



Pedro Dinis Batista Azevedo

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Quantificação de Neuromelanina em Doenças Neurodegenerativas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Dra. Rita G. Nunes, Investigadora Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Co-orientador: Dra. Sofia Reimão, Médica, Assistente Hospitalar do Centro Hospitalar Lisboa Norte, EP - Hospital de Santa Maria e Assistente Convidada de Imagiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Júri:

Presidente: Dra. Carla Maria Quintão Pereira, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Dra. Patrícia Margarida Piedade Figueiredo, Professora Auxiliar, Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa

Vogal: Dra. Rita G. Nunes Investigadora Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Outubro de 2014

Pedro Dinis Batista Azevedo

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Quantificação de Neuromelanina em Doenças Neurodegenerativas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Dra. Rita G. Nunes, Investigadora Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Co-orientador: Dra. Sofia Reimão, Médica, Assistente Hospitalar do Centro Hospitalar Lisboa Norte, EP - Hospital de Santa Maria e Assistente Convidada de Imagiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Constituição do Júri

Presidente: Dra. Carla Maria Quintão Pereira, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Dra. Patrícia Margarida Piedade Figueiredo, Professora Auxiliar, Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa

Vogal: Dra. Rita G. Nunes Investigadora Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Outubro de 2014

Quantificação de Neuromelanina em Doenças Neurodegenerativas

Copyright © 2014. Todos os direitos reservados. Pedro Dinis Batista Azevedo, Faculdade de Ciências e Tecnologia e 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

A todos aqueles que ao longo destes 5 anos me ajudaram e contribuíram de alguma forma para concluir esta etapa, e a todos os que tive a oportunidade e privilégio de privar no quotidiano da vida académica.

À Professora Rita Nunes pela infinita paciência, empenho, disponibilidade, simpatia, conselhos e acima de tudo por toda a dedicação ao conhecimento e á importância de o transmitir.

À Dra. Sofia Reimão por todas as sugestões, simpatia e energia contagiante em todo o seu trabalho.

À Carolina Salgueiro, Joana Reis e Inês Ropio, por serem as mais fantásticas colegas de casa, por todas as noites de companhia e amizade.

À Andreia Serrano pelos lanches nas tardes intermináveis de trabalho, pela calma e sorriso em todas as situações.

À Ana Luísa por ter acompanhado cada momento deste desafio, por ter sido a mais incrível parceira de laboratório, trabalho e amiga que alguém pode sonhar, por todas aquelas noites em branco em que nada corria bem mas que no fim se resolviam sempre.

A todos os meus amigos de longa data com quem partilho a maior parte dos meus dias. Por todo o vosso companheirismo e alegria.

Finalmente ao meu pai, por ser o meu exemplo a seguir, à minha mãe, avós e avô por estarem sempre presentes e por me apoiarem em todos os momentos. A vocês devo tudo. Para terminar, um agradecimento especial ao meu avô Rocha por tudo o que representou e me transmitiu durante a sua vida

A doença de Parkinson (DP) é uma das patologias neurodegenerativas com maior incidência na população mundial com mais de 60 anos de idade. A sua progressão é acompanhada de uma redução acentuada da qualidade de vida dos pacientes, tornando-se vital procurar novos métodos que permitam entender os mecanismos fisiopatológicos da doença e auxiliem o seu diagnóstico em ambiente clínico.

Estudos anteriores têm demonstrado que a neuromelanina, um pigmento localizado na região da *substantia nigra pars compacta* (SN), está presente nos neurónios produtores de dopamina e nos neurónios noradrenérgicos do *locus coeruleus*, sendo a sua perda uma das principais características patológicas da DP. Sabendo que a neuromelanina possui propriedades paramagnéticas é possível identificá-la em imagens de ressonância magnética ponderadas em T1.

O objectivo deste trabalho passa pela procura de soluções para melhorar os processos de filtragem e segmentação utilizados num programa desenvolvido previamente para a segmentação desta região e assim conduzir à introdução da ferramenta em ambiente clínico. São também objectivos do trabalho o estudo da evolução temporal da área estimada da SN em grupos de doentes com DP e em voluntários saudáveis, investigar potenciais efeitos da medicação da DP na área de neuromelanina e ainda identificar eventuais alterações na concentração deste pigmento em pacientes com Tremor Essencial (TE) auxiliando o diagnóstico diferencial com a DP.

Os resultados obtidos permitiram identificar um novo processo de filtragem bastante superior ao anteriormente utilizado e otimizar o processo de segmentação. Foi ainda possível diferenciar o grupo de controlo dos doentes com DP com base nas áreas medidas para a SN. Os pacientes de TE não revelaram alterações na área da neuromelanina face ao grupo de controlo contrastando com os doentes com DP.

Concluiu-se que o protocolo de aquisição condiciona a qualidade das imagens e deve ser melhorado no futuro. A diferenciação entre doentes com DP e indivíduos saudáveis permite que a ferramenta seja relevante a nível do diagnóstico destas patologias. Foi ainda possível demonstrar que este método permite distinguir entre TE e DP, um resultado que poder ter grande relevância em futuras aplicações.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, Tremor Essencial, Qualidade de imagem, segmentação, neuromelanina

Parkinson's disease is one of the most widely spread neurodegenerative pathologies across the world. Its progress leads to an ever growing loss in life quality for the patients, making it a priority to search and find new methods that would allow a further understanding of the disease mechanisms and develop new tools for diagnosis.

Previous studies have demonstrated that neuromelanin, a pigment located on the substantia nigra pars compacta, is present in dopamine neurons whose loss is one of DP's main characteristics. Knowing that neuromelanin has paramagnetic proprieties makes it possible to detect it through T1 Magnetic Resonance imaging.

This work aims to improve the filtering and segmentation processes used in a previously developed program that measures the area of the SN, possibly leading to its introduction in the clinical setting.

It also analyses the temporal evolution of these measurements, potential effects of medication on DP patients at neuromelanin's area and changes on the concentration of the neuromelanin pigment in essential tremor patients, making it a tool for diferential diagnosis.

The results enabled the introduction of a substantially more effective filtering methodology and optimization of the segmentation process. With these changes it was possible to differentiate between control subjects and DP patients. Unlike DP patients, ET patients have shown no changes in the SN area when compared to the controls.

It can be concluded that it is possible to distinguish between DP patients and healthy subjects, although in the future it would be desirable to further optimise the acquisition protocol so as to improve image quality. There was no significant change on the SN areas with time (within a year), nor with medication. Finally, it was possible to show that this methodology enables differentiation between DP and ET patients, which is highly relevant considering its clinical applicability.

Keywords: Parkinson's Disease, Essential Tremor, Image quality, Segmentation, neuromelanin

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xv
Siglas e acrónimos	xvii
Lista de símbolos	xix
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento do tema e estado de arte	1
1.2. Estrutura da Tese	2
2. Conceitos teóricos	5
2.1. A doença de Parkinson	5
2.2. A <i>Neuromelanina</i>	7
2.3. Técnicas de Diagnóstico Actuais	8
2.4. O papel da Imagem Médica na Doença de Parkinson	8
2.5. O Tremor Essencial	10
2.6. Fundamentos de Imagem por Ressonância Magnética	10
2.7. Filtragem de ruído em imagens de RM	14
3. Análise de Imagens Sintéticas	19
3.1. Obtenção de Imagens Sintéticas da <i>SNc</i>	19
3.2. Metodologia	20
3.3. Resultados	22
3.4. Discussão de Resultados	25
4. Análise de Imagens Reais	27
4.1. Métodos e Procedimentos	27
4.1.1. Descrição da Amostra	27
4.1.2. Metodologia	29
4.1.2.1 Aquisição de imagens	29
4.1.2.2 Análise de Imagens	30
4.1.2.3 Análise estatística	33
4.2. Análise da DP	33
4.2.1. Avaliação dos métodos de filtragem em imagens reais	33
4.2.1.1 Resultados da avaliação	34

4.2.1.2	Discussão dos resultados.....	37
4.2.2.	Variações da Neuromelanina na DP	39
4.2.2.1	Comparação entre Pacientes e Controlos	39
4.2.2.2	Efeito da medicação no grupo DP denovo	41
4.2.2.3	Evolução Temporal da Área nos grupos	42
4.2.2.4	Assimetria na DP	43
4.2.2.5	Discussão de Resultados	44
4.3.	A neuromelanina e o Tremor Essencial	45
4.3.1.	Resultados	45
4.3.2.	Discussão de Resultados	46
5.	Conclusões e Perspectivas Futuras	49
	Bibliografia	51
	Anexo 1.....	55

Lista de figuras

Figura 2-1. Localização e morfologia da SN. Adaptado de[13].	5
Figura 2-2. Padrão de perda de neurónios produtores de dopamina. (Vermelho=maior perda; Azul= Menor perda).Adaptado de [5].	6
Figura 2-3. Comparação entre a <i>substantia nigra</i> de um indivíduo normal e um com DP[15].	7
Figura 2-4. Spin aleatório dos núcleos e sobre a influência de um campo magnético externo.Adaptado de [28].	11
Figura 2-5. Sequência <i>Fast Spin-echo</i> . Adaptado de[33]	13
Figura 2-6. Exemplo de Distribuição 2-D Gaussiana. $\mu = 0,0$ e $\sigma = 1$ [37].	15
Figura 3-1. Exemplos de imagens sintéticas com níveis variáveis de contraste e RSR. Do topo esquerdo para o fundo direito (Contraste, RSR): (10%,10); (30%, 30); (50%, 50); (70%,10); (90%, 30); (110%,50).	20
Figura 3-2. Da Esquerda para a direita: imagem com ruído (Contraste 10%, RSR 10), filtrada com filtros Gaussiano, “Edge-Preserving”, ANLM e PRI-NLM. Em baixo: Perfil de Intensidade segundo a linha vermelha.	22
Figura 3-3. Resultados da segmentação para a imagem referência, e imagens filtradas com o filtro Gaussiano, Edge, ANLM e PRI-NLM (da esquerda para a direita). Imagem filtrada (Contraste-10% RSR 10).	23
Figura 3-4. Gráficos de superfície para o erro relativo obtido com cada um dos filtros testados para diferentes valores de contraste e RSR.	23
Figura 3-5. Diagrama de caixa representando a performance dos filtros.	24
Figura 4-1-Posionamento dos cortes no cérebro.	29
Figura 4-2. Janela Inicial da Interface. A preto Importação de imagens (Dicom/Nifti). A vermelho -Seleccção de filtros. A verde - Variação de contraste, zoom e segmentação. A castanho - Dados do paciente.	30
Figura 4-3. Janela da segmentação. A vermelho-3 grupos de teste para processos de segmentação. Cada grupo fornece o valor da área da SN. A Verde - Ferramentas de apoio (Marcação de seed points, zoom, variação de contraste, exportar resultados). A castanho - Segmentação Manual.	31
Figura 4-4-Imagem Real da SN com zonas de alta intensidade.	32

Figura 4-5. a) e b) Segmentação da SN pelo algoritmo <i>region-growing</i> com <i>seed points</i> variáveis.	32
Figura 4-6. Imagem original com ruído e filtrada pelos diversos métodos estudados.....	34
Figura 4-7. Diagrama de caixa de cada área distribuída por filtro para o grupo de controlo.	36
Figura 4-8. Diagrama de caixa de cada área distribuída por filtro para o grupo DP denovo.	36
Figura 4-9. Diagrama de caixa de cada área distribuída por filtro para o grupo DP 2 a 5.	37
Figura 4-10. Diagrama de Caixa representando a área da SN para cada grupo.	40
Figura 4-11. Área da SN para o grupo DP denovo nas diferentes aquisições.	41
Figura 4-12. Diagrama de caixa para o grupo de controlo por data de aquisição.	43
Figura 4-13. Diagrama de caixa da área da SN para os 3 grupos	46

Lista de tabelas

Tabela 3-1. Análise Descritiva dos resultados da segmentação, sendo apresentados a média e desvio padrão (dp) do número de pixéis incluídos na SN, considerando todos os valores de contraste e RSR testados. É também apresentado o valor de referência obtido na ausência de ruído e para o valor de contraste mais alto.....	24
Tabela 4-1. Distribuição demográfica dos participantes – dp corresponde a desvio padrão	27
Tabela 4-2. Número de participantes no estudo da DP por data de aquisição.	28
Tabela 4-3. Parâmetros da sequência de aquisição Fast Spin Echo	29
Tabela 4-4. Tempo de execução dos processos de filtragem. Dados podem variar consoante o hardware. Todos os dados apresentados foram obtidos sobre as mesmas condições e no mesmo computador	34
Tabela 4-5. Área média, amplitude e valor p para todos os filtros, subdivididos pelos grupos	35
Tabela 4-6. Área média e valor p para os grupos estudados.	39
Tabela 4-7. Área média e valor p para o grupo DP denovo nas várias datas de aquisição.....	41
Tabela 4-8. Área média e valor p para cada grupo e todas as datas de aquisição.	42
Tabela 4-9- Percentagem de erro para a correlação entre a assimetria detectada clinicamente e com recurso às áreas da neuromelanina.	44
Tabela 4-10. Área média e valor p para comparação entre cada grupo de doentes e os controlos.	46

Siglas e acrónimos

ANLM	<i>Adaptative Non Local Means</i>
DP	<i>Doença de Parkinson</i>
FID	<i>Free Induction Decay</i>
FOV	<i>Field of View</i>
FSE	<i>Fast Spin Echo</i>
HSM	<i>Hospital de Santa Maria</i>
IRM	<i>Imagem por Ressonância Magnética</i>
NLM	<i>Non Local Means</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PRI-NLM	<i>Pre-Filtered Rotationally Invariant Non Local Means</i>
RF	<i>Radiofrequência</i>
RM	<i>Ressonância Magnética</i>
RSR	<i>Razão Sinal ruído</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
SN	<i>Substantia Nigra</i>
SNpc	<i>Substantia Nigra pars compacta</i>
TA	<i>Tempo de Aquisição</i>
T.E.	<i>Tempo de Eco</i>
TE	<i>Tremor Essencial</i>
TM	<i>Transferência de Magnetização</i>
TR	<i>Tempo de Repetição</i>
UKBBC	<i>United Kingdom Brain Bank Criteria</i>
UPDRS	<i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i>

Lista de símbolos

W *Frequência de Larmor*

γ *Razão giromagnética*

B_0 *Campo Magnético Externo*

M *Vector magnetização*

1. Introdução

1.1. Enquadramento do tema e estado de arte

A doença de Parkinson (DP) é actualmente uma das mais relevantes patologias neurodegenerativas, afectando cerca de 1% da população mundial acima dos 60 anos de idade[1] e reduzindo consideravelmente a qualidade de vida do doente à medida que progride. Devido ao envelhecimento da população torna-se imperativo compreender e interpretar correctamente os mecanismos fisiopatológicos da doença de forma a obter avanços a nível terapêutico e do diagnóstico clínico. O diagnóstico baseia-se actualmente em critérios clínicos, nomeadamente na observação e classificação dos sintomas de acordo com diversas escalas pré-elaboradas e na opinião do clínico[2], [3].

Os sintomas iniciais característicos da doença são motores[4], tremor em repouso, rigidez muscular e instabilidade postural, sendo que o seu aparecimento está relacionado com a perda de neurónios produtores de dopamina na *substantia nigra pars compacta* (SNc)[5]. Estes neurónios contêm um pigmento denominado neuromelanina, cujas propriedades paramagnéticas permitem a sua identificação como zona hipertensa em imagens obtidas por ressonância magnética (RM) e ponderadas em T1[6]–[8]. Esta propriedade abre a possibilidade de avaliar o aparecimento e a evolução da doença através de alterações nesta zona hipertensa, podendo estas ser quantificadas. Nos últimos anos vários estudos têm procurado avaliar a variação da área da SN nas imagens e a progressão efectiva da doença, servindo desta forma como suporte às observações clínicas [7], [9], [10] .

Uma das principais dificuldades encontradas na medição correcta destas áreas é a fraca qualidade das imagens adquiridas. Esta falta de qualidade traduz-se num elevado nível de ruído que compromete a identificação das zonas a medir e consequentemente requer a utilização de técnicas de filtragem para eliminar ou reduzir o ruído sem alterar os detalhes da imagem.

Este projecto surge no seguimento do trabalho elaborado pela Mestre Joana Ferreira[11], que consistiu na criação de um programa em ambiente Matlab com uma interface gráfica de fácil utilização para análise deste tipo de imagens de RM (Ressonância Magnética), fornecendo medições semi-automáticas da área da SN para apoio ao diagnóstico clínico. Partindo da interface já desenvolvida, o presente trabalho teve como objectivo melhorar as funcionalidades do programa já existente, tornando-o mais robusto de forma a permitir medições mais exactas, condições essenciais para a sua utilização futura. Para atingir tal objectivo, e tendo em conta que a principal limitação reside na qualidade das imagens disponíveis, foram estudados diferentes processos de filtragem. O melhor procedimento deverá resultar do mais eficaz compromisso entre remoção do ruído e preservação dos detalhes da imagem, sendo ambas as características de igual relevância para a quantificação a ser realizada.

Outro parâmetro relevante e abordado neste trabalho é o processo de segmentação[12] utilizado na medição semiautomática. O algoritmo pré-desenvolvido não funciona consistentemente em todas as imagens em que é aplicado, sendo que alterações ligeiras na intensidade das mesmas ou diferentes níveis de contraste conduzem a segmentações bastante aquém da região anatómica de interesse. Sabendo que o seu desempenho é fulcral para delinear correctamente a região de interesse na imagem procurou-se refinar o seu comportamento tendo em consideração novos processos de filtragem e afinação dos parâmetros de controlo do algoritmo em si.

Para testar e justificar as alterações efectuadas, foram realizados ensaios num conjunto de dados sintéticos e posteriormente em dados adquiridos em indivíduos saudáveis e com DP.

