e 9,3 Hz^[12] (Figura 3.1b);

* Batimento ciliar circular - movimento para a frente e para trás em forma de chicote, num perfil lateral. E visto de cima, um movimento grande e circular. Com CBF de 10,7 Hz ^[12](Figura 3.1c);

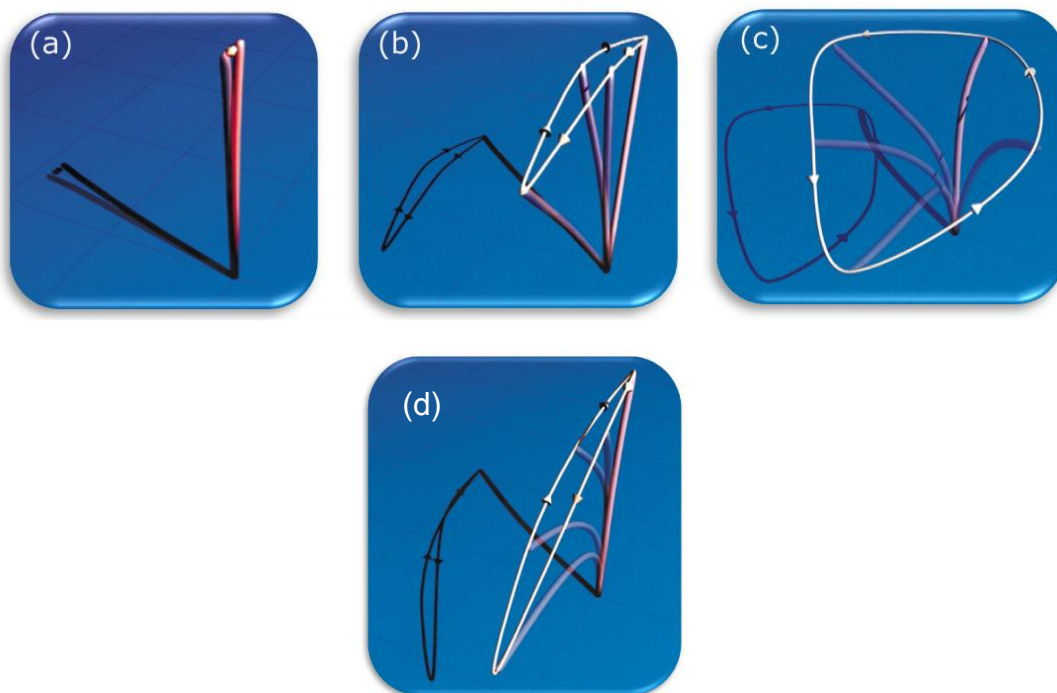


Figura 3.1- (a) Diagrama do cílio virtualmente imóvel, (b) Diagrama do padrão de batimento do cílio rígido, (c) Diagrama do batimento ciliar circular, (d) Diagrama do cílio normal^[12]



Métodos de pré-processamento

No decorrer desta dissertação é importante ter-se em conta alguns métodos de processamento de sinal e de imagem, uma vez que as amostras a serem estudadas são sequências de imagens com um determinado tempo de gravação. Logo, a componente tempo vai permitir obter um sinal que poderá ser útil no cálculo das frequências. Também poderá ser necessário um tratamento com diversos filtros para obter informação através da sequência de imagens.

4.1 - Processamento de sinal

4.1.1 - FFT

Cooley e Tukey desenvolveram um algoritmo eficiente para o cálculo da transformada de Fourier, uma vez que a transformação de sinais em tempo para frequência é uma operação computacional pesada. Este algoritmo tem o nome de FFT e considera que uma série infinita de senos e cossenos, ou exponenciais complexas podem representar um sinal no domínio do tempo e assim encontradas as suas respectivas frequências^[22].

A função FFT realizada por meio de um computador recebe um sinal em tempo discreto com número N de amostras e fornece como resultado um sinal em frequência com o mesmo número de amostras, N .

O cálculo de FFT, $X(\omega)$, é efectuado por:

$$X(\omega) = \sum_{k=-\infty}^{+\infty} x(k)e^{-j\omega k} \cong \sum_{k=N_1}^{N_2} x(k)e^{-j\omega k} \quad \text{Equação 4.1}$$

onde $N_2 - N_1$ é maior que zero e N_1 é o primeiro ponto da amostra e N_2 o último. Quanto maior esta amostra melhor a resolução, uma vez que o resultado é distribuído uniformemente entre 0 e 2π [22].

Os sinais utilizados neste trabalho serão todos puramente reais, uma vez que se tratam de valores de intensidades dos píxeis. Uma propriedade importante a ter em conta é a de simetria. Como $x(k)$ é real, a parte real da transformada apresentará os mesmo valores que a parte imaginária da transformada, mas a parte real terá simetria par e a parte imaginária simetria ímpar. Assim, será mais fácil considerar a parte imaginária da transformada de Fourier zero e usar os valores obtidos pela parte real, que obtêm sempre um representação espelhada.

4.2 -Processamento de imagem

4.2.1 - Filtro Sobel

O filtro Sobel é um filtro de realce de contornos.

No filtro Sobel o núcleo utilizado é de 3x3 para chegar ao resultado final pretendido. Utiliza uma matriz de píxeis 3x3 como se verifica na figura 4.1:

<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>
<i>g</i>	<i>h</i>	<i>i</i>

Figura 4.1 - Matriz 3x3 a ser usada para um filtro, em que cada posição é um píxel da imagem.

O valor do píxel em análise, ou seja, do píxel "e" é obtido por:

$$S = \sqrt{(c + 2f + i - a - 2d - g)^2 + (g + 2h + i - a - 2b - c)^2} \quad \text{Equação 4.2}$$

No caso de se utilizar os três canais de cores, RGB, é necessário fazer este cálculo para cada um[23].

4.2.2 - Filtro Roberts

O filtro Roberts utiliza um núcleo de 2x2 píxel, como ilustra a figura 4.2.

$f(x,y)$	$f(x+1,y)$
$f(x,y+1)$	$f(x+1,y+1)$

Figura 4.2 - Matriz 2x2 a ser usada num filtro Roberts, em que cada posição é um píxel da imagem.

aplicando a função:

$$G[f(x,y)] \cong \sqrt{[f(x,y) - f(x+1,y+1)]^2 + [f(x+1,y) - f(x,y+1)]^2}$$

Equação 4.3

após realizar uma convolução entre os núcleos apresentados na figura 4.3 e a imagem original:

0	1
-1	0

1	0
0	-1

Figura 4.3- Núcleos a aplicar na convolução com a imagem original.

Trata-se de um filtro de contornos de bordos. No caso de a imagem ter mais do que uma cor, a função tem de ser aplicada para cada canal^[23].

4.2.3 - Binarização automática - Método Otsu

A binarização é utilizada para transformar a imagem original numa imagem a preto e branco, sendo que o valor de binarização automática é calculado através de um algoritmo que utiliza o histograma da distribuição das intensidades na imagem.

Este algoritmo, após ter todos os valores distribuídos num vector, procura separar em dois grupos de forma mais homogénea possível e calcula automaticamente o valor de *threshold* (t), para a binarização.

O método Otsu divide o histograma (vector) em dois grupos e procura o valor de t , maximizando a variância inter-classe:

$$\sigma^2 = q_1(t)q_2(t)(\mu_1(t) - \mu_2(t))^2 \quad \text{Equação 4.4}$$

Seja $q_1(t)$ e $q_2(t)$ a probabilidade do grupo para os quais $i \leq t$ e $i > t$, respectivamente.

$$q_1(t) = \sum_{i=1}^t P(i) \quad \text{Equação 4.5}$$

$$q_2(t) = \sum_{i=t+1}^l P(i) \quad \text{Equação 4.6}$$

$$\mu_1(t) = \frac{\sum_{i=1}^t iP(i)}{q_1(t)} \quad \text{Equação 4.7}$$

$$\mu_2(t) = \frac{\sum_{i=t+1}^l iP(i)}{q_2(t)} \quad \text{Equação 4.8}$$

O valor t , será o valor a ser utilizado para realizar a binarização, *threshold*, todos os valores abaixo serão píxeis pretos e todos os valores acima serão píxeis brancos^[23].

4.2.4 - Filtro Mediana

Os filtros de mediana permitem reduzir o ruído das imagens sem, no entanto, esbater muito nem deslocar as arestas e contornos das mesmas. O valor mediano é aquele para o qual existem metade dos valores menores que ele e outra metade dos valores maiores. Este tipo de filtros é adaptado à remoção de ruído impulsivo.

Considera-se o valor em análise o píxel central, e será essa a posição ocupada pelo valor mediano do conjunto de 9 píxeis^[23].

5

Desenvolvimento do *software*

Foi concebido um *software* de seu nome **CiliarMove**, foi assim denominado com base nas palavras "cílio" e "movement"⁴, para estudo do movimento dos cílios.

As amostras a serem estudadas posteriormente por este programa serão obtidas através do método de escovagem nasal, sendo montadas algumas células ciliadas entre lâmina e lamela. O batimento das células ciliadas será adquirido por uma câmara de alta velocidade acoplada a um microscópio com objectivas de alta resolução. Assim, obtém-se, da amostra, um conjunto de imagens em sequência do tipo TIFF gravadas com uma determinada frequência. Estas amostras são fornecidas pelo laboratório de *cilia regulation and disease* do CEDOC@IGC.

O programa foi concebido consoante as necessidades dos futuros utilizadores do CEDOC@IGC de forma a lhes proporcionar uma redução significativa no tempo de diagnóstico e uma maior quantidade de informação possível.

5.1 - Início

Começou-se por programar no *software* ImageJ. Este *software* é utilizado no CEDOC@IGC, e assim os utilizadores mais próximos estariam mais familia-

⁴ *movement* - movimento

rizados com o programa, mas devido às suas limitações de memória e falta de controlo da mesma, optou-se pela não utilização do mesmo.

A utilização do *software* Matlab seria fundamental devido à sua facilidade de processamento de sinal, mas o tempo que demora exclui também esta hipótese.

5.2 - Linguagem de programação escolhida

Devido a uma intensa utilização de memória, como foi verificado no Matlab, para processamento das imagens, foi escolhida a **linguagem C#**. Esta linguagem permite o acesso directo à memória, o que torna o processamento mais rápido. Tem ainda outras vantagens, como a sua flexibilidade, componentes de interface gráfica com o utilizador, excepções na codificação neste caso para evitar erros durante o processamento, acesso a bibliotecas diferenciadas com funções previamente criadas, possibilidade de criar um executável final sem ser necessário um programa de base, e muitas outras ofertas de facilidade para o programador e para o utilizador final.

O programa foi compilado no *Visual Studio Express*, um programa *freeware*⁵, leve e desenvolvido pela *Microsoft*.

5.3 - Introdução ao programa e sua interface

Como as imagens obtidas pela câmara de alta velocidade são em tons de cinzento, os valores de intensidades para cada píxel associados à cor vermelha(R), verde(G) e azul(B) são iguais. Sendo assim o programa foi desenvolvido apenas utilizando um canal de RGB, para poupar memória e aumentar a velocidade de processamento.

