

# **Seguimento de Células e Cálculo da sua Deformação em Microcanais: Um Método Automático**

**Bruna Rafaela Pereira Taboada**

Relatório Final do Trabalho de Projeto apresentado à

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**

**Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em

**Tecnologia Biomédica**

Dezembro de 2013



# **Seguimento de Células e Cálculo da sua Deformação em Microcanais: Um Método Automático**

**Bruna Rafaela Pereira Taboada**

Relatório Final do Trabalho de Projeto apresentado à

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão  
Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

Orientador:

**Dr. Fernando Monteiro**

**Dr. Rui Lima**

Este trabalho de projeto inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

Dezembro de 2013



*“[...] talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito [..]  
Não sou o que deveria ser,  
mas graças a Deus, não sou o que era antes.”*

***Martin Luther King***



*À minha avó.*



# Agradecimentos

Para a realização deste relatório final muitos foram aqueles que me apoiaram, de várias formas e nas diversas etapas deste projeto. Em especial, gostaria de agradecer:

ao Prof Dr. Fernando Monteiro, por todos os conhecimentos transmitidos ao longo desta etapa, bem como ao longo de todo o meu percurso académico, por toda a disponibilidade, paciência incentivo e confiança depositada em mim;

ao Prof. Dr. Rui Lima, pela sugestão do tema e pelo ânimo mostrado com o meu trabalho, bem como por todos os ensinamentos transmitidos, dedicação, disponibilidade, confiança, motivação e esperança;

à Prof. Dr. Ana Isabel Pereira pela compreensão, motivação e apoio ao longo deste ano;

à minha mãe Maria Zita Pereira, por todo o amor, por me incentivar e nunca desistir de mim, apoiando-me sempre em todas as minhas decisões, e principalmente pela oportunidade que me deu de poder estudar;

ao meu namorado, Pedro Martinho, pelo amor, apoio, compreensão, paciência e motivação ao longo deste projeto e por aturar a minha teimosia e insistir comigo;

aos meus colegas Raquel Rodrigues, Vera Faustino, Diana Cidre, Diana Pinho, David Bento e Elmano Pinto, pela sua ajuda, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio e pela companhia feita ao longo deste projeto.

Agradeço também o apoio financeiro concedido pelo Global COE Program 2007 “Global Nano-Biomedical Engineering Education and Research Network”, Japão, a ajuda concedida pela Fundação para a Ciência e Tecnologia no âmbito dos projetos PTDC/SAU-BEB/108728/2008, PTDC/SAU-BEB/105650/2008, PTDC/EME-MFE/ 099109/2008 e PTDC/SAU-ENB/116929/2010, COMPETE, QREN e União Europeia (FEDER).



## Resumo

A deformação dos glóbulos vermelhos ao longo do escoamento sanguíneo tem sido cada vez mais estudada, uma vez que o seu conhecimento abre caminhos para diagnosticar diversas patologias. Assim, têm surgido vários métodos para medir este fenómeno, bem como técnicas de fabricação de microcanais transparentes que permitem estudar em detalhe a deformabilidade das células sanguíneas.

Os métodos manuais existentes para calcular a deformação dos glóbulos vermelhos são exaustivos, demorados e propícios à ocorrência de erros por parte dos utilizadores. Assim, existe a necessidade de desenvolver métodos automáticos de forma a eliminar estes problemas.

Neste trabalho, utilizando técnicas de processamento de imagem desenvolveu-se um método automático (*MKHtrackCells*) para o seguimento de células ao longo de microcanais e cálculo do seu índice de deformação.

O método proposto foi utilizado para estudar o comportamento de glóbulos vermelhos humanos ao longo de um microcanal com uma microestenose e de uma contração hiperbólica. Ambos os microcanais foram fabricados usando a técnica de litografia suave.

Os resultados obtidos demonstram que o método proposto é uma técnica promissora para o seguimento de células, bem como para a determinação do seu comportamento fisiológico ao longo de microcanais.

**Palavras-chave:** Seguimento de Células, Índice de Deformação, Processamento de Imagem.



# Abstract

## Cells Tracking and Calculation of its Deformability in Microchannels: an Automatic Method

The deformation of red blood cells along the blood flow has been increasingly studied, since its knowledge may demonstrate the ability to diagnose several pathologies. Thus, many methods for measuring this phenomenon have been proposed, as well as transparent microchannels manufacturing techniques allows to study blood cells deformability in detail.

Current manual methods to calculate red blood cells deformability are labor intensive, time consuming and may introduce user errors into the data. Hence, it is crucial to develop automatic methods in order to eliminate those problems.

In this work, by using image processing technique, an automatic method was developed (*MKHtrackCells*) not only to track cells along microchannels and but also to calculate their deformability.

The proposed method was used to study the behavior of human red blood cells along a microchannel with a microstenosis and with a hyperbolic contraction. Both microchannels were fabricated using a soft lithography technique.

The results have shown that the proposed method is a promising technique for cells tracking and to determine their dynamical behavior along the microchannel.

**Keywords:** Cells Tracking, Deformation Index, Image Processing



# Publicações

## Publicação 1

TABOADA, B., MONTEIRO, F. C. e LIMA, R., Erythrocytes tracking through a microchannel using an automatic method of image analysis, *I Encontro de Jovens Investigadores do Instituto Politécnico de Bragança*, 15 e 16 de Novembro, Bragança, Portugal, 2013.

## Publicação 2

MONTEIRO, F. C., TABOADA, B. e LIMA, R., Visualization of red blood cells flowing through a PDMS microchannel with a microstenosis: an image analysis assessment". *IV ECCOMAS Thematic Conference on Computational Vision and Medical Image Processing*, 14-16 Outubro, Funchal, Portugal, 2013.

## Publicação 3

TABOADA, B., BENTO, D., PINHO, D., PEREIRA, A. I. e LIMA, R., Cell-free Layer Measurements in Bifurcating Microchannels: a global approach, *Livro de Resumos do XVI Congresso da Associação Portuguesa de Investigação Operacional*, 3-5 de Junho, Bragança, Portugal, p.30, 2013.

## Publicação 4

PINTO, E., TABOADA, B., RODRIGUES, R., FAUSTINO, V., PEREIRA, A. e LIMA, R., Cell Free Layer (CFL) Analysis in a Polydimethylsiloxane (PDMS) Microchannel: a Global Approach". *WebmedCentral BIOMEDICAL ENGINEERING*; 4(8):WMC004374, 2013.

### **Publicação 5**

RODRIGUES, R.; FAUSTINO, V.; PINHO, D.; PINTO, E.; CIDRE, D.; YAGINUMA, T.; TABOADA, B.; BENTO, D. e LIMA, R., Separation and deformation of red blood cells in PDMS microchannels, *Abstracts book of the Iberian meeting on rheology: "Fundamental and applied rheology"*, 4-6 Setembro, Málaga, Espanha, p.93, 2013.

### **Publicação 6**

PINTO, E., TABUADA, B., FAUSTINO, V., CIDRE, D., RODRIGUES, R., MIRANDA, J., GARCIA, V. e LIMA, R., Blood flow in microchannels manufactured by a low cost technique: xurography, *Abstracts book of the Iberian meeting on rheology: "Fundamental and applied rheology"*, 4-6 Setembro, Málaga, Espanha, p.94, 2013.

### **Publicação 7**

PINTO, E., TABOADA, B., FAUSTINO, V., CIDRE, D., RODRIGUES, R., MIRANDA, J., GARCIA, V. e LIMA, R., Blood flow in microchannels manufactured by a low cost technique: xurography, in *Perspectives in Fundamental and Applied Rheology*, Rubio-Hernandez, F.J., et al. (Eds), p.285-290, ISBN 978-84-616-5245-7, 2013.

### **Publicação 8**

RODRIGUES, R.O., FAUSTINO, V., PINHO, D., PINTO, E., CIDRE, D., YAGINUMA, T., TABOADA, B., BENTO, D. e LIMA, R., Separation and deformation of red blood cells in PDMS microchannels, in: *Perspectives in Fundamental and Applied Rheology*, Rubio Hernandez, F.J., et al. (Eds), 2nd Edition (In Press). ISBN 978-84- 616-5245-7

# Conteúdo

<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>xv</b>
<b>Capítulo 1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Motivação .....	1
1.2 Estrutura do relatório .....	2
<b>Capítulo 2. Fundamentação Teórica .....</b>	<b>3</b>
2.1 Constituição do sangue .....	3
2.2 Reologia do sangue .....	6
2.2.1 Comportamento dos fluidos .....	7
2.2.2 Velocidade de escoamento.....	8
2.2.3 Comportamento reológico em microcanais .....	9
<b>Capítulo 3. Revisão de Literatura.....</b>	<b>11</b>
3.1 Escoamento sanguíneo.....	11
3.2 Seguimento de células .....	18
<b>Capítulo 4. Processamento de Imagem .....</b>	<b>21</b>
4.1 Seguimento de objetos .....	21
4.1.1 Seleção das características de interesse para o seguimento .....	24
4.1.2 Detecção do objeto.....	24
4.1.3 Seguimento.....	25
4.2 Segmentação .....	26

4.2.1	Segmentação baseada no histograma ( <i>Thresholding</i> ).....	27
4.2.2	Transformada <i>watershed</i> .....	28
4.3	Fluxo ótico .....	32
<b>Capítulo 5. Método Proposto - <i>MKHtrackCells</i> .....</b>		<b>39</b>
5.1	Pré-processamento .....	39
5.2	Cálculo do gradiente e transformada <i>watershed</i> .....	43
5.3	Fluxo ótico .....	48
5.4	Obtenção das características das regiões .....	50
5.5	Seguimento .....	52
<b>Capítulo 6. Resultados e Discussões .....</b>		<b>55</b>
6.1	Microcanal com uma microestenose.....	55
6.2	Microcanal hiperbólico .....	63
<b>Capítulo 7. Conclusões e Trabalhos Futuros .....</b>		<b>73</b>
7.1	Conclusões .....	73
7.2	Trabalhos futuros .....	75
<b>Referências Bibliográficas.....</b>		<b>77</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 2.1:</b> Constituição do sangue [1].	4
<b>Figura 2.2:</b> Dimensões de um eritrócito [56].	4
<b>Figura 2.3:</b> Comportamentos dos fluidos sujeitos a tensões de corte [54].	7
<b>Figura 2.4:</b> Representação dos perfis de velocidades para Hct <1% e Hct superior [30].	8
<b>Figura 2.5:</b> a) Efeito de Fahraeus em capilares de vidro. b) Distribuição do Hct [30].	9
<b>Figura 2.6:</b> Efeito de Fahraeus-Lindqvist. Variação da viscosidade em função do diâmetro do microcanal [30].	10
<b>Figura 3.1:</b> Técnica de aspiração por micropipeta [28].	12
<b>Figura 3.2:</b> Em cima: aspiração por micropipeta de um GV normal. Em baixo: aspiração por micropipeta de um GV infetado com malária [28].	13
<b>Figura 3.3:</b> Cálculo do índice de deformação.	14
<b>Figura 3.4:</b> a) Sequência de deformação de um GV saudável. b) GVs rígidos por influência do glutaraldeído [5].	15
<b>Figura 3.5:</b> Escoamento de GVs num microcanal com Hct a 10% [17].	16
<b>Figura 3.6:</b> Avaliação da deformação dos eritrócitos na linha central do microcanal. a) Ilustração das 12 regiões utilizadas para a análise do índice de deformação dos GVs. b) Média do índice de deformação nas 12 regiões utilizando quatro caudais diferentes: $Q=0.11\text{ml/h}$ , $Q=1.11\text{ml/h}$ , $Q=2.27\text{ml/h}$ e $Q=4.2\text{ml/h}$ . Os valores medidos são expressos como a média $\pm$ desvio padrão de acordo com uma análise do teste $t$ com um nível de confiança de 95% [57].	17
<b>Figura 3.7:</b> Determinação da trajetória de células usando o plugin <i>MTrackJ</i> disponível no <i>software Image J</i> [17].	20
<b>Figura 4.1:</b> Representação de objetos. (a) Centróide- (b) vários pontos. (c) Forma retangular. (d) Forma elíptica. (e) Forma articulada. (f) Modelo esquelético.	

(g).Pontos de controlo do contorno do objeto. (h) Contorno do objeto. (i) Silhueta do objeto [58].....	23
<b>Figura 4.2:</b> Em cima: histogramas aproximados por duas distribuições normais, onde a interseção representa o limiar ótimo. Em baixo: resultados dos limiares ótimo e convencional em histogramas combinados [49].....	27
<b>Figura 4.3:</b> À esquerda: imagem do gradiente. À direita: imagem como relevo topográfico [2]. .....	28
<b>Figura 4.4:</b> a) Bacias hidrográficas em mínimos e watersheds. b) Construção de barragens em locais onde a água proveniente de dois mínimos diferentes de mistura [37].....	29
<b>Figura 4.5:</b> À esquerda: imagem original. À direita: resultado da aplicação da segmentação watershed [39].....	29
<b>Figura 4.6:</b> Representação da transformada watershed por imersão. a) São feitos furos em cada um dos mínimos locais. b) A superfície é submersa em água e é construída uma barragem entre bacia b3 e b4. c) Com a continuação da imersão são construídas mais barragens [37]. .....	30
<b>Figura 4.7:</b> Representação da transformada watershed com o método rainfalling. a) O rainfalling define quatro barragens superiores. b) Resultado final da segmentação com as mesmas cinco regiões que o método de imersão [37]. .....	31
<b>Figura 4.8:</b> Código de cores do fluxo ótico.....	36
<b>Figura 4.9:</b> Resultado do cálculo do fluxo ótico. Na primeira e na segunda colunas: imagens de uma sequência de imagens. Terceira coluna: Resultado do fluxo ótico como cor. ....	37
<b>Figura 5.1:</b> a) Imagem original. do microcanal com uma microestenose b) Máscara de fundo do microcanal com uma microestenose. c) Resultado da subtração da máscara de fundo à imagem original. ....	40
<b>Figura 5.2:</b> a) Histograma da imagem sem fundo. b) Histograma da imagem com contraste ajustado. c) Imagem resultante do ajuste de contraste. ....	41
<b>Figura 5.3:</b> Aplicação do filtro de mediana. a) Máscara 3x3. b) Máscara 5x5. c) Máscara 7x7. ....	43
<b>Figura 5.4:</b> a) Região 3x3 da imagem. b) Máscaras do filtro de <i>Sobel</i> [19]. ....	45