O conjunto de imagens reais adquiridas é também utilizado num estudo cujo o objectivo é a diferenciação entre pacientes e controlos, a investigação da evolução temporal da área da neuromelanina e o efeito da medicação nesta região em pacientes com o diagnóstico recente.

Realizou-se paralelamente ao estudo da neuromelanina na DP, um estudo adicional em pacientes com tremor essencial como avaliação de possíveis alterações a nível da SNc também nesta patologia.

1.2. Estrutura da Tese

A dissertação de Mestrado aqui apresentada é constituída por 5 capítulos.

No primeiro apresenta-se uma breve introdução aos temas e problemáticas fundamentais a abordar, sendo estes apresentados em mais detalhe no capítulo 2. São também apresentados os fundamentos teóricos para toda a argumentação e justificação para os processos experimentais empreendidos.

No capítulo 3 é explicada a criação e utilização de imagens sintéticas para testar vários filtros, sendo de seguida apresentados os resultados da segmentação destas imagens e a sua análise estatística, terminando com uma conclusão acerca deste trabalho.

No capítulo 4 são realizados todos os testes em imagens reais. Apresenta-se a metodologia que rege a interface desenvolvida e os sujeitos que participam no estudo. São novamente aplicados os filtros testados em imagens sintéticas e efectuada uma análise comparativa com esses resultados. É apresentada uma análise estatística para sustentar as conclusões sobre qual o processo de filtragem a utilizar. Segue-se a análise das variações na DP e no TE, os seus resultados e principais relações.

Finalmente no capítulo 5 apresentam-se as conclusões globais de todo o estudo, fazendo uma análise às alterações introduzidas e discutindo-se futuras aplicações da ferramenta desenvolvida.

2. Conceitos teóricos

2.1. A doença de Parkinson

A DP é um distúrbio neurodegenerativo bastante comum. Na Europa atinge cerca de 160 pessoas em cada 100000, chegando a atingir 4% da população com idade superior a 80 anos[4]. A tendência actual de envelhecimento da população mundial torna imperativo entender os mecanismos desta doença e como diagnosticá-la eficientemente para melhorar a qualidade de vida dos doentes enquanto se continua paralelamente à procura por uma cura.

A principal característica patológica da doença é a perda de neurónios produtores de dopamina da *substantia nigra* (SN), estando a sua localização e morfologia representadas na figura 2-1. A perda afecta principalmente a componente ventral da SN pars compacta, sendo que esta se localiza anteroinferiolateralmente ao núcleo rubro.

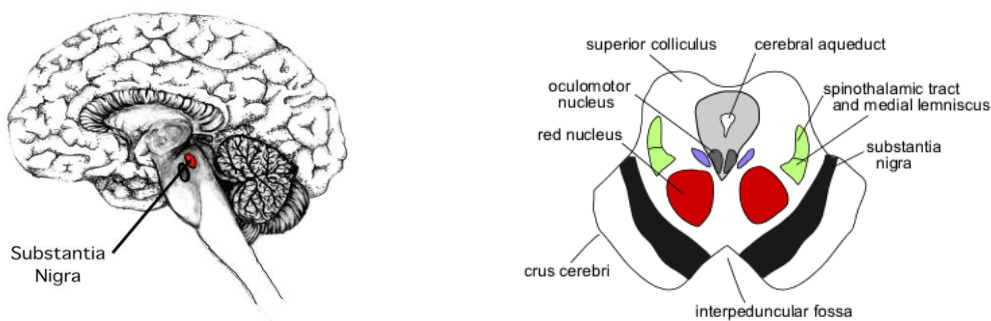


Figura 2-1. Localização e morfologia da SN. Adaptado de[13].

A SN é ainda constituída pela região *pars reticularis*[14]. Os neurónios produtores de dopamina encontram-se distribuídos na zona posteromedial da SN e contêm neuromelanina, sendo dos principais controladores da função motora do corpo.

Este processo de perda é progressivo e afecta diferentes partes do complexo da SN sendo que a perda mais severa ocorre na parte ventrolateral da SNc[5] . A figura 2-2 apresenta um mapa do padrão de perda.

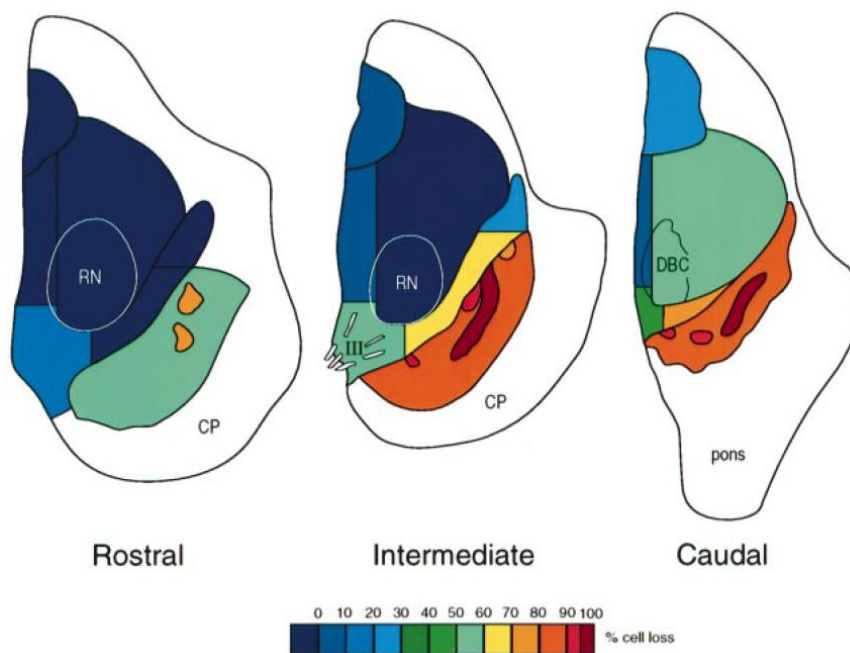


Figura 2-2. Padrão de perda de neurónios produtores de dopamina. (Vermelho=maior perda; Azul= Menor perda). Adaptado de [5].

O conhecimento destas zonas e do padrão de redução com a progressão da DP é fundamental para interpretar e diagnosticar eficazmente esta patologia. Foi demonstrado através da análise *post-mortem* de amostras do mesencéfalo que existe um padrão de redução específico para o avanço da DP[5]. Tal constatação foi possível com recurso à imunocoloração com calbindina e tirosina hidroxilase seguida de análise por dispositivos de imagem assistida por computador e tratamento estatístico. Concluiu-se então que a SNpc aparenta ser a região do mesencéfalo mais afectada pela perda de dopamina, especialmente a sua parte dorsal. Nesse mesmo estudo, o facto mais interessante foi que a redução da dopamina segue uma diminuição ordenada ao longo da duração da doença sugerindo que a SNpc é a região a ter em conta para identificar correctamente a presença da doença e o seu estágio evolutivo. Para enfatizar ainda mais a sua importância, não parece existir outra patologia que provoque este fenómeno na SNc sendo possivelmente exclusivo da DP. Pode-se observar na figura 2-3 a

diferença entre a SNc de um indivíduo com DP e um indivíduo saudável, sendo claramente visível a olho nu a perda de coloração na SN do paciente.

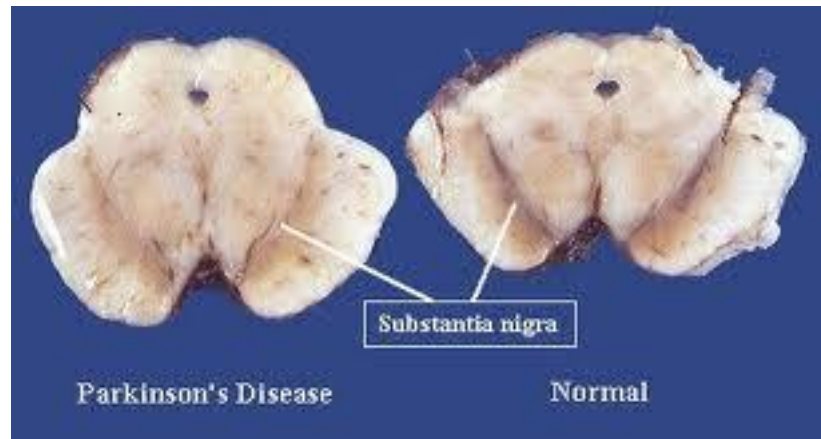


Figura 2-3. Comparação entre a *substantia nigra* de um indivíduo normal e um com DP[15].

2.2. A Neuromelanina

Focando apenas a atenção na SN por ser a zona onde se encontram as células produtoras de dopamina, sabe-se de antemão que com a perda de dopamina ocorre também a perda da neuromelanina, um pigmento negro (dá o nome à zona em que se encontra) presente nos neurónios produtores de dopamina da SN[16].

A neuromelanina é um subproduto da síntese de neurotransmissores monoamínicos e é encontrada em abundância na SN. Devido à sua capacidade quelante para o ferro é considerada como uma substância neuroprotectora do cérebro. Na DP o decréscimo da sua concentração pode conduzir a um aumento dos danos oxidativos nas células.

Estas propriedades da neuromelanina despertaram a comunidade científica para a sua relevância no processo patológico da DP e do seu uso como possível biomarcador. Para tal é necessário que se consiga observar esta região do cérebro de forma nítida para diferenciar a neuromelanina do restante tecido circundante.

2.3. Técnicas de Diagnóstico Actuais

As técnicas actuais de diagnóstico baseiam-se apenas nas manifestações clínicas da doença não havendo capacidade de corroborar estas manifestações com o processo patológico de forma prática e *in vivo* sendo o diagnóstico final feito por confirmação patológica da presença de corpos de Lewy na autópsia[1].

Sendo assim procura-se interpretar a resposta do organismo à levodopa (fármaco que permite diminuir o défice de dopamina provocado pela doença) e os sintomas motores do paciente, classificando-os de acordo com alterações previamente encontradas em doentes ao longo dos anos[4].

Para tal o clínico baseia-se em quatro sintomas que são característicos da doença: o tremor em repouso, a rigidez muscular, a bradicinesia (abrandamento na velocidade dos movimentos e tempos de reacção) e a instabilidade postural. Não é necessária a presença dos quatro simultaneamente para que o diagnóstico seja efectuado[3], [17]. Para além dos sintomas motores, a DP caracteriza-se por um grande número de sintomas não motores, salientando-se a alteração do olfacto, as alterações cognitivas ou a alteração dos padrões de sono[4].

Existem várias escalas de classificação para avaliar o grau das alterações motoras, mas a maioria não foi suficientemente avaliada e testada para ser fiável[3].

A escala UPDRS (*Unified Parkinson Disease Rating Scale*)[2] é a escala com mais credibilidade para avaliar o grau de debilitação[4]. Estudos com esta escala revelam que a progressão da doença não é linear ao longo do tempo, sendo a taxa de deterioração variável e mais rápida na fase inicial da doença e em doentes com instabilidade postural.

2.4. O papel da Imagem Médica na Doença de Parkinson

A DP resulta de uma degeneração da SN e uma deficiência na produção de dopamina. A imagem médica apresenta-se como uma área com ferramentas que podem estudar de forma não invasiva os vários estádios da doença.

As técnicas de PET(*Positron Emission Tomography*) e SPECT(*Single-photon Emission Computed Tomography*) fornecem medições das alterações na distribuição e produção da dopamina a nível pré-sináptico em doentes com sintomas ou pré-sintomáticos na DP. Estas medições permitem a correlação entre as deficiências da dopamina com a bradicinesia e a rigidez muscular fornecendo possíveis biomarcadores de imagem (medidas derivadas de imagens que reflectem a presença de doenças) para monitorizar a progressão da doença. Por este motivo os estudos têm-se focado principalmente no desenvolvimento de biomarcadores detectáveis em PET/SPECT por alterações no metabolismo sendo que estas técnicas envolvem custos elevados comprometendo assim a sua viabilidade para uma aplicação em grande

escala[6]. Para além destas limitações técnicas é importante ter em conta que ambas as técnicas utilizam radioisótopos e o seu decaimento radioactivo dentro do corpo, sendo que a emissão de radiação ionizante pode provocar danos no organismo a longo prazo devido aos seus efeitos cumulativos[18].

Estas técnicas devem portanto ser recursos usados com cautela e moderação e nunca para diagnóstico regular.

O projecto proposto aborda a possibilidade de encontrar ferramentas de diagnóstico da DP baseadas no fenómeno da ressonância magnética, sendo que este tem sido alvo de grandes progressos tecnológicos ao longo dos anos.

Os avanços nos detalhes da imagem funcional e estrutural a nível cerebral apresentam-se como melhorias que tornam possível detectar alterações provocadas pela DP e até distingui-las das restantes síndromes parkinsonianas. A IRM (Imagem por Ressonância Magnética) consegue hoje em dia identificar vários candidatos a biomarcadores da DP, seguindo os traços neuropatológicos da doença nos seus estádios iniciais[19].

Alguns destes biomarcadores conseguem detectar alterações em diferentes níveis do sistema nervoso central incluindo a SN.

Esta diferenciação é possível pelo facto de a neuromelanina apresentar propriedades paramagnéticas o que conduz à redução do tempo de relaxação T1, tornando a imagem na zona da *substantia nigra* ligeiramente mais hipertensa[20].

A utilização de sequências de aquisição de IRM ponderadas em T1 com TE reduzido em campos de 3 T permitiram a visualização da zona da SNc como estrutura hipertensa quando comparada com o restante tecido cerebral[20]. Realizar estes estudos em RM a 3T permite aumentar a resolução espacial, a razão sinal/ruído, sendo que o tempo de relaxação T1 é também mais longo do que em 1.5T o que contribui para um melhor contraste em relação aos tecidos circundantes. Estudos iniciais demonstraram que a hiperintensidade desta área depende da concentração de neuromelanina na DP, sendo que a progressiva redução de neuromelanina se reflecte de forma perceptível nas imagens [8]. Esta expectável correlação entre as imagens sensíveis à neuromelanina e a sua alteração durante a DP tem sido alvo de vários estudos [7], [10], [11], [20], [21]. Sendo o objectivo dos mesmos verificar até que ponto se podem diferenciar os estádios da doença com medições da área e volume da SN. São também investigadas alterações que auxiliem o diagnóstico clínico, permitindo a antecipação do processo de medicação.

Como ponto de partida para este trabalho é importante referir o estudo[11] já efectuado pela Mestre Joana Lobato Ferreira do qual surgiu uma interface computacional que permite o cálculo da área da neuromelanina com recurso a um algoritmo *region-growing* e com aplicação prévia de um filtro cujas características permitem reduzir parcialmente o ruído inerente ao tipo de aquisição efectuada. Neste estudo pretende-se atenuar a perda de definição das margens entre regiões, sendo este um efeito resultante da aplicação do filtro inicialmente escolhido para redução do ruído com o intuito de facilitar a aplicação do algoritmo de segmentação. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram a sua validade para detectar as diferenças no pigmento da neuromelanina e distinguir grupos de controlo saudável e doentes com DP.

2.5. O Tremor Essencial

O tremor essencial (TE) é o mais comum de entre os tremores patológicos. Pensa-se que pode abranger cerca de 20 vezes mais indivíduos do que a DP, estimando-se que afecte cerca de 9% da população mundial acima dos 60 anos de idade[22] .

A característica marcante desta patologia é o tremor com frequência entre 8-12 Hz que ocorre maioritariamente nos braços durante movimentos voluntários[23].

Nos últimos anos vários estudos intensivos permitiram identificar dois tipos de TE[24]–[26]. O tipo mais comum (afectando cerca de 75% dos pacientes) é caracterizado por degeneração no cerebelo e redução no número de células Purnkinje. O segundo tipo envolve a presença de corpos de Lewy confinados ao *locus coeruleus*.

A patologia apresenta diversas disfunções motoras apesar de o tremor nos braços ser o seu sintoma mais reconhecido, podendo existir tremor na cabeça, na voz, instabilidade postural e movimentos subtis dos olhos[27].

Recentemente foram identificadas alterações não motoras como disfunção cognitiva ou até sintomas de doença psiquiátrica como a demência. Por estes motivos a doença deve ser encarada como uma síndrome neuropsiquiátrica cujos sintomas motores e não motores acompanham o característico tremor[22].

A doença pode ser controlada com medicamentos como antiepiléticos, reduzindo o efeito dos sintomas mas não existe ainda uma cura para os mecanismos que os provocam [27]. O seu diagnóstico é puramente clínico, baseado no historial médico e em casos atípicos com recurso a análises laboratoriais e imagens cerebrais.

2.6. Fundamentos de Imagem por Ressonância Magnética

Partindo da física nuclear podemos explicar a obtenção de imagens por ressonância magnética analisando o comportamento dos spins nucleares nos tecidos a estudar[28].

Núcleos com spins diferentes de zero adquirem valores distintos de energia se estiverem na presença de um campo magnético. Considerando um spin como um momento magnético que sofre precessão em torno de um eixo imaginário e olhando apenas para núcleos com spins $\pm 1/2$ podemos afirmar que o seu movimento oscilatório em torno do eixo é aleatório (figura 2-44) e como tal a sua magnetização total é nula. Mas ao aplicar um campo magnético sobre estes núcleos, os spins distribuem-se na direcção desse mesmo campo, sendo que de acordo com as leis da física ocuparão primeiro o estado de energia mais baixa e só depois o de

energia mais alta. Por este motivo a magnetização total dos spins terá a direcção do campo aplicado, deixando de ser nula. Tendo em conta estas propriedades, é usual escolher como núcleo a utilizar na ressonância magnética o hidrogénio pois cumpre os requisitos de spin e existe em grande abundância nos tecidos do corpo humano.