É possível processar até pelo menos 1024 *frames*, de uma sequência de imagens. Quanto maior a sequência de imagens, melhor a resolução dos resultados, uma vez que assim ter-se-á mais informação para processar e obter melhor resultados, com mais precisão.

⁵ *freeware* - programa de livre acesso, gratuito

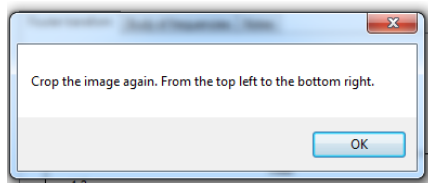


Figura 5.1 - Exemplo de um aviso de má utilização das opções do programa CiliarMove. "Corte a imagem outra vez. A partir do topo esquerdo e de seguida o canto inferior direito."

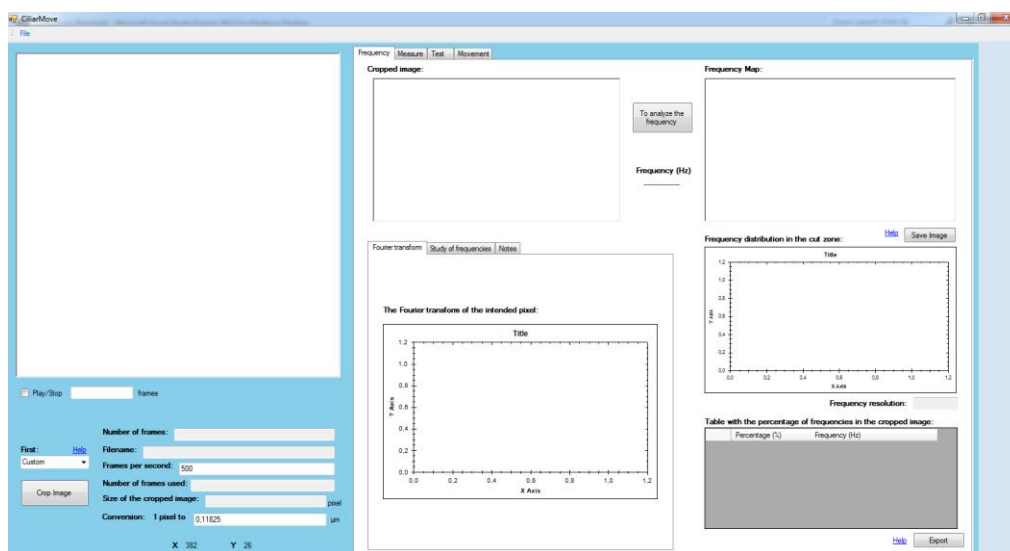


Figura 5.2 - Interface do *software* ciliarMove, quando o mesmo é ligado.

A interface do programa foi desenvolvida de forma a ser fácil de ser utilizada e intuitiva (figura 5.2). Os métodos estão separados por abas e há sempre uma zona visível com a informação e a apresentação da sequência de imagens. Sempre que o utilizador tiver uma dúvida pode clicar no botão 'help' que se encontra junto a cada botão. No caso de haver algum problema durante o processamento de dados ou má utilização por parte do utilizador, este será informado com uma *pop-up*⁶ que indica o erro (figura 5.1). Como pode-se observar na figura 5.3, após ter-se escolhido a sequência que se pretende estudar, é apresentado:

⁶ *pop-up* - janela extra que abre-se na interface

- A *frame* da sequência escolhida pelo utilizador como a primeira da sequência
- Número de *frames* da sequência escolhida
- O nome do ficheiro da amostra
- A velocidade de gravação da câmara de alta velocidade. Encontra-se pré-definida para 500 *frames/s* por ser a utilizada no laboratório em causa, mas poderá ser alterada.
- A escala de conversão de um píxel. Está pré-definida para 0,11825 μm , pela mesma razão que a velocidade de gravação, e também poderá ser alterada.

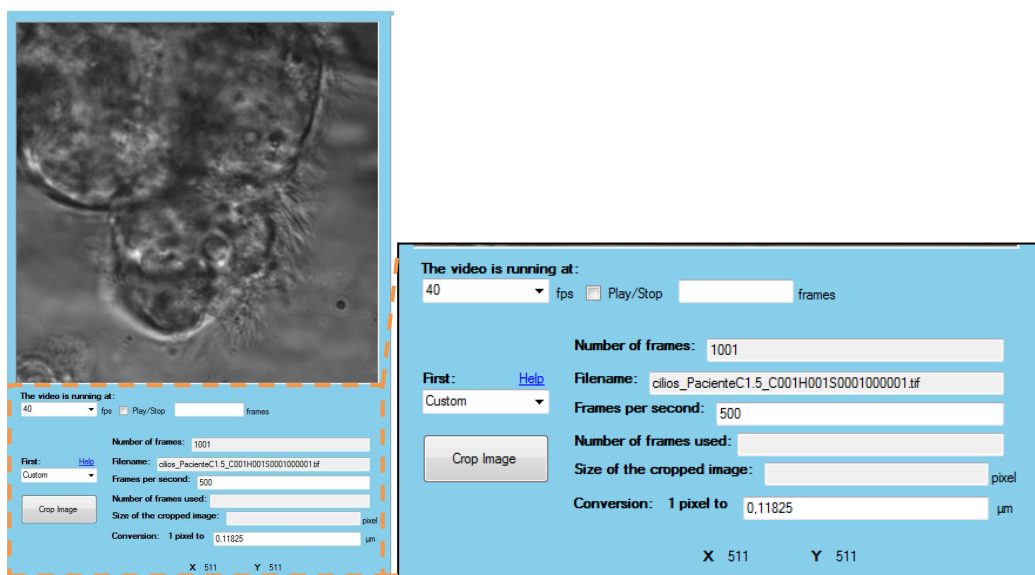


Figura 5.3 - Parte da interface permanente durante todo o estudo com a informação da amostra aberta com a imagem da primeira *frame*. Contém a hipótese de se ver a sequência de imagens a correr, saber a *frame* em que se encontra, escolher a velocidade para ver o vídeo e escolher e cortar o ROI no tamanho que se pretende. Assim que é aberta a sequência de imagens é possível ver o número de imagens que contém a amostra, o nome do ficheiro, a velocidade de gravação (pré-definido para 500fps pode ser alterada), a conversão de um píxel para micrómetros e as coordenadas do píxel quando se passa o rato por cima da imagem. *Software CiliarMove*.

Para se abrir uma sequência de imagens, basta apenas escolher a primeira *frame* da sequência. Cada imagem da sequência tem de seguir uma ordem numérica no final do seu nome. Poderá abrir imagens em PNG, BMP, JPG e TIFF.

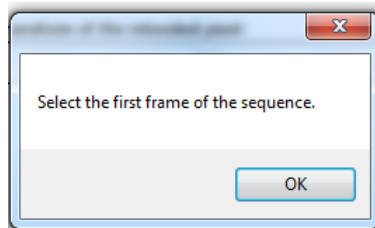


Figura 5.4 - Aviso que indica que se deve escolher a primeira *frame* da sequência sempre que se pretende abrir uma nova sequência. *Software CiliarMove*.

5.4 - Visualização do vídeo

De forma a poupar recursos ao utilizador, o programa permite visualizar a sequência de imagens em forma de vídeo na velocidade escolhida pelo mesmo : 10, 20, 30, 40 ou 50fps. Indica o número da *frame* que passa no momento e quando o utilizador pára o vídeo, indica a *frame* em que se encontra.

É possível ver e parar a visualização da sequência de imagens a qualquer momento.

5.5 - Métodos

Para realizar qualquer um dos métodos descritos a seguir é **necessário escolher uma zona de interesse (ROI)**. Este é escolhido pelo próprio utilizador de acordo com o seu interesse. Sendo assim, tem várias hipóteses:

- Personalizado, onde o utilizador escolhe o tamanho que pretende, bastando clicar na imagem da amostra no canto superior esquerdo e no canto inferior direito do ROI que pretende obter no final (figura 5.5).

- Com dimensões por defeito: 5x5, 10x10, 20x20, 30x30, 40x40, 50x50, 60x60, 70x70, 80x80, 90x90, 100x100 píxel, e obterá um ROI com as dimensões pré-definidas com apenas um clique na imagem da *frame* em demonstração, no local que pretende que seja o meio do ROI pretendido.

- "Last one⁷", que fará um ROI do mesmo tamanho realizado anteriormente (no caso de já ter feito algum) que se realiza da mesma forma que os pré-definidos, clicando uma vez na imagem que será o centro do ROI.

⁷ *Last one* - último

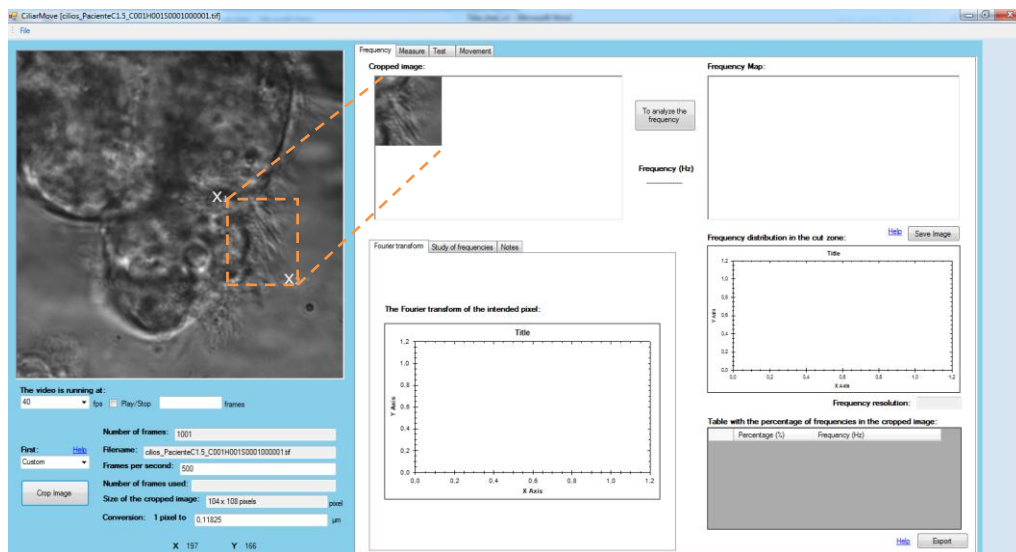


Figura 5.5 - Demonstração do corte "Custom" do ROI na imagem e o que origina. Primeiro clique em X1 e segundo clique em X2, depois de clicar no botão "Crop Image". *Software* CiliarMove.

O programa contém três métodos principais para o estudo dos cílios: análise da frequência do batimento ciliar, obtenção do comprimento do cílio e estudo da dinâmica do movimento. O primeiro método vem substituir o método manual no diagnóstico de DCP para descobrir a frequência de cílios através de visualização das *frames*. Os restantes métodos ainda não foram implementados noutros programas com este fim, tratando-se de uma novidade e também uma grande ajuda para a descoberta de novos padrões no diagnóstico.