<b>Figura 5.5:</b> Resultado obtido com o filtro de <i>Sobel</i> .....	45
<b>Figura 5.6:</b> Resultado da pré-inundação da imagem.....	46
<b>Figura 5.7:</b> a) Resultado da segmentação <i>watershed</i> . b) Resultado a cores da segmentação <i>watershed</i> . Cada cor representa uma micro-região diferente.	46
<b>Figura 5.8:</b> a) Resultado obtido após a operação de dilatação. b) Mesmo resultado representado a cores.....	47
<b>Figura 5.9:</b> Imagem de entrada para o cálculo do fluxo ótico.....	48
<b>Figura 5.10:</b> a) Componente <i>u</i> do fluxo ótico. b) Componente <i>v</i> do fluxo ótico. c) e d) Resultado obtido para o fluxo ótico para dois escoamentos diferentes. ....	49
<b>Figura 5.11:</b> a) Imagem resultante da binarização. b) Imagem obtida depois do preenchimento de orifícios. c) Imagem obtida depois de remover as bordas. ....	51
<b>Figura 5.12:</b> Modelo <i>keyhole</i> utilizado.....	52
<b>Figura 5.13:</b> Funcionamento do modelo <i>keyhole</i> [47].....	53
<b>Figura 5.14:</b> Seguimento de duas células usando o modelo <i>keyhole</i> . ....	53
<b>Figura 5.15:</b> Imagens resultantes do seguimento de células aplicando o modelo <i>keyhole</i> , <i>i</i> representa o número da imagem. ....	54
<b>Figura 6.1:</b> Representação do microcanal com uma microestenose em que $W_1=50\mu m$ e $W_2=10\mu m$ .....	56
<b>Figura 6.2:</b> Sistema de microscopia utilizado para obter as imagens do microcanal com uma microestenose [40]. ....	56
<b>Figura 6.3:</b> Células estudadas ao longo do microcanal com uma microestenose. ....	57
<b>Figura 6.4:</b> Trajetória do GV 1 ao longo do microcanal com uma microestenose. ....	58
<b>Figura 6.5:</b> Trajetória do GV 2 ao longo do microcanal com uma microestenose. ....	58
<b>Figura 6.6:</b> Índice de deformação do GV 1 ao longo do microcanal com uma microestenose. ....	59
<b>Figura 6.7:</b> Índice de deformação do GV 2 ao longo do microcanal com uma microestenose. ....	60
<b>Figura 6.8:</b> Trajetória obtida para o GV 3 ao longo do microcanal com uma microestenose. ....	61
<b>Figura 6.9:</b> Índice de deformação dos GVs ao longo do microcanal com uma microestenose por zonas. ....	62

<b>Figura 6.10:</b> Trajetória obtida para o GV 4 ao longo do microcanal com uma microestenose. ....	63
<b>Figura 6.11:</b> Microcanal hiperbólico. a) Ilustração de todo o microcanal. b) Dimensões do microcanal.....	64
<b>Figura 6.12:</b> Sistema de microscopia utilizado para obter as imagens do microcanal hiperbólico. ....	65
<b>Figura 6.13:</b> GV seguido ao longo microcanal hiperbólico. ....	65
<b>Figura 6.14:</b> Trajetória do GV1 ao longo do microcanal hiperbólico.....	66
<b>Figura 6.15:</b> Índice de deformação do GV normal ao longo do microcanal hiperbólico. ....	67
<b>Figura 6.16:</b> Célula exposta a 0.02% de diamida, seguida ao longo do microcanal hiperbólico. ....	68
<b>Figura 6.17:</b> Trajetória do GV exposto a 0.02% de diamida', ao longo do microcanal hiperbólico. ....	69
<b>Figura 6.18:</b> Índice de deformação do GV exposto a 0.02% de diamida, ao longo ao microcanal hiperbólico. ....	70
<b>Figura 6.19:</b> Índice de deformação do GV normal e do GV exposto a 0.02% de diamida por zonas.....	70

## Lista de Abreviaturas

<b>2D</b>	Do inglês <i>two-dimensional</i> ou duas dimensões.
<b>3D</b>	Do inglês <i>three-dimensional</i> ou três dimensões.
<b>Dx40</b>	Dextrano 40.
<b>EDTA</b>	Do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> ou ácido etilenodiamino tetracético.
<b>GV(s)</b>	Glóbulo(s) vermelho(s).
<b>Hct(s)</b>	Hematócrito(s).
<b>ID</b>	Índice de Deformação.
<b>LDSR</b>	Do inglês <i>Laser-Diffraction Slit Rheometer</i> ou reómetro com difração de raios laser.
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano.
<b>Re</b>	<i>Reynolds</i> .
<b>RGB</b>	Do inglês <i>red, green and blue</i> ou vermelho, verde e azul.



# Capítulo 1. Introdução

## 1.1 Motivação

O seguimento de objetos, mais conhecido como *tracking*, permite analisar propriedades anatómicas e dinâmicas dos mesmos, tendo grande variedade de aplicações em visão computacional. O seguimento de objetos é normalmente utilizado em aplicações que exigem o reconhecimento da posição e da forma do objeto em estudo em imagens consecutivas. Nestas aplicações o seguimento torna-se num problema desafiador, pois mudanças abruptas nas características do movimento, do objeto e da cena dificultam o reconhecimento do objeto em cada imagem.

Desde que o significado clínico da deformação dos glóbulos vermelhos (GVs) se tornou um caminho possível para diagnosticar várias patologias, o seguimento de células em escoamentos sanguíneos ganhou grande importância. Outros métodos para a determinação das propriedades dos GVs em escoamentos sanguíneos foram propostos, tendo surgido nos últimos anos técnicas de fabricação de microcanais transparentes. Estes microcanais, produzidos em polidimetilsiloxano (PDMS) permitem o estudo das propriedades dos GVs ao longo do escoamento sanguíneo.

Vários estudos realizados determinam as propriedades do escoamento e dos GVs utilizando técnicas manuais de seguimento [26, 29, 31, 43, 57]. Um exemplo destas técnicas é o recurso ao *software Image J* por intermédios do *plugin MTrackJ*. Uma vez que este método é manual, a sua utilização resulta num processo bastante moroso e cansativo o que pode introduzir erros nos resultados por parte do utilizador.

Assim sendo, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um método automático que permita o seguimento de células ao longo de microcanais, bem como a determinação da sua deformação e de outras características.

Os microcanais utilizados neste estudo foram fabricados utilizando a técnica de litografia suave. O escoamento sanguíneo foi filmado utilizando um sistema de microscopia e os vídeos foram analisados como um sequência de imagens, recorrendo ao *software Matlab*.

Neste trabalho foram utilizadas várias técnicas de análise de imagem como o pré-processamento, a segmentação e o cálculo do fluxo ótico. O seguimento de células entre imagens consecutivas foi realizado tendo como base o modelo *keyhole* proposto por Reyes-Aldasoro *et al.* [47] e a similaridade entre o fluxo ótico, calculado tendo por base Brox *et al.* [10].

## 1.2 Estrutura do relatório

Este relatório encontra-se dividido em vários capítulos sendo que no Capítulo 1 se apresenta a motivação e o objetivo deste trabalho.

O Capítulo 2 diz respeito à fundamentação teórica, apresentando-se um breve resumo acerca do sangue e das suas propriedades ao longo do escoamento. O Capítulo 3 corresponde à revisão de literatura, onde se apresentam algumas das técnicas existentes para o seguimento de células e cálculo da sua deformação.

No Capítulo 4, são abordados várias técnicas de processamento de imagem, como a segmentação e o cálculo do fluxo ótico, seguindo-se o Capítulo 5 no qual é descrito o método desenvolvido para o seguimento de células.

No Capítulo 6 são apresentados os resultados obtidos e é feita a análise e discussão dos mesmos, finalizando-se com o Capítulo 7 onde se apresentam as conclusões e propostas de trabalhos futuros.

## Capítulo 2. Fundamentação Teórica

O desenvolvimento de métodos para o seguimento de células através de microcanais requer o conhecimento básico da constituição do sangue bem como das suas características. Assim, este capítulo visa o esclarecimento acerca da constituição do sangue e das suas propriedades.

### 2.1 Constituição do sangue

O sangue é um fluido corporal que circula num sistema tubular fechado e tem como principais funções o transporte de oxigénio, dióxido de carbono, nutrientes, produtos de secreções e de calor para todo o corpo [3], apresentando uma cor vermelho-brilhante se proveniente de uma artéria e vermelho-escuro se proveniente de uma veia [4].

Este biofluido é heterogéneo, sendo composto por uma parte líquida, o plasma, e pelos elementos celulares [4], que correspondem a cerca de 46% do volume total de sangue e dizem respeito aos glóbulos vermelhos, aos glóbulos brancos e às plaquetas (ver Figura 2.1) [30].

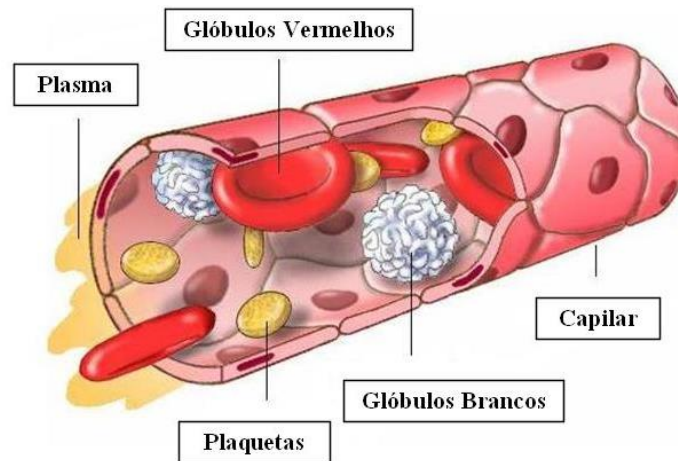


Figura 2.1: Constituição do sangue [1].

## Glóbulos Vermelhos

Os glóbulos vermelhos, também conhecidos como eritrócitos ou hemácias, são células sem núcleo, contendo hemoglobina e, são as células sanguíneas mais abundantes. As dimensões destas células são variáveis, apresentando um GV normal uma forma de disco bicôncavo com cerca de  $8\mu\text{m}$  de diâmetro e uma espessura média de  $2\mu\text{m}$  (ver Figura 2.2), sendo os bordos mais espessos que o centro [4, 30, 41].

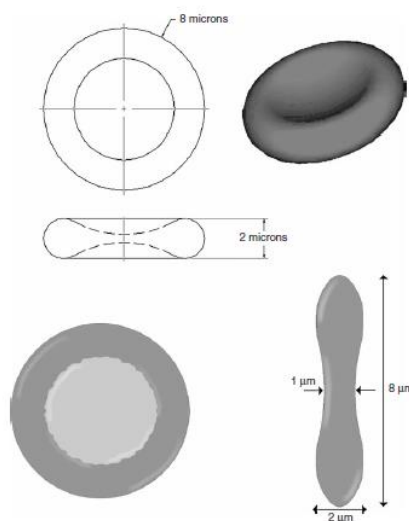


Figura 2.2: Dimensões de um eritrócito [56].

A capacidade de deformação dos GVs é geralmente influenciada pela sua membrana, pela sua forma e também pela concentração de hemoglobina [30].

A percentagem de volume ocupado pelos eritrócitos no volume total de sangue designa-se hematócrito (Hct). Uma vez que os GVs são as células responsáveis pelo transporte de oxigénio e dióxido de carbono, o Hct é um parâmetro que afeta a capacidade do sangue transportar estes gases [56].

### **Glóbulos Brancos**

Os glóbulos brancos ou leucócitos são células com núcleo que representam o maior mecanismo de defesa corporal, sendo responsáveis pela resposta imunitária. Estas células dividem-se em dois tipos: as células granuladas, constituídas pelos neutrófilos, eosinófilos e basófilos, e as células agranuladas, constituídas pelos linfócitos e monócitos [4, 41]. O diâmetro dos glóbulos brancos varia entre os  $7-22\mu\text{m}$ , dependendo do seu tipo. Estas células constituem menos de 1% do total de células sanguíneas [30].

### **Plaquetas**

As plaquetas ou trombócitos são células sem núcleo, com forma redonda ou oval e diâmetro entre  $1-2\mu\text{m}$ . Estas células possuem duas importantes funções: a aglutinação, que lhes permite reunirem-se em agregações, e a adesão, que lhes consente fixarem-se à superfície de corpos estranhos, desempenhando um importante papel no processo de coagulação do sangue [4, 41].

## Plasma

O plasma é um líquido amarelado constituído por cerca de 90% de água e 10% de proteínas, substâncias inorgânicas, vitaminas e gases dissolvidos [30, 56].

## 2.2 Reologia do sangue

O sangue é um biofluido, pelo que o seu escoamento obedece aos princípios físicos do escoamento no interior de condutas, no qual a massa, a energia e a quantidade de movimento são conservados. A circulação do sangue nos vasos sanguíneos é conseguida pelas forças de gravidade e pelas forças devidas aos gradientes de pressão. Uma vez que a pressão nos vasos sanguíneos varia de ponto para ponto torna-se possível o movimento do sangue. Contudo, forças de corte e forças devidas à turbulência do escoamento opõem-se à circulação do sangue [51].

O escoamento de um fluido pode ser considerado laminar, transitório ou turbulento. Um escoamento laminar ocorre quando o fluido se move ao longo de trajetórias bem definidas, apresentando camadas, onde cada camada desliza sobre a camada adjacente. Em regime laminar a viscosidade tende a amortecer a tendência para o aparecimento de turbulências. No escoamento turbulento, as partículas do fluido descrevem trajetórias irregulares, havendo uma transferência de quantidade de movimento de uma porção de fluido para outra [51].

Os escoamentos podem ser classificados em laminares ou turbulentos tendo em conta a sua posição relativa numa escala de turbulência em que se indica o número de *Reynolds* ( $Re$ ). Em regime laminar o número de  $Re$  é inferior a 2100. O escoamento é turbulento quando o número de  $Re$  é superior a 4000. Entre estes dois limites o regime é de transição [54]. O número de  $Re$  define-se pela razão entre as forças de inércia e as forças de viscosidade e, para condutas de secção circular, pode ser calculado pela equação 2.1.

$$Re = \frac{\rho VD}{\mu} = \frac{VD}{\nu} \quad (2.1)$$

onde  $\rho$  é a massa volúmica do fluido,  $V$  é a velocidade média,  $D$  é o diâmetro da conduta,  $\mu$  é a viscosidade do fluido e  $\nu$  é a viscosidade cinemática [51].

### 2.2.1 Comportamento dos fluidos

Relativamente ao seu comportamento, os fluidos podem ser Newtonianos ou não-Newtonianos. Os fluidos Newtonianos são aqueles em que a sua viscosidade não varia ao longo do escoamento. Embora o sangue não possa ser considerado como um fluido Newtoniano, pode ser modelado como tal em determinadas circunstâncias [56]. Quando estudado o plasma sanguíneo com um viscosímetro, verifica-se que este se comporta como um fluido Newtoniano. Contudo, para um Hct de 45%, a viscosidade varia com a taxa de deformação, concluindo-se que o sangue com Hcts elevados se comporta como um fluido não-Newtoniano [30].

Os fluidos não-Newtonianos são aqueles cuja viscosidade varia de acordo com a taxa de deformação, não obedecendo á lei de Newton da viscosidade [51].