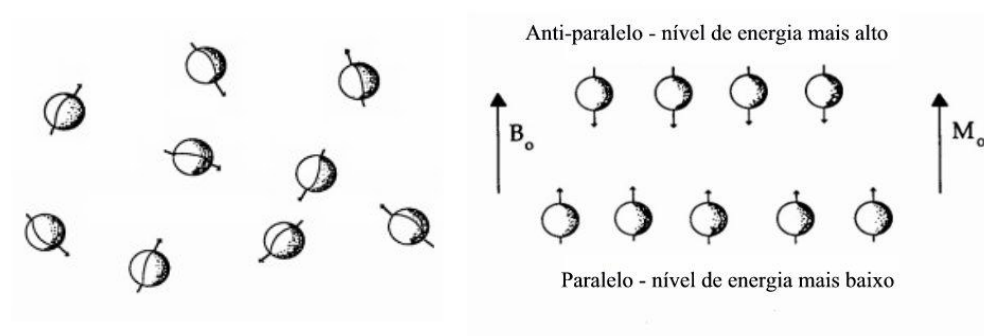


Figura 2-4. Spin aleatório dos núcleos e sobre a influência de um campo magnético externo. Adaptado de [28].

A frequência à qual os núcleos giram devido ao fenómeno da precessão pode ser descrita por uma equação em que a frequência de precessão ou frequência de Larmor é proporcional à constante giromagnética e à amplitude do campo magnético externo B_0 [29].

$$W = \gamma \times B_0 \quad (\text{Equação 2-1})$$

Esta frequência encontra-se na gama das radiofrequências (RF), logo ao expormos os núcleos a uma fonte de RF externa iremos interferir com a sua oscilação podendo originar o fenómeno da ressonância que pretendemos analisar. Ao aplicar um impulso de RF provoca-se a mudança de direcção da magnetização total, conferindo-lhe uma componente transversal.

Ao alterarmos a amplitude e a duração dos impulsos obtemos diferentes efeitos nos núcleos. Os mais utilizados são os impulsos de 90° e 180° .

Após os impulsos, os spins tendem a voltar ao seu estado de alinhamento inicial (estado de equilíbrio), ou seja os spins libertam a energia absorvida regressando ao seu estado mais estável e a uma magnetização total longitudinal (de acordo com B_0). Analisando a desfasagem dos spins, podemos inferir que a frequência de precessão de cada spin é ligeiramente diferente ou os spins nunca deixariam de estar em fase. Tal acontece porque o campo magnético externo não é totalmente uniforme e existe alguma interacção entre os próprios spins dos tecidos. Como consequência o sinal medido após o impulso de RF decai com o tempo, dando origem a um sinal denominado FID (*Free Induction Decay*). O decaimento do sinal pode ser ajustado a uma curva exponencial o que permite a sua caracterização por

uma constante de tempo. No caso chamamos a esta constante $T2^*$ sendo o tempo necessário para que o valor da magnetização transversal decaia até 37% do seu valor inicial. Para remover o efeito das heterogeneidades do campo podemos partir do princípio que estas são constantes no tempo e ao aplicarmos um impulso de 180° algum tempo após um impulso inicial de 90° invertemos a fase dos spins. Este processo permite reagrupar os spins e aumentar novamente a magnetização transversal, criando um eco do FID inicial, designamos esta sequência de impulsos por *spin-echo*.

Um outro processo de relaxação importante envolve a troca de energia entre o tecido e o meio envolvente. Este processo caracteriza o retorno da magnetização à sua componente longitudinal máxima após qualquer impulso RF, envolve também cedências energéticas que são descritas por uma constante temporal que designamos por $T1$ e que representa o tempo que a magnetização longitudinal leva a retomar 63% do seu valor de equilíbrio (após a aplicação de um impulso de 90°). Este parâmetro permite também inferir sobre o tecido em estudo pois o tempo $T1$ varia com a estrutura do mesmo.

A intensidade do sinal em RM após a aplicação de um impulso de excitação, podemos afirmar que este é proporcional à densidade de núcleos de hidrogénio nos tecidos, dependendo de $T2$ pela expressão

$$M_{xy} = m_0 e^{-\left(\frac{t}{T2}\right)} \quad \text{(Equação 2-2)}$$

e de $T1$ por

$$M_z = m_0 \left(1 - e^{-\left(\frac{t}{T1}\right)}\right) \quad \text{(Equação 2-3)}$$

Nestas equações o parâmetro m_0 refere-se ao valor máximo da magnetização longitudinal se tiver sido aplicado um impulso RF de 90° [30].

TE (Tempo de Eco) é o tempo entre a aplicação do impulso de excitação e o eco. TR (Tempo de repetição) é o tempo entre dois impulsos de excitação. Para obter imagens ponderadas em $T1$, $T2$ ou densidade protónica alteramos TE e TR consoante o tecido que se pretende enfatizar.

Para imagens ponderadas em $T1$ utilizam-se TE e TR curtos e para imagens ponderadas em $T2$ ambos (TR e TE) devem ser longos.

Para contraste em $T1$ aparecem como áreas hipertensas tecidos como a gordura, hemorragias e a melanina.

Neoplasmas, edemas, inflamações e o líquido encéfalo-raquidiano aparecem como áreas hipotensas. Verifica-se o contrário em imagens ponderadas em $T2$.

Um passo fundamental para obter imagens em RM prende-se com a localização espacial dos sinais medidos. Para tal torna-se a intensidade do campo magnético variável no espaço. Para conseguir tal efeito sobrepõem-se ao campo estático uma série de campos com gradientes lineares nas direcções x, y e z. Este processo permite escolher o corte e a posição do sinal a codificar, visto que ao introduzir estas variações no campo magnético estamos a

alterar ligeiramente a frequência de precessão dos spins na direcção escolhida. A ponderação para cada frequência espacial é guardada no espaço k.

Para assegurar o preenchimento deste espaço de forma eficiente existe uma grande variedade de sequências de impulsos RF e gradientes de campo que permitem obter imagens de RM dos mais variados tecidos alterando a ponderação das mesmas (dependendo dos parâmetros utilizados nas sequências e das constantes T1 e T2 dos tecidos).

O desenho de uma sequência consiste de componentes indispensáveis ao fenómeno da ressonância e de componentes variáveis consoante o tecido ou as características que se pretendem realçar na imagem[31], [32].

Para qualquer sequência os seus componentes básicos são:

- Um impulso de RF excitatório para induzir o fenómeno da RM
- Gradientes de campo magnético para codificação espacial
- Uma combinação de ecos de sinal para definir a ponderação da imagem segundo os tempos de relaxação.

O utilizador controla os parâmetros (TR,TE, *flip angle*, FOV(*Field of View*), entre outros) de forma a obter o melhor compromisso entre contraste, resolução espacial e velocidade de aquisição para a imagem que pretende[29].

Para este trabalho é essencial abordar a sequência *Fast Spin Echo* (FSE) (figura 2-5) utilizada para obter imagens com bom contraste da região SNC.

Nesta sequência o intervalo de tempo que se segue ao primeiro eco é utilizado para preencher as linhas do espaço k para o corte seleccionado pelo impulso de 90°. O facto de serem necessárias menos repetições (TR) permite preencher mais rapidamente o espaço e reduzir o tempo de aquisição. O número de ecos medido durante um TR é chamado factor turbo.

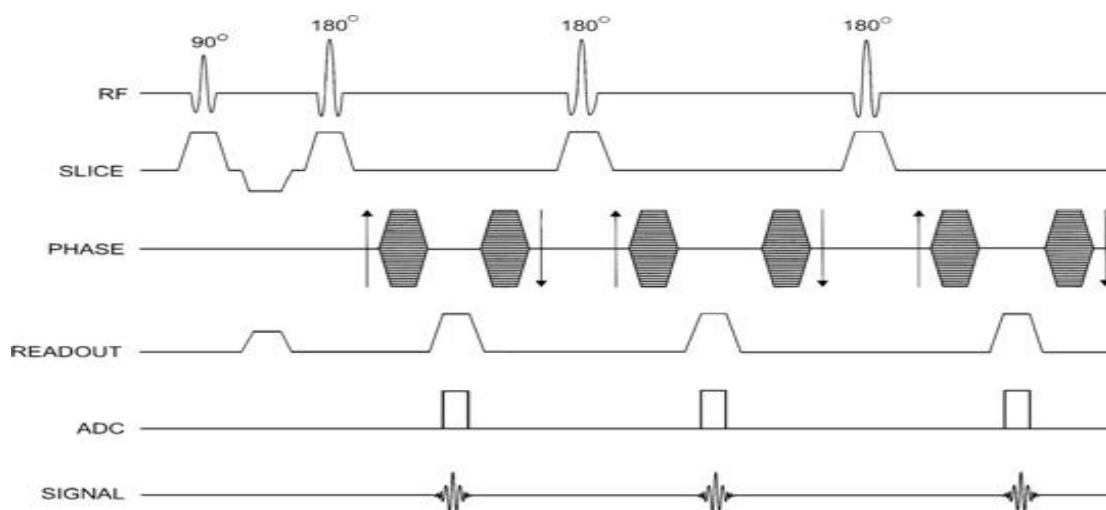


Figura 2-5. Sequência *Fast Spin-echo*. Adaptado de[33]

Outro aspecto relevante prende-se com o mecanismo da Transferência de Magnetização (TM) utilizado em conjunto com as sequências FSE para melhorar o contraste. Este processo consiste na saturação dos spins presentes em macromoléculas com átomos de hidrogénio associadas às mesmas e na sua interacção com moléculas de água livre. Para proceder á saturação, utiliza-se um impulso de RF desviado da frequência de precessão dos prótons livres, sendo este impulso responsável pela TM e consequente atenuação do sinal da água em presença das macromoléculas que contenham hidrogénio, sendo este o caso nos neurónios produtores de dopamina.

2.7. Filtragem de ruído em imagens de RM

As imagens de magnitude são as mais comuns em IRM pois permitem evitar o problema dos artefactos de fase descartando essa informação. Aquando da aquisição, o sinal é medido por um detector de RF sendo que para o efeito da medição do ruído consideramos que cada canal de detecção possui uma distribuição Gaussiana com média de zero, assumindo-se também que cada canal do sinal apresenta ruído branco. A RSR (Razão Sinal ruído) é muitas vezes utilizada como parâmetro de avaliação do nível de ruído nas imagens.

Vários parâmetros influenciam a RSR, sendo que o ruído provém não só da resistência do detector mas também de perdas por indução na amostra. A fonte dominante do ruído na aquisição depende da intensidade do campo magnético estático. Outros parâmetros que influenciam o nível de ruído são o tamanho de cada voxel na imagem, a largura de banda de RF do receptor, entre outros, estando até algumas das fontes de ruído associadas ao próprio doente (ruído fisiológico por exemplo) [29]. A RSR pode ser definida em termos do volume de cada voxel pela equação 2-4.

$$RSR = K \times (Volume\ do\ Voxel) \times \sqrt{\frac{Número\ de\ medições}{Largura\ de\ Banda}} \quad (Equação\ 2-4)$$

Sendo K uma constante que engloba os factores dependentes do hardware de aquisição, da intensidade do campo, da sequência de aquisição e dos tecidos analisados.

Para quantificação da neuromelanina através da segmentação da área da SN, um dos principais problemas prende-se com a reduzida RSR. Em parte esta deve-se à pequena dimensão do voxels neste estudo ($0,4 \times 0,4 \times 0,25\ mm^3$) que conduz a um menor sinal proveniente de cada voxel. É no entanto importante referir que por outro lado é desejável adquirir imagens com resolução espacial elevada de modo a minimizar efeitos de volume parcial que dificultariam também a definição dos limites da SN.

É frequente assumir que o ruído nas imagens de RM é descrito por uma distribuição Gaussiana. A distribuição Gaussiana[34] constitui uma boa aproximação para descrever o ruído para intensidades de sinal altas, mas verifica-se que para zonas da imagem em que não existe sinal de RM a distribuição de Rayleigh adequa-se muito melhor à realidade. Por este motivo considera-se que o ruído em IRM segue uma distribuição Riciana mais adequada também no caso de intensidades de sinal baixas[34]. Quando a RSR é baixa, tornar-se mais difícil a visualização de detalhes nas imagens de RM, sendo estes essenciais em processos de segmentação tal como aquele a que nos propomos neste estudo para medição da SNc.

Uma solução para este problema passa por tentar reduzir o ruído através da aplicação de um filtro. Este substitui o valor de intensidade em cada píxel por um novo valor calculado a partir da sua vizinhança. Este procedimento trás como desvantagem o potencial efeito de suavização das diferenças nas intensidades de pixéis vizinhos, o que dificulta a delimitação de regiões. A procura de um filtro para redução do ruído tem de ter sempre por objectivo a atenuação deste efeito de suavização.

Como já foram realizados estudos prévios em que se executou a segmentação da região da neuromelanina considera-se neste trabalho o filtro gaussiano[10] utilizado anteriormente como atenuador de ruído.

O filtro gaussiano[35], [36] calcula um novo valor para cada pixel da imagem a partir de uma vizinhança pré-definida. O peso de cada elemento da vizinhança segue uma função gaussiana que é fixa (figura 2-6). É um filtro passa-baixo e simétrico, tendo o mesmo efeito em todas as direcções da imagem. Conserva os componentes da imagem com baixa frequência mas atenua algumas altas frequências da imagem, causando perda de informação e suavizando os contornos da mesma. Este fenómeno é controlado pelo desvio padrão da função gaussiana.

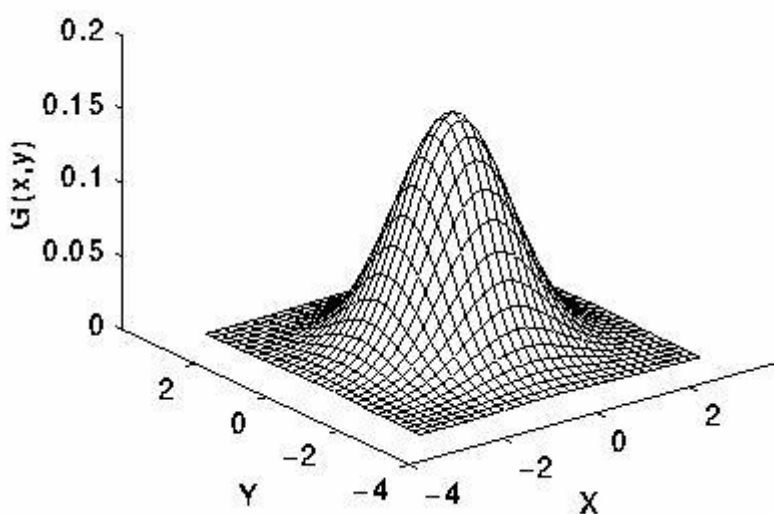


Figura 2-6. Exemplo de Distribuição 2-D Gaussiana. $\mu = (0,0)$ e $\sigma = 1$ [37].

O filtro *Edge-preserving smoothing*[38] foi utilizado no trabalho que conduziu à elaboração deste estudo[11]. Este é um filtro de média adaptativa em que o nível de suavização da intensidade dos pixéis é determinado tendo em consideração a intensidade dos pixéis vizinhos, sendo por isso à partida mais eficaz na preservação de altas frequências espaciais do que um filtro gaussiano.

O filtro de médias não local (NLM)[39] tem vindo a ser recentemente considerado como um método simples mas eficaz de remover ruído de uma imagem sem comprometer os seus detalhes, tirando partido da redundância na imagem, que apresenta diversas zonas com intensidades semelhantes. Basicamente este filtro reduz o ruído numa imagem calculando médias ponderadas da intensidade de pixéis da vizinhança definida e multiplicando o valor do pixel em análise por essa ponderação. Boueds et al(2005) sugeriu que pixéis com vizinhanças semelhantes tendem a ser semelhantes no seu valor original sem influência do ruído[40].

$$\hat{x}(i) = \frac{\sum_{j \in \Omega} w(i,j) \times y(j)}{\sum_{j \in \Omega} w(i,j)} \quad w(i,j) = e^{-\frac{\|N_i - N_j\|^2}{h^2}} \quad (\text{Equação 2-5})$$

Nesta equação Ω representa o volume de pesquisa para as vizinhanças, $w(i,j)$ representa o peso da semelhança entre as vizinhanças designadas por N_i e N_j . $y(i)$ representa o píxel em estudo da imagem original e $\hat{x}(i)$ a estimativa final para o valor de intensidade do mesmo.

Este processo de filtragem apresenta algumas limitações sendo possível apenas identificar vizinhanças que partilhem a mesma estrutura e orientação não sendo por isso rotacionalmente invariante, o que se traduz numa redução do peso de conjuntos de pixéis com estruturas semelhantes mas orientações diferentes.

O filtro PRI-NLM (*Pre-Filtered Rotationally Invariant Non Local Means filter*) utiliza o valor do voxel central de cada conjunto, tornando a avaliação das semelhanças num processo dependente de cada ponto e não de cada região, o que lhe permite ser rotacionalmente invariante[41][42] .

Só por si esta alteração continuaria a apresentar limitações pois a utilização de pontos específicos como ponderação em vez de médias de cada região tornaria o método demasiado sensível a variações de ruído na imagem. Por este motivo o filtro PRI-NLM utiliza uma imagem previamente filtrada pelo método ODCT ("*Oracle-based Coefficient transform filter*") para determinação dos pesos, sendo que neste método de pré-filtragem são utilizados blocos de coeficientes sobre a imagem para obter estimativas acerca da intensidade original de cada voxel sem ruído. Cada bloco é avaliado através da sua comparação com um limiar fixo, sendo que é tida em conta a possibilidade de existirem blocos sobrepostos aos quais é ajustado o peso.

Este método toma então partido de duas propriedades da imagem, a redundância dos valores de intensidade em determinadas regiões e a capacidade de representar a mesma por um número de funções base reduzidas (neste caso bases formadas por transformadas de coeficientes discretos) [41].