5.5.1 - Frequência do batimento ciliar:

Este método consiste no estudo da **frequência do batimento do cílio ao longo do tempo, automaticamente**. É possível obter resultados em segundos, ao contrário do método manual utilizado.

Para se obter uma validação dos seus resultados, este método foi sempre comparado com o método manual.

A frequência é a característica mais importante para o diagnóstico de DCP. Esta pode indicar se o doente está ou não doente.

- Transformada de Fourier :

Para iniciar, guarda todos os valores das intensidades de todos os píxeis de todas as *frames* num vector. Com estes valores é calculada a FFT para cada píxel da sequência, com o auxílio de uma biblioteca, a *Aforge*. A *Aforge* é um *framework*, ou seja, é um conjunto de conceitos usados para resolver um problema agrupando código comum entre vários projectos. Para este caso foi utilizado *Aforge.Imaging* que contém múltiplas funções para processamento de imagem, uma delas a transformada de Fourier. Esta função apenas aceita valores de potência inteira de base dois, $N = 2^m$.

Para evitar a componente contínua nos resultados da FFT, antes de realizar a FFT é subtraída a média do sinal das intensidades dos píxeis. Com este passo, retira-se o valor causado no ponto zero da FFT evitando a presença de uma frequência não real. O ponto zero da FFT é apenas a média do valor do sinal a ser estudado, uma vez que:

$$X(\omega) = \sum_{k=0}^{N-1} x(k)e^{-j\omega k} \Big|_{\omega=0} \Rightarrow X(0) = \sum_{n=0}^{N-1} x(k)e^{-jk \cdot 0} = \sum_{n=0}^{N-1} x(k)$$

Equação 5.1

Assim, obtém-se, para cada píxel da sequência de imagens da amostra em estudo, um conjunto de frequências com diversas amplitudes associadas.

- Escolha da frequência:

Para decidir qual o pico a escolher do sinal obtido foram comparadas algumas contagens feitas manualmente da mesma amostra com gráficos da FFT obtidos automaticamente pelo programa. Após análise dos gráficos, a melhor frequência a ser escolhida automaticamente pelo programa seria o primeiro máximo, pois correspondia ao pico da contagem manual, na sua maioria (tabela 5.1) .

Para se ter uma incerteza associada à frequência, uma vez que se trata de um diagnóstico, utilizou-se o facto de os resultados estarem dependentes de N . Sabendo N e a velocidade de gravação ter-se-á o intervalo para dispor os resultados da frequência:

$$\text{Intervalo entre valores de frequência(Hz)} = \frac{\text{Velocidade de gravação(frame/s)}}{N(\text{frame})}$$

Equação 5.2

Assim, metade do valor obtido para "Intervalo entre valores de frequências" será a incerteza, pois tratam-se de valores discretos dispostos num histograma (Figura 5.10b).

Tabela 5.1- Comparação de valores de frequência obtidos manualmente com a frequência com maior amplitude de um píxel obtida automaticamente, para algumas amostras. (a) exemplo de uma frequência superior à normal. (b) exemplo de uma frequência associada ao movimento da amostra.

N.º Amostra	Valor da frequência obtido manualmente (Hz)	Valor da frequência máximo obtido automaticamente num píxel (Hz)
1 (Normal L7_C001S0001)	33,33 (150 frames)	34,2 ± 0,2
		34,2 ± 0,2
		68,4 ± 0,2 (a)
		34,2 ± 0,2
2 (cilios_PacienteC1.5_ C001H001S0001)	5,44 (919 frames)	4,9 ± 0,5
		4,9 ± 0,5
		6,8 ± 0,5
		4,9 ± 0,5
3 (Contro- lo1_ServiçoPCD_ cilia2_C001H001S0 001)	19,84 (252 frames)	15,7 ± 0,5
		21,5 ± 0,5
		15,7 ± 0,5 (b)
		19,5 ± 0,5

A diferença entre os valores obtidos no método automático e os obtidos no método manual devem-se à movimentação da amostra durante a gravação com determinada frequência. Frequências superiores poderão ser frequências har-

mónicas ou frequências obtidas devido à passagem de mais de um cílio pelo mesmo píxel com frequências diferentes.

A estrutura da célula pode alterar a frequência uma vez que estas contêm mais do que um cílio e não é possível isolar cada um deles de modo a que se obtenha a sua frequência específica. Como o batimento ciliar tem tendência a ter um movimento com uma frequência bem determinada e sendo o movimento dos cílios bem ordenados, um píxel poderá ter mais do que um cílio a passar num determinado tempo. Desta forma obtêm-se frequências superiores ao esperado.

- Tentativa de remoção do movimento celular:

Na tentativa de remover a frequência do movimento da célula na amostra, usou-se o *plug-in*⁸ "Align slices in stack" para o ImageJ^[24], um programa *freeware* utilizado pelo CEDOC@IGC. Este *plug-in* tenta fazer o registo de imagem, alinhando todas as *frames* com a base num ponto de referência seleccionado. Tenta encontrar um padrão de semelhanças na sequência de imagens e depois tenta colocá-lo sempre na mesma posição de forma a que a imagem não tenha um movimento não pretendido.

Esta técnica de registo de imagem não foi bem sucedida com este tipo de amostras, pois não é fácil encontrar uma zona para seleccionar que seja igual em todas as *frames* de forma a evitar o movimento da célula. Há sempre um movimento de algum organelo ou uma mudança de intensidades nos píxeis devido à gravação que não permite melhorar a qualidade da amostra.

De forma a confirmar os resultados obtidos anteriormente, recorreu-se ao Matlab e às suas bibliotecas de registo de imagem^[25]. Mas obtiveram-se os mesmos resultados. Embora as imagens fossem alinhadas não o era suficiente para diminuir o movimento da célula (figura 5.6).

Deste modo, esta técnica não foi utilizada no decorrer do trabalho.

⁸ *plug-in* - módulo de extensão de um programa

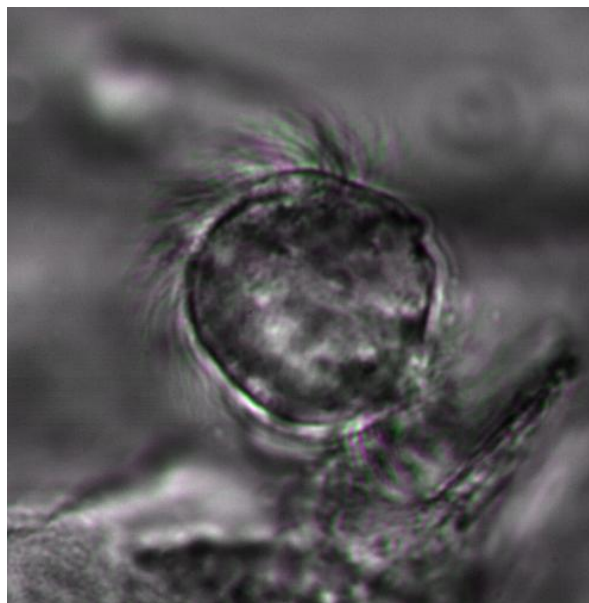


Figura 5.6 - Exemplo de uma imagem obtida em Matlab sobre a imagem original encontra-se representada a diferença, a cores de verde e rosa, entre duas *frames* após ter sido alinhada pelo método de registo de imagens. Pode-se observar que continua a existir movimento na zona celular.

- Mapa de frequências do ROI:

Após detectada a primeira frequência máxima em cada píxel é criada, logo de seguida e automaticamente, uma imagem do mesmo tamanho da ROI, onde cada píxel corresponde a uma frequência que está associada a uma cor, um mapa de frequências. O *dégradé* de cores começa no azul escuro para frequências mais baixas, passa pelo verde, amarelo e acaba no vermelho para frequências elevadas. Esta imagem pode ser guardada se o utilizador assim o pretender (figura 5.7a).

Se se passar com o rato do computador por cima desta imagem, aparecerá o valor da frequência associado ao píxel (figura 5.7b).

Em caso de dúvida em relação às frequências apresentadas, com um simples clique no píxel em questão, pode-se verificar e analisar o espectro de potência do sinal associado a esse píxel. (figura 5.8).



Figura 5.7 - Exemplo de uma representação do mapa de frequências após análise das frequências do ROI escolhido pelo utilizador no *software* CiliarMove. a) imagem obtida como mapa de frequências. O *dégradê* de cores começa no azul escuro para frequências mais baixas, passa pelo verde, amarelo e acaba no vermelho para frequências elevadas. b) Indicador de frequências quando se passa o rato sobre os píxeis do mapa de frequências.

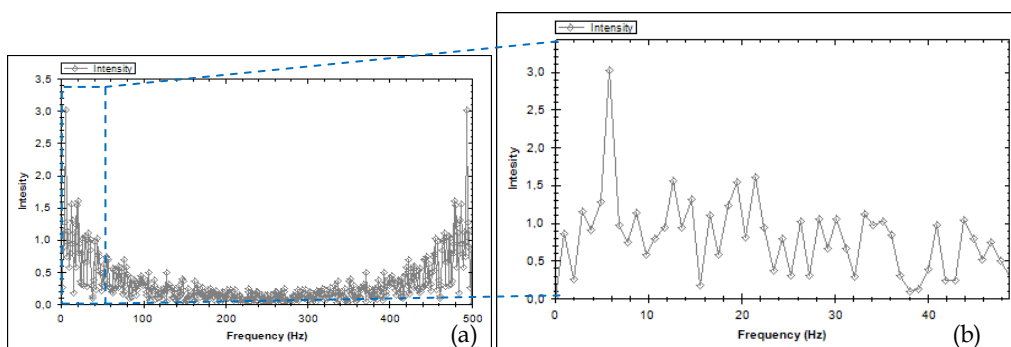


Figura 5.8 - Exemplo de um FFT associado a um píxel escolhido no mapa de frequências pelo utilizador no *software* CiliarMove. (a) FFT completa, (b) Zoom da FFT a)

- Exibição das frequências encontradas no ROI:

Quando o método termina, também é apresentado um histograma com os valores de todas as frequências encontradas no ROI, onde a amplitude corresponde à percentagem com que foi encontrada a frequência no mesmo. O histograma foi criado com o auxílio de ZedGraph^[26], um controlo para interface de C# que permite ao utilizador ampliar o gráfico, ver valores e guardá-lo. Este controlo torna mais fácil ao utilizador estudar o histograma (figura 5.10).

Para uma melhor visualização de valores pode-se ver e exportar para uma folha de cálculo uma tabela com os mesmos valores apresentados no histograma (figura 5.9).

Como a resolução da frequência varia consoante o número de *frames* utilizadas para a FFT, já que esta apenas aceita valores de potência de dois, é sempre apresentado o valor da resolução. Este será metade da distância entre duas frequências.

Table with the percentage of frequencies in the cropped image:

Percentage (%)	Frequency (Hz)
9.16	3.90625
37.26	4.8828125
4.36	5.859375
20.68	6.8359375
1.41	7.8125
0.82	8.7890625

[Help](#) [Export](#)

Figura 5.9 - Demonstração de um exemplo de uma tabela que aparece na interface do programa CiliarMove com todas as frequências encontradas após análise de frequências do ROI escolhido pelo utilizador.