Na Figura 2.3 pode observar-se o comportamento de fluidos Newtonianos e não-Newtonianos de acordo com a variação da tensão de corte e da taxa de deformação de corte.

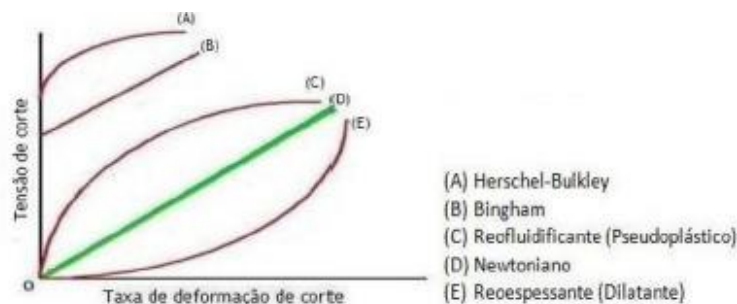


Figura 2.3: Comportamentos dos fluidos sujeitos a tensões de corte [54].

### 2.2.2 Velocidade de escoamento

Ao longo dos anos têm sido feitos vários estudos acerca da velocidade de escoamento do sangue que revelam resultados dispersos, refletindo a complexidade dos fenômenos que ocorrem na microcirculação. A dispersão dos resultados deve-se ao facto de a velocidade de escoamento ser afetada por vários parâmetros combinados, tais como o Hct, o diâmetro do microcanal, a taxa de deformação, o fluido em suspensão (plasma, soro fisiológico ou dextrano), erros experimentais, entre outros [30].

Goldsmith *et al.* [18] propuseram um perfil de velocidades que sugere que para soluções diluídas, com um Hct de cerca de 1%, este perfil se aproxima de uma parabólica. Para Hcts superiores o perfil de velocidades assemelha-se a um “pistão” (perfil horizontal perpendicular às paredes do microcanal), como ser observado na Figura 2.4.

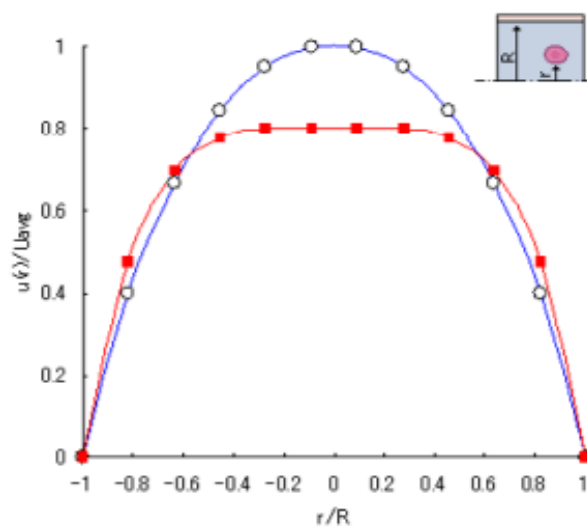
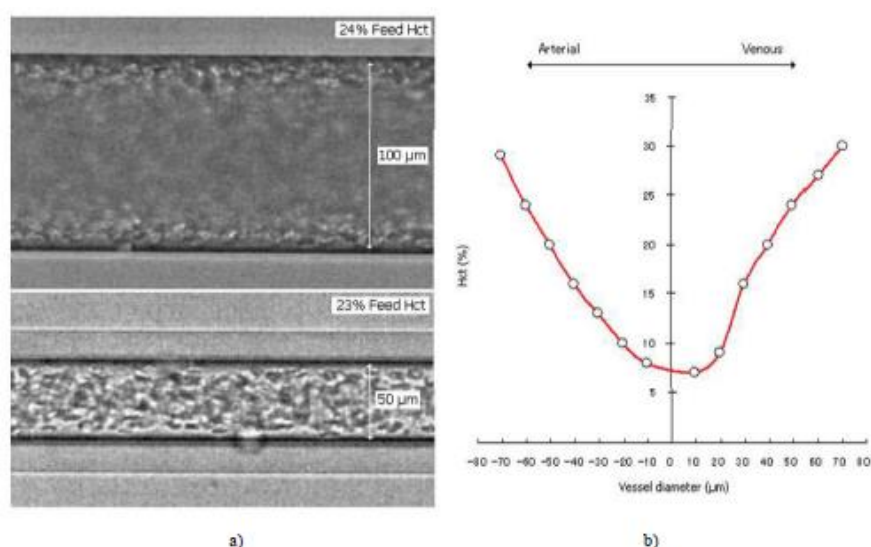


Figura 2.4: Representação dos perfis de velocidades para Hct <1% e Hct superior [30].

### 2.2.3 Comportamento reológico em microcanais

Investigações realizadas para estudar o comportamento do sangue em microcanais com diferentes diâmetros e para diferentes Hcts, observou-se o efeito de Faharaeus e o efeito de Faharaeus-Lindqvist [30].

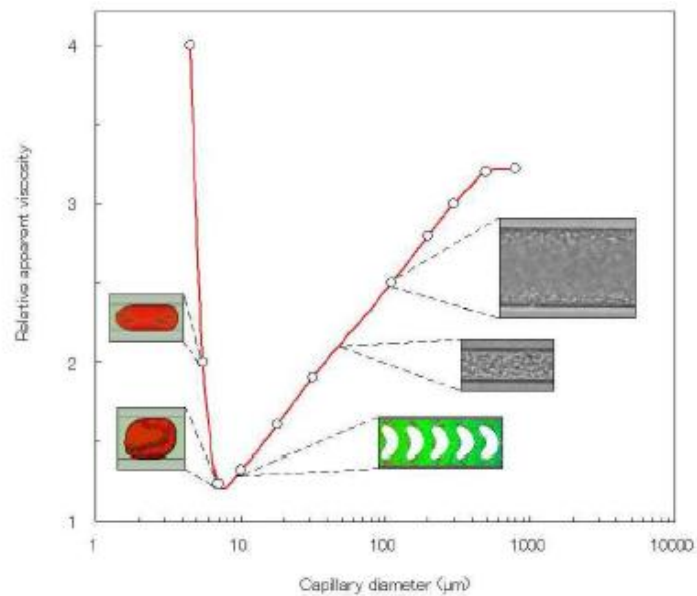
Robin Faharaeus observou que para microcanais com diâmetro inferior a  $300\mu\text{m}$  o comportamento sanguíneo e o Hct são fortemente afetados. O efeito de Faharaeus mostra que para microcanais estreitos ocorre a migração axial dos GVs para o centro do microcanal e a formação de uma camada livre de células junto das paredes. Na Figura 2.5 pode-se observar este efeito.



**Figura 2.5:** a) Efeito de Faharaeus em capilares de vidro. b) Distribuição do Hct [30].

No efeito de Faharaeus-Lindqvist, que também ocorre em microcanais com diâmetro inferior a  $300\mu\text{m}$ , observa-se que a viscosidade aparente diminui com a diminuição do diâmetro do microcanal. No entanto, na Figura 2.6 pode observar-se que para microcanais com diâmetros inferiores a  $7\mu\text{m}$  o efeito de Faharaeus-Lindqvist é

invertido devido à dificuldade dos GVs ( $8\mu\text{m}$  de diâmetro) em escoarem em canais com diâmetros inferiores a  $7\mu\text{m}$ .



**Figura 2.6:** Efeito de Fahraeus-Lindqvist. Variação da viscosidade em função do diâmetro do microcanal [30].

Em termos gerais, o efeito de Fahraeus-Lindqvist pode ser explicado pela formação de uma camada livre de células junto às paredes do microcanal, pela diminuição do Hct e consequente diminuição da viscosidade. A existência da camada livre de células reduz o atrito entre os GVs e as paredes do microcanal e, conseqüentemente, diminui a resistência ao escoamento, contribuindo assim para a redução da viscosidade do sangue [30].

## Capítulo 3. Revisão de Literatura

Neste capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica acerca do escoamento sanguíneo e das técnicas utilizadas para a determinação de propriedades dos glóbulos vermelhos. Apresenta-se ainda uma secção sobre os métodos existentes para fazer o seguimento de células.

### 3.1 Escoamento sanguíneo

Ao longo dos anos têm sido realizados vários estudos experimentais para compreender o comportamento do escoamento sanguíneo na microcirculação, uma vez que diversas doenças podem alterar as propriedades do sangue. Um exemplo de uma dessas doenças é a diabete, pois esta patologia reduz a deformabilidade dos glóbulos vermelhos [41].

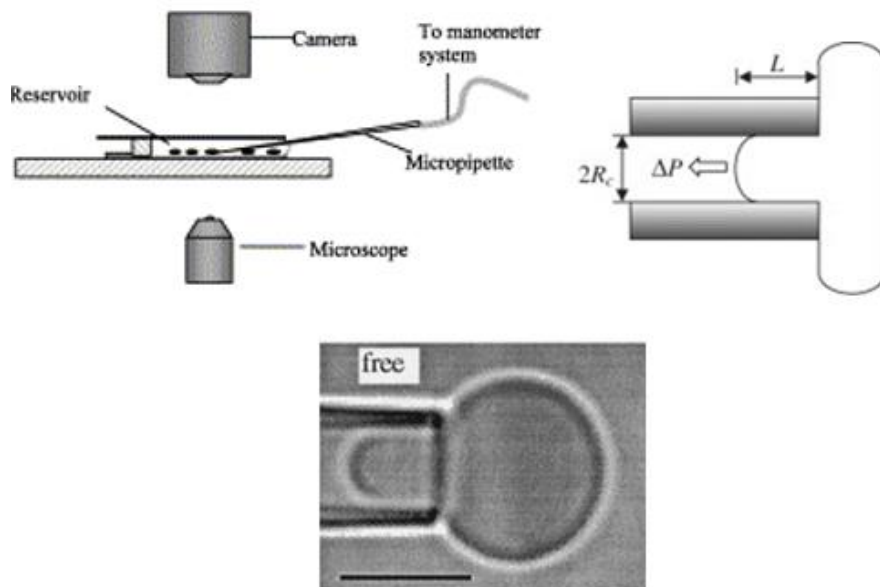
Uma vez que os GVs têm que passar por capilares com diâmetro inferior ao seu, uma ligeira diminuição da sua deformabilidade pode dificultar o escoamento dos eritrócitos e, conseqüentemente, causar doenças graves tais como diabetes, hipertensão, células falciforme e enfarte do miocárdio [55].

A determinação da deformabilidade dos GVs também é relevante dado que em várias doenças, como a anemia falciforme e a malária, parece existir uma fração de células deformáveis e outra de células menos deformáveis e/ou rígidas [12].

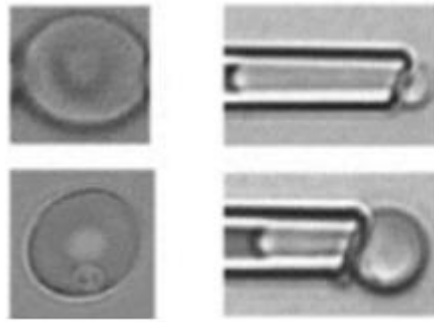
Sendo o conhecimento da deformabilidade dos GVs na microcirculação um facto possível para diagnosticar várias patologias, foram desenvolvidos vários métodos para determinar este fenómeno.

Guégue *et al.* [21] testaram um dispositivo que mede a pressão da filtração de uma suspensão de eritrócitos. Dado que os GVs passam através de um filtro com poros com  $3\mu\text{m}$ , o aumento da pressão permite avaliar um índice de deformação (ID). Esta técnica de medição da pressão de filtração mostrou ser uma técnica sensível, permitindo aproximar-se da deformação dos GVs, e bastante útil na hemorreologia clínica.

Outro método utilizado na determinação da deformação do GVs é a aspiração por micropipeta [36]. Nesta técnica os eritrócitos são aspirados para capilares de vidro com  $1-5\mu\text{m}$  de diâmetro (Figura 3.1 e Figura 3.2). A pressão negativa necessária para aspirar as células é utilizada para determinar a deformação das mesmas. Embora este método seja preciso, é uma técnica difícil de aplicar e morosa, sendo raramente utilizada em diagnósticos clínicos,



**Figura 3.1:** Técnica de aspiração por micropipeta [28].



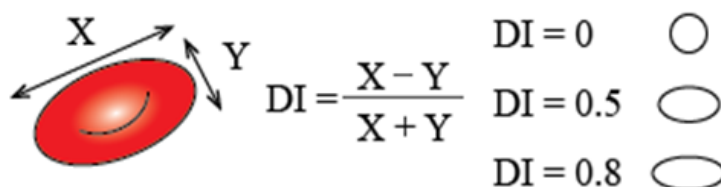
**Figura 3.2:** Em cima: aspiração por micropipeta de um GV normal. Em baixo: aspiração por micropipeta de um GV infectado com malária [28].

No estudo *Analyzing Red Blood Cell-Deformability Distribution* [12] foi analisada a distribuição de deformabilidade dos GVs de indivíduos saudáveis e de vários pacientes, comparando-se essas distribuições a fim de se determinar a presença de células anômalas. Os resultados obtidos para a distribuição de deformabilidade de GVs de indivíduos saudáveis mostraram que esta é uma distribuição quase simétrica e perto de uma distribuição normal, sendo a média e o desvio-padrão da deformabilidade um excelente parâmetro para distinguir amostras com GVs com características saudáveis de amostras com GVs com características anômalas. Uma vez que a distribuição de deformabilidade de pacientes com anemia falciforme mostrou um aumento na fração de células hipodeformáveis, esta fração é um bom parâmetro para monitorizar a gravidade da doença, sendo que se também foi observado um aumento desta fração para um paciente em crise. Para a amostra de malária, verificou-se um aumento da fração de células hiperdeformáveis.

Os resultados obtidos mostram que a distribuição de deformabilidade dos GVs é uma representação poderosa para o diagnóstico de várias doenças. As frações de células hipodeformáveis e hiperdeformáveis e o desvio-padrão da distribuição são parâmetros quantitativos excelentes para avaliar alterações na deformabilidade dos GVs.

Shin *et al.* [55] investigaram a deformabilidade dos GVs e os seus efeitos na viscosidade do sangue recorrendo a um reómetro com difração de raios laser (LDSR). O padrão de difração a laser é analisado por um programa de encaixe de elipse, calculando-

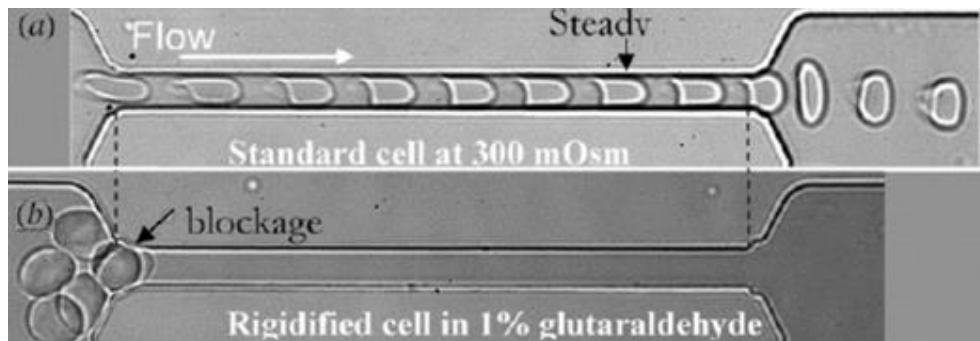
se o índice de alongamento, definido como  $(X-Y) / (X+Y)$ , em que X e Y são os eixos maior e menor da elipse, respetivamente (Figura 3.3).