Outra variante do filtro NLM é o ANLM (*Adaptive Non Local Means Filter*)[43][42], que tem em consideração a variação espacial do ruído na imagem. Sendo o principal parâmetro de

um filtro de NLM h^2 , que regula o impacto do mesmo, experimentalmente o seu valor óptimo seria δ^2 , sendo δ o desvio padrão do ruído. No entanto ao trabalhar com ruído não estacionário o uso de um parâmetro global leva a processos pouco robustos computamente e a uma performance sub-ótima. Logo o filtro ANLM calcula uma estimativa do ruído local de cada imagem de acordo com a equação 2.6.

$$\sigma^2 = \min(d(R_i, R_j)) \quad \forall j \neq i \quad \text{and} \quad R = \mu - \varphi(\mu) \quad (\text{Equação 2-6})$$

Esta expressão tem como base a distância euclidiana (d) mínima entre dois volumes R_i e R_j . $R = \mu - \varphi(\mu)$ sendo μ o volume original com ruído e $\varphi(\mu)$ o mesmo volume filtrado com um filtro passa-baixo (máscara 3x3x3).

Este processo permite identificar regiões com a mesma estrutura e características mas com médias de intensidade diferentes, compensando assim as incoerências típicas na intensidade de imagens de RM e reduzindo a sobrestimação do ruído em alguns casos extremos. Assim é possível usar o valor de $h^2 = \sigma^2$, característica de um filtro ANLM.

3. Análise de Imagens Sintéticas

3.1. Obtenção de Imagens Sintéticas da SNc

O objectivo da análise de imagens sintéticas é a avaliação preliminar do desempenho de um novo conjunto de filtros para a correcta segmentação da zona da neuromelanina.

Um conjunto de imagens sintéticas foi criado a partir de uma representação anatómica da SN de uma imagem de RM real utilizando o programa Matlab™. Na sua criação foram considerados apenas dois níveis de intensidade, um correspondente à SN (região da neuromelanina) e outro para a restante imagem. Foi adicionado ruído a estas imagens segundo a equação 3-1.

Este conjunto foi gerado com níveis variáveis de contraste, entre 10 a 110% maior intensidade na zona da SN do que na restante imagem (incremento de 20% por cada imagem do conjunto).

Para cada nível de contraste, foram geradas imagens com níveis variáveis de RSR (entre 10 e 50 com incrementos de 10), perfazendo um total de 30 imagens. Foi criada adicionalmente uma imagem sem ruído com 110% de contraste, como referência para o processo experimental.

Para obter a distribuição Riciana característica das imagens de RM foi adicionado ruído gaussiano às componentes real e imaginária das imagens antes de se calcular a magnitude. Alguns exemplos destas imagens são apresentados na figura 3-1.

$$imagem_{com_{ruído}} = \sqrt{(imagem + ruídoReal)^2 + ruídoImaginário^2} \quad (\text{Equação 3-1})$$

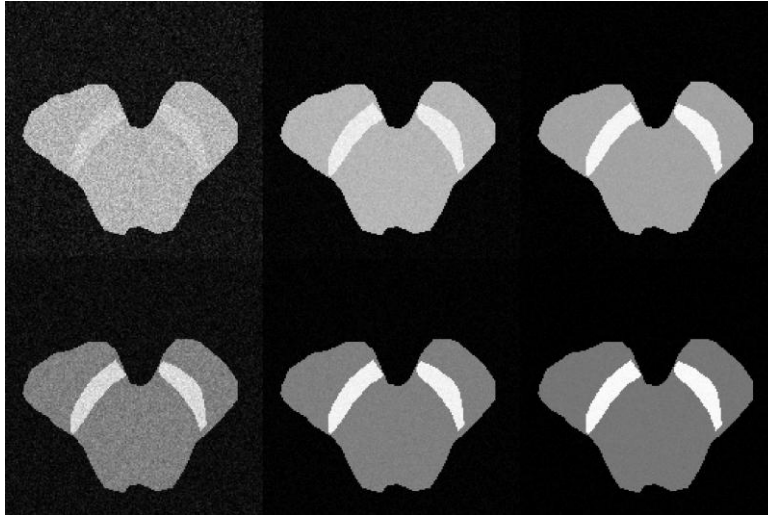


Figura 3-1. Exemplos de imagens sintéticas com níveis variáveis de contraste e RSR. Do topo esquerdo para o fundo direito (Contraste, RSR): (10%,10); (30%, 30); (50%, 50); (70%,10); (90%, 30); (110%,50).

3.2. Metodologia

Para realizar a avaliação tirou-se mais uma vez partido do programa Matlab™, elaborando um script que permitiu filtrar e segmentar o conjunto de forma automatizada. Cada imagem com os níveis de RSR e contraste previamente identificados, foi filtrada pelos 4 filtros descritos no capítulo 2. O filtro Gaussiano foi implementado com um kernel de (2 x 2 pixel) tal como no trabalho de Sasaki et al 2013[9], sendo que os filtros Edge-Preserving, ANLM e PRI-NLM foram implementados de acordo com os parâmetros definidos pelos autores.

A imagem é de seguida segmentada com recurso ao algoritmo “region-growing”. Partindo do princípio que na maioria das imagens existem regiões cujos valores de intensidade são relativamente próximos é possível proceder à agregação dos seus pixels através de um critério de comparação. Sabendo que a região da SN, cuja intensidade é teoricamente homogênea e superior às das regiões adjacentes, este método aparenta indicado para a

segmentação na análise a que nos propomos, tendo sido já utilizado previamente para o mesmo propósito noutro estudo[11] .

A implementação desta metodologia no ambiente de trabalho Matlab™ foi desenvolvida por Daniel Kellner[44]. O algoritmo necessita de *seed points*, ou seja, para segmentar a região de interesse é necessário definir manualmente um ponto que o utilizador considere pertencer a essa região. Tal ponto fornece um valor de intensidade base a partir do qual é possível seleccionar regiões de diferentes tamanhos consoante o número de pixéis agrupados. Esta variação nas dimensões da segmentação é controlada pelo valor de limiar que se define no algoritmo a priori. Este valor define quais os pixéis a incluir na região segmentada tendo em conta a sua intensidade. Se a intensidade do pixel analisado pertencer ao intervalo definido tendo em conta o limiar e a intensidade no *seed point*, este é incluído na região final, caso contrário é excluído (Equação 3-2).

$$I_{seed} \pm thr \times (I_{max} - I_{min}) \quad (\text{Equação 3-2})$$

Nesta equação I_{seed} é a intensidade no seed point, thr o valor do limiar, I_{max} a intensidade máxima da imagem e I_{min} a sua intensidade mínima.

De forma a simplificar e retirar variáveis que pudessem afectar as conclusões da análise, o *seed point* foi mantido na mesma posição para todas as imagens sintéticas.

O número de pixéis na área de interesse foi registado para cada imagem e para cada filtro testado no conjunto e também na imagem de referência. A partir destas medidas foi possível estimar o erro relativo introduzido por cada filtro na segmentação (Equação 3-3).

$$Erro\ Relativo = \frac{(N_{real} - N_{est}) \times 100}{N_{real}} \quad (\text{Equação 3-3})$$

Nesta equação N_{real} representa o número de pixéis detectados na imagem de referência e N_{est} o número de pixéis detectados para cada imagem e filtro.

Foi realizada uma análise estatística dos resultados utilizando o software R® (Version 3.1.0, The R Foundation for Statistical Computing).

Devido ao número reduzido de dados optou-se pela utilização de um teste não paramétrico (teste Kruskal-Wallis) considerando as amostras independentes.

O nível de significância utilizado no teste foi de 5%, sendo o intervalo de confiança de 95%. As diferenças foram consideradas significativas se o valor p obtido fosse inferior a 5%.

3.3. Resultados

Nesta Secção apresentam-se os resultados da filtragem e segmentação obtidos a partir do script Matlab™ descrito em 3.2.

No Anexo 1 encontra-se a tabela com os resultados da segmentação (numero de pixéis detectados) para cada um dos filtros testados.

De seguida apresenta-se um exemplo do resultados dos processos de filtragem para uma imagem (figura 3-2), e os seus perfis de intensidade segundo uma linha traçada a vermelho que atravessa a zona da neuromelanina, sendo que, tal como foi descrito anteriormente, as imagens em estudo possuem apenas dois níveis de intensidade antes da introdução do ruído.

Utilizou-se para esta figura a imagem com menor RSR (10) e maior contraste (110%), ou seja apresenta-se o exemplo para as condições mais desfavoráveis para os filtros previamente utilizados.

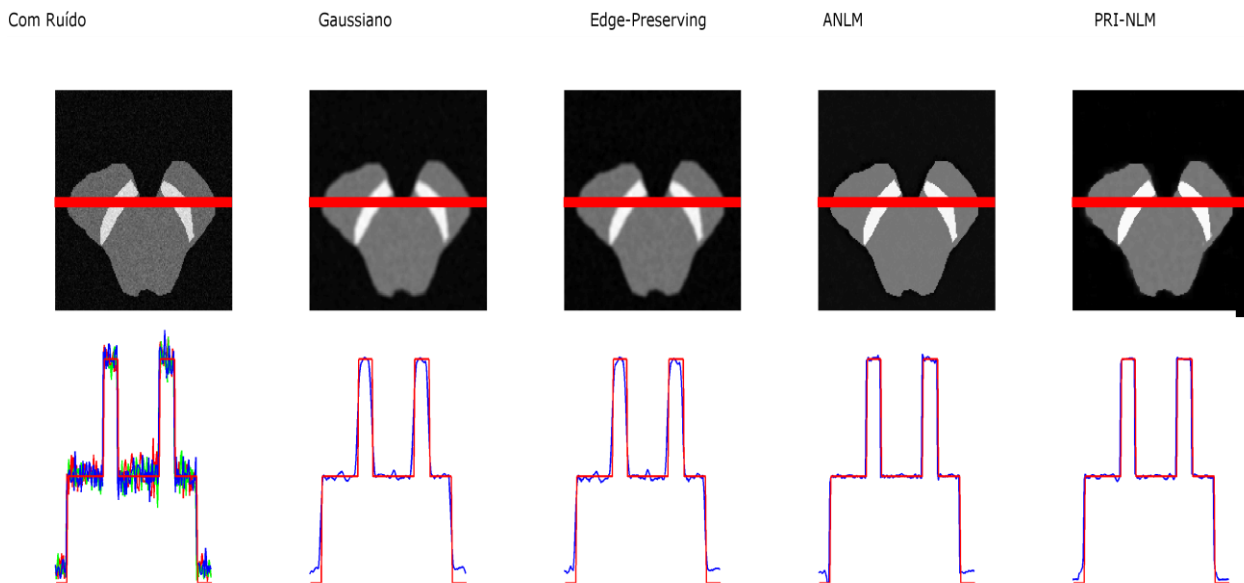


Figura 3-2. Da Esquerda para a direita: imagem com ruído (Contraste 110%, RSR 10), filtrada com filtros Gaussiano, “Edge-Preserving”, ANLM e PRI-NLM. Em baixo: Perfis de Intensidade para as imagens (a azul) Perfil de intensidade para a imagem referencia sobreposto(a vermelho) .

Para a mesma imagem (RSR-10,Contraste-110%), os resultados da segmentação pós filtragem e da segmentação da imagem referência permitem uma outra análise visual dos resultados (Figura 3-3).



Figura 3-3. Resultados da segmentação para a imagem referência, e imagens filtradas com o filtro Gaussiano, Edge, ANLM e PRI-NLM (da esquerda para a direita). Imagem filtrada (Contraste-10% RSR 10).

A equação (3-2) apresentada na secção 3.2 para o cálculo do erro relativo foi aplicada ao resultados do apêndice A. Para simplificar a interpretação destes resultados apresentam-se gráficos de superfície (figura 3-4) representando o erro relativo introduzido na segmentação para cada filtro testado.

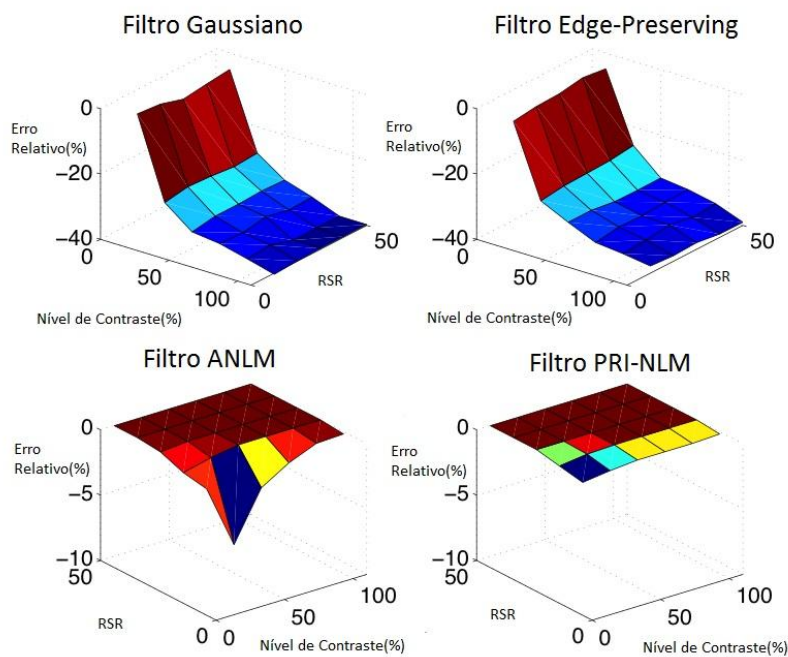


Figura 3-4. Gráficos de superfície para o erro relativo obtido com cada um dos filtros testados para diferentes valores de contraste e RSR.

Para o filtro gaussiano a menor percentagem de erro obtida foi de 4% para um nível de contraste de 10% e RSR de 10, sendo que para as mesmas condições a aplicação do filtro *Edge-Preserving* resultou num erro de 6,3% enquanto os filtros ANLM e PRI-NLM apresentaram erros de 0,7% e 1,2% respectivamente.

Aumentando o nível de contraste e RSR foi possível obter segmentações exactas com os filtros da família NLM (a partir de RSR 20 e contraste 50%), enquanto que utilizando os filtros Gaussiano ou *Edge-Preserving* o erro continuou a aumentar atingindo um máximo de 40,3% para o filtro Gaussiano e 39% para *Edge-Preserving*.

Na análise estatística calculou-se a média de pixéis detectados nos diferentes processos de filtragem e o seu desvio padrão, numa análise descritiva. Na tabela seguinte inclui-se também o resultado da segmentação da imagem referência (Tabela 3-1).

Tabela 3-1. Análise Descritiva dos resultados da segmentação, sendo apresentados a média e desvio padrão (dp) do número de pixéis incluídos na SN, considerando todos os valores de contraste e RSR testados. É também apresentado o valor de referência obtido na ausência de ruído e para o valor de contraste mais alto.

Filtro	Referência	Gaussiano	Edge	ANLM	PRI-NLM
Média \pm dp	1183	823 \pm 143	840 \pm 135	1179 \pm 14	1182 \pm 2

O teste Kruskal-Wallis para a variável número de pixéis por filtro obteve um valor $p < 0,05$ logo a diferença entre os resultados da segmentação é estatisticamente significativa. Uma representação gráfica dos resultados ajuda a compreender melhor a magnitude das diferenças (Figura 3.5)

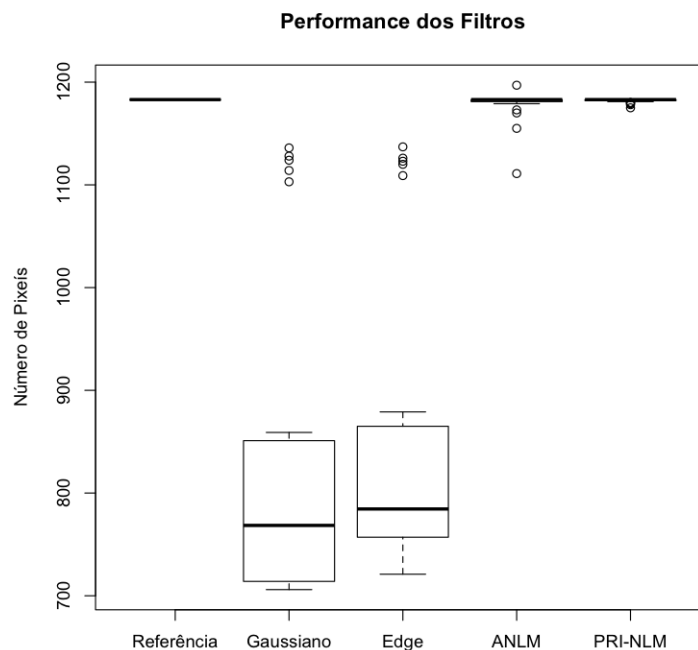


Figura 3-5. Diagrama de caixa representando a performance dos filtros.

3.4. Discussão de Resultados

A observação de uma imagem filtrada e posteriormente segmentada (Figuras 3-2 e 3-3.) ilustra o efeito dos processos de filtragem no número de pixels detectado. As diferenças entre os mesmos são claramente visíveis sendo reforçadas pela apresentação dos perfis de intensidade na região de interesse (Figura 3-2). Uma vez que as imagens em estudo possuem apenas duas intensidades antes da introdução do ruído, estes perfis são um indicador de que ambos os filtros da família NLM retornam a imagem praticamente à sua intensidade original (detectam-se dois picos correspondentes à zona da neuromelanina), sendo tal observação muito mais difícil com a utilização do filtro *Edge-Preserving* e impossível para o filtro Gaussiano.

Quantitativamente os resultados da segmentação com o filtro gaussiano ou *Edge-Preserving* conduzem a uma subestimação significativa da área real da neuromelanina, sendo pouco afectados pelo aumento da RSR mas sofrendo um decréscimo considerável com o aumento do contraste. Ambos os filtros funcionam de forma semelhante, suavizando as fronteiras da imagem. Sendo que o filtro *Edge-Preserving* ao ponderar o valor de cada pixel através da diferença entre a sua intensidade e a dos vizinhos, ajustando o peso dado a cada um deles, permite ainda assim uma redução deste efeito[38].