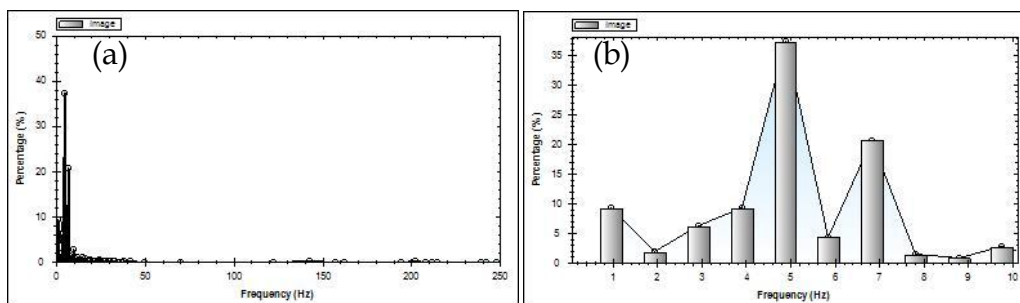


Figura 5.10 - Demonstração de um exemplo de um histograma de frequências que aparece na interface do programa CiliarMove. (a) Histograma com uma escala elevada. (b) Mesmo histograma com uma escala mais pequena, onde se pode observar todos os pontos da frequência ligados.

- Estudo das frequências obtidas:

Para auxiliar o trabalho do utilizador e, por conseguinte, o diagnóstico da doença, é fornecida a possibilidade de fazer um estudo detalhado do histograma/tabela de frequências.

Será possível, com um intervalo de frequências definido pelo utilizador (pré-definido 0 a 500 Hz, frequência pré-definida de gravação) obter uma tabela com: o número associado à amostra, o número associado ao ROI da amostra, a

média de frequências, a mediana das frequências, a moda das frequências, o desvio padrão das frequências, a frequência mínima, a frequência máxima, o intervalo de frequências escolhido, o nome do ficheiro, o tamanho do ROI escolhido e a resolução da frequência (figura 5.11).

Sempre que se pretende saber estes valores, basta clicar no botão "Study" na aba "Study of frequencies" do separador "Frequency", depois de se ter realizado a análise da frequência do ROI pretendido.

Como o utilizador pode querer estudar vários ROI's da mesma amostra, o programa conta o número de ROI's estudados e associa um número. Também é associado um número às amostras que abre, consoante é indicado pelo utilizador, quando este abre a sequência de imagens, indicando se a amostra é ou não do mesmo paciente. Se for do mesmo paciente o número na amostra será contínuo, caso contrário volta ao número 1. Com esta numeração torna-se possível analisar a mesma amostra. Poder-se-á obter a média e o desvio padrão de todos os valores obtidos na tabela de estudo das frequências. No fim da análise, ou mesmo durante a mesma, é possível apagar linhas na tabela e exportar a mesma para uma folha de cálculo de forma a guardar os valores obtidos (tabela 5.2).

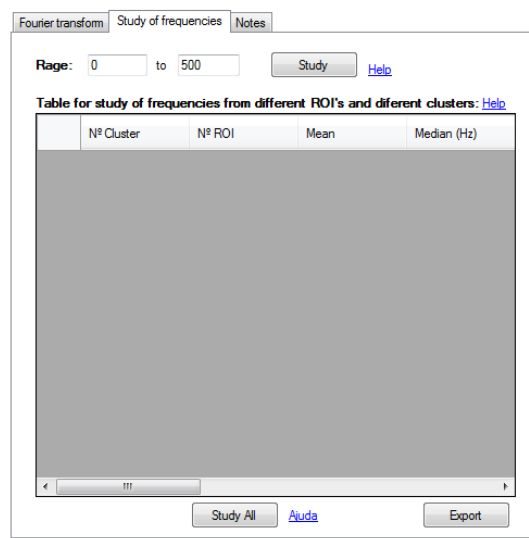


Figura 5.11 - Opção disponível na interface na parte da análise de frequências que permite ao utilizador fazer um estudo mais aprofundado do histograma ou tabela de frequências.

Tabela 5.2 - Exemplo de uma tabela obtida no fim do estudo de três amostras diferentes, com diferentes ROI's. Neste exemplo apresentam-se 2 casas decimais, pois foi posteriormente tratada, mas o programa oferece mais casas decimais, deixando ao critério do utilizador.

N° Cluster	N° ROI	Mean (Hz)	Median (Hz)	Mode (Hz)	Standard Deviation (Hz)	Min (Hz)	Max (Hz)	Range (Hz)	Filename	Size of ROI	Frequency resolution (Hz)
1	1	9,94	9,77	4,88	5,65	0,98	19,53	0 to 20	cllios_PacienteCl1.5_C001 H001S00010000001.tif	22 x 22 pixels	0,49
1	2	12,70	12,70	4,88	7,19	0,98	24,41	0 to 25	cllios_PacienteCl1.5_C001 H001S00010000001.tif	55 x 51 pixels	0,49
1	4	10,25	9,77	4,88	5,78	0,98	19,53	0 to 20	cllios_PacienteCl1.5_C001 H001S00010000001.tif	89 x 89 pixels	0,49
Mean	-	10,96	10,74	4,88	6,21	0,98	21,16				
Standard Deviation	-	1,51	1,69	0	0,85	0	2,82				
2	1	16,96	16,60	4,88	10,07	0,98	38,09	0 to 40	cllios_PacienteCl1.5_C001 H001S00010000001.tif	89 x 89 pixels	0,49
2	3	14,27	12,70	4,88	9,58	0,98	38,09	0 to 40	cllios_PacienteCl1.5_C001 H001S00010000001.tif	44 x 41 pixels	0,49
Mean	-	15,61	14,65	4,88	9,83	0,98	38,09				
Standard Deviation	-	1,90	2,76	0	0,34	0	0				
1	1	25,93	32,71	34,18	143,24	0,49	34,67	0 to 50	Normal L7_C001 S00010000001.tif	75 x 59 pixels	0,24
1	2	26,56	33,20	34,18	14,62	0,49	34,18	0 to 50	Normal L7_C001 S00010000001.tif	46 x 51 pixels	0,24
1	3	29,13	32,71	34,18	10,85	0,49	34,67	0 to 40	Normal L7_C001 S00010000001.tif	67 x 65 pixels	0,24
Mean	-	27,21	32,88	34,18	13,26	0,49	34,51				
Standard Deviation	-	1,70	0,28	0	2,09	0	0,28				

5.5.2 - Comprimento do cílio

O comprimento do cílio é uma característica do mesmo que não é muito explorada. Sabe-se que este tem um determinado comprimento e o mesmo pode influenciar o seu funcionamento. O facto de ser maior ou menor que o normal pode provocar problemas e ser um factor importante para o diagnóstico DCP. Este método poderá, por isso, trazer informações relevantes ao estudo do diagnóstico da doença em causa.

Para este método é necessário que o ROI contenha célula, cílios e fundo, para uma melhor medição dos cílios. Qualquer medida é calculada em píxeis e depois automaticamente convertida para micrómetros com o valor de conversão definido na interface.

O programa permite medir o cílio de uma forma manual ou automática. O modo automático foi sendo validado com o modo manual. Futuramente poderá ser comparado com o método *3D confocal imaging* que é utilizado no CEDOC@IGC.

5.5.2.1 - Modo manual

É uma opção simples. Basta escolher o número de vezes que pretende medir o cílio e clicar no início e no fim, ou vice-versa, do cílio, o número de vezes que se escolheu previamente.

No caso do cílio se encontrar numa posição não recta, é possível escolher o número de segmentos em que se pretende dividir o cílio. Para medir basta escolher o número de segmentos que se tenciona utilizar na medição e o número de vezes que se pretende medir o cílio. A medida é realizada da mesma forma que a anterior, mas em vez de se clicar apenas no início e no fim do cílio, clica-se o número de vezes que se achar necessário para segmentar o cílio e obter o seu comprimento.

Será apresentada uma tabela com os valores de todas as medições e a respectiva média e desvio padrão.

5.5.2.2 - Modo Automático:

É necessário, antes de realizar este método, que o ROI esteja numa determinada posição com célula, cílio e fundo, com os cílios quase alinhados com zero graus, como se verifica na figura 5.12 . Para tal ser possível, o utilizador pode rodar a imagem.

Desta forma o programa irá tentar sempre calcular o comprimento do cílio, linha a linha do ROI.

Para se chegar ao método final foram realizadas várias tentativas, para se encontrar o comprimento do cílio. Estas tentativas serão explicadas de seguida.

- Aproveitar o mapa de frequências (Resultado não favorável) :

Já que a análise de frequências nos mostra um mapa de frequências e supostamente apenas os cílios teriam movimento, com uma conversão para tons de cinzento e de seguida com uma binarização automática obtinha-se o cílio. Mas a célula também tem movimento, por efeitos da aquisição ou mesmo por influência do movimento do cílio, o que tornou impossível detectar o ponto ligação do cílio com a célula(figura 5.13c).

Tentando melhorar a imagem obtida aplicou-se um filtro de mediana de forma a tentar retirar os *outliers*⁹, mas o resultado não foi melhor, uma vez que para além de retirar os *outliers* também retirou parte dos cílios, invalidando a tentativa (figura 5.13d).

⁹ *outliers* - valor atípico; que se apresenta distante de um grupo de valores

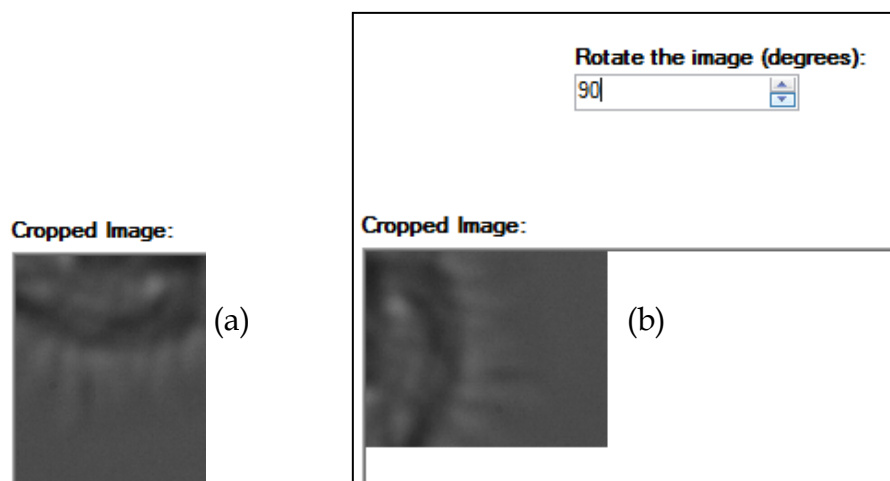


Figura 5.12 - Exemplo de como a amostra deve estar posicionada para realizar o modo automático de medição de cílio no *software* CiliarMove. (a) Posição original. (b) Posição após ter rodado 90°