**Figura 3.3:** Cálculo do índice de deformação.

A fim de variar a capacidade de deformação dos GVs, Shin e o seu grupo de investigação expuseram os eritrócitos com diferentes concentrações de glutaraldeído (GA), concluindo que quanto maior a concentração de GA menores os valores do índice de alongamento, pois o GA torna as células mais rígidas, logo menos deformáveis [55]. Os resultados obtidos com a técnica de LDSR mostram que quanto mais endurecidos são os GVs, maior a viscosidade do sangue, concluindo-se que a viscosidade é fortemente afetada pela deformabilidade dos GVs.

Outros estudos [5, 15, 16, 26, 31] demonstram que utilizando a técnica de litografia suave é possível fabricar microcanais transparentes para estudar o movimento e a deformação das células (Figura 3.4). Em Lima *et al.* [31] é descrita a técnica de litografia suave para a fabricação de microcanais em PDMS.

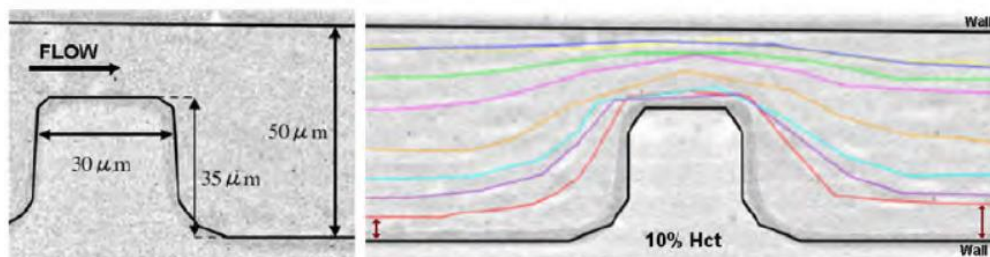


**Figura 3.4:** a) Sequência de deformação de um GV saudável. b) GVs rígidos por influência do glutaraldeído [5].

Estudos recentes [9, 43, 48] utilizaram uma técnica de baixo custo para a fabricação de microcanais em PDMS, a xurografia. Em contraste com a litografia suave, esta técnica utiliza equipamentos e materiais usados na indústria de impressão, como *plotters* de corte e vinil. Na xurografia as geometrias são desenhadas com recurso a *software* CAD e posteriormente fabricam-se os moldes em vinil, utilizando uma *plotter* de corte. Estes moldes são usados para a fabricação dos microcanais em PDMS. A xurografia apresenta as grandes vantagens de ser uma técnica rápida e pouco dispendiosa [9, 41].

Fujiwara *et al.* [16] estudaram o comportamento de GVs num microcanal com uma estenose, usando um sistema confocal micro-PTV. Adicionando partículas fluorescentes à água pura, observaram que as trajetórias são quase simétricas a montante e a jusante da estenose, o que não aconteceu quando estudaram as trajetórias de GVs usando Hcts de 10% e 20%.

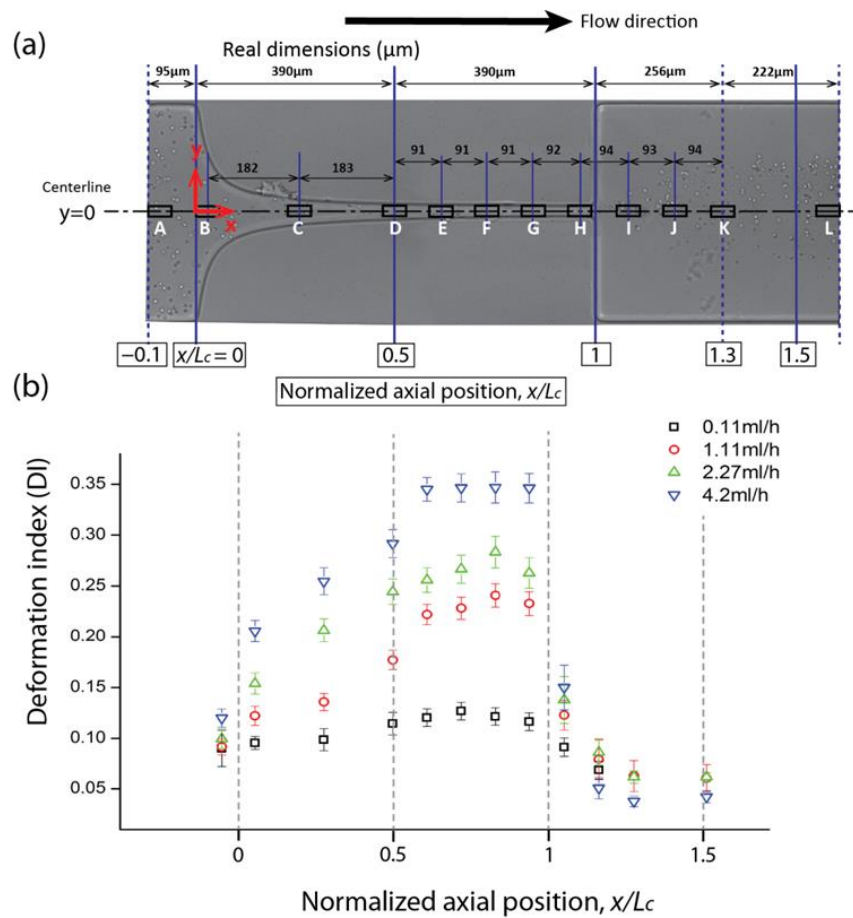
Para um Hct de 10% verificaram que as trajetórias dos GVs não eram simétricas (Figura 3.5), sendo que os eritrócitos que inicialmente se encontravam junto à parede inferior do microcanal tenderam a afastar-se da parede após a estenose. Utilizando um Hct de 20% observaram que neste caso a assimetria das trajetórias era inferior à assimetria verificada com um Hct de 10%.



**Figura 3.5:** Escoamento de GVs num microcanal com Hct a 10% [17].

Fujiwara e o seu grupo de trabalho analisaram ainda o escoamento sanguíneo com células rígidas, verificando que com os GVs endurecidos a camada livre de células formada era consideravelmente mais fina em comparação com os GVs saudáveis. Os eritrócitos rígidos que inicialmente se encontravam junto à parede do microcanal permanecem perto da parede mesmo após a estenose. Assim, concluíram que a deformação dos GVs desempenha um papel importante na assimetria das trajetórias e na espessura da camada livre de células.

Em *Extensional flow-based assessment of red blood cell deformability using a hyperbolic converging microchannel* [27] foi proposta uma nova abordagem para avaliar a capacidade de deformação dos GVs. Lee e o seu grupo de trabalho verificaram que os GVs que escoavam no centro do microcanal antes de entrar na região convergente hiperbólica não se deformavam, apresentando um ID quase nulo. Na região convergente hiperbólica os GVs que escoavam ao longo da linha central estavam alongados, atingindo a máxima deformação, e relaxavam lentamente após passar a região convergente. Recentemente, Yaginuma *et al.* [57] usando um método próximo do anterior realizaram um estudo ao longo de todo o microcanal hiperbólico e obtiveram resultados próximos dos anteriormente obtidos por Lee *et al.* (ver Figura 3.6).



**Figura 3.6:** Avaliação da deformação dos eritrócitos na linha central do microcanal. a) Ilustração das 12 regiões utilizadas para a análise do índice de deformação dos GVs. b) Média do índice de deformação nas 12 regiões utilizando quatro caudais diferentes:  $Q=0.11\text{ml/h}$ ,  $Q=1.11\text{ml/h}$ ,  $Q=2.27\text{ml/h}$  e  $Q=4.2\text{ml/h}$ . Os valores medidos são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de acordo com uma análise do teste  $t$  com um nível de confiança de 95% [57].

Por Faustino *et al.* [15] foi estudada a influência que o contacto com células tumorais tem na deformabilidade dos GVs. Esta investigação permitiu concluir que o contacto com células tumorais diminui a deformabilidade dos GVs. Contudo, contactos entre GVs saudáveis e células tumorais superiores a 24 horas não afetam ainda mais a deformabilidade dos GVs.

Em Rodrigues *et al.* [48] foi estudada a deformação dos GVs em microcanais hiperbólicos. Neste estudo verificou-se que para diferentes caudais, o ID dos GVs era maior na região de contração hiperbólica. Verificou-se ainda que na região da contração a deformação aumenta substancialmente com a velocidade de escoamento.

## 3.2 Seguimento de células

Uma propriedade fundamental de qualquer objeto do mundo real é que ele se movimenta no espaço e no tempo. Esta característica é particular para os organismos vivos, que requerem a passagem de tempo para o seu metabolismo, crescimento, reação a estímulos e reprodução. Assim, a compreensão de qualquer objeto animado requer não só o estudo das suas características no espaço (propriedades anatómicas) como também das suas características no tempo (propriedades dinâmicas).

Estudos realizados com células vivas tendem a produzir muita mais informação do que aquela que é possível analisar pelo olho humano. Assim, a análise computadorizada de imagens permite obter o máximo de informação possível de uma forma eficiente, possibilitando analisar sequências de imagens que refletem processos dinâmicos, como o escoamento sanguíneo.

Apesar de as primeiras tentativas de seguimento de células através do processamento de imagens terem surgido há cerca de 30 anos, o desenvolvimento de métodos mais avançados fortaleceu-se na última década, havendo uma tendência crescente para o desenvolvimento de ferramentas de *software* que possibilitem o seguimento de células. Essas ferramentas são, geralmente, capazes de realizar o seguimento de várias células e permitem o cálculo de vários parâmetros dinâmicos [33].

Em Meijering *et al.* [33] podem consultar-se mais pormenores relativos às ferramentas de *software* existente para o seguimento de células.

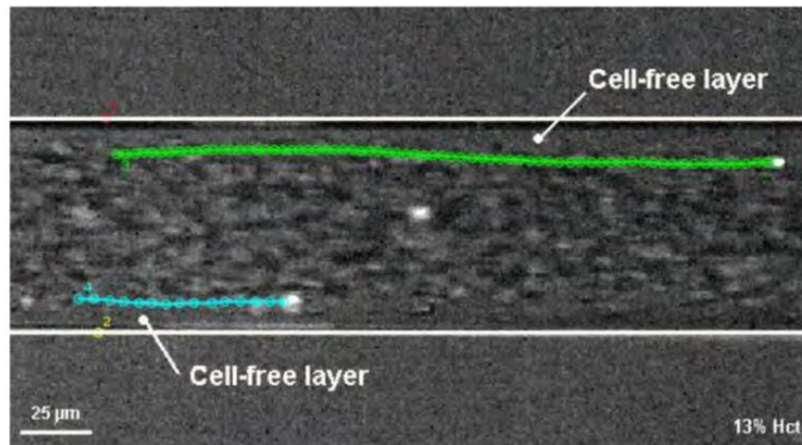
Muitos dos métodos existentes para o seguimento de células são manuais, o que resulta num processo tedioso, demorado e limitado no número de medições que podem ser feitas. Sendo assim, têm surgido nos últimos anos muitas técnicas automáticas para o seguimento de células.

Eden *et al.* [14] descreveram um método chamado *CellTrac*, que foi projetado para um seguimento totalmente automático de células em circulação, permitindo a recuperação das suas características. Esta técnica atua em dois níveis: primeiro, uma etapa de processamento global que extrai os vasos e linhas centrais, baseando-se em cores e padrões temporais; segundo, uma etapa de processamento local que extrai as posições e

velocidades das células em circulação. A correspondência entre células de uma imagem para a imagem seguinte foi conseguida através de um algoritmo que incorpora a informação local e global. A incorporação da informação global permitiu superar dificuldades inerentes a métodos de seguimento que usam apenas informação local. O método *CellTrack* permitiu a extração de um grande volume de dados num curto período de tempo, comparando com medições manuais. Comparações entre métodos manuais e o *CellTrack* mostraram que este último é um substituto confiável de métodos manuais de seguimento de células.

No estudo efetuado por Kamoun *et al.* [24] foi proposto um método automático de seguimento de células que permite analisar a microcirculação. Neste método, a microscopia intravital (técnica que permite a visualização e análise do escoamento sanguíneo em animais vivos) foi usada para visualizar a microcirculação, por imagiologia fluorescente, e GVs marcados. A deteção dos GVs foi efetuada aplicando um modelo de correspondência temporal e, em seguida, as células que apareciam em imagens sucessivas foram ligadas com base em restrições de comportamento. Esta técnica possibilita efetuar o seguimento de mais GVs do que uma técnica manual, permitindo uma análise mais robusta da microcirculação e demonstrou que o uso de apenas alguns GVs selecionados manualmente e aleatoriamente não é eficaz para o conhecimento da microcirculação.

Muitos estudos efetuados recentemente recorrem a métodos manuais de seguimento como por exemplo, a aplicação do *plugin MTrackJ* disponível no *software Image J* [26, 29, 31, 43, 57]. Usando esta técnica o centróide da célula em estudo é selecionado manualmente imagem a imagem, obtendo-se as suas coordenadas  $x$  e  $y$ , que são posteriormente utilizadas para a determinação da trajetória da célula (Figura 3.7).



**Figura 3.7:** Determinação da trajetória de células usando o plugin *MTrackJ* disponível no *software Image J* [17].

Outras técnicas como a imagiologia ótica e a ressonância magnética também são usadas para seguimento de células, com o objetivo de estudar e avaliar possibilidades terapêuticas, dinâmicas de migração e diferenciação celular. Mais detalhes sobre estas aplicações podem ser consultados nos trabalhos de Hoehn *et al.* [22] e de Kurokawa *et al.* [25].

## Capítulo 4. Processamento de Imagem

Neste capítulo são apresentadas técnicas de processamento de imagem. Na primeira secção esclarecem-se alguns pressupostos relativos ao seguimento de objetos. Na segunda secção são apresentados alguns métodos existentes para a segmentação de imagens. Por fim, é descrito o processo para o cálculo do fluxo ótico.

### 4.1 Seguimento de objetos

O desenvolvimento de computadores de alta potência, a disponibilidade de câmaras de vídeo de alta qualidade e a baixo custo, e a necessidade crescente de análises automáticas de vídeo, aumentou o interesse nos algoritmos de seguimento de objetos, fazendo com que estes métodos passassem a desempenhar um papel importante em visão computacional [58].