Ao contrário destes dois filtros, os filtros da família NLM estimam os valores de cada pixel com recurso a regiões dispersas por toda a imagem, identificando zonas de intensidade semelhante e atribuindo-lhes valores iguais na imagem filtrada como demonstrado nos perfis de intensidade (Figura 3.2b). Tal leva ambos os filtros ANLM e PRI-NLM a serem quase perfeitos na remoção de ruído neste conjunto de imagens. Em particular o filtro PRI-NLM com a utilização de uma imagem pré-filtrada antes de identificar o grau de semelhança entre as intensidades mostra-se o método de excelência nesta análise, resultando em medições exactas para as áreas da SN.

Neste estudo, os novos filtros (ANLM e PRI-NLM) foram superiores permitindo a remoção do ruído e preservação dos detalhes nas imagens. Apesar de promissores, estes resultados têm de ser considerados preliminares. O uso de imagens sintéticas condiciona a avaliação dos processos de filtragem, principalmente os que funcionam com ponderação de regiões semelhantes e estimativa do ruído tal como o PRI-NLM e ANLM, respectivamente. Para poder tirar conclusões com maior validade seria necessário o uso de imagens sintéticas que apresentassem também variações de intensidade mais realistas. Uma possibilidade seria considerar distribuições gaussianas com diferentes médias para as intensidades observadas em diferentes tipos de tecidos. Ainda assim, esta análise não substituiria a realização de estudos em imagens de RM reais tal como apresentado no próximo capítulo.

4. Análise de Imagens Reais

4.1. Métodos e Procedimentos

4.1.1. Descrição da Amostra

No presente estudo participaram 47 indivíduos (Tabela 4-1). A amostra era constituída por 10 voluntários saudáveis (identificados como grupo de Controlo), 12 pacientes com diagnóstico inicial de DP designados por DP novo, 10 pacientes com DP cujo diagnóstico tinha sido efectuado entre 2 a 5 anos antes do início do estudo denominados como DP 2 a 5, e 15 pacientes com tremor essencial identificados como Tremor.

O diagnóstico da doença de Parkinson foi realizado por um neurologista especialista em doenças de movimento segundo os critérios da *United Kingdom Brain Bank Criteria (UKBBC)*[45].

Tabela 4-1. Distribuição demográfica dos participantes – dp corresponde a desvio padrão

	Controlos	TE	DP denovo	DP 2 a 5
Nº.				
(Feminino/Masculino)	10(4/6)	15(8/7)	12(7/5)	10(2/8)
Idade (Média \pm dp)	61,20(\pm 7,3)	70,46(\pm 12,5)	63,23(\pm 11,9)	66,9(\pm 10,3)

Os doentes com Tremor Essencial foram diagnosticados seguindo os critérios da *Movement Disorder Society on Tremor*[46]. Os doentes com DP e TE foram recrutados da Unidade de Doenças do Movimento do Centro Hospitalar Lisboa Norte, EP-Hospital de Santa Maria(HSM), no âmbito do projecto de Doutoramento em Imagiologia da Dra. Sofia Reimão. Todos os doentes e controlos foram avaliados por um Neurologista especialista em doenças do movimento.

Os critérios de exclusão para o estudo foram a presença de demência, doença psiquiátrica ou contra-indicações para a realização de exames de IRM em campos de 3T.

Todos os indivíduos incluídos no estudo deram o seu consentimento informado e o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde do HSM.

Para o estudo da DP foram realizadas várias aquisições (Tabela 4-2) dos elementos dos vários grupos ao longo de um ano. Tal aquisição permite inferir sobre alterações na área da neuromelanina na evolução da doença, sendo também possível avaliar eventuais efeitos terapêuticos nos pacientes do grupo DP denovo, comparando uma primeira aquisição sem medicação e uma outra com um intervalo de 2 meses já com o paciente medicado. De realçar que ao longo do estudo alguns participantes desistiram ou faltaram a determinado exame e por esse motivo a amostra por grupo não é homogénea ao longo do tempo. Para os pacientes com TE a evolução temporal não foi analisada.

Tabela 4-2. Número de participantes no estudo da DP por data de aquisição.

Data de aquisição	Grupo	Nº de Indivíduos
Primeira	Controlos	10
	DP denovo	12
	DP 2 a 5	10
2 Meses	DP denovo	6
6 Meses	Controlos	10
	DP denovo	10
	DP 2 a 5	8
1 Ano	Controlos	10
	DP denovo	10
	DP 2 a 5	8

4.1.2. Metodologia

4.1.2.1 Aquisição de imagens

As imagens foram obtidas na Sociedade Portuguesa de Ressonância Magnética e no HSM em equipamentos RM Achieva, Philips Medical Systems de 3T, com uma bobina de 8 canais.

A sequência de aquisição utilizada foi a FSE com ponderação em T1 tal como proposta por Sasaki et al [20] (Tabela 4-3).

Tabela 4-3. Parâmetros da sequência de aquisição Fast Spin Echo

Sequência	T.E.	TR	Nº de Ecos	TA	Nº de cortes	Espessura de corte	FOV	Resolução do plano
T1W-FSE	10 ms	633 ms	3	8 min	20	2.5 mm	220x190 mm2	0,40x0,40 mm2

As secções foram cuidadosamente colocadas no plano axial oblíquo, perpendiculares ao pavimento do quarto ventrículo (Figura 4-1).

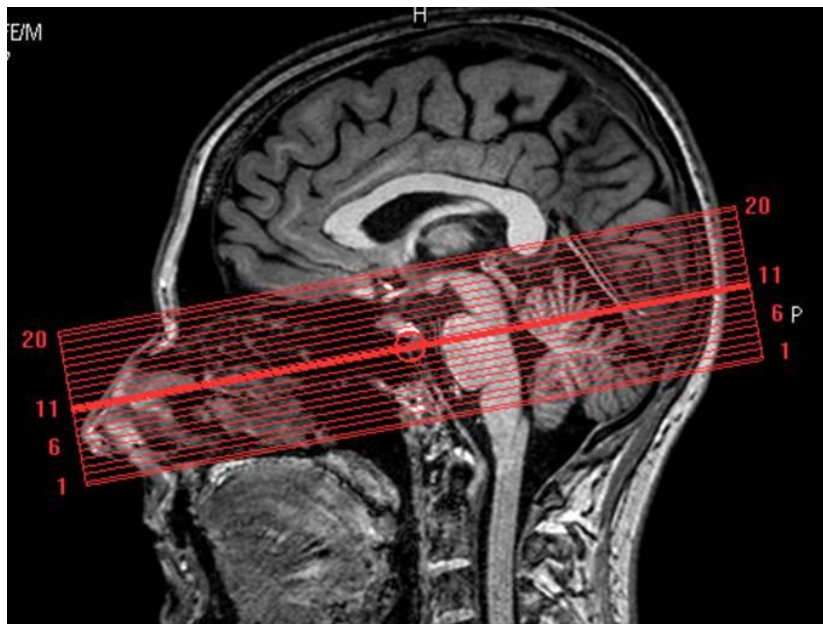


Figura 4-1-Posicionamento dos cortes no cérebro.

4.1.2.2 Análise de Imagens

Para o estudo de processos de filtragem e segmentação em imagens reais utilizou-se como ferramenta base de análise a interface previamente desenvolvida em Matlab™[11].

Foi no entanto necessário proceder a alterações no programa para acomodar os filtros e métodos de segmentação a testar.

Tal como no estudo anterior é possível ler imagens de RM em formato DICOM (mais utilizado em ambiente clínico) ou Nifti. A interface permite visualizar as 20 imagens de cada aquisição, podendo o utilizador escolher o corte a segmentar (Figura 4-2). Nas imagens adquiridas a SN é em geral visível em 3 cortes consecutivos tendo-se identificado o corte com a maior área e que permitisse uma melhor visualização da neuromelanina para segmentação (em geral o do meio).

Após a selecção da imagem, o utilizador pode escolher qual dos 4 filtros utilizar, bastando para tal pressionar o botão com a designação do mesmo. Estas 4 opções permitem avaliar a performance de cada filtro no conjunto de imagens recolhidas e averiguar a sua influência nos resultados da segmentação.

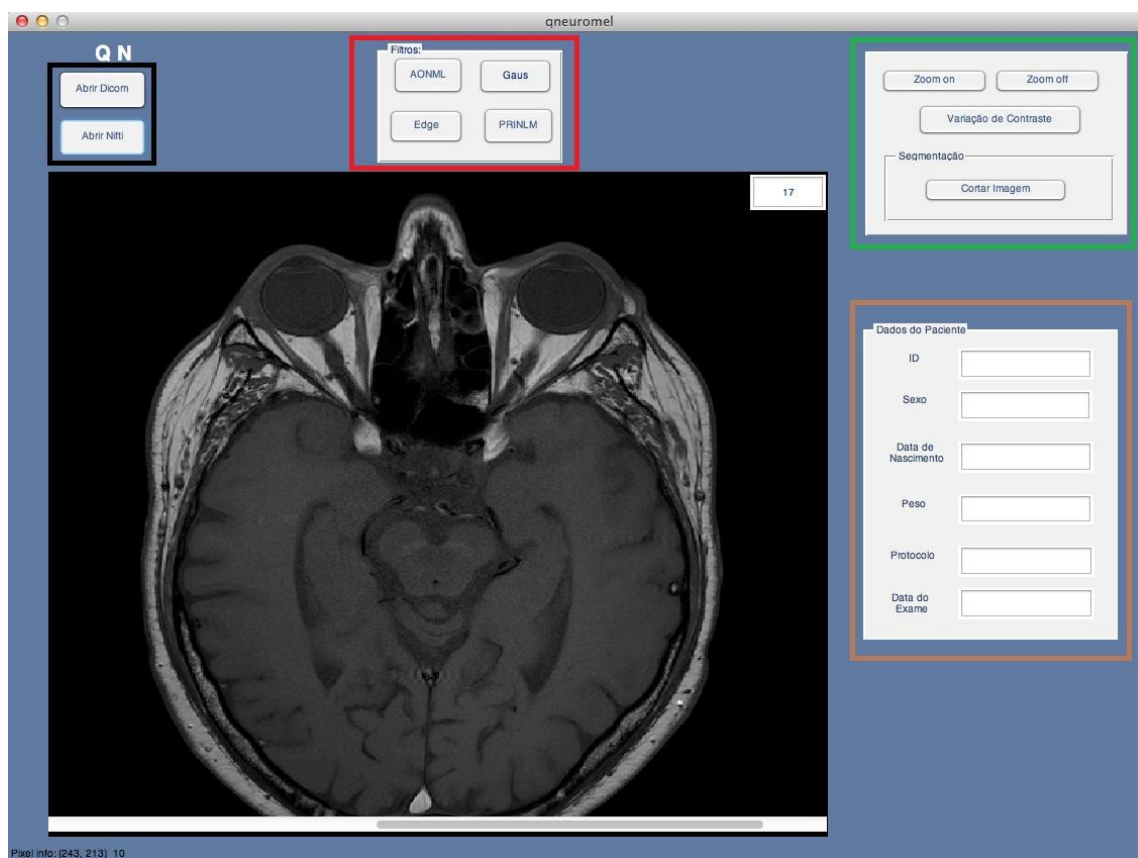


Figura 4-2. Janela Inicial da Interface. A preto Importação de imagens (Dicom/Nifti). A vermelho -Seleccção de filtros. A verde - Variação de contraste, zoom e segmentação. A castanho - Dados do paciente

Para a aplicação dos algoritmos de segmentação foi modificada a janela de segmentação para permitir a comparação directa entre dois processos de segmentação distintos (Figura 4-3).

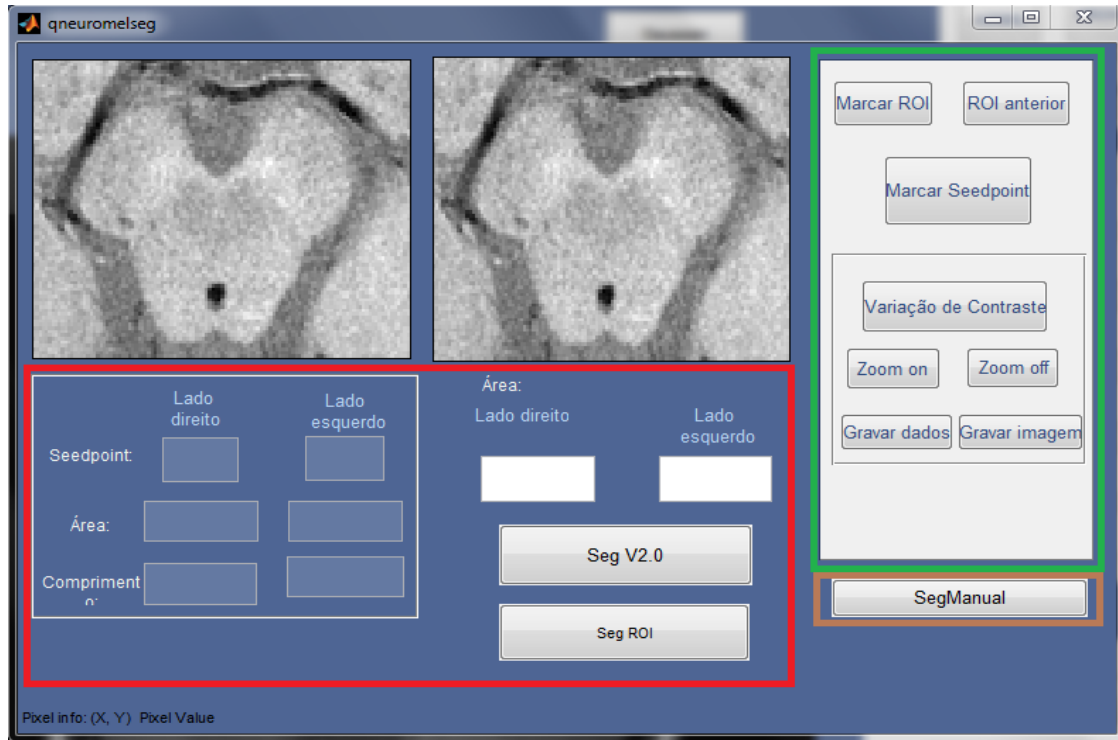


Figura 4-3. Janela da segmentação. A vermelho-3 grupos de teste para processos de segmentação. Cada grupo fornece o valor da área da SN. A Verde - Ferramentas de apoio (Marcação de seed points, zoom, variação de contraste, exportar resultados). A castanho - Segmentação Manual.

O algoritmo de segmentação utilizado neste capítulo é idêntico ao referido na secção 3.2. No entanto e como estamos a lidar com imagens reais os *seed points* deixam de ser fixos, passando a ser o utilizador a marcá-los na imagem na região que considere pertencer à SN, tal como acontecia no trabalho anterior[11]. O valor de *thr* também foi definido e mantido constante a 3% na análise aos diferentes processos de filtragem. Este valor foi mais tarde ajustado tendo em conta o processo de filtragem utilizado no restante trabalho.

Uma escolha correcta destes dois parâmetros (*seed point* e limiar) é fundamental para que o resultado da segmentação represente correctamente a anatomia da zona da SN em cada imagem estudada. Em alguns casos a imagem em si compromete uma boa segmentação devido a zonas de intensidade elevada fora da zona em avaliação (Figura 4-4).

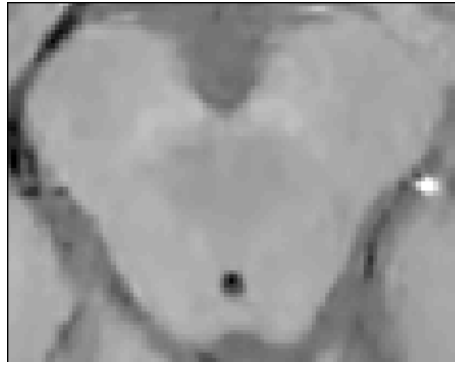


Figura 4-4-Imagem Real da SN com zonas de alta intensidade.

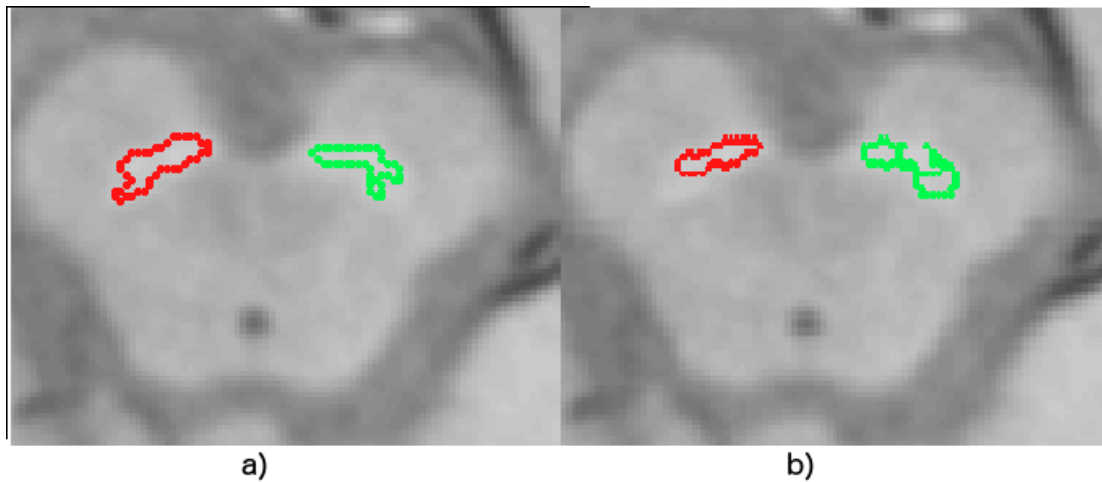


Figura 4-5. a) e b) Segmentação da SN pelo algoritmo *region-growing* com *seed points* variáveis.