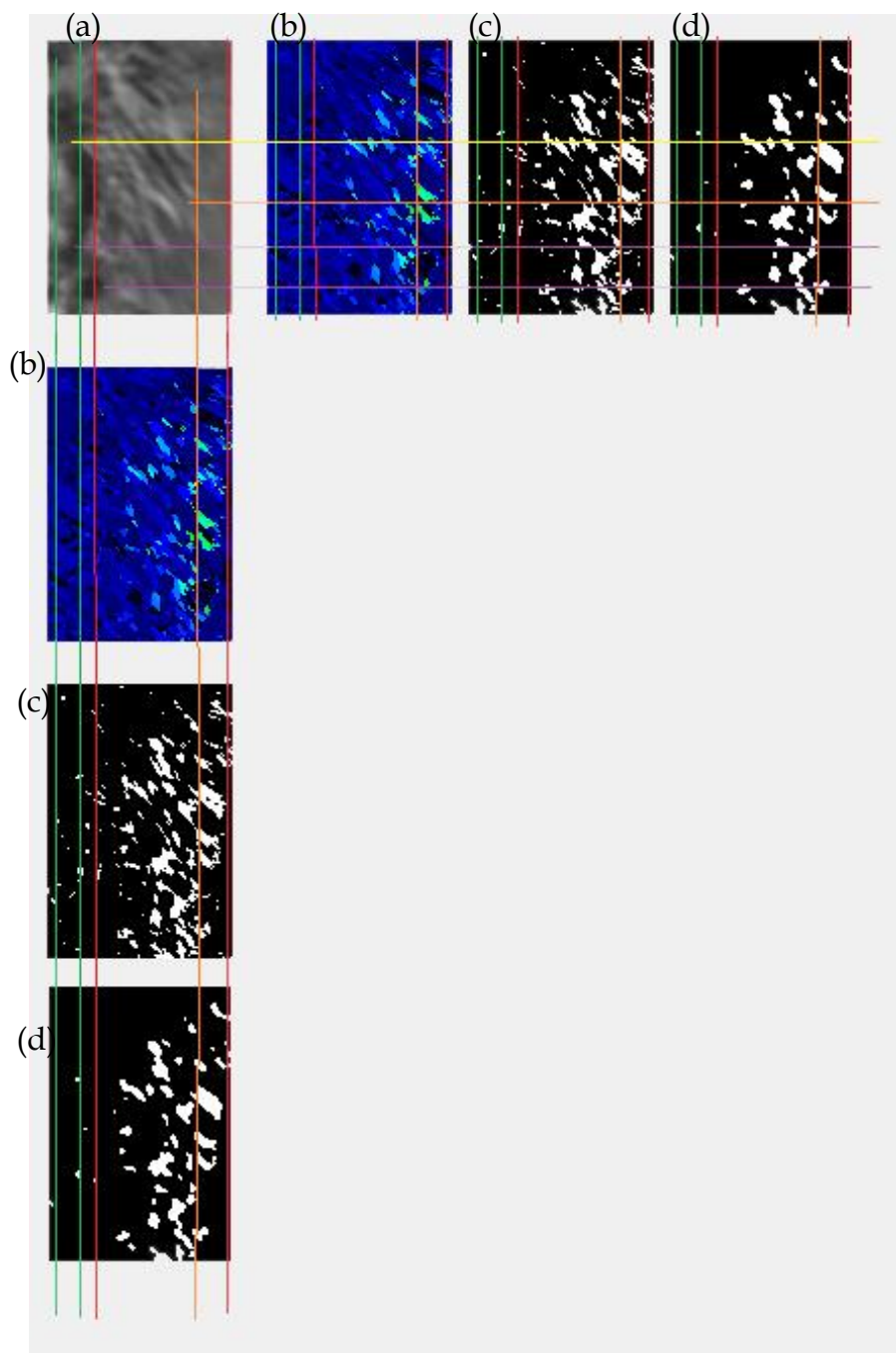


Figura 5.13 - Exemplo de uma tentativa de calcular o comprimento do cílio através do mapa de frequências obtido pelo método de análise de frequências. As linhas de diversas cores ajudaram a localizar manualmente os cílios e a célula, de forma a verificar o melhor tratamento para imagem e a descobrir os cílios automaticamente. (a) ROI de uma amostra de exemplo. (b) Mapa de frequências de ROI *a*). (c) Binarização automática de *b*). (d) Mediana de *c*) para retirar os *outliers*.

- Média da diferença de intensidades entre *frames* (Resultado não favorável):

Como a zona ciliar contém vários cílios, era de esperar que existisse uma elevada diferença de intensidades. Numa tentativa de encontrar a zona ciliar calculou-se a diferença de intensidades de *frame* para *frame* de cada píxel e de seguida calculou-se a média para cada um. Admitindo que a imagem já está na posição correcta: célula, cílio e fundo; criou-se um gráfico de várias linhas de forma a encontrar um padrão. Era de esperar uma média superior em toda a zona ciliar e uma média quase nula nas diferentes linhas das amostras, mas não foi o que se sucedeu (figura 5.14). A própria zona ciliar continha uma média diferente, dependendo se continha ou não muco na amostra.

A diferença de *frames* poderia ser negativa, sendo assim tomou-se a hipótese de calcular o módulo da diferença de intensidades. A falha foi a mesma. Não havia um padrão que indicasse o início e o fim do cílio. A figura 5.14 mostra um exemplo desta tentativa.

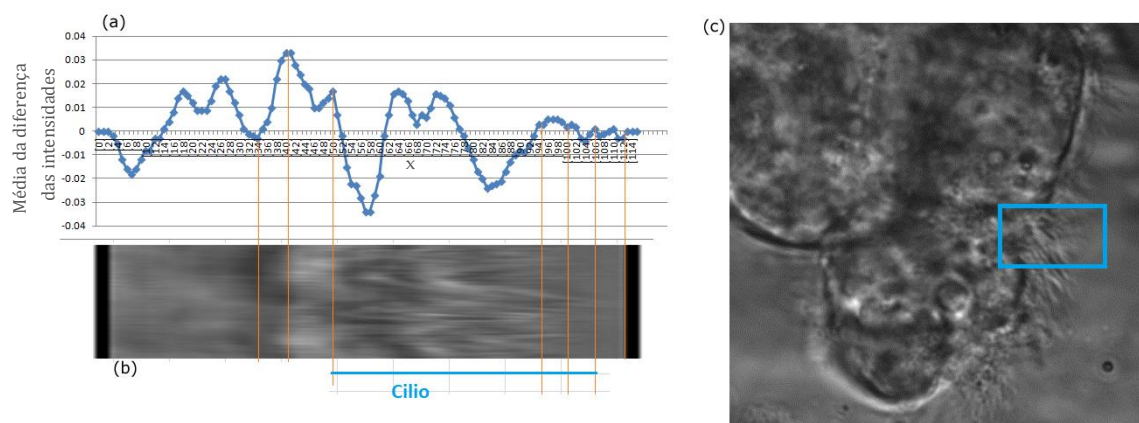


Figura 5.14 - Exemplo de aplicação da tentativa da média da diferença de intensidades para uma linha de um ROI identificado em *c*). (a) representa o gráfico em função da posição do píxel. (b) parte de um quimógrafo de uma linha do ROI, com a representação de onde se encontra o cílio.

- Desvio padrão das intensidades ao longo das *frames* (Resultado não favorável):

Seguindo a mesma lógica da hipótese anterior, como os cílios teriam maior variedade de intensidades ao longo das *frames*. Realizou-se o desvio padrão das intensidades de cada píxel. Seria de esperar um grande desvio padrão na zona

ciliar, mas por observação de gráficos criados de uma linha do ROI com os valores do desvio padrão ao longo da coluna do ROI detectou-se que por vezes o mínimo do desvio padrão aparecia na célula. Contudo, nem sempre se verificava este acontecimento e diferenciar a ponta final do cílio com o fundo era complicado, devido à existência de muco ou ao líquido da preparação se movimentar na amostra (figura 5.15).

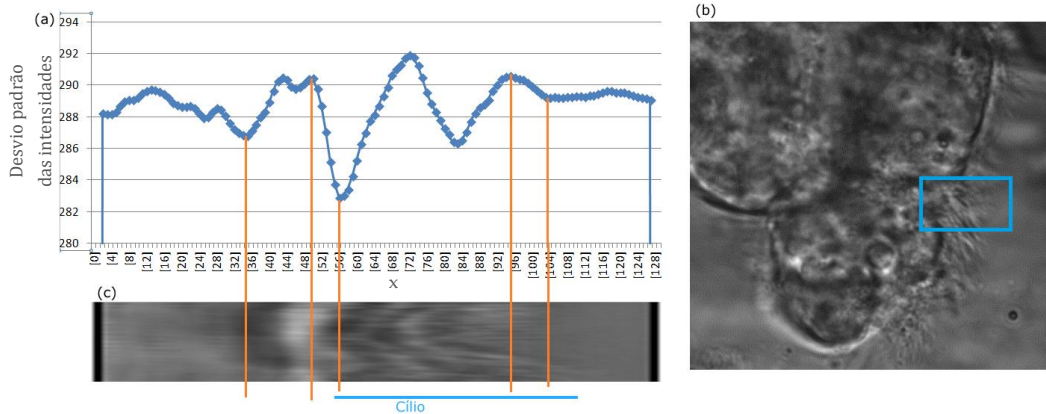


Figura 5.15 - Exemplo de aplicação da tentativa de desvio padrão das intensidades ao longo das *frames* para uma linha de um ROI identificado em *c*). (a) representa o gráfico em função da posição do píxel. (b) parte de um quimógrafo de uma linha do ROI, com a representação de onde se encontra o cílio.

- Média das frequências superiores à principal detectada:

Como já foi mencionado, os cílios poderão apresentar outras frequências superiores. Tal facto deve-se à passagem de vários cílios pelo mesmo píxel devido à existência de vários cílios na mesma zona. Mas a célula e o fundo não terão estas frequências porque estão isolados na sua zona. Assim sendo, é de esperar que as frequências superiores nos cílios tenham uma amplitude suficientemente alta que as distinga das mesmas frequências que se encontram na célula ou no fundo. Pode-se observar na figura 5.16 a diferença das amplitudes para um píxel pertencente à célula, figura 5.16(a), ao cílio, figura 5.16(b), e ao fundo, figura.16(c).

Assim, optou-se por verificar, para cada linha, o gráfico da média de todas as frequências três vezes superiores à frequência considerada fundamental de cada píxel (figura 5.16) , apenas porque é um número que se adequa à circuns-

tância. Esta frequência fundamental é encontrada da mesma forma que se encontra na análise de frequências, a maior frequência no gráfico de FFT.