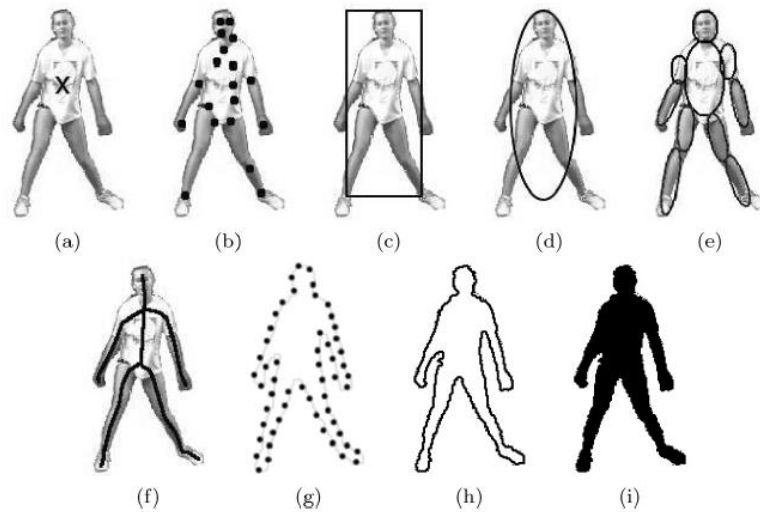
Geralmente, o seguimento de objetos consiste em duas etapas fundamentais: a deteção dos objetos de interesse em movimentos e a associação desses objetos imagem a imagem, a fim de construir a sua trajetória [23, 33, 34, 58]. O objetivo final do seguimento de objetos é a análise dos objetos a fim de determinar medidas quantitativas que permitam conhecer a seu comportamento.

O seguimento do objetos torna-se por vezes um problema desafiador e complexo devido a vários fatores tais como: a perda de informação causada pela projeção do mundo 3D em imagens 2D, o ruído nas imagens, os movimentos bruscos e complexos dos objetos, a natureza não rígida ou articulada dos objetos e as variações na iluminação [58].

Contudo, o problema pode ser simplificado tendo um conhecimento prévio sobre o número e o tamanho dos objetos, ou a aparência e a forma dos mesmos.

Relativamente à forma os objetos podem ser representados por:

- Pontos: o objeto é representado por um ponto, o centróide (Figura 4.1 (a)), ou por um conjunto de pontos (Figura 4.1 (b)). Esta representação é adequada para o seguimento de objetos que ocupam pequenas regiões numa imagem.
- Formas geométricas simples: o objeto é representado por formas geométricas simples, por exemplo por um retângulo ou por uma elipse (Figura 4.1 (c) e (d)). Esta representação é normalmente usada para objetos rígidos.
- Silhueta e contorno do objeto: o contorno do objeto define o seu limite (Figura 4.1 (g) e (h)), sendo a silhueta a região dentro do contorno (Figura 4.1 (i)). Esta representação é adequada para o seguimento de formas não rígidas.
- Modelos de forma articulada: os objetos articulados são compostos por várias partes. O corpo humano é um exemplo de um objeto articulado, sendo constituído por cabeça, tronco e membros. As várias partes do objeto articulado podem ser modeladas por cilindros ou elipses (Figura 4.1 (e)).
- Modelos esqueléticos: o esqueleto do objeto (Figura 4.1 (f)) pode ser extraído através da aplicação de uma transformada de eixo medial à silhueta. Esta representação pode ser usada para objetos rígidos ou articulados.



**Figura 4.1:** Representação de objetos. (a) Centróide- (b) vários pontos. (c) Forma retangular. (d) Forma elíptica. (e) Forma articulada. (f) Modelo esquelético. (g).Pontos de controle do contorno do objeto. (h) Contorno do objeto. (i) Silhueta do objeto [58].

Relativamente à aparência, os objetos podem ser representados como:

- Densidades de probabilidade da aparência do objeto: um exemplo é o histograma. As densidades de probabilidade das características da aparência (cor, textura) podem ser obtidas a partir das regiões especificadas por modelos de forma.
- Padrões: podem ser formados usando formas geométricas simples ou silhuetas. Só são adequados para o seguimento de objetos cujas formas não variem muito durante o processo.
- Modelos de aparência ativos: são gerados pela modelação simultânea da forma e da aparência do objeto.
- Modelos de aparência multivista: codificam diferentes vistas de um objeto [58].

#### 4.1.1 Seleção das características de interesse para o seguimento

A seleção das características certas para o seguimento tem grande importância. As características visuais a ter em conta são:

- Cor ou brilho: a cor aparente de um objeto é influenciada por dois fatores físicos, a distribuição da iluminação e a refletância da superfície do objeto. Em processamento de imagem o espaço de cor mais utilizado é o RGB (vermelho, verde e azul). Contudo, podem ser utilizados outros espaços como, por exemplo, o YUV, o CIE-Lab ou o HSV.
- Contornos: a deteção de contornos é usada para identificar fortes mudanças na intensidade da imagem. Os contornos são menos sensíveis a variações na iluminação, relativamente à característica da cor.
- Fluxo ótico: define a alteração da posição de cada *pixel* de uma região como um conjunto de vetores. O cálculo do fluxo ótico é comumente utilizado na segmentação de movimento e em aplicações de seguimento. Na secção 4.3 descreve-se mais detalhadamente o cálculo do fluxo ótico, de acordo com Brox *et al.* [10].
- Textura: é uma medida da variação de intensidade de uma superfície que quantifica propriedades como a suavidade e a regularidade. Esta característica também é menos sensível a variações de iluminação do que a cor [58].

#### 4.1.2 Deteção do objeto

Para fazer o seguimento de objetos é necessário que primeiramente estes sejam detetados. A deteção dos objetos pode ser alcançada com a construção de uma imagem de fundo, sem células, sendo detetados os desvios da imagem a analisar em relação ao fundo. Esta técnica de subtração do fundo permite que qualquer alteração significativa numa região da imagem em relação ao fundo seja considerada como um objeto em movimento.

A subtração do fundo pode apresentar alguns problemas que se prendem com a ocorrência de regiões incompletas, isto é, quando os objetos ficam divididos em várias regiões, ou quando o objeto tem tonalidades, no seu interior, semelhantes ao fundo, originando o aparecimento de orifícios no interior das regiões.

Uma das limitações importante na subtração do fundo é a exigência de câmaras estacionárias, pois o movimento das câmaras distorce os modelos de fundo.

Outra técnica para a detecção dos objetos é a segmentação. Esse processo divide a imagem em partes significativas e similares, resultando numa imagem na qual cada *pixel* contém uma etiqueta relativa ao segmento a que pertence. Todos os algoritmos de segmentação abordam dois problemas: definição de critérios para uma boa partição e a escolha do método para realização de uma partição eficiente [58]. Na secção 4.2 são descritos alguns dos métodos utilizados em segmentação de imagens.

### 4.1.3 Seguimento

O objetivo do seguimento de células é criar uma trajetória da célula ao longo do tempo. A forma mais simples de o conseguir é associar cada célula previamente detetada à célula mais próxima na imagem seguinte, considerando, por exemplo, a posição dos centróides.

Sendo os GVs representados pelos modelos de forma e/ou aparência descritos anteriormente, existem métodos específicos para o seguimento, de acordo com modelo utilizado:

- Seguimento de pontos: os objetos detetados em imagens consecutivas são representados como pontos, e a associação dos pontos de imagem para imagem é baseada no estado anterior do objeto.
- Seguimento de *kernel*: o *kernel* refere-se à forma e à aparência do objeto, por exemplo, um padrão retangular associado a um histograma. Neste caso o seguimento dos objetos é feito pelo cálculo do movimento do *kernel* em imagens consecutivas.

- Seguimento de silhueta: os métodos de seguimento de silhueta usam a informação codificada dentro da região do objeto. Esta informação pode estar na forma de densidade de aparência ou em modelos de forma [58].

## 4.2 Segmentação

A segmentação é uma técnica de processamento de imagem que permite dividir uma imagem num conjunto heterogéneo e significativo de regiões constituintes, de tal modo que os *pixels* que pertencem a uma região possuem um conjunto idêntico de propriedades ou atributos [6, 8, 13, 19, 20].

O nível de segmentação, ou seja, a quantidade de regiões em que a imagem é dividida, o método de segmentação a aplicar e a escolha das propriedades de associação de regiões, dependem do problema a ser resolvido, sendo que a segmentação deve parar quando o objeto de interesse for isolado [6].

Os algoritmos de segmentação normalmente baseiam-se em duas propriedades básicas de níveis de intensidade: a descontinuidade e a similaridade. Na primeira categoria, a imagem é segmentada com base em mudanças abruptas nos níveis de cinzento, tais como os contornos de objetos. Na segunda categoria, a segmentação da imagem é baseada na homogeneidade de propriedades predefinidas dos *pixels* da imagem [6, 19, 20].

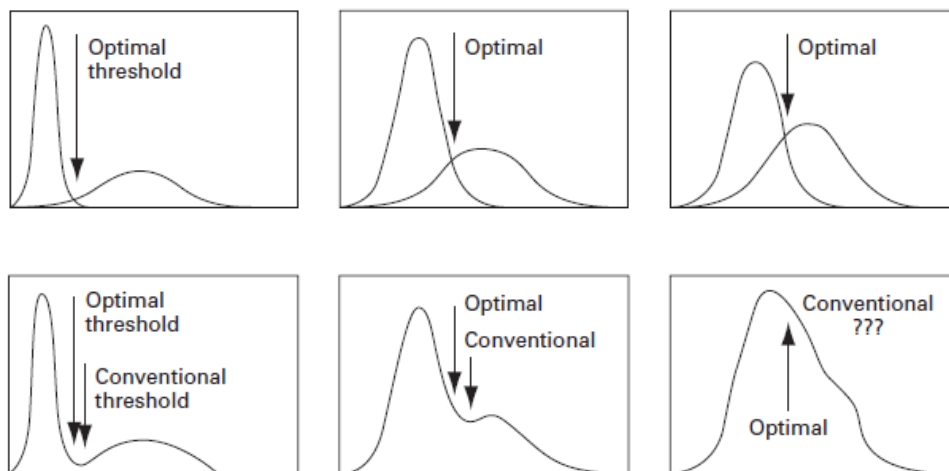
Nas subsecções seguintes são descritos alguns dos métodos utilizados para a segmentação de imagens.

### 4.2.1 Segmentação baseada no histograma (*Thresholding*)

A segmentação baseada no histograma ocupa uma posição central na segmentação de imagens, uma vez que é uma técnica intuitiva e simples.

O caso mais simples de *thresholding* é a binarização, onde cada *pixel* é comparado com um limiar e, dependendo da sua diferença, é considerado como objeto ou como fundo. A binarização pode ser simples, apresentando apenas duas cores na imagem segmentada, ou múltipla, apresentando mais do que duas cores.

No caso ideal, um histograma de níveis de cinzento é composto por duas distribuições normais distintas, sem sobreposição e com um único valor de limiar global. No entanto, as imagens reais têm normalmente um histograma com sobreposição de várias distribuições. Assim, o valor de limiar ótimo é calculado como o nível de cinzento que resulta no menor número de *pixels* a serem mal classificados. Isto corresponde ao ponto de interseção das duas distribuições e não é idêntico ao valor do fundo do vale entre picos, que é o valor normalmente convencionado (Figura 4.2).

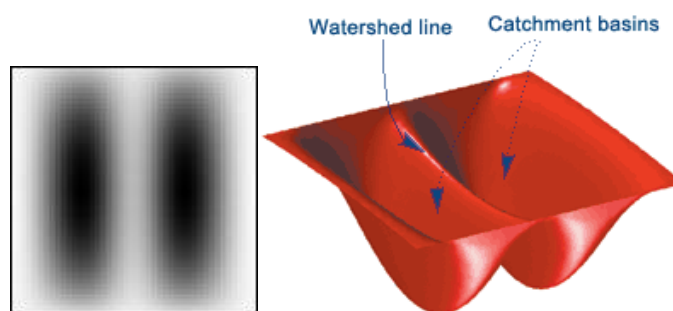


**Figura 4.2:** Em cima: histogramas aproximados por duas distribuições normais, onde a interseção representa o limiar ótimo. Em baixo: resultados dos limiares ótimo e convencional em histogramas combinados [49].

Em imagens com fundo variável não é possível fazer a segmentação com um único limiar global. Uma forma de ultrapassar esta limitação é a partição da imagem em subregiões [49].

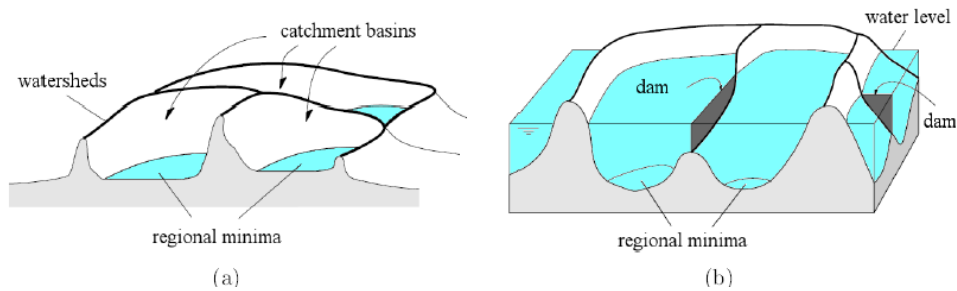
#### 4.2.2 Transformada *watershed*

A transformada *watershed* considera a imagem do gradiente como um relevo topográfico, em que os valores de intensidade ou do gradiente são interpretados como a altura na imagem topográfica [20]. Gradientes altos ficam então representados como montanhas e gradientes baixos ficam representados como vales. Na Figura 4.3 pode ver-se um exemplo de uma imagem do gradiente e a respetiva imagem topográfica, podendo verificar-se que a zona de gradiente mais baixo está representado como um vale e pode ser preenchida com água.



**Figura 4.3:** À esquerda: imagem do gradiente. À direita: imagem como relevo topográfico [2].

Os conceitos mais importantes na transformada *watershed* são os mínimos, as bacias hidrográficas e os *watersheds*. Assim, a segmentação *watershed* transforma a imagem num conjunto de bacias hidrográficas separadas por *watersheds* [37]. Na Figura 4.4 pode ver-se uma ilustração da segmentação *watershed*.



**Figura 4.4:** a) Bacias hidrográficas em mínimos e watersheds. b) Construção de barragens em locais onde a água proveniente de dois mínimos diferentes de mistura [37]

Uma vez que a segmentação *watershed* é sensível ao ruído e à textura local, produz um grande número de pequenas regiões devido ao grande número de mínimos que apresenta uma imagem. Muitos dos métodos de segmentação produzem contornos das imagens incorretos e deslocados na presença de ruído, contudo, a transformada *watershed* produz contornos extra (sobre-segmentação), preservando também os contornos reais, como se pode ser na Figura 4.5.