Na figura 4-5 está representada a segmentação da mesma imagem mas com *seed points* colocados em locais distintos da SN. É possível verificar que a alteração dos *seed points* tem influência na segmentação. Esta observação é de extrema relevância uma vez que tais variações podem comprometer a validade dos resultados obtidos em função da elevada variabilidade deste processo.

De realçar ainda que o valor de limiar também afecta bastante os resultados, mas o facto de este ter sido mantido constante ao longo de toda a análise deverá traduzir-se na introdução de menor variabilidade nos resultados.

Paralelamente a segmentação manual, totalmente dependente da marcação realizada pelo utilizador é utilizada daqui em diante como referência na avaliação dos resultados.

Todas as áreas da SN obtidas a partir dos processos de segmentação foram calculadas pela equação 4-1.

$$\text{Área} = N^{\circ}_{\text{pixeis}} \times \text{área}_{\text{pixel}} \quad (\text{Equação 4-1})$$

Na equação o algoritmo calcula automaticamente quantos pixéis compõem a zona de interesse da neuromelanina e a área de cada pixel é definida pelo protocolo de aquisição.

4.1.2.3 *Análise estatística*

A área da neuromelanina foi em todo o trabalho comparada com recurso à utilização de testes não paramétricos. Testes Kruskal-Wallis, com comparações emparelhadas em que o respectivo valor p foi corrigido de acordo com o método de *Bonferroni* foram considerados como indicados para a análise dos dados. Um valor p de 0,05 foi considerado como sendo significativo.

Todos os testes estatísticos foram realizados no programa R® (*Version 3.1.0, The R Foundation for Statistical Computing*).

4.2. Análise da DP

4.2.1. Avaliação dos métodos de filtragem em imagens reais

O objectivo final da metodologia desenvolvida é facilitar a distinção entre indivíduos saudáveis e de indivíduos com DP partindo dos respectivos valores da área da SN. Para avaliar a performance dos diferentes processos de filtragem testados (Gaussiano, *Edge-Preserving*, PRI-NLM e ANLM), foram comparando os valores das áreas segmentadas após filtragem das imagens com os valores obtidos por segmentação manual. Partindo do pressuposto de que a capacidade de “filtragem” do sistema visual humano é a melhor, os valores obtidos por segmentação manual foram considerados como “*gold standard*”, pretendendo-se identificar o tipo de filtro que permite obter valores para as áreas tão próximos destes quanto possível.

Optou-se por não utilizar nesta avaliação todo o conjunto de imagens disponíveis, mas apenas imagens dos 3 grupos obtidas na primeira aquisição e após um ano, perfazendo um total de 60 imagens correspondendo ao corte do meio da região SN.

4.2.1.1 Resultados da avaliação

O tempo típico necessário para a aplicação de cada processo de filtragem em estudo é apresentado na Tabela 4.4.

Tabela 4-4. Tempo de execução dos processos de filtragem. Dados podem variar consoante o hardware. Todos os dados apresentados foram obtidos sobre as mesmas condições e no mesmo computador

Filtro	Tempo
Gaussiano	4 s
Edge-Preserving	64 s
PRI-NLM	48,5 s
ANLM	155 s

Observa-se que o filtro gaussiano é o mais rápido de entre todos os processos, sendo seguido pelo *Edge-Preserving*, PRI-NLM e ANLM. Entre o mais rápido e mais lento a diferença é de 151 segundos.

Um exemplo do efeito dos processos de filtragem ajuda a dar uma ideia da eficácia de cada um (Figura 4-6). O filtro gaussiano e *Edge-Preserving* suavizam a imagem, sendo esse efeito particularmente visível para o filtro gaussiano. Os filtros PRI-NLM e ANLM apresentam imagens mais nítidas neste exemplo.

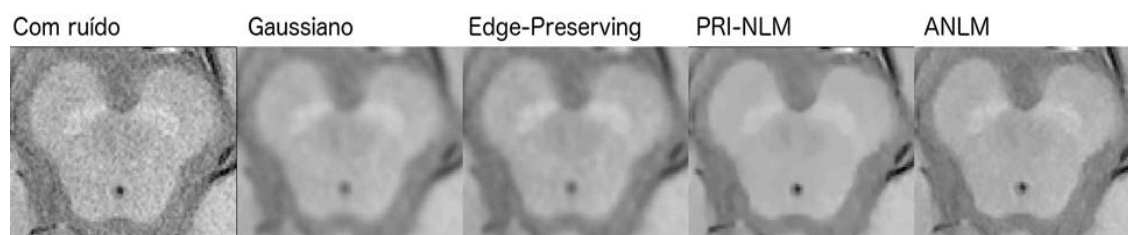


Figura 4-6. Imagem original com ruído e filtrada pelos diversos métodos estudados

As áreas médias obtidas para a SN e a amplitude de variação das mesmas para cada um dos grupos e filtros após segmentação manual ou semiautomática ($\text{thr}=3,0\%$). Um teste *Krukall-Wallis* global aos dados obteve um valor $p<0,05$, indicando a existência de diferenças estatísticas significativas entre os filtros testados. Por este motivo foram incluídos os resultados dos testes com comparações múltiplas (Tabela 4.5). Não foi feita distinção entre os lados esquerdo e direito da zona em estudo.

Tabela 4-5. Área média, amplitude e valor p para todos os filtros, subdivididos pelos grupos

Filtro	Grupo	Área média \pm dp	Amplitude(Máximo-Mínimo)	Valor p(Manual vs Filtro)
Manual	Controlos	30 \pm 5	23	
PRI-NLM		28 \pm 15	61	0,59002
ANLM		26 \pm 7	33	0,1603
Edge-Preserving		22 \pm 10	32	0,0068
Gaussiano		17 \pm 6	31	0,00001
Manual	DP denovo	22 \pm 5	36	
PRI-NLM		29 \pm 20	101	1
ANLM		21 \pm 10	48	1
Edge-Preserving		18 \pm 9	42	0,0198
Gaussiano		16 \pm 8	39	0,00052
Manual	DP 2 a 5	20 \pm 5	27	
PRI-NLM		29 \pm 22	97	1
ANLM		22 \pm 15	56	1
Edge-Preserving		17 \pm 11	43	0,57658
Gaussiano		16 \pm 10	43	0,3608

Para o grupo de controlo a área média das imagens segmentadas aproxima-se mais da área medida por segmentação manual para as imagens filtradas pelo filtro PRI-NLM, seguido pelo filtro ANLM, *Edge-Preserving* e Gaussiano, sendo que estes dois últimos apresentam diferenças estatisticamente significativas como indica o valor p . De realçar que a amplitude de variação dos resultados é muito acentuada para o filtro PRI-NLM quando comparada com a amplitude de variação para os restantes filtros e por segmentação manual, sendo esta diferença claramente visível num diagrama de caixa (Figura 4-7).

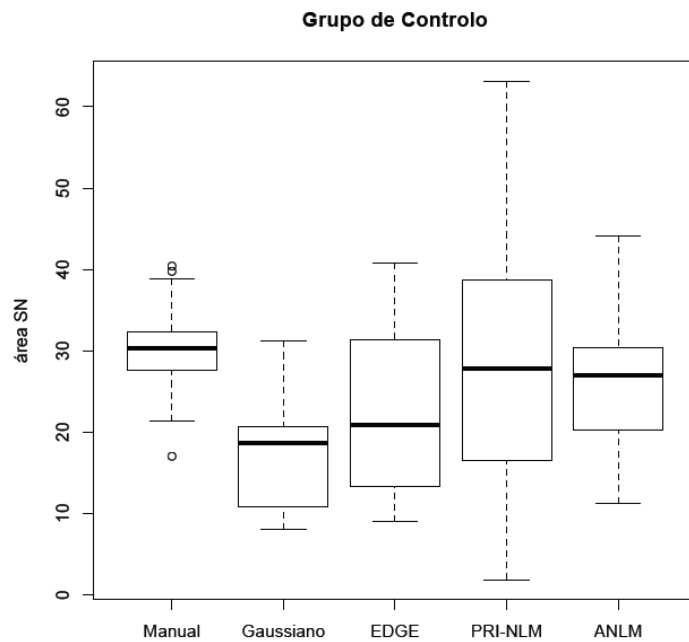


Figura 4-7. Diagrama de caixa de cada área distribuída por filtro para o grupo de controle.

Para o grupo DP denovo verifica-se que filtro ANLM apresenta a área média mais próxima da medida manualmente sendo seguido do filtro *Edge-Preserving*, Gaussiano e PRI-NLM. Neste grupo o valor p indica que não existem diferenças estatísticas para o filtro ANLM, *Edge-Preserving* e PRI-NLM. Os resultados da amplitude de variação são mais acentuados para este grupo do que para o grupo de controle, sendo que o filtro PRI-NLM apresenta uma amplitude de variação dos resultados na ordem dos 100, um valor muito elevado comparativamente ao valor médio. O diagrama de caixa permite uma observação visual dos resultados (Figura 4-8).

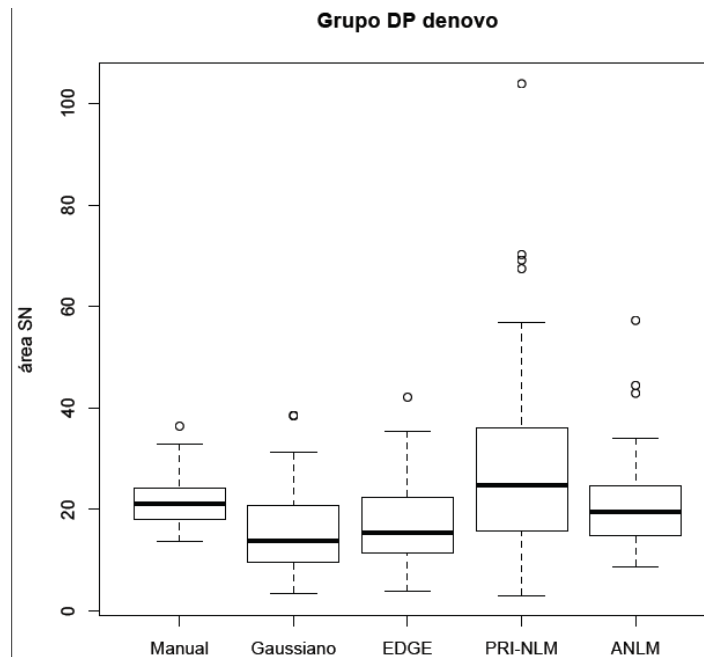


Figura 4-8. Diagrama de caixa de cada área distribuída por filtro para o grupo DP denovo.

Para o grupo DP 2 a 5 (Figura 4-9) a tendência apresentada para o grupo DP denovo mantém-se com o filtro ANLM a apresentar a área média mais próxima da manual seguido dos filtros *Edge-Preserving*, Gaussiano e PRI-NLM. As amplitudes de variação apresentam a mesma ordem de grandeza do grupo acima referido. De realçar os valores elevados para o desvio padrão das áreas para o filtro PRI-NLM independentemente do grupo em estudo.

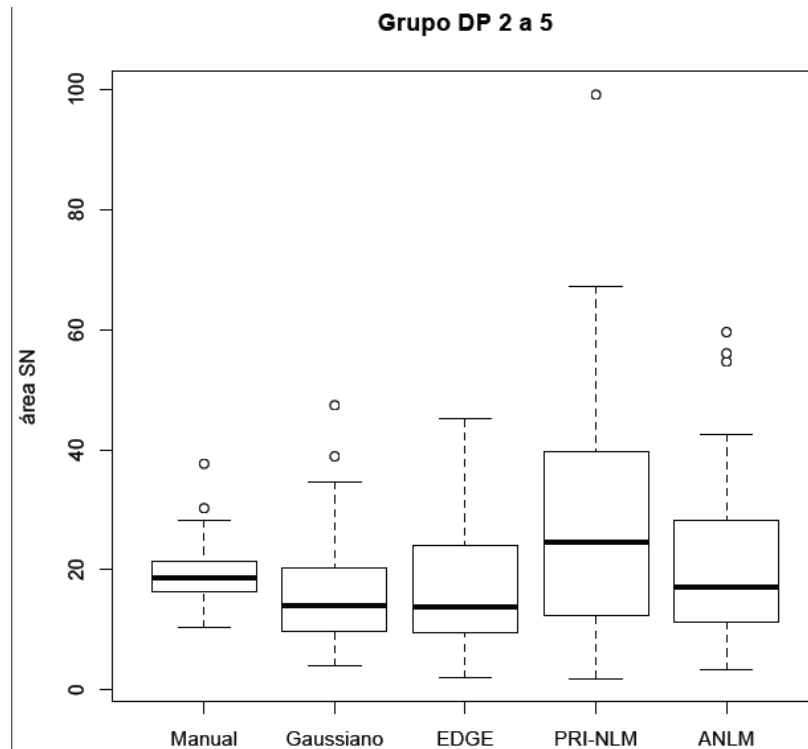


Figura 4-9. Diagrama de caixa de cada área distribuída por filtro para o grupo DP 2 a 5.

4.2.1.2 Discussão dos resultados

O processo de filtragem previamente utilizado foi comparado com uma nova abordagem à filtragem de imagens de RM e a uma outra utilizada num estudo prévio. A análise destes processos com base numa comparação dos valores da área para cada método de filtragem e uma segmentação manual realizada previamente permite aferir o grau de fiabilidade de cada metodologia.

Tal como esperado, os filtros *Edge-Preserving* e Gaussiano apresentam resultados semelhantes traduzidos numa subestimação das áreas. Por outro lado a performance dos dois novos filtros testados, PRI-NLM e ANLM não vai ao encontro dos resultados da análise realizada em imagens sintéticas apresentada no capítulo 3.

Este resultado não é inteiramente surpreendente devido à complexidade das imagens reais. A presente análise permite inferir sobre a prestação destes métodos de uma forma mais clara e segura.

No exemplo de imagem filtrada é visualmente perceptível que estes novos processos resultam em imagens filtradas de melhor qualidade, no entanto na análise quantitativa verifica-se que o filtro *Edge-Preserving* nos grupos de pacientes com DP permite a obtenção de áreas mais bem enquadradas com os resultados da segmentação manual do que o filtro PRI-NLM.

Para além disso este último filtro é extremamente sensível a variações de intensidade nas imagens, o que se traduz na grande dispersão dos resultados. Este facto está possivelmente relacionado com a imagem analisada utilizar dois processos de filtragem. Um processo inicial que define os pesos das ponderações a aplicar no segundo processo. Sendo que este processo tem como base um filtro NLM cujas propriedades assentam na procura de semelhanças na imagem, pode acontecer que o algoritmo considere algumas regiões como tendo um grau de semelhança que na realidade não existe, atribuindo-lhe um valor de intensidade da mesma ordem e assim introduzindo a tendência de sobrestimação das áreas da SN.

O filtro ANLM apresenta em todos os grupos as áreas médias mais próximas da segmentação manual e nenhuma diferença estatisticamente significativa. Ao contrário do filtro PRI-NLM não aparenta sofrer de uma dispersão acentuada, sendo calculada uma estimativa do ruído localmente, estimativa essa que é tida em conta nos parâmetros de funcionamento e controlo da filtragem.

O filtro ANLM aparenta ser o mais fiável e exacto dos analisados neste estudo, no entanto existe a necessidade de realçar a importância do processo de segmentação como variável não controlada neste estudo. O algoritmo *region-growing* dependente da marcação de *seed-points* apresenta como já foi referido anteriormente uma grande variabilidade dependendo do valor do limiar, *thr*, e dessa mesma marcação. Apesar de todo o estudo ter sido efectuado pelo mesmo utilizador mantendo os parâmetros tão constante quanto possível, há a possibilidade de os resultados obtidos não reflectirem na totalidade a extensão das diferenças. Tentou-se por isso durante a elaboração deste trabalho melhorar o processo de segmentação com recurso a outras técnicas, nomeadamente a utilização de um método alternativo de segmentação que utilizasse apenas um valor de limiar fixo, após normalização da intensidade da imagem recorrendo a uma *ROI* onde não se esperaria variação de intensidade. Neste processo regiões da imagem com intensidades superiores ao valor limite (a neuromelanina apresenta sinal hipertenso) seriam consideradas parte da região de interesse. Na prática tal processo revelou-se ineficaz, pois a gama de intensidades das imagens varia bastante de imagem para imagem, mesmo após um processo de normalização das mesmas. Esta estratégia foi por isso abandonada.

Outra abordagem foi melhorar o algoritmo existente, minimizando a dependência nos *seed points* e obrigando o algoritmo a procurar sempre a zona de maior intensidade como *seed point*. Conseguiu-se que este algoritmo funcionasse e possibilitasse algumas segmentações promissoras, mas as imagens analisadas possuem demasiadas regiões de alta intensidade que não pertencem à zona de interesse e no global este processo introduzia demasiados erros na

localização da zona a segmentar para ser viável. Por tal motivo a única alteração no processo de segmentação foi a afinação do valor de *thr* para o filtro ANLM utilizado na restante análise.

4.2.2. Variações da Neuromelanina na DP

Após a identificação e análise de novos processos de filtragem e segmentação decidiu-se utilizar o filtro ANLM, por apresentar os resultados mais promissores e como tal o valor de *thr* foi ajustado (testados vários *thr* na mesma imagem até se obter a melhor observação visual), sendo o valor fixado a 2,5%. Procedeu-se à quantificação da neuromelanina de todo o conjunto de imagens do estudo da DP disponíveis. Tal como já anteriormente referido, os objectivos foram: comparar o valor da área em doentes e controlos, avaliar o possível efeito da medicação no grupo DP denovo, estudar a evolução temporal da neuromelanina na progressão da doença e a sua assimetria.