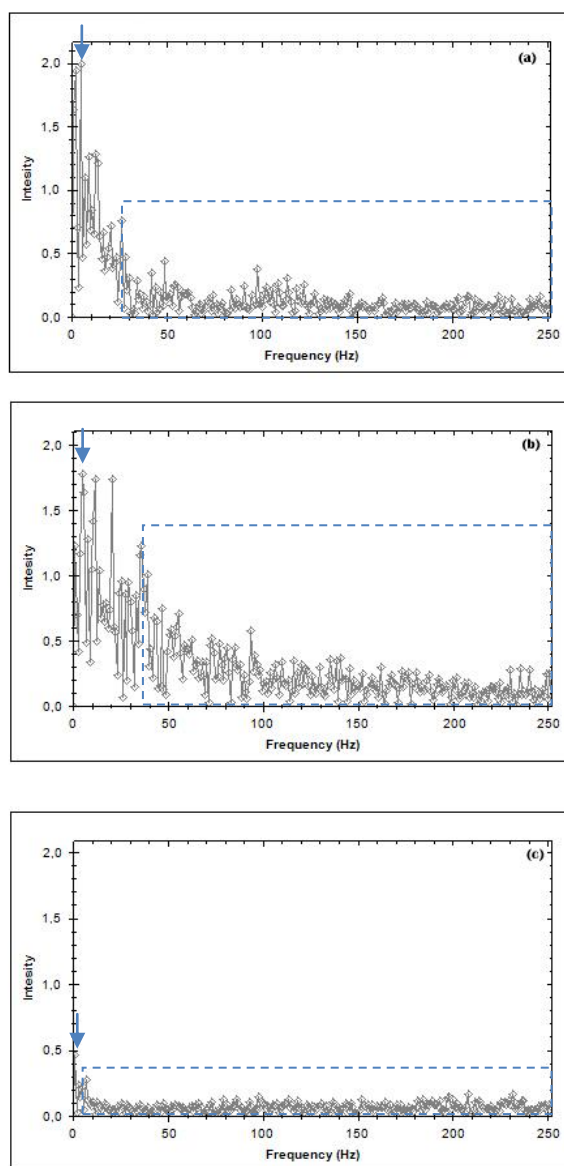


Figura 5.16 - Gráficos FFT de um píxel (a) pertencente à célula, (b) ao cílio, e (c) ao fundo, da amostra em estudo no *software* CiliarMove. As setas representam a frequência escolhida automaticamente pelo programa para associar ao píxel em estudo. As caixas a tracejado representam todas as frequências com valores três vezes superiores à frequência fundamental, que serão utilizadas para calcular o comprimento do cílio no método automático do *software*.

Com esta hipótese, observou-se que havia uma grande diferença entre o valor obtido para a zona ciliar e os valores obtidos para as zonas da célula e do fundo da amostra (figura 5.16).

Encontrou-se um padrão ao longo das linhas do ROI, a maior distância entre dois pontos com, aproximadamente, o mesmo valor será a zona ciliar (figura 5.17). Este padrão verificou-se para várias amostras, continuando a depender muito da qualidade da sequência de imagens.

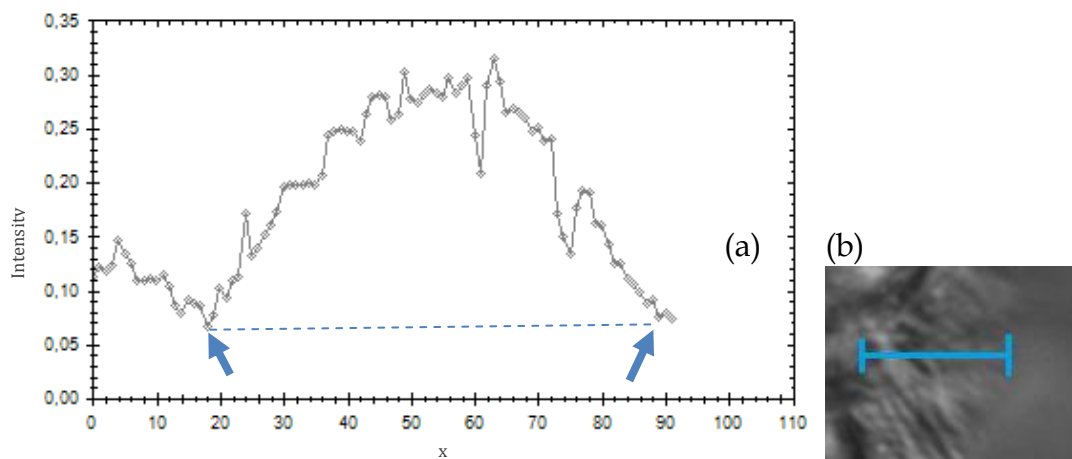


Figura 5.17 - Exemplo da aplicação de "Média das frequências superiores à principal detectada". (a) Onde se pode verificar no gráfico, o comprimento do cílio será entre o ponto 18 e 89. (b) representação do ROI medido, a azul encontra-se o ponto 18 a 89.

Para se detectar automaticamente o padrão calculou-se para cada linha do ROI a média das intensidades ao longo do tempo em cada píxel. De seguida, o algoritmo procura, na linha, a maior distância entre dois píxéis com o mesmo valor, sem conter valores menores entre eles, como está exemplificado na figura 5.17(a). Depois de realizar este processo para todas as linhas do ROI que serão estudadas, calcula-se uma média de todos os valores obtidos para cada linha deste, e este será o valor final para o comprimento do cílio medido automaticamente (figura 5.18c).

Com este padrão, para se obter um melhor resultado final, o programa faz o estudo das frequências para todos os píxeis de 80% das linhas do ROI. Não realiza para 10% da parte superior e 10% da parte inferior do ROI, para evitar que no caso de o ROI não esteja bem escolhido, que não tenha a zona da célula ou a zona do fundo para fazer os cálculos, ou devido a muitas células serem redondas e assim torna-se complicado obter um ROI perfeito com as condições pedidas.

Foi a hipótese escolhida para este método, porque obteve melhores resultados em termos de comparação com o modo manual.

Este método só é viável se no movimento dos cílios, ao longo do tempo, estes atinjam uma posição horizontal. Caso contrário, o valor calculado poderá ser menor que o esperado.

5.5.2.3 - Tabela com as medidas do cílio

Sempre que é medido o cílio, tanto no modo automático como no modo manual, tem-se numa tabela com as seguintes informações: número da amostra, número do ROI, nome do ficheiro, número de medidas feitas manualmente, a média das medidas manuais e o respectivo desvio padrão, a medida feita pelo modo manual e a conversão utilizada para o píxel.

É possível exportar esta tabela para uma folha de cálculo para ser guardada se o utilizador pretender. Assim, torna-se mais fácil para o utilizador organizar os dados obtidos (Figura 5.18d)

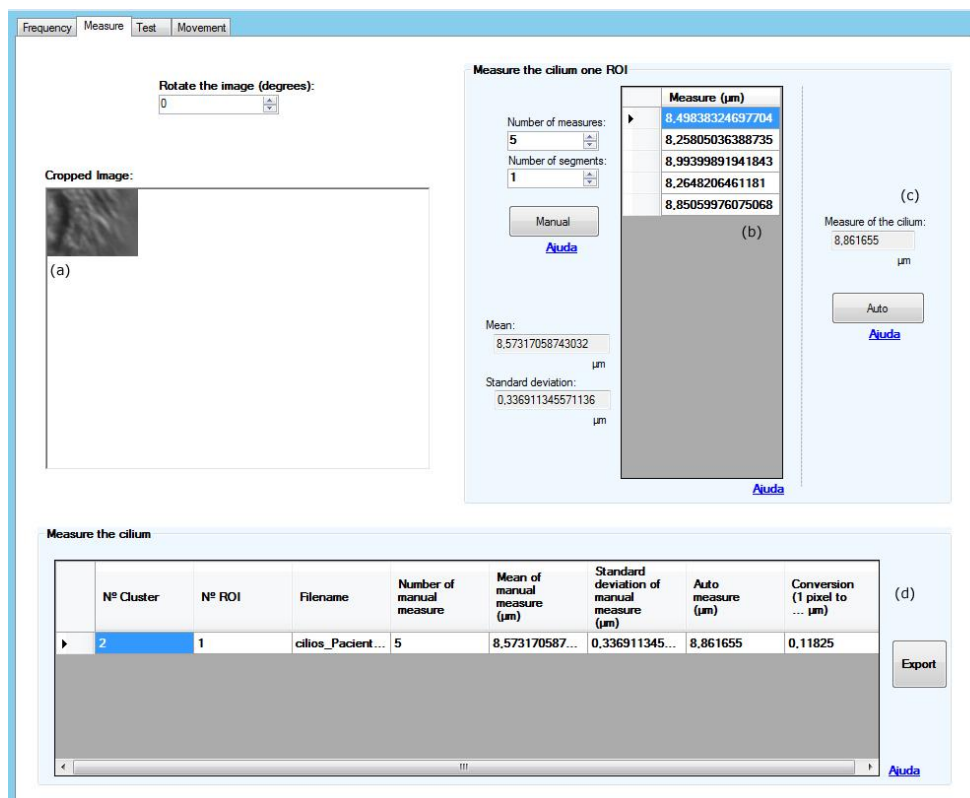


Figura 5.18 - Exemplo da utilização do método de medição do cílio. (a) ROI nas condições pretendidas célula, cílio e fundo. (b) Tabela com valores medidos no modo manual. (c) Valor obtido pelo método automático. (d) Tabela com a informação das medidas do cílio para o ROI em estudo.

5.5.3 - Dinâmica do movimento:

Sabe-se que o cílio tem um comportamento único no seu movimento, tipo chicote, e que já foi caracterizado teoricamente. Mas o movimento do conjunto dos cílios em células epiteliais nunca foi estudado como uma hipótese de ajuda no diagnóstico de DCP.

O cílio terá uma dinâmica de movimento como se pode observar na figura 5.19. Nesta figura, se se reparar nos números 5 e 19, encontra-se uma área de movimento do cílio, que poderá ser quantificada, pois os cílios de um paciente que tenha DCP terão um movimento menos fluído, logo uma área mais pequena. Ter-se-á assim uma informação adicional para um possível auxílio no diagnóstico.

Uma vez que o cílio das células epiteliais do nariz é responsável pelo transporte de muco, o seu alcance no movimento (figura 5.19, número 1-10) será importante.

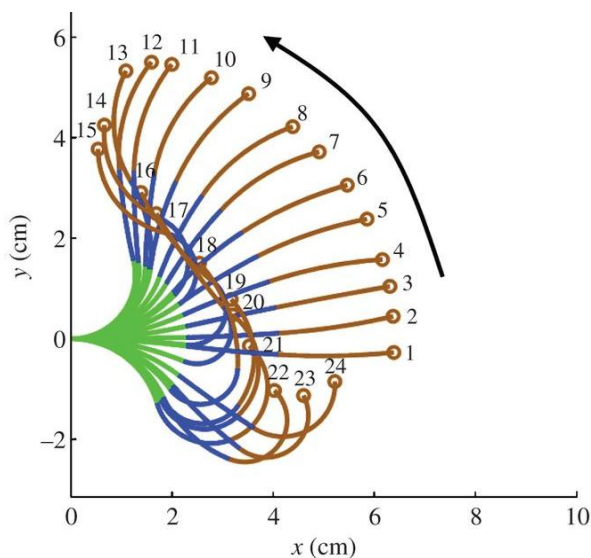


Figura 5.19 - Exemplo de uma representação do movimento de um cílio visto de lado. Os números indicam a sequência do movimento. A seta representa a direcção do muco.^[27]

Deste modo, tentou-se criar um método automático que mostre o movimento da ponta do cílio de forma a se tentar caracterizar esta actividade. Não há nenhum objectivo concreto a se alcançar, uma vez que não se sabe ao certo o que se espera, mas com este método tentou-se descobrir a dinâmica do movimento ao longo das *frames* e a dinâmica da onda de movimento de todo o conjunto de cílios. Estas hipóteses serão explicadas de seguida. Este método encontra-se em desenvolvimento.