**Figura 4.5:** À esquerda: imagem original. À direita: resultado da aplicação da segmentação watershed [39].

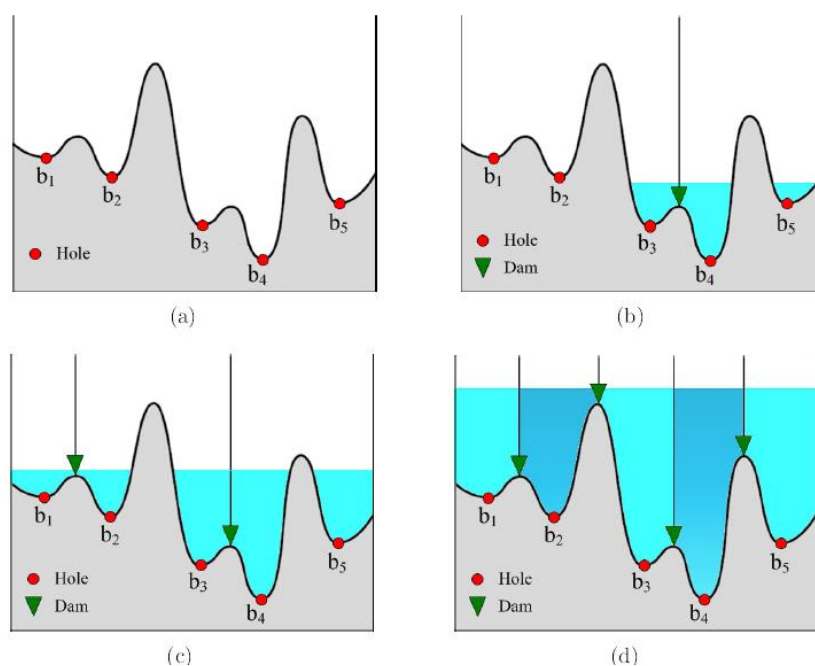
O problema da sobre-segmentação pode ser reduzido com o pré-processamento da imagem, através da remoção do ruído, da eliminação de regiões demasiado pequenas e ainda com uma etapa de fusão de regiões similares, tornando este método robusto [37].

Existem duas abordagens diferentes para implementar a segmentação *watershed*: a técnica de imersão e a técnica da queda de chuva (*rainfalling*).

### Imersão

Na transformada *watershed* por imersão, em cada um dos pontos da superfície topográfica que correspondem a mínimos locais é feito um furo. De seguida, toda a superfície é lentamente imersa em água e, através dos furos, a água sobe de maneira uniforme ocupando cada bacia hidrográfica.

A fim de evitar que a água de diferentes bacias hidrográficas se misture são construídas barragens virtuais em locais onde a água proveniente de dois mínimos se mistura. Quando toda a imagem topográfica fica submersa, as barragens que separam as bacias hidrográficas correspondem aos contornos das regiões [37]. Na Figura 4.6 pode ver-se uma ilustração desta abordagem.



**Figura 4.6:** Representação da transformada watershed por imersão. a) São feitos furos em cada um dos mínimos locais. b) A superfície é submersa em água e é construída uma barragem entre bacia b3 e b4. c) Com a continuação da imersão são construídas mais barragens [37].

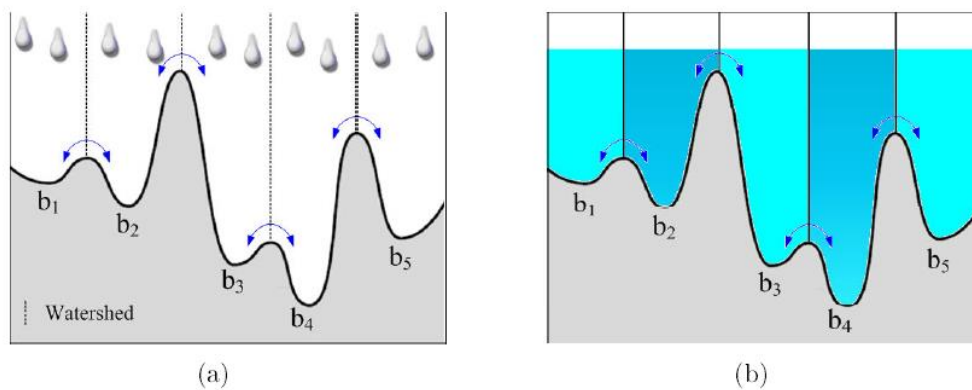
### Queda de chuva (*rainfalling*)

De acordo com a lei da gravidade, uma gota de água colocada em qualquer lugar da superfície topográfica vai seguir o caminho da descida mais íngreme até atingir um mínimo permitindo agrupar os *pixels* que fluem para o mesmo mínimo em diferentes bacias hidrográficas, produzindo uma imagem segmentada.

Nesta abordagem topográfica são considerados três tipos de pontos:

- pontos pertencentes a um mínimo local,
- pontos nos quais se for colocada uma gota de água ela desliza com certeza para um único mínimo,
- pontos nos quais a água se poderá deslocar com igual probabilidade para mais do que um mínimo, as linhas *watershed* ou simplesmente *watersheds*.

O método de *rainfalling* consiste em encontrar os pontos que correspondem a mínimos locais e atribuir-lhes uma etiqueta, sendo atribuída a mesma etiqueta a pontos vizinhos que sejam mínimos. Considerando gotas de chuva que caem nos pontos não etiquetados, é atribuída a esses pontos a etiqueta correspondente à zona para onde a gota de chuva escorrer (ver Figura 4.7). Calculando o gradiente de cada *pixel* de uma imagem, a gota de chuva tende a escorrer para o ponto vizinho que tem o gradiente mais baixo [37, 39].



**Figura 4.7:** Representação da transformada watershed com o método rainfalling. a) O rainfalling define quatro barragens superiores. b) Resultado final da segmentação com as mesmas cinco regiões que o método de imersão [37].

Os resultados obtidos usando a técnica de imersão e de *rainfalling* não são muito diferentes, contudo, computacionalmente, há grandes diferenças uma vez que o método de *rainfalling* é mais rápido e mais fácil de programar.

### 4.3 Fluxo ótico

A percepção do movimento é um importante elemento para a compreensão e interpretação do nosso mundo. Num caso ideal, o movimento de um objeto no espaço 3D corresponde a um movimento 2D numa sequência de imagens. Estes movimentos podem então ser apresentados como um campo de vetores de movimento, que permite estimar qual a melhor posição de cada *pixel* em imagens consecutivas [37]. Esse campo de vetores de movimento é conhecido como o fluxo ótico.

O cálculo do fluxo ótico proposto por Brox *et al.* [10] acelera o cálculo do fluxo ótico uma vez que características de movimento globais podem ser detetadas imediatamente, e melhora a precisão da estimativa de fluxo, melhorando a aproximação de gradientes de imagem por deformação. A estimativa do fluxo ótico envolve a solução de um problema de correspondência, isto é, pretende-se determinar a que *pixel* na imagem seguinte corresponde o *pixel* da imagem atual. Para encontrar estas correspondências é necessário definir algumas propriedades que são afetadas pelo deslocamento.

Tendo em conta que  $I(x, y, t)$  e  $I(x, y, t + 1)$  são duas imagens sucessivas numa sequência de imagens, e que  $w := (u, v, 1)^T$  é o deslocamento procurado entre uma imagem em  $t$  e outra em  $t+1$ , assume-se:

- **Intensidade constante**

Com esta suposição assume-se que o valor de cinzento de um *pixel* não é alterado pelo deslocamento (equação 4.1).

$$I(x, y, t) = I(x + u, y + v, t + 1) \quad (4.1)$$

A linearização da suposição de intensidade constante fornece a restrição de fluxo ótico (equação 4.2). Contudo esta linearização só é válida se a imagem se deslocar linearmente o que, por norma, não acontece, especialmente em grandes deslocamentos.

$$I_x u + I_y v + I_t = 0 \quad (4.2)$$

A suposição de intensidade constante tem a desvantagem de ser suscetível a pequenas alterações na iluminação, mas estas podem ocorrer naturalmente.

- **Gradiente constante**

Tendo em conta a ocorrência de alterações na iluminação é útil permitir variações no valor no valor de cinzento e calcular o fluxo ótico a partir de um critério que seja invariante sobre mudanças de intensidade. Assume-se então que o gradiente de intensidade da imagem não varia com o deslocamento (equação 4.3).

$$\nabla I(x, y, t) = \nabla I(x + u, y + v, t + 1) \quad (4.3)$$

Nesta equação,  $\nabla I = (\partial_x, \partial_y)^T$  denota o gradiente espacial. Embora o gradiente se possa alterar devido a alterações na intensidade, é muito menos dependente da iluminação do que a hipótese de intensidade constante.

- **Suavização do campo**

De acordo com os pressupostos de intensidade constante e de gradiente constante, estima-se o deslocamento apenas localmente, sem ter em conta a interação entre *pixels* vizinhos. Isto pode levar a alguns problemas, bem como ao aparecimento de valores discrepantes nas estimativas.

Posto isto, é importante inserir a suposição de suavização do campo, que pode ser aplicada no domínio espacial, se só existirem duas imagens, ou no domínio espaço-temporal, se forem procurados deslocamentos numa sequência de imagens.

Como o campo de deslocamento terá descontinuidades nos contornos dos objetos, é sensato generalizar a suavização do campo através de um campo de fluxo suavizado por partes.

Considerando o *pixel*  $x := (x, y, t)^T$  com vetor de fluxo  $w := (u, v, 1)^T$ , os desvios aos pressupostos de intensidade constante e de gradiente constante são medidos pela energia descrita na equação 4.4.

$$E_{Data}(u, v) = \int_{\Omega} \psi(|I(x+w) - I(x)|^2 + \gamma |\nabla I(x+w) - \nabla I(x)|^2) dx \quad (4.4)$$

Onde  $\Omega$  é a região de interesse e  $\gamma$  é um peso entre os dois pressupostos. A função côncava  $\psi$  é introduzida pois, quando aumentada, reduz a influência dos valores atípicos introduzidos pelos penalizadores quadráticos na estimativa.

A equação 4.5 penaliza a variação total do campo, descrevendo o pressuposto da suavização do campo.

$$E_{Smooth}(u, v) = \int_{\Omega} \psi(|\nabla_3 u|^2 + |\nabla_3 v|^2) dx \quad (4.5)$$

Para aplicações que usem apenas duas imagens, o gradiente espácio-temporal  $\nabla_3 := (\partial_x, \partial_y, \partial_t)^T$  é substituído pelo gradiente espacial.

A energia total é então calculada pela soma ponderada dos dois termos anteriores (equação 4.6) com o parâmetro  $\alpha < 0$ .

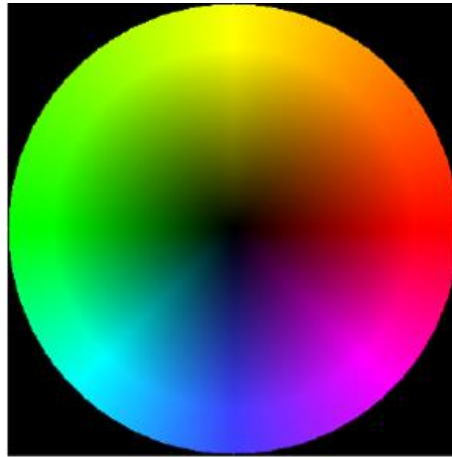
$$E(u, v) = E_{Data} + \alpha E_{Smooth} \quad (4.6)$$

O objetivo final é encontrar as funções  $u$  e  $v$  que minimizem esta função de energia, recorrendo a métodos iterativos [10].

Este método de cálculo do fluxo ótico apresenta vantagens em relação a outros métodos:

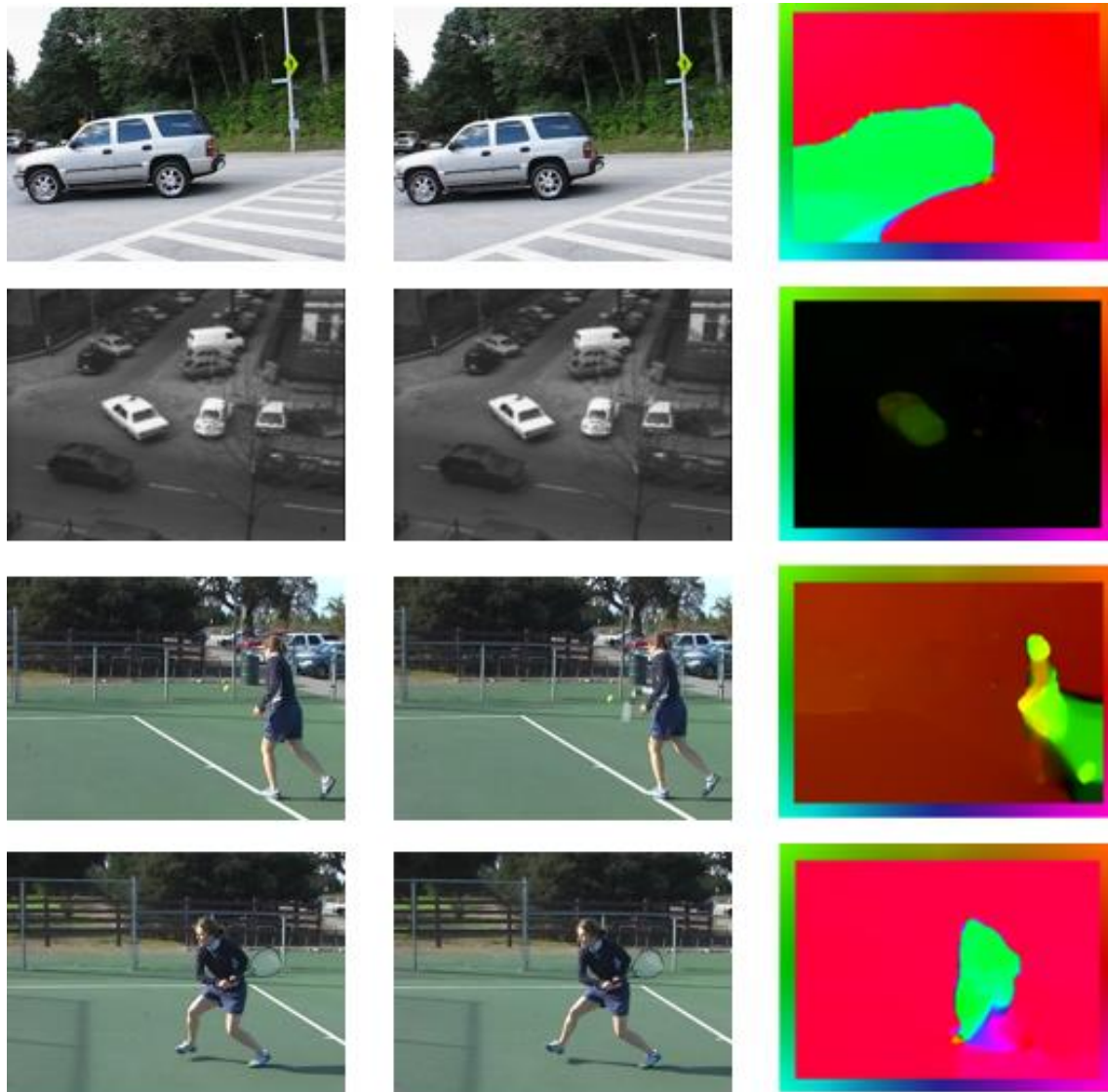
- ✓ a utilização de pressupostos não linearizados permite o cálculo do fluxo ótico mesmo em grandes deslocamentos,
- ✓ fornece campos de fluxo densos e suaves,
- ✓ o método é robusto ao ruído,
- ✓ com a introdução do pressuposto do gradiente constante, o método torna-se bastante robusto relativamente a alterações na iluminação que aparecem na maioria das sequências de imagens [37].