4.2.2.1 Comparação entre Pacientes e Controlos

Para avaliar a capacidade da ferramenta em distinguir os diferentes grupos mediu-se a área média para os grupos de Controlo, DP denovo e DP 2 a 5, acompanhados dos respectivos valores *p* para o teste *Kruskal-Wallis* com comparações múltiplas (Tabela 4-6), uma vez que o valor $p < 0,05$ indica a presença de diferenças estatísticas entre os grupos em estudo. Esta avaliação foi feita com dados de todas as datas de aquisição (Primeira, 2 meses, 6 meses, 1 ano).

Tabela 4-6. Área média e valor *p* para os grupos estudados.

Grupo	Área média \pm dp (mm ²)	Valor <i>p</i> (Controlo Vs DP)
Controlo	26 \pm 7	
DP denovo	21 \pm 9	0,000288
DP 2 a 5	21 \pm 13	0,000126

Analisando os valores obtidos para a área média e valor p verifica-se que existe uma diferença significativa entre o grupo de controlo e os pacientes com DP independentemente de pertencerem ao grupo DP denovo ou DP 2 a 5. A distinção entre dois grupos de pacientes não é possível sendo que os dados recolhidos para o grupo DP 2 a 5 apresentam uma amplitude de variação elevada (Figura 4-10).

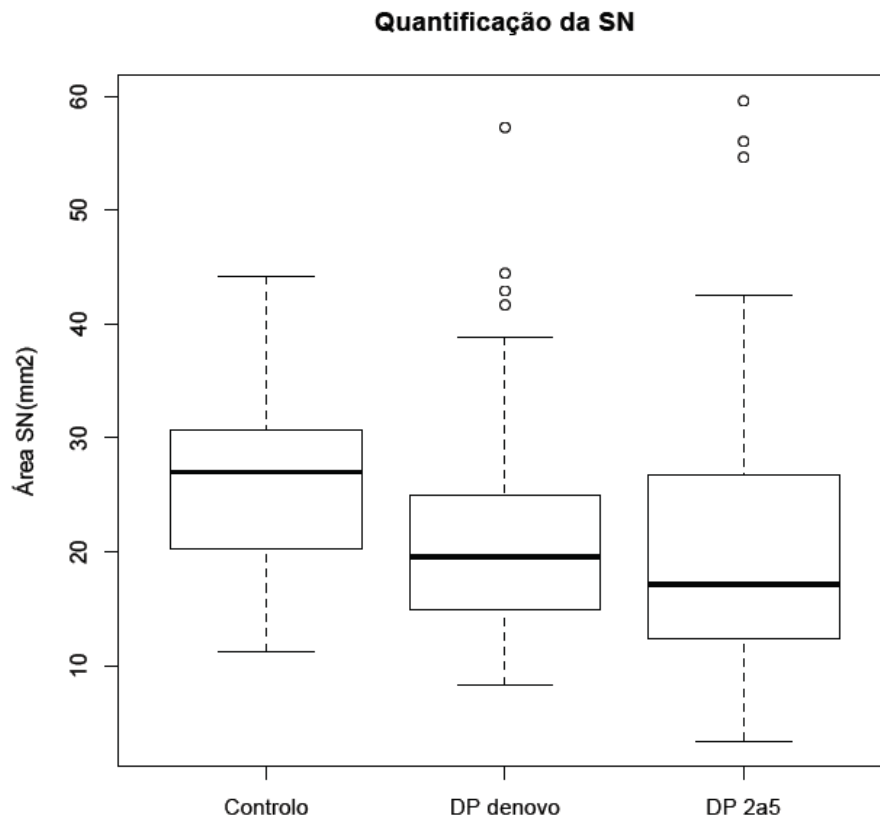


Figura 4-10. Diagrama de Caixa representando a área da SN para cada grupo.

4.2.2.2 Efeito da medicação no grupo DP denovo

A aquisição de imagens imediatamente após o diagnóstico permite averiguar a possibilidade de alterações na área da SN devido á medicação seguidamente iniciada. A área média para os pacientes pertencentes ao grupo DP denovo foi comparada para a primeira aquisição e aquisições seguintes (Tabela 4-7).

Tabela 4-7. Área média e valor p para o grupo DP denovo nas várias datas de aquisição.

Data de aquisição	Área média \pm dp
Primeira	21 \pm 10
2 meses	23 \pm 7
6 meses	19 \pm 8
1 ano	22 \pm 10

O teste *Kruskal-Wallis* obteve um valor $p > 0,05$ logo não foram detectadas diferenças significativas entre as áreas médias para as diferentes datas de aquisição. Uma análise visual permite dar uma perspectiva global destes resultados (Figura 4-11).

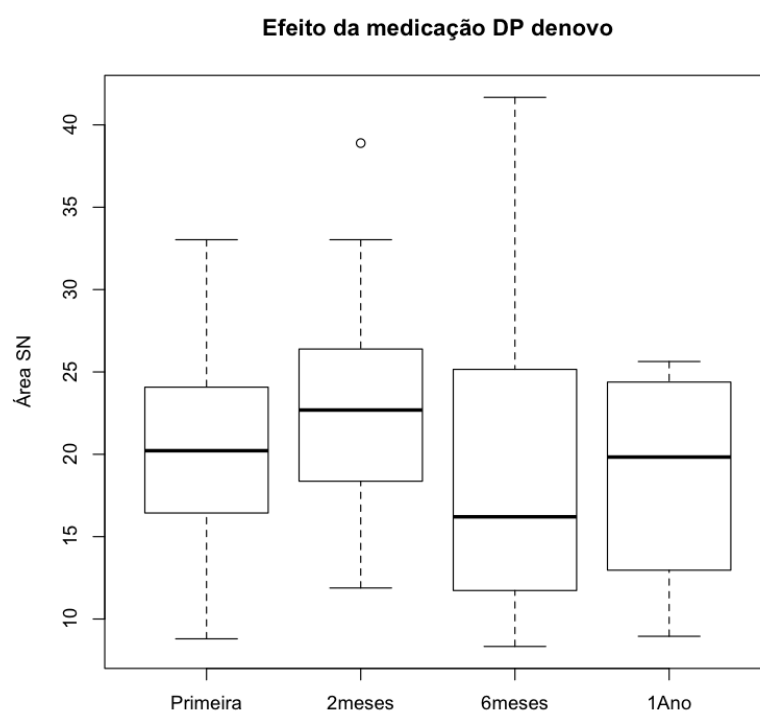


Figura 4-11. Área da SN para o grupo DP denovo nas diferentes aquisições.

Visualmente aparenta existir um ligeiro aumento nas áreas correspondentes à aquisição efectuada 2 meses após o diagnóstico inicial. Uma vez que os pacientes da aquisição a 2 meses são apenas 6, analisaram-se apenas estes 6 pacientes para todas as datas.

4.2.2.3 Evolução Temporal da Área nos grupos

A recolha de dados em diferentes dados após o diagnóstico do paciente permite averiguar a existência de alterações ao longo da progressão da doença. A análise dos dados obtidos em sujeitos saudáveis permite avaliar o grau de reprodutibilidade da metodologia utilizada. Neste estudo o período temporal analisado é de um ano.

Mais uma vez as áreas médias foram obtidas para cada grupo subdividido em instantes no tempo (Primeira, 2 meses, 6 meses, 1 Ano). Não foi efectuado o teste estatístico *Kruskal-Wallis* com comparações múltiplas uma vez que o teste global obteve um valor $p > 0,05$, não indicando a presença de diferenças estatísticas entre as áreas nas diferentes datas.

Tabela 4-8. Área média e valor p para cada grupo e todas as datas de aquisição.

Data de Aquisição	Grupo	Área média \pm dp
Primeira	Controlo	27 \pm 5
6 Meses		26 \pm 8
1 Ano		26 \pm 9
Primeira	DP denovo	21 \pm 10
2 Meses		23 \pm 7
6 Meses		19 \pm 8
1 Ano	DP 2 a 5	22 \pm 10
Primeira		23 \pm 15
6 Meses		19 \pm 7
1 Ano		20 \pm 13

As áreas obtidas não apresentam alterações significativas dependendo da data de aquisição.

No grupo de Controlo o valor médio permanece praticamente inalterado nas 3 aquisições. Já para o grupo DP denovo existe um ligeiro aumento aos 2 meses, seguido de uma redução aos 6 meses e novo aumento passado 1 ano. No entanto esta variação não excede os 4 mm². Visualmente verifica-se que a distribuição dos dados é maioritariamente homogénea, ainda que a amplitude de variação observada para o grupo DP2 a 5 fosse tendencialmente maior (Figura 4-12)

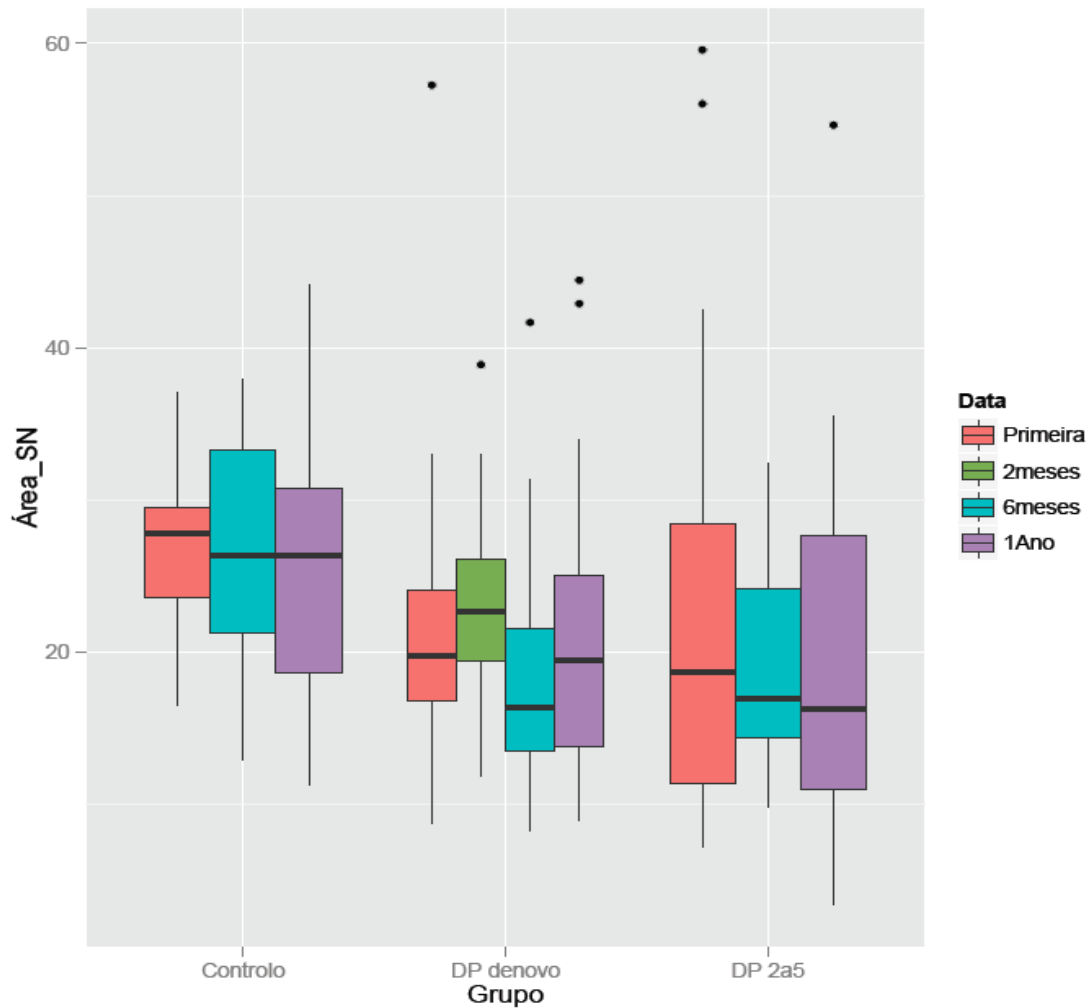


Figura 4-12. Diagrama de caixa para o grupo de controlo por data de aquisição.

4.2.2.4 Assimetria na DP

É relevante avaliar a assimetria na quantificação da SN para os grupos de pacientes uma vez que a redução na neuromelanina não é necessariamente igual em ambos os lados da SN [5].

A área média para os lados direito e esquerdo foi respectivamente de 20mm^2 e 22mm^2 com desvios padrão de 12mm^2 e 11mm^2 .

Na avaliação clínica realizada no HSM calcula-se o “*Score de Assimetria*” (Equação 4-2) que permite identificar o lado do paciente mais afectado pela doença, sendo teoricamente expectável que um dos lados da SN apresente uma menor área de neuromelanina para o lado mais afectado.

$$Score_{assimetria} = \frac{\text{ÁreaLado direito} - \text{ÁreaLado esquerdo}}{\text{Média}(\text{ÁreaLado direito}, \text{ÁreaLado esquerdo})} \quad (\text{Equação 4-2})$$

Se o valor do *Score* for positivo o lado direito será o mais afectado, caso contrário será o lado esquerdo. O lado mais afectado segundo a avaliação clínica do HSM foi comparado com os resultados da Equação 4-2 para todos os pacientes do grupo DP denovo e DP 2 a 5 (Tabela 4-9)

Tabela 4-9- Percentagem de erro para a correlação entre a assimetria detectada clinicamente e com recurso às áreas da neuromelanina.

Grupo	% de erro em cada grupo
DP denovo	33,3%
DP 2 a 5	30%

A comparação entre todos os resultados das duas avaliações revelou um erro máximo de 33,3% para o Grupo DP denovo e 30% para o Grupo DP 2 a 5.

4.2.2.5 *Discussão de Resultados*

O principal objectivo da quantificação da neuromelanina é a identificação de doentes com DP. Como tal é vital que o processo de filtragem não afecte negativamente o processo de segmentação que se lhe segue.

Nos resultados obtidos é possível verificar que a introdução do novo processo de filtragem permitiu uma clara distinção entre o Grupo de Controlo e os Grupos DP denovo e DP 2 a 5. Já a distinção entre os doentes em diferentes estádios da doença, esta não parece ser possível existindo ainda a possibilidade desta diferença nem sequer existir, pois na altura do diagnóstico pode já ter ocorrido grande parte da redução na área da SN.

Um dos objectivos do estudo prende-se com a possibilidade de que a medicação tomada pelos pacientes após o diagnóstico possa afectar a área da neuromelanina. Nos dados recolhidos verifica-se que apesar de não existirem alterações significativas, a aquisição feita dois meses depois apresenta um ligeiro aumento para o valor da área média, bem como da distribuição de todos os valores no diagrama de caixa. Este aumento é passageiro pois aos 6 meses ocorre uma nova redução. De momento não há explicação para estes resultados, sendo necessário antes de mais comprová-lo repetindo o estudo num maior número de doentes, e se possível após optimização do protocolo de aquisição de modo a melhorar a RSR e contraste das imagens e assim reduzir a variabilidade deste tipo de medições.

A evolução temporal dos pacientes não detectou alterações relevantes nos valores da área com o tempo, o que tal como foi mencionado para a distinção entre o grupo DP de novo e

DP 2 a 5 pode indicar que o padrão de perda já tinha ocorrido. Os valores para o grupo de controlo são os mais constantes tal como era expectável o que valida de certa forma o método utilizado, indicando uma boa reprodutibilidade dos resultados. No entanto a amostra é bastante reduzida o que impede a generalização dos resultados.

A análise da Assimetria na DP é um parâmetro extremamente relevante no diagnóstico da doença. A investigação da correlação entre a variação da área da neuromelanina e o lado clinicamente mais afectado pela doença representa um passo importante nesta área. O estudo da área neste trabalho conclui que na maioria dos casos estudados o lado com menor área de neuromelanina nos pacientes corresponde ao lado clinicamente afectado. No entanto será necessário um estudo mais aprofundado no futuro devido ao reduzido tamanho da amostra e aos problemas identificados com a qualidade das imagens.

Globalmente conseguiu aumentar-se a eficiência e robustez do programa com recurso a novas técnicas de filtragem e refinamento do processo de segmentação (afinação do limiar utilizado para o novo processo de filtragem). No entanto a utilização de *seed points* definidos manualmente pode ainda introduzir uma grande variabilidade nos resultados obtidos. Esta variabilidade está associada à presença de artefactos em algumas imagens e nalguns casos na presença de zonas de intensidade superior à da neuromelanina na sua vizinhança, o que não era expectável. Algumas destas zonas foram identificadas como sendo vasos sanguíneos o que as torna difíceis de remover pois estão associadas à anatomia do indivíduo.

Na sua grande maioria e quando não são regiões anatómicas, estas zonas de alta intensidade aparentam não estar relacionadas com o software utilizado mas sim com artefactos e diferentes gamas de intensidade nas próprias imagens (Figura 4-4).

4.3. A neuromelanina e o Tremor Essencial

Neste estudo pretendeu-se avaliar se o TE afecta a neuromelanina tal como acontece com a DP. Os resultados desta comparação permitem tirar elações sobre os mecanismos de ambas as doenças e até que ponto existem semelhanças ou diferenças entre as mesmas. Os grupos em análise são o grupo de controlo, o grupo DP formado com os elementos do grupo DP denovo e o grupo do Tremor incluindo todos os pacientes com TE. A caracterização da amostra e a metodologia seguida neste estudo encontram-se já descritos na secção 4.1.

4.3.1. Resultados

A área média e os valores p do teste Kruskal-Wallis com comparações múltiplas foram registados (Tabela 4-10), uma vez que o teste estatístico inicial obteve um valor $p < 0,05$.

Tabela 4-10. Área média e valor p para comparação entre cada grupo de doentes e os controlos.

Grupo	Área média \pm (mm ²)	Valor p(Controlos vs)
Controlos	27 \pm 5	
Tremor	26 \pm 6	1
DP	21 \pm 10	0,0006

Os valores obtidos para a área média dos grupos bem como o valor p das comparações múltiplas revelam que os mesmos são praticamente idênticos para o grupo de controlo e o grupo com TE, sendo mais baixos para o grupo com DP. Esta tendência é confirmada visualmente pelo diagrama de caixa da figura 4-13.