A tentativa de registo de imagem, como já foi explicado na análise de frequência, seria a ideal para se obter melhores resultados para o estudo da dinâmica do movimento do cílio. Contudo, como já se discutiu, não melhora significativamente a sequência.

Para o melhor funcionamento do método também é necessário rodar o ROI e colocar: célula, cílio e fundo, por esta ordem da esquerda para a direita.

- Detecção da zona de movimento ao longo de todas as *frames*:

Primeiro, o programa realiza o método automático de detectar o comprimento do cílio para se ter uma noção de onde a ponta do cílio se deve localizar. Este método ajuda a poupar recursos à procura da ponta do cílio.

De seguida, aplica-se um filtro Sobel e uma binarização automática, com o apoio da *framework* Aforge, a todas as *frames* da amostra. As várias imagens ficam a preto e branco, com a zona ciliar e a célula a branco (Figura 5.20h).

Com a informação da ponta do cílio encontrada para cada linha do ROI, o programa procura o primeiro ponto branco que fica mais próximo, tanto para a esquerda como para a direita do ponto pré-definido como ponta final do cílio. Depois de encontrar os pontos nas diversas linhas marca-os com uma cor azul numa cópia do ROI da primeira *frame*, para representação de toda a amostra.

Depois de fazer este último processo para todas as *frames*, obtém-se uma zona pintada a azul que será a zona de movimento ciliar (Figura 5.20b).

Este método peca porque a aplicação do Sobel e a binarização automática, por vezes retiram parte da zona ciliar, "encolhendo" o movimento em demasia, ou mantêm ruído no fundo da amostra que pode interferir com os resultados finais.

Tentou-se obter resultados com outros dois filtros, Roberts e Gaussiano, uma vez que são detectores de bordos, mas os resultados não foram as mais favoráveis, verificando-se que o nível de ruído era maior.

- Detecção da zona de movimento de uma batida:

Para se realizar este método, o utilizador precisa de indicar qual a frequência dos cílios na amostra em estudo. Depois desta comunicação o programa calcula o número de *frames* com:

$$\text{Número de frames (frames)} = \frac{\text{Velocidade de gravação da amostra (frames/s)}}{\text{Frequência do batimento do cílio (Hz = \frac{1}{s})}}$$

Equação 5.3

e realiza todo o processo descrito anteriormente, mas apenas com o número de *frames* de uma batida e mostra uma imagem com os pontos encontrados em azul (Figura 5.20c).

- Detecção do movimento ao longo das *frames*, *frame a frame*:

Utilizando novamente o método descrito em "Detecção da zona de movimento ao longo de todas as *frames*", o programa vai guardando a *frame* com os pontos encontrados e marcados a azul numa pasta criada "Mov" na directoria da sequência de imagens. Assim, poder-se-á ver o movimento detectado em todas as *frames*, *frame a frame*.

- Detecção do limiar do movimento da ponta do cílio, de acordo com a zona de movimento:

Este método aproveita a imagem com a zona de movimento a azul criada em "Detecção da zona de movimento ao longo de todas as *frames*" e cria uma imagem igual ao ROI com apenas o último ponto a azul de cada linha. Com esta informação cria um gráfico para uma melhor visualização dos resultados (figura 5.20d,e).

- Detecção do limiar do movimento da ponta do cílio, de acordo com o comprimento do cílio:

Este método aproveita a informação obtida quando se calcula o comprimento do cílio automaticamente. Ou seja, utiliza os valores obtidos do comprimento do cílio para cada linha do ROI em estudo, obtidos através do método "Média das frequências superiores à principal detectada" (5.5.2.2). Estes valores são marcados em todas as linhas numa imagem idêntica ao do ROI. Também cria um gráfico com a informação dos valores para uma melhor visualização (Figura 5.20f,g).

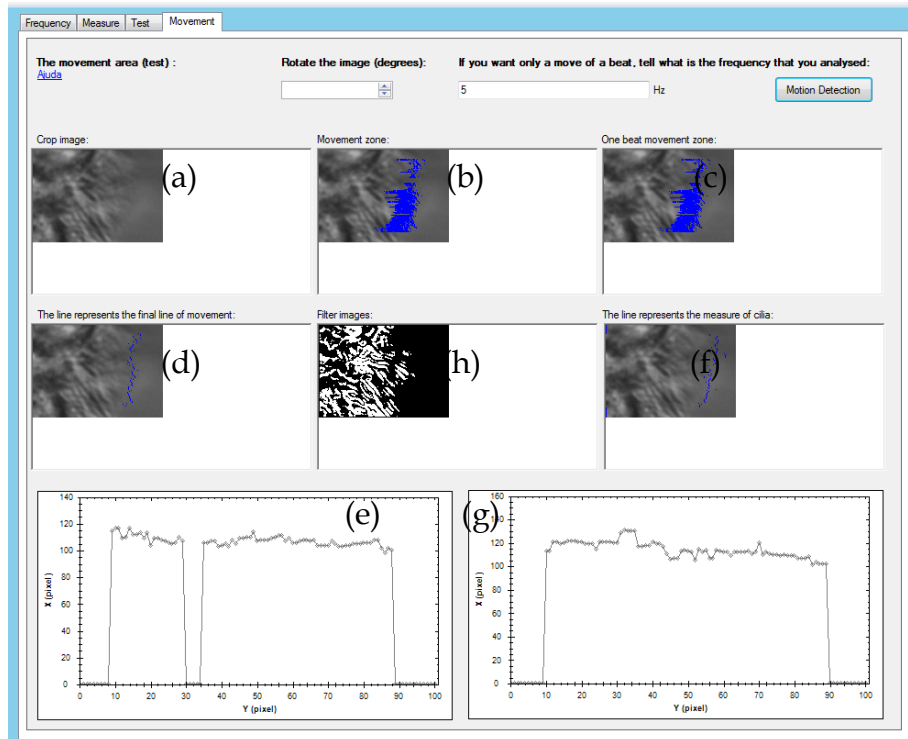


Figura 5.20 - Representa a interface do *software* CiliarMove para o método de estudo da dinâmica do movimento. (a) ROI em estudo nas condições pretendidas. (b) Demonstração da zona de movimento dos cílios para todas as *frames*. (c) Demonstração da zona de movimento dos cílios para uma batida dos cílios, de acordo com a informação dada pelo utilizador da frequência da amostra. (d,e) Representação do limiar do movimento de todas as *frames* em conjunto e sua respectiva representação em gráfico. (f,g) Representação do limiar do movimento de todas as *frames* através do método de obtenção do comprimento do cílio e sua respectiva representação em gráfico.

Na figura 5.20(e) é possível encontrar valores nulos no meio do sinal. Estes valores aparecem quando o algoritmo não consegue detectar qualquer informação referente ao cílio. Os restantes zeros nas pontas do sinal são relativos aos 20% da imagem que não são estudados no algoritmo, devido à possibilidade de não ser um ROI perfeito, como foi explicado no método: "Média das frequências superiores à principal detectada" na secção 5.5.2.2. Tal também é de notar na figura 5.20(g).

6

Características do *software*

É um **programa simples e leve** e pode ser instalado em qualquer computador com o sistema operativo *Windows Microsoft*. Em computadores com um processador relativamente bom, i5 por exemplo, é possível abrir a sequência de imagens em 8 segundos e analisar a frequência de um ROI de 275 x 165 píxeis em aproximadamente 25 segundos ou de um ROI de 50 x 50 em 3 segundos.

Uma desvantagem por parte do *Visual Studio Express* é que apenas permite a utilização de 1,5Gb da memória RAM do computador. É raro utilizar-se tais quantidades de memória, mas no caso de tal acontecer é criada uma excepção no código evitando que o programa bloqueie. Para que não aconteça esta excepção, não devem ser escolhidos ROI's muito grandes.

A interface do programa tem um tamanho de 1550x887 píxeis. No caso do ecrã ter uma resolução menor, esta adapta-se ao ecrã sendo possível navegar através de *scroll-bars*¹⁰.

Para exportar os dados do programa directamente é necessário um programa do tipo folha de cálculo, caso contrário é possível seleccionar os dados da tabela e simplesmente copiar e colar onde se pretende.

¹⁰ *scroll-bars* - Barras que se encontram, normalmente, do lado direito e na parte de baixo da interface que permite deslocar a mesma.

6.1 - Outras aplicações

O programa **CiliarMove** foi concebido com o objectivo de ajudar no diagnóstico da doença DCP analisando sequências de imagens do epitélio nasal, mas depois deste estar pronto, verificou-se que também pode ser usado para outro tipo de células ciliadas.

6.2 - Diferenças em relação a programas já existentes

Já existem pelo menos três *softwares* disponíveis para determinar a frequência do batimento dos cílios, como já foram descritos anteriormente.

Em comparação com o *software* desenvolvido durante esta dissertação, não são tão completos.

O SAVA é pago, logo não se tem tão fácil acesso ao seu conteúdo e utilização.

O CiliaFA trabalha com duas plataformas diferentes até obter o resultado final, o que o torna pouco intuitivo. Este também mostra um histograma de frequências encontradas mas para vários ROI's e a imagem que mostra as frequências é a preto e branco. O CiliarMove mostra um mapa de frequências a cores de forma a ser mais intuitivo, apenas funciona com uma plataforma para obter os resultados e permite ao utilizador escolher qualquer ROI.

O Yi et al.(2003) desenvolveu um programa que apenas processa 128 *frames* e divide a imagem em várias de 2x2 e realiza a média de todos os píxeis do seu interior perdendo informação, ao contrário do CiliarMove que consegue processar pelo menos 1024 *frames* e realiza o estudo com todos os píxeis que se encontrem dentro do ROI.



Aspectos a melhorar no *software*

Qualquer projecto de engenharia, seja de que área for, encontra-se sempre sujeito a novas características, melhoramentos ou novidades que o tornem melhor, mais actualizado e com melhor desempenho. O CiliarMove não é excepção à regra e algumas alterações e acrescentos ao programa enriquecê-lo-ão no futuro.

7.1 - Estudo do movimento da batida do cílio

Este ponto é dos que mais dúvidas suscita e ao mesmo tempo mais novidades pode trazer na área de diagnóstico de DCP. Trata-se de uma técnica inovadora e que poderá fornecer dados quantitativos no que toca à dinâmica do movimento ciliar. Num futuro próximo, pretende-se testar o seguinte procedimento: realizar um quimógrafo para várias linhas do ROI e realizar um filtro Sobel juntamente com a binarização e assim, tentar descobrir o limite do cílio. Com este limite poder-se-ia criar um gráfico com o limite descoberto para várias linhas do ROI e tentar encontrar um padrão.