Para facilitar a visualização dos campos de fluxo usa-se uma imagem RGB representativa (Figura 4.8), onde a cor indica a direção do deslocamento e a intensidade a magnitude do mesmo.



**Figura 4.8:** Código de cores do fluxo ótico.

Na Figura 4.9 pode ver-se o resultado da aplicação do cálculo do fluxo ótico a algumas sequências de imagens reais. A primeira e a segunda colunas dizem respeito a duas imagens da sequência e, na terceira coluna, de acordo com a cor pode-se ver o respetivo deslocamento.



**Figura 4.9:** Resultado do cálculo do fluxo ótico. Na primeira e na segunda colunas: imagens de uma sequência de imagens. Terceira coluna: Resultado do fluxo ótico como cor.



## Capítulo 5. Método Proposto - *MKHtrackCells*

Neste capítulo é apresentado o método desenvolvido, *MKHtrackCells*, para o seguimento de células em microcanais e para o cálculo da sua deformação ao longo do escoamento. Em cada subsecção é descrita cada uma das etapas necessárias ao desenvolvimento do algoritmo.

Os vídeos do escoamento analisados foram captados usando uma câmara de alta velocidade e depois transferidos para um *software* onde foram convertidos para uma sequência/conjunto de imagens. Todas as imagens foram depois analisadas usando a *toolbox* de processamento de imagem disponível no *software Matlab*, onde se desenvolveu o método aqui proposto.

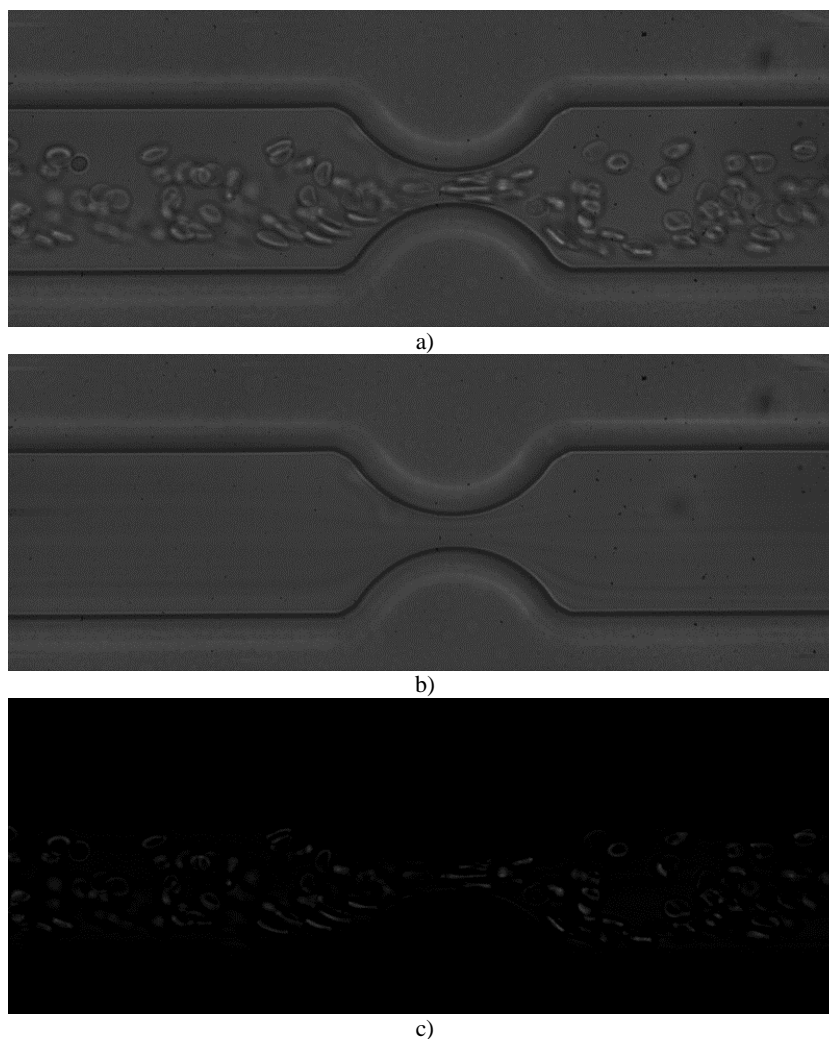
### 5.1 Pré-processamento

Em sistemas de análise de imagem, a etapa do pré-processamento é fundamental, uma vez que permite melhorar a qualidade da imagem, tornando a análise mais simples.

Esta etapa de pré-processamento iniciou-se com a subtração do fundo. Esta técnica permite que todo o cenário constante ao longo da sequência de imagens seja eliminado, restando apenas os objetos que apresentam movimento, sendo, neste caso as células.

Tendo em conta todas as imagens da sequência de imagens, a máscara do fundo pode ser obtida através da média de todas as imagens. Neste caso, as imagens são somadas, *pixel a pixel*, e o valor obtido nesta soma é dividido pelo número total de imagens. Na Figura 5.1 b) pode ver-se máscara de fundo correspondente a um dos microcanais em estudo.

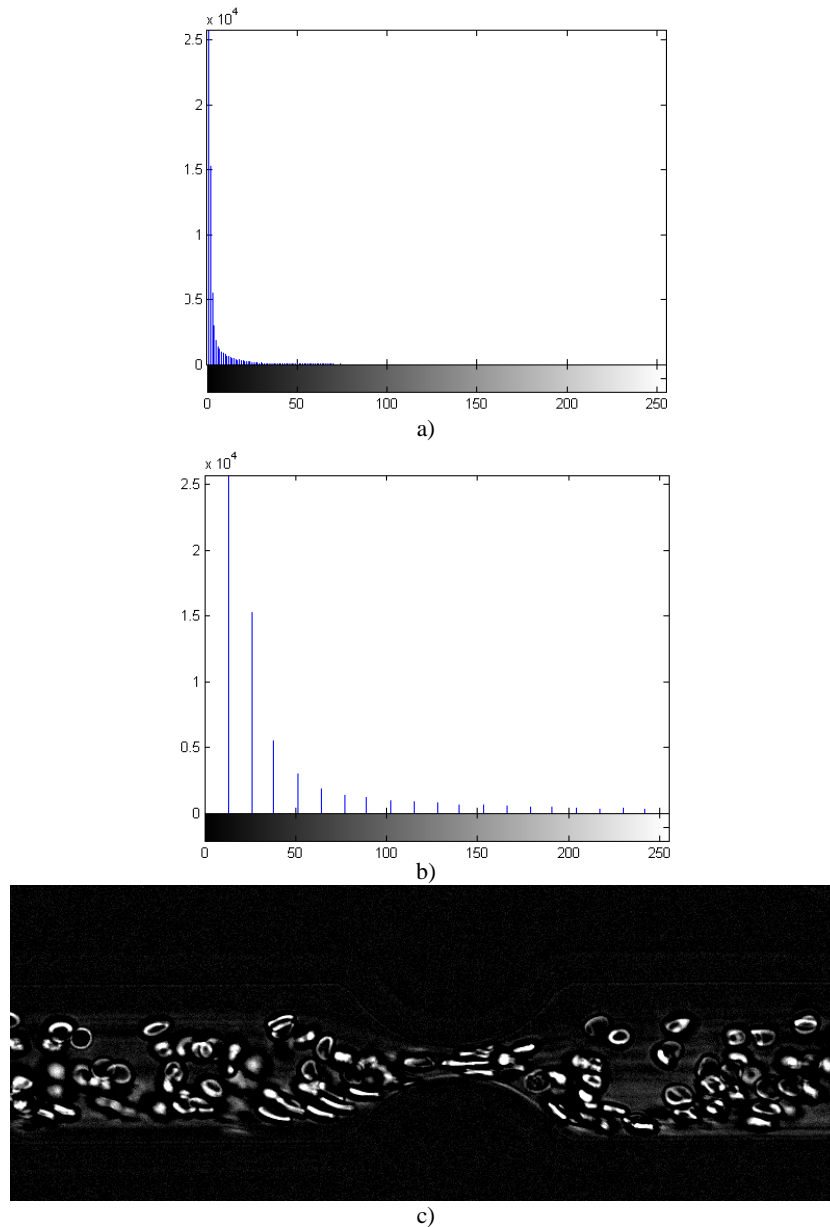
Após a obtenção da máscara de fundo, recorrendo a uma função de subtração de imagens, faz-se a subtração da máscara à imagem original. Na Figura 5.1 a) e c) pode ver-se a imagem original e a imagem resultante da subtração da máscara do fundo, respetivamente.



**Figura 5.1:** a) Imagem original. do microcanal com uma microestenose b) Máscara de fundo do microcanal com uma microestenose. c) Resultado da subtração da máscara de fundo à imagem original.

A imagem resultante da subtração do fundo apresenta um baixo contraste, tornando-se necessária uma operação de aumento de contraste, de modo que as células fiquem mais perceptíveis. O ajuste do contraste da imagem consiste em espalhar os níveis de cinzento, que originalmente se encontram apenas num pequeno intervalo do

histograma da imagem, para valores entre 0 e 255, mantendo a proporção entre os valores. Na Figura 5.2 figura pode ver-se o histograma da imagem, depois de retirado o fundo, bem como o histograma resultante e a respetiva imagem resultante após o ajuste de contraste.



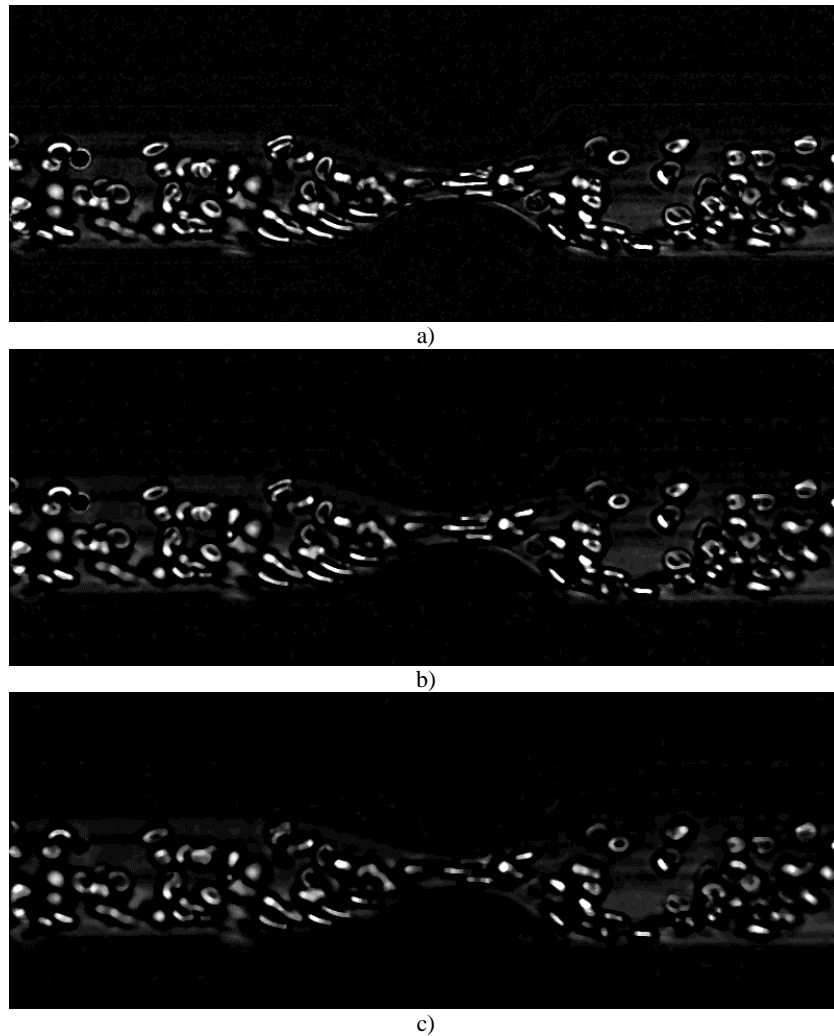
**Figura 5.2:** a) Histograma da imagem sem fundo. b) Histograma da imagem com contraste ajustado. c) Imagem resultante do ajuste de contraste.

A utilização de filtros de remoção de ruído é também uma etapa importante no pré-processamento de imagens, pois permite eliminar algum ruído presente nas imagens. Os filtros utilizados em processamento de imagens podem ser filtros no domínio espacial ou filtros no domínio das frequências.

Um exemplo de filtro espacial é o filtro de mediana. A aplicação deste filtro consiste num processo fácil com 4 etapas:

1. Definição do ponto central  $(x, y)$  e de uma máscara  $(N \times N)$  centrada do ponto  $(x, y)$ ;
2. Aplicação do cálculo da mediana aos *pixels* que fazem parte da máscara;
3. Atribuição do valor de mediana ao ponto  $(x, y)$ ;
4. Repetição do processo para todos os *pixels* da imagem.

Os filtros espaciais apresentam a vantagem de serem fáceis de implementar, no entanto, o tamanho da máscara pode influenciar o resultado. Assim, quanto maior é a máscara aplicada maior é a quantidade de filtragem, logo maior é a quantidade de ruído removido, no entanto, maior será a perda de detalhes na imagem [38]. Na Figura 5.3 são apresentados resultados obtidos com a aplicação do filtro de mediana com diferentes máscaras. Pode ver-se que com uma máscara de 3x3 ainda existe muito ruído na imagem. Com a utilização de uma máscara 7x7 o ruído torna-se inferior, contudo, nota-se já alguma perda de detalhes. Depois de vários testes foi escolhida uma máscara de 5x5, que apresenta a melhor relação detalhe/ruído.



**Figura 5.3:** Aplicação do filtro de mediana. a) Máscara 3x3. b) Máscara 5x5. c) Máscara 7x7.

## 5.2 Cálculo do gradiente e transformada *watershed*

Para aplicação da transformada *watershed*, o cálculo do gradiente da imagem é imprescindível pois permite a detecção de mínimos da imagem, a aplicação simplificada de uma pré-inundação da imagem e a detecção de zonas em rampa.