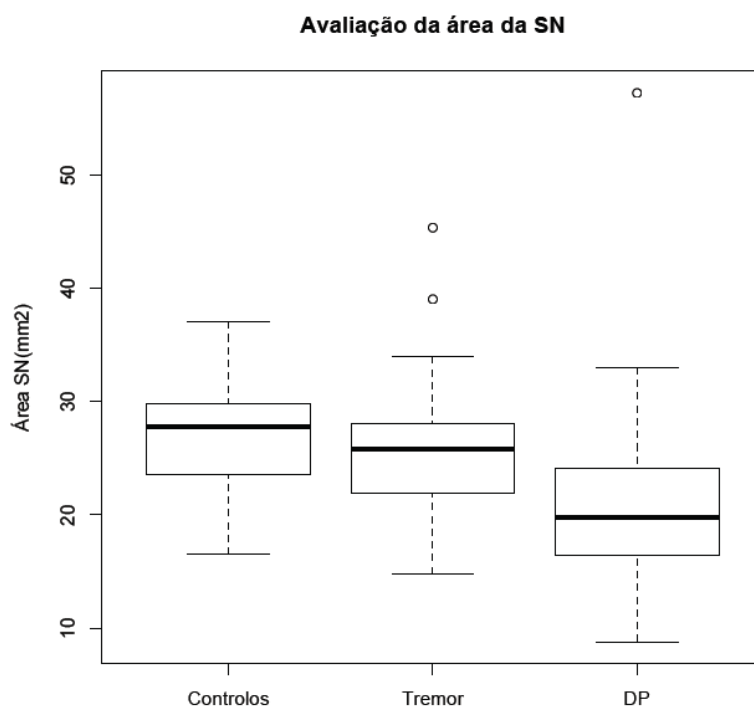


Figura 4-13. Diagrama de caixa da área da SN para os 3 grupos

4.3.2. Discussão de Resultados

No âmbito do desenvolvimento da interface para a quantificação da neuromelanina e das alterações introduzidas na mesma ao longo deste trabalho, este estudo apresenta uma nova aplicação desta ferramenta na investigação clínica, que não tinha sido ainda explorada no trabalho que o precedeu [11].

Analisando os resultados da quantificação realizada para os 3 grupos em estudo conclui-se que existe uma diferença estatisticamente significativa entre os doentes com DP e o grupo de controlos, sendo que esta diferença não existe para TE.

Com estes resultados pode-se sugerir que os pacientes com TE não sofrem alterações na região da neuromelanina ao contrário dos pacientes com DP cuja região SN é severamente afectada, sendo esta conclusão realçada pelo facto de os pacientes com DP avaliados neste estudo terem o diagnóstico clínico recente. Estes resultados fazem parte do primeiro estudo sobre as alterações na neuromelanina no TE. O Estudo faz parte de um artigo que foi submetido para publicação e se encontra em fase de avaliação[47].

Mesmo com uma amostra pequena estes resultados podem vir a revelar-se como um importante marcador na distinção das duas patologias em ambiente clínico.

Uma amostra de maior dimensão é necessária para verificar a validade destes resultados.

5. Conclusões e Perspectivas Futuras

O trabalho aqui apresentado teve como objectivo principal a optimização da interface computacional de análise da neuromelanina em imagens de RM, focando-se na filtragem e segmentação de imagens de modo a permitir a sua utilização num ambiente clínico.

Este objectivo foi atingido após a realização de vários testes com imagens sintéticas e reais utilizando um conjunto de filtros seleccionados como opções válidas para preservar as características da imagem removendo eficazmente o ruído inerente ao processo de aquisição das mesmas.

A optimização do algoritmo de segmentação revelou-se um processo infrutífero devido sobretudo à incapacidade de encontrar uma solução que libertasse o algoritmo da utilização de um *seed point* manual como ponto de partida para ao seu funcionamento. No entanto uma optimização do algoritmo já instalado foi possível para o novo processo de filtragem o que aparenta ter resultado em melhorias globais na utilização do programa. Seria interessante e relevante, num projecto futuro, alterar a funcionalidade do algoritmo, tornando-o num processo plenamente automático, eliminando assim o erro inerente à escolha do *seed point* pelo utilizador e consequente variabilidade nos resultados.

A análise das imagens sintéticas apesar de algo limitada permitiu tirar conclusões preliminares acerca das propriedades das imagens que mais influenciam a filtragem, sendo uma das mais interessantes a relevância do nível de contraste no desempenho dos processos. Verificou-se que o nível de contraste influencia muito mais os resultados do que a RSR, o que é bastante interessante para optimização futura dos parâmetros da sequência de aquisição. Esta análise foi apresentada no *6th Workshop on Biomedical Engineering* sob a forma de um poster e encontra-se em fase de preparação um artigo intitulado (*"Investigating the Optimal Filtering Procedure for Segmentation of Neuromelanin-Sensitive Magnetic Resonance Images"*) que aborda em maior detalhe a influencia da filtragem nos resultados da segmentação das imagens.

Uma nova optimização da sequência de aquisição tendo em conta estas observações deve ser considerada como fundamental e indispensável em qualquer estudo futuro. Ao longo de toda a análise das imagens recolhidas, a presença de artefactos, o elevado nível de ruído, regiões de alta intensidade artificiais e não relacionadas com a anatomia da região, revelaram-se como um elemento limitante na aplicação da metodologia desenvolvida e correcta interpretação dos resultados obtidos.

Outro objectivo do trabalho foi o estudo das alterações na neuromelanina com o tempo e a assimetria da mesma na progressão da DP. O estudo realizado revelou que a ferramenta no seu estado actual consegue distinguir com rigor os controlos dos pacientes com DP sendo esta a observação mais importante para uma futura utilização.

Foi no entanto sugerido pelos resultados obtidos que o efeito da medicação em doentes com diagnóstico recente e a progressão da doença no período de um ano podem não ser detectáveis devido a limitações nesta metodologia, ou que tais alterações não se manifestem a nível da neuromelanina.

Paralelamente ao estudo da neuromelanina na DP realizou-se um estudo em pacientes com TE, tendo sido observadas diferenças entre a DP e o TE na SN. Este resultado é muito promissor a nível da investigação clínica e possíveis implicações para a compreensão dos mecanismos destas patologias. Constitui também uma demonstração das potencialidades da ferramenta desenvolvida podendo ser utilizada no futuro como auxiliar para o diagnóstico diferencial entre as duas patologias.

No futuro é desejável um aumento da população em estudo e a aquisição contínua de dados em períodos de tempo superior aos aqui estudados (máximo de 1 ano).

Bibliografia

- [1] A. Samii, J. G. Nutt, and B. R. Ransom, "Parkinson ' s disease," vol. 363, pp. 1783–1793, 2004.
- [2] "The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS): status and recommendations.," *Mov. Disord.*, vol. 18, no. 7, Jul. 2003.
- [3] J. Jankovic, "Parkinson's disease: clinical features and diagnosis.," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 79, no. 4, pp. 368–76, Apr. 2008.
- [4] C. a Davie, "A review of Parkinson's disease.," *Br. Med. Bull.*, vol. 86, pp. 109–27, Jan. 2008.
- [5] P. Damier, E. C. Hirsch, Y. Agid, and a M. Graybiel, "The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease.," *Brain*, vol. 122 (Pt 8, pp. 1437–1448, 1999.
- [6] D. J. Brooks, "Imaging approaches to Parkinson disease.," *J. Nucl. Med.*, vol. 51, no. 4, pp. 596–609, Apr. 2010.
- [7] S. T. Schwarz, T. Rittman, V. Gontu, P. S. Morgan, N. Bajaj, and D. P. Auer, "T1-Weighted MRI shows stage-dependent substantia nigra signal loss in Parkinson's disease.," *Mov. Disord.*, vol. 26, no. 9, pp. 1633–1638, Aug. 2011.
- [8] R. a Menke, J. Scholz, K. L. Miller, S. Deoni, S. Jbabdi, P. M. Matthews, and M. Zarei, "MRI characteristics of the substantia nigra in Parkinson's disease: a combined quantitative T1 and DTI study.," *Neuroimage*, vol. 47, no. 2, pp. 435–41, Aug. 2009.
- [9] C. Ohtsuka, M. Sasaki, K. Konno, M. Koide, K. Kato, J. Takahashi, S. Takahashi, K. Kudo, F. Yamashita, and Y. Terayama, "Changes in substantia nigra and locus coeruleus in patients with early-stage Parkinson's disease using neuromelanin-sensitive MR imaging.," *Neurosci. Lett.*, vol. 541, pp. 93–8, Apr. 2013.
- [10] K. Ogisu, K. Kudo, M. Sasaki, K. Sakushima, I. Yabe, H. Sasaki, S. Terae, M. Nakanishi, and H. Shirato, "3D neuromelanin-sensitive magnetic resonance imaging with semi-automated volume measurement of the substantia nigra pars compacta for diagnosis of Parkinson's disease.," *Neuroradiology*, vol. 55, no. 6, pp. 719–24, Jun. 2013.
- [11] Joana Vilar Lobato Ferreira, "Quantificação da Neuromelanina," FCT-UNL, 2013.
- [12] M. a. Balafar, a. R. Ramli, M. I. Saripan, and S. Mashohor, "Review of brain MRI image segmentation methods," *Artif. Intell. Rev.*, vol. 33, no. 3, pp. 261–274, Jan. 2010.
- [13] C. E. Myers, "Memory Loss and the Brain Artwork," 2006. [Online]. Available: <http://www.memorylossonline.com/glossary/substantianigra.html>.
- [14] M. Sasaki, E. Shibata, K. Tohyama, K. Kudo, J. Endoh, K. Otsuka, and A. Sakai, "Monoamine neurons in the human brain stem: anatomy, magnetic resonance imaging findings, and clinical implications.," *Neuroreport*, vol. 19, no. 17, pp. 1649–54, Nov. 2008.

- [15] G. C. College, "Substantia Nigra." [Online]. Available: <http://www.gwc.maricopa.edu/class/bio201/parkn/jcadis51.htm>.
- [16] H. Oikawa, M. Sasaki, Y. Tamakawa, S. Ehara, and K. Tohyama, "The Substantia Nigra in Parkinson Disease : Proton Density – Weighted Spin-Echo and Fast Short Inversion Time Inversion-Recovery MR Findings," no. December, pp. 1747–1756, 2002.
- [17] A. Hughes, S. Daniel, and A. Lees, "Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease.," *Neurology*, no. 57, pp. 1497–9, 2001.
- [18] W. D. F. P. E. T. Ct, S. P. Mu, and T. Beyer, "Radiation Exposure of Patients Undergoing Examinations," vol. 46, no. 4, pp. 608–613, 2005.
- [19] N. Pyatigorskaya, C. Gallea, D. Garcia-Lorenzo, M. Vidailhet, and S. Lehericy, "A review of the use of magnetic resonance imaging in Parkinson's disease," *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, p. 1756285613511507–, Nov. 2013.
- [20] M. Sasaki, E. Shibata, K. Tohyama, J. Takahashi, K. Otsuka, and K. Tsuchiya, "Neuromelanin magnetic resonance imaging of locus ceruleus and substantia nigra in Parkinson ' s disease," *Neuroreport*, vol. 17, no. 1, pp. 1215–1218, 2006.
- [21] K. Kashihara, T. Shinya, and F. Higaki, "Neuromelanin magnetic resonance imaging of nigral volume loss in patients with Parkinson's disease.," *J. Clin. Neurosci.*, vol. 18, no. 8, pp. 1093–1096, Aug. 2011.
- [22] M. D. Elan D. Louis, "Essential Tremor as a Neuropsychiatric Disorder," *J Neurol Sci.*, vol. 289, no. 212, pp. 1–10, 2010.
- [23] D. Hardesty, D. Maraganore, J. Matsumoto, and E. Louis, "Incresead risk of head tremor in women with essential tremor:longitudinal data from the Rochester Epidemiology Project," *Mov Disord*, vol. 1, pp. 529–533, 2004.
- [24] E. Louis, J. Vonsattel, L. Honig, A. Lawton, C. Moskowitz, and B. Ford, "Essential tremor associated with pathologic changes in the cerebellum.," *Arch Neurol*, no. 63, pp. 1189–1193, 2006.
- [25] E. Louis, J. Vonsattel, L. Honig, A. Rajput, and C. Robinson, "Neuropathological changes in essential tremor.33 cases compared with 21 controls.," *Brain*, no. 130, pp. 3297–3307, 2007.
- [26] J. Axelrad, E. Louis, L. Honig, I. Flores, G. Ross, and R. Pahwa, "Reduced Purkinje cell number in essential tremor: a postmortem study.," *Arch Neurol*, no. 65, pp. 101–107, 2008.
- [27] H. Abboud, A. Ahmed, and H. H. Fernandez, "Essential tremor: choosing the right management plan for your patient.," *Cleve. Clin. J. Med.*, vol. 78, no. 12, pp. 821–8, Dec. 2011.
- [28] R. B. Lufkin, *The MRI Manual*. 1990.
- [29] D. W. McRobbie, E. A. Moore, M. J. G. And, and Martin R. Prince, "MRI From Picture to Proton."
- [30] D. Noll, "Notes on MRI,Part 1," 2006. [Online]. Available: <http://web.eecs.umich.edu/~dnoll/BME516/mri1.pdf>.

- [31] L. Bitar, "MR pulse sequences: what every radiologist wants to know but is afraid to ask.," *Radiographics*, no. 26, pp. 513–37, 2006.
- [32] A. Boyle, "An interactive taxonomy of MR imaging sequences," *Radiographics*, 2006.
- [33] S. M. I. Group, "Magnetic Resonance - Technology Information Portal." [Online]. Available: http://www.mr-tip.com/gifs/pstd_2.gif.
- [34] H. and S. P. Gudbjartsson, "The rician distribution of noisy mri data," *Magn. Reson. Med.*, vol. 34(6), pp. p. 910–914, 1995.
- [35] R. A. Haddad and A. N. Akansu, "A Class of Fast Gaussian Binomial Filters for Speech and Image Processing," *IEEE Trans. Acoust. Speech Signal Process.*, vol. 39, pp. 723–727, 1991.
- [36] H. J. Blinchikoff and A. I. Zverev, *Filtering in the Time and Frequency Domains*. .
- [37] A. Pinheiro, H. Lage, and J. Machado, "Processamento e Reconhecimento de Imagem Médica." .
- [38] N. N. and N. Papamarkos, "Color reduction for complex document images," *Int. J. Imaging Syst. Technol. Vol. 19*, 2009.
- [39] H. Liu, C. Yang, N. Pan, E. Song, and R. Green, "Denoising 3D MR images by the enhanced non-local means filter for Rician noise.," *Magn. Reson. Imaging*, vol. 28, no. 10, pp. 1485–1496, Dec. 2010.
- [40] A. Buades, B. Coll, and J. Morel, "A review of image denoising algorithms, with a new one," *Multiscale Model. Simul.*, vol. vol.4, pp. 490–530, 2005.
- [41] J. V Manjón, P. Coupé, A. Buades, D. Louis Collins, and M. Robles, "New methods for MRI denoising based on sparseness and self-similarity.," *Med. Image Anal.*, vol. 16, no. 1, pp. 18–27, Jan. 2012.
- [42] P. Coupé, "MRI denoising-Pierrick Coupé." [Online]. Available: <https://sites.google.com/site/pierrickcoupe/softwares/denoising-for-medical-imaging/mri-denoising/mri-denoising-software>.
- [43] P. Coup and C. Ha, "Adaptive Multiresolution Non-Local Means Filter for 3D MR Image Denoising," pp. 1–21, 2011.
- [44] D. Kellner, "MATLABCENTRAL-Fileexchange-Region-Growing." [Online]. Available: <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/32532-region-growing--2d-3d-grayscale->.
- [45] A. Hughes, Y. Ben-Shlomo, and S. Daniel, "What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study," *Neurology*, no. 42, pp. 1142–6, 1992.
- [46] G. Deuschl, P. Bain, and M. Brin, "Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor. Ad Hoc Scientific Committee.," *Mov Disord*, no. 13(suppl 3), pp. 2–23, 1998.
- [47] S. Reimão, P. Pita Lobo, D. Neutel, L. Guedes, M. Coelho, M. Rosa, P. Azevedo, J. Ferreira, D. Abreu, N. Gonçalves, R. Nunes, J. Campos, and J. Ferreira, "Substantia nigra neuromelanin-MR imaging differentiates Essential tremor from 'denovo' Parkinson's disease," 2014.

Contagem de Pixels por Filtro no conjunto das imagens sintéticas:

Contraste	RSR	Gaussiano	Edge	ANLM	PRI-NLM
10%	10	1136	1109	1197	1175
30%	10	845	851	1111	1178
50%	10	769	804	1155	1180
70%	10	757	761	1170	1180
90%	10	733	751	1180	1180
110%	10	706	736	1181	1181
10%	20	1128	1120	1173	1179
30%	20	859	862	1179	1182
50%	20	783	804	1183	1183
70%	20	753	774	1183	1183
90%	20	738	757	1183	1183
110%	20	711	730	1183	1183
10%	30	1103	1123	1181	1183
30%	30	854	865	1183	1183
50%	30	783	792	1183	1183
70%	30	768	771	1183	1183
90%	30	713	768	1183	1183
110%	30	713	734	1183	1183
10%	40	1114	1137	1183	1183
30%	40	845	868	1183	1183
50%	40	787	790	1183	1183
70%	40	749	777	1183	1183
90%	40	714	752	1183	1183
110%	40	713	722	1183	1183
10%	50	1124	1126	1183	1183
30%	50	851	879	1183	1183
50%	50	783	791	1183	1183
70%	50	752	779	1183	1183
90%	50	713	759	1183	1183
110%	50	713	721	1183	1183