Outro método para caracterização do movimento ciliar, seria conseguir detectar a ponta de vários cílios e segui-los *frame a frame*. Assim, obter-se-ia um movimento "ideal" que poderia oferecer mais informação. Para isto acontecer, estar-se-ia dependente da qualidade das imagens, que neste momento seria um factor impeditivo, logo a melhor solução seria marcar *frame a frame* manualmente e discutir o resultado obtido.

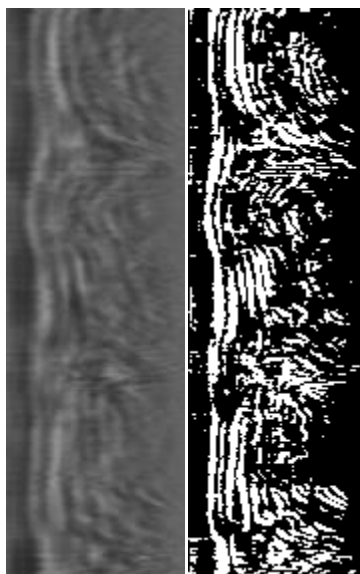


Figura 7.1 - (a) Exemplo de um quimógrafo de uma amostra ciliar. (b) Quimógrafo *a*) depois de aplicado um filtro Sobel e uma binarização automática.

7.2 - Comprimento do cílio

Realizar um segundo método para descobrir o comprimento automaticamente. Uma vez que o que existe depende da qualidade da gravação da imagem. Neste ponto, propõe-se, por exemplo, considerar a média de todos os pontos da FFT, excepto da frequência escolhida como fundamental e realizar a razão entre o pico mais alto, frequência escolhida, e a média obtida. Será um procedimento a testar.

7.3 - Aspecto geral do programa

Permitir ao utilizador realizar o *zoom* do ROI, criar um logotipo para o programa e melhorar o aspecto estético.

8

Conclusão

A investigação feita aponta para a necessidade de desenvolvimento de um programa deste tipo, de forma a responder à lacuna que existe na área de diagnóstico de DCP, nomeadamente em Portugal. Desta forma, concretizou-se um *software* para o centro de diagnóstico de DCP em Portugal.

O *software* foi programado de raiz e ao longo deste tempo foi desenvolvido com aplicação de vários métodos na sua elaboração até chegar à versão final. Estes métodos foram adicionados e testados passo a passo.

CiliarMove carece ainda de uma validação mais exaustiva. Ainda assim, o estudo analisou um número aceitável de amostras que atestam a sua credibilidade. Este já se encontra em utilização no CEDOC@IGC e com uma aceitação positiva por parte dos utilizadores, pelo menos para o uso do método de análise de frequências e para o de medição do comprimento do cílio.

O método de estudo do movimento do cílio é um método mais complicado de se elaborar uma vez que não se tem uma ideia definida do que se espera. Sabe-se o tipo de movimento do cílio sozinho e em conjunto, mas não se sabe como é o tipo de movimento quantitativamente. Para se aumentar o nível de certeza sobre os resultados elaborados vai ser necessário esperar até se obter mais amostras de pacientes e controlos para uma melhor comparação.

Este projecto não foi considerado para termos comerciais, uma vez que será uma mais valia se for *freeware*. Já foi feita uma comunicação em forma de poster. Pretende-se também que venha a ser divulgado através de um artigo em revista científica.



Bibliografia

[1] - Seeley, Stephens, Tate. **Anatomia & Fisiologia**, 6ª edição, 2003, *Luso-Ciência*

[2] - Inés Ibañez-Tallon, Svetlana Gorokhova and Nathaniel Heintz. **Loss of function of axonemal dynein Mdnah5 causes primary ciliary dyskinesia and hydrocephalus**. 2002, *Human Molecular Genetics*, Vol. 11, No. 6

[3] -Peter Satir, Søren Tvorup Christensen. **Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia**, 2007, *Annu. Rev. Physiol.* 69:377–400

[4] -S Blanchon, L Bassinet, N Beydon, A Clément, E Escudier, JF Papon, A Tamalet. **Diagnostic algorithm for Primary Ciliary Dyskinesia**, 2012, *Cilia* 1(Suppl 1):P5

[6] - T. Wodehouse, S.A. Kharitonov, I.S. Mackay, P.J. Barnes, R. Wilson, P.J. Cole. **Nasal nitric oxide measurements for the screening of primary ciliary dyskinesia**, 2003, *Eur Respir J* ; 21: 43–47

[7] - B. Thomas, A. Rutman and C. O'Callaghan. **Disrupted ciliated epithelium shows slower ciliary beat frequency and increased dyskinesia**, 2009, *Eur Respir J* ; 34: 401–404

[8] - M A Chilvers, A Rutman, C O'Callaghan. **Functional analysis of cilia and ciliated epithelial ultrastructure in healthy children and young adults**, 2003, *Thorax* ;58:333–338

[9] - A. Bush, P. Cole, M. Hariri, I. Mackay, G. Phillips, C. O'Callaghan, R. Wilson, J.O. Warner. **REVIEW: Primary ciliary dyskinesia: diagnosis and standards of care**, 1998, *Eur Respir J*; 12: 982–988

[10] - A. Barbato, T. Frischer, C.E. Kuehni, D. Snijders, I. Azevedo, G. Baktai, L. Bartoloni,

E. Eber, A. Escribano, E. Haarman, B. Hesselmar, C. Hogg, M. Jorissen, J. Lucas, K.G. Nielsen, C. O'Callaghan, H. Omran, P. Pohunek, M-P.F. Strippoli and A. Bush. **Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children**, 2009, *Eur Respir J* ; 34: 1264–1276

[11] - Mark A Chilvers, Christopher O'Callaghan. **Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods**, 2000, *Thorax* ;55:314–317

[12] - Mark A. Chilvers, Andrew Rutman, Christopher O'Callaghan. **Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia**, 2003, *Mosby*

[13] -Nada Hornef, Heike Olbrich, Judit Horvath, Maimoona A. Zariwala, Manfred Fliegau, Niki Tomas Loges, Johannes Wildhaber, Peadar G. Noone, Marcus Kennedy, Stylianos E. Antonarakis, Jean-Louis Blouin, Lucia Bartoloni, Thomas Nußslein, Peter Ahrens, Matthias Griese, Heiner Kuhl, Ralf Sudbrak, Michael R. Knowles, Richard Reinhardt, and Heymut Omran. **DNAH5 Mutations Are a Common Cause of Primary Ciliary Dyskinesia with Outer Dynein Arm Defects**. 2006, *Am J Respir Crit Care Med*, Vol 174. pp 120–126.

[14] - A. Barbato, T. Frischer, C.E. Kuehni, D. Snijders, I. Azevedo, G. Baktai, L. Bartoloni, E. Eber, A. Escribano, E. Haarman, B. Hesselmar, C. Hogg, M. Jorissen, J. Lucas, K.G. Nielsen, C. O'Callaghan, H. Omran, P. Pohunek, M-P.F. Strippoli and A. Bush. **Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children**, 2009, *Eur Respir J*; 1264–1276

[16] - Maimoona A Zariwala, Michael R Knowles, Margaret W Leigh. **Primary Ciliary Dyskinesia**, 2007, *GeneReviews*

[17] - W. J. Yi, K.S. Park, C.H. Lee, C.S. Rhee. **Correlation between ciliary beat frequency and metachronal wave disorder using image analysis method**, 2003, *Med. Biol. Eng. Comput.*; 41,481-485

[18] - Claire M Smith, Jana Djakow, Robert C Free, Petr Djakow, Rana Lonnen, Gwyneth Williams, Petr Pohunek, Robert A Hirst, Andrew J Easton, Peter W Andrew, Christopher O'Callaghan. **ciliaFA: a research tool for automated, high-throughput measurement of ciliary beat frequency using freely available software**, 2012, *Smith et al. Cilia*; 1:14

[19] - Bruce A. Ammons, Joseph H. Sisson, Sisson. **Ammons Video Analysis (SAVA) of cilia Beat Frequencies**, *Ammons Engineering*

[20] - Jana Djakow, Tamara Svobodova', Karel Hrach, Jiri Uhlík, Ondrej Cinek, Petr Pohunek. **Effectiveness of Sequencing Selected Exons of DNAH5 and DNAI1 in Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia**, 2012, *Pediatric Pulmonology* 47:864-875

[21] - Joana Fermeiro, Teresa Bandeira, Luísa Lobo, Luísa Pereira. **Discinesia ciliar primária revista: A propósito de três casos clínicos**, 2010, *Revista portuguesa de pneumologia*, 837-847

[22] - Fernando Coito, **Sebenta de análise de sinais - Análise de Fourier**, FCT-UNL.

[23] - André Mora, José Fonseca, **Sebenta de sistemas sensoriais**, FCT-UNL.

[28] - Hiroshi Hamada, Chikara Meno, Daisuke Watanabe, Yukio Saijoh, **Review: Establishment of vertebrate left-right asymmetry**, 2002, *Nature Reviews genetics* 3; 103-113

[29] - Patrick Hosie, Dominic A Fitzgerald, Adam Jaffe, Catherine S Birman, Lucy Morgan, **Review article: Primary ciliary dyskinesia: Overlooked and undertreated in children**, 2014, *Journal of Paediatrics and Child Health*

[30] - Manfred Fliegauf, Thomas Benzing, Heymut Omran, **Review: When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies**, 2007, *Nature*, Volume 8: 880-893

Sites

[5] - <http://www.pcdfoundation.org/> (acedido a 20 de Junho de 2014)

[15] - <http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/ampliaciones/7-cilio-flagelo.php>
(acedido a 21 de Janeiro de 2014)

[24] - <https://sites.google.com/site/qingzongtseng/template-matching-ij-plugin> (acedido a 24 de Maio de 2014)

[25] - <http://www.mathworks.com/discovery/image-registration.html>
(acedido a 20 de Maio de 2014)

[26] - <http://zedgraph.sourceforge.net/samples.html> (acedido a 18 de Março de 2014)

[27] - <http://royalsocietypublishing.org/content/10/78/20120666> (acedido a 1 de Outubro de 2014)



Anexo

Resumo submetido para poster na Física 2014:

NOVO SOFTWARE PARA ANÁLISE DO EPITÉLIO NASAL HUMANO

I. Vale¹, S. Lopes², C. Quintão^{1,3}

¹ Departamento de Física da , Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa

² Centro de Estudos de Doenças Crónicas, Instituto Gulbenkian de Ciência

³ Instituto de Biofísica e Engenharia Biomédica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

E-mail de contacto: i.vale@campus.fct.unl.pt

RESUMO

A discinesia ciliar primária resulta de disfunção ciliar no ser humano. É uma doença rara caracterizada por infecções respiratórias, *situs inversus* e infertilidade, que é possível estudar através da análise do comportamento dos cílios de células epiteliais do nariz.

Desenvolveu-se um programa executável em C#, que processa uma sequência de imagens de cílios em movimento, filmados com uma câmara de alta velocidade. Esta ferramenta detecta de uma forma robusta as frequências e o padrão de batimento ciliar, estima a dimensão dos cílios e faz parte de um projecto de criação de um centro de diagnóstico desta doença em Portugal.