A utilização de filtros de realce tem o objetivo de destacar detalhes suavizados de uma imagem. Os filtros de realce são baseados nas derivadas de 1ª e 2ª ordem que requerem a seguinte definição: a 1ª derivada deve ser zero em regiões uniformes, não

deve ser zero no degrau de uma transição de cinzento ou no início de uma rampa e não deve ser zero ao longo da rampa; a 2ª derivada deve ser zero em regiões uniformes, não deve ser zero nos degraus, início e fim de rampas e transições de cinzento e deve ser zero ao longo de rampas e declive constantes [19].

Em processamento de imagens a 1ª derivada é obtida pela amplitude do gradiente. Para uma função  $f(x, y)$  o gradiente é definido pelo vetor 5.1.

$$\nabla f(x, y) = \left[ \frac{\partial f(x, y)}{\partial x}, \frac{\partial f(x, y)}{\partial y} \right] = [G_x, G_y] \quad (5.1)$$

A amplitude desse vetor é dada pela equação 5.2.

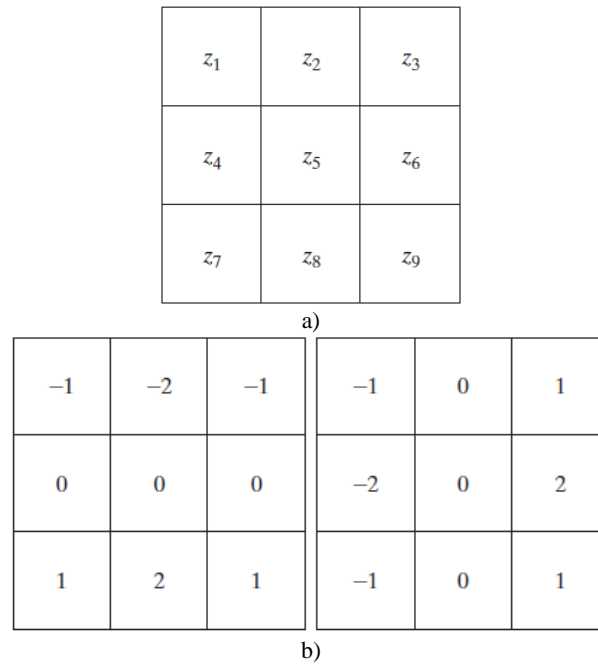
$$G = \sqrt{G_x^2 + G_y^2} \quad (5.2)$$

Usando uma aproximação do gradiente (equação 5.3) é possível reduzir o peso computacional desse cálculo.

$$\nabla f \approx |G_x| + |G_y| \quad (5.3)$$

O gradiente é então calculado aplicando filtros e somando os valores absolutos obtidos. Na Figura 5.4 b) podem ver-se as máscaras do filtro de *Sobel*, usado neste trabalho. Tendo em conta uma região  $3 \times 3$  da imagem (Figura 5.4 a)) o filtro *Sobel* pode ser implementado usando a equação 5.4 [19].

$$\begin{aligned} \nabla f = & |(z_7 + 2z_8 + z_9) - (z_1 + 2z_2 + z_3)| \\ & + |(z_3 + 2z_6 + z_9) - (z_1 + 2z_4 + z_7)| \end{aligned} \quad (5.4)$$



**Figura 5.4:** a) Região 3x3 da imagem. b) Máscaras do filtro de *Sobel* [19].

Na Figura 5.5 pode ver-se o resultado obtido para a amplitude do gradiente usando o filtro de *Sobel*.



**Figura 5.5:** Resultado obtido com o filtro de *Sobel*.

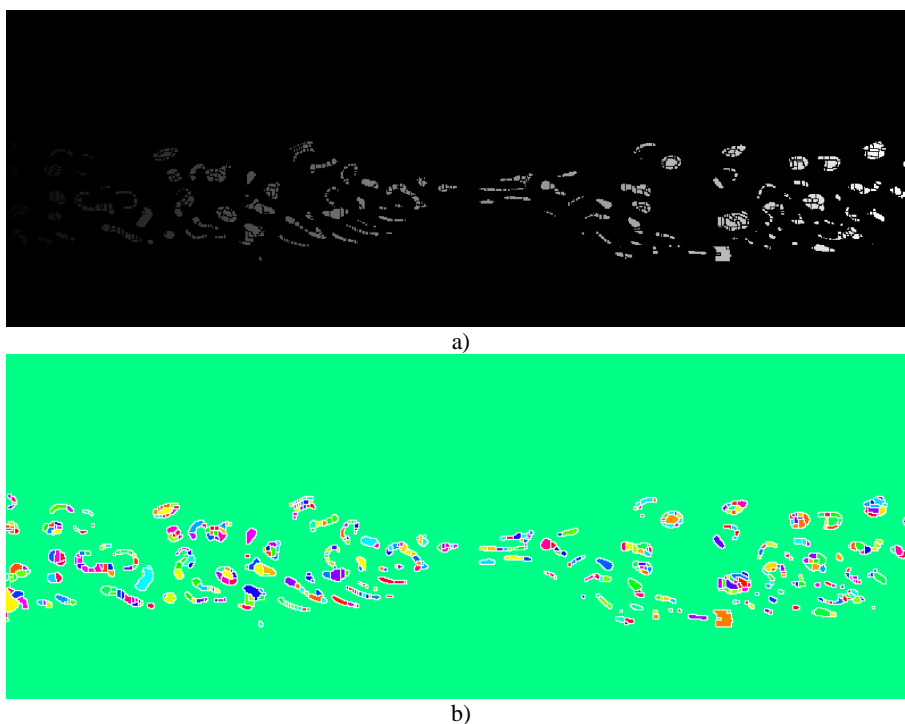
Para melhorar o processo de segmentação usando a transformada *watershed*, efetuou-se uma pré-inundação da imagem, que consiste em colocar todos os gradientes inferiores a um certo valor a zero. Neste caso, foram colocados a zero todos os gradientes

com um valor inferior a 5% do gradiente máximo, obtendo o resultado da Figura 5.6, onde se verifica que muitos gradientes que diziam respeito a ruído foram eliminados.



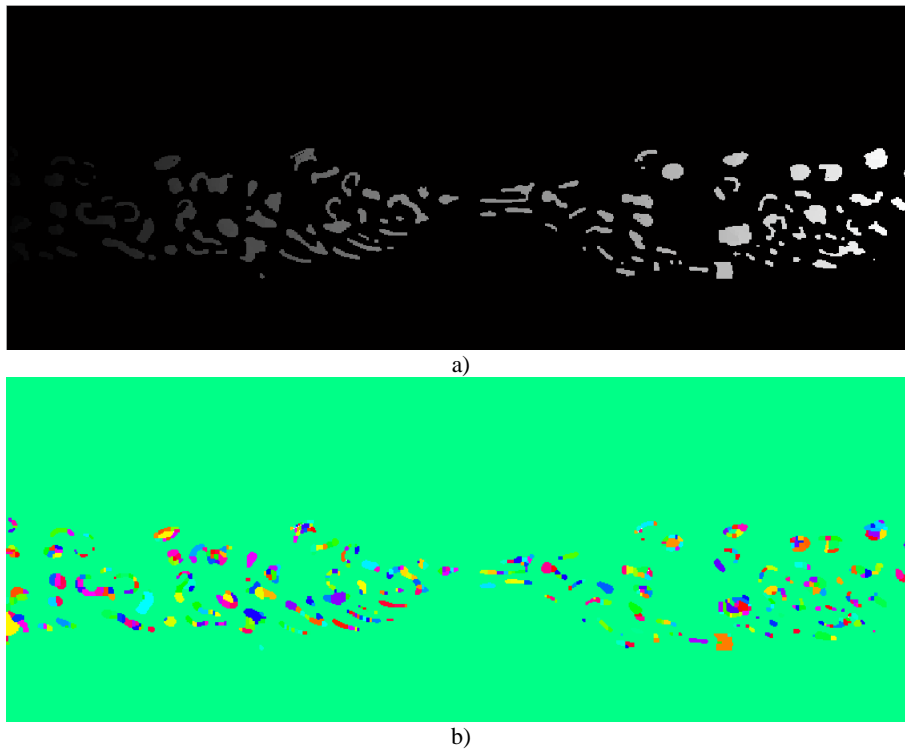
**Figura 5.6:** Resultado da pré-inundação da imagem.

O resultado obtido com a pré-inundação é então utilizado como imagem de entrada na aplicação da transformada *watershed*, que já foi explicada na subsecção 4.2.2. Com a aplicação desta transformada obtém-se o resultado da Figura 5.7.



**Figura 5.7:** a) Resultado da segmentação *watershed*. b) Resultado a cores da segmentação *watershed*. Cada cor representa uma micro-região diferente.

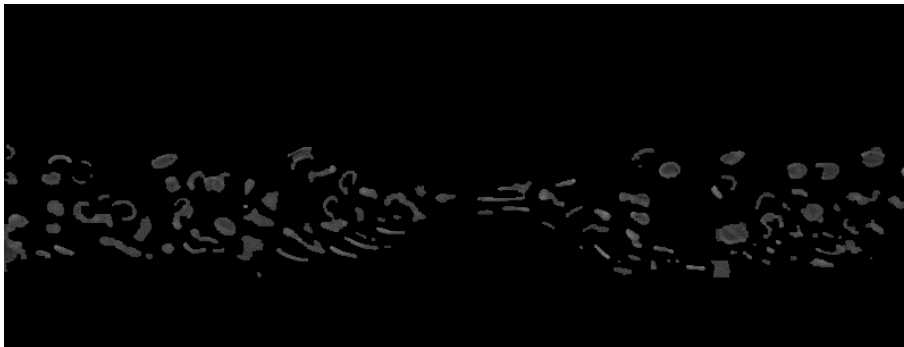
A fim de obter regiões completas recorreu-se à operação de dilatação, que permite completar regiões pela adição de *pixels*. Nesta etapa os *pixels* foram preenchidos de acordo com um elemento estruturante em forma de quadrado com lado de dois *pixels*. Na Figura 5.8 b) pode verificar-se que os contornos brancos existentes na Figura 5.7 b) já não existem. Isto deve-se ao facto de as regiões terem sido completadas com a operação de dilatação.



**Figura 5.8:** a) Resultado obtido após a operação de dilatação. b) Mesmo resultado representado a cores.

### 5.3 Fluxo ótico

Para calcular o fluxo ótico criou-se uma imagem com o fundo todo preto e com as células segmentadas com a cor original (Figura 5.9).



**Figura 5.9:** Imagem de entrada para o cálculo do fluxo ótico.

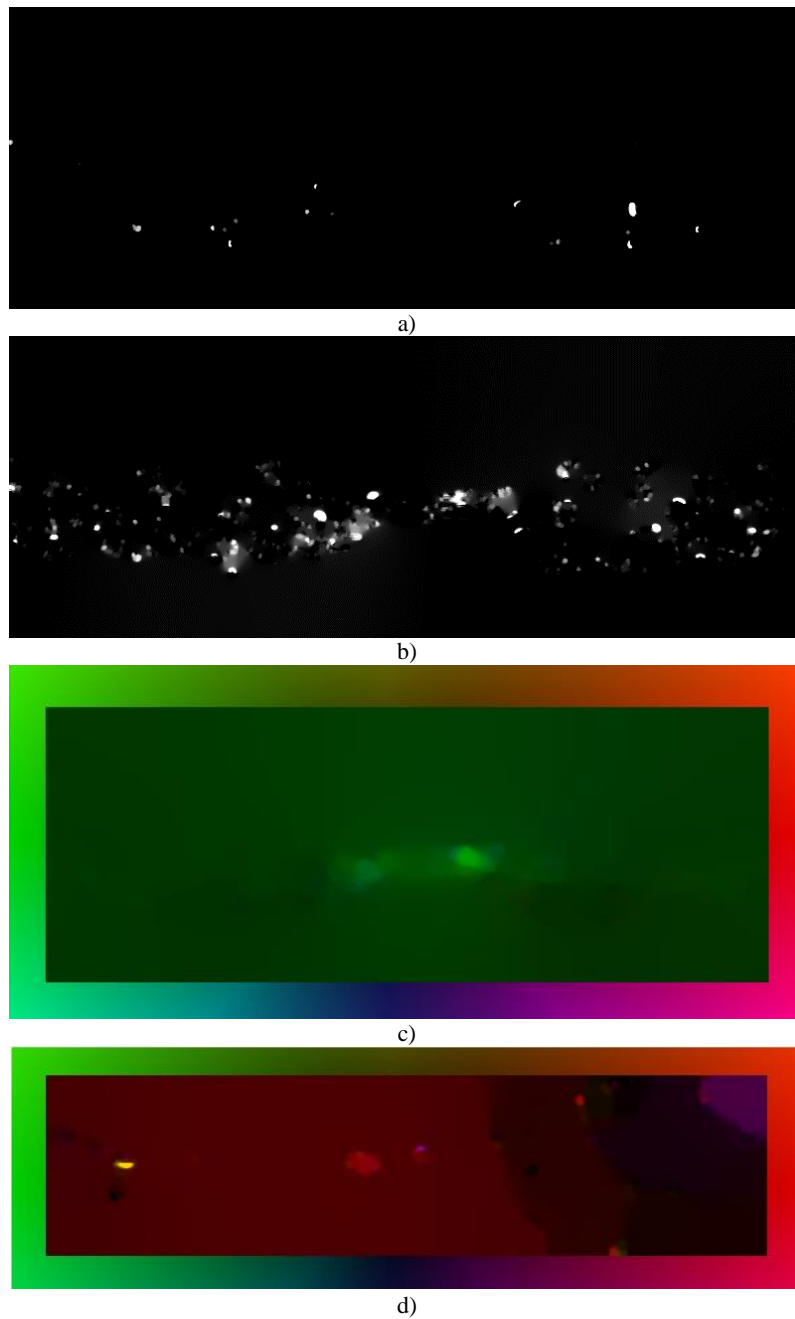
Recorrendo ao cálculo do fluxo ótico explicado na subsecção 4.3 obtiveram-se as componentes  $u$  e  $v$  do fluxo ótico (representadas na Figura 5.10 a) e b), respetivamente), que foram utilizadas para calcular a direção e a amplitude do fluxo ótico. A amplitude do fluxo ótico foi calculada pela equação 5.5 e a direção foi calculada pela equação 5.6.

$$A = \sqrt{u^2 + v^2} \quad (5.5)$$

$$d = \tan^{-1} \frac{v}{u} \quad (5.6)$$

A direção diz então respeito à direção do movimento, enquanto que a amplitude dá uma estimativa da distância percorrida pela célula entre duas imagens consecutivas. A Figura 5.10 c) e d) representa o fluxo ótico obtido. Pela cor pode-se verificar que a direção

do escoamento na Figura 5.10 c) é da direita para a esquerda, enquanto que na Figura 5.10 d) as células se movem da esquerda para a direita.



**Figura 5.10:** a) Componente  $u$  do fluxo ótico. b) Componente  $v$  do fluxo ótico. c) e d) Resultado obtido para o fluxo ótico para dois escoamentos diferentes.

## 5.4 Obtenção das características das regiões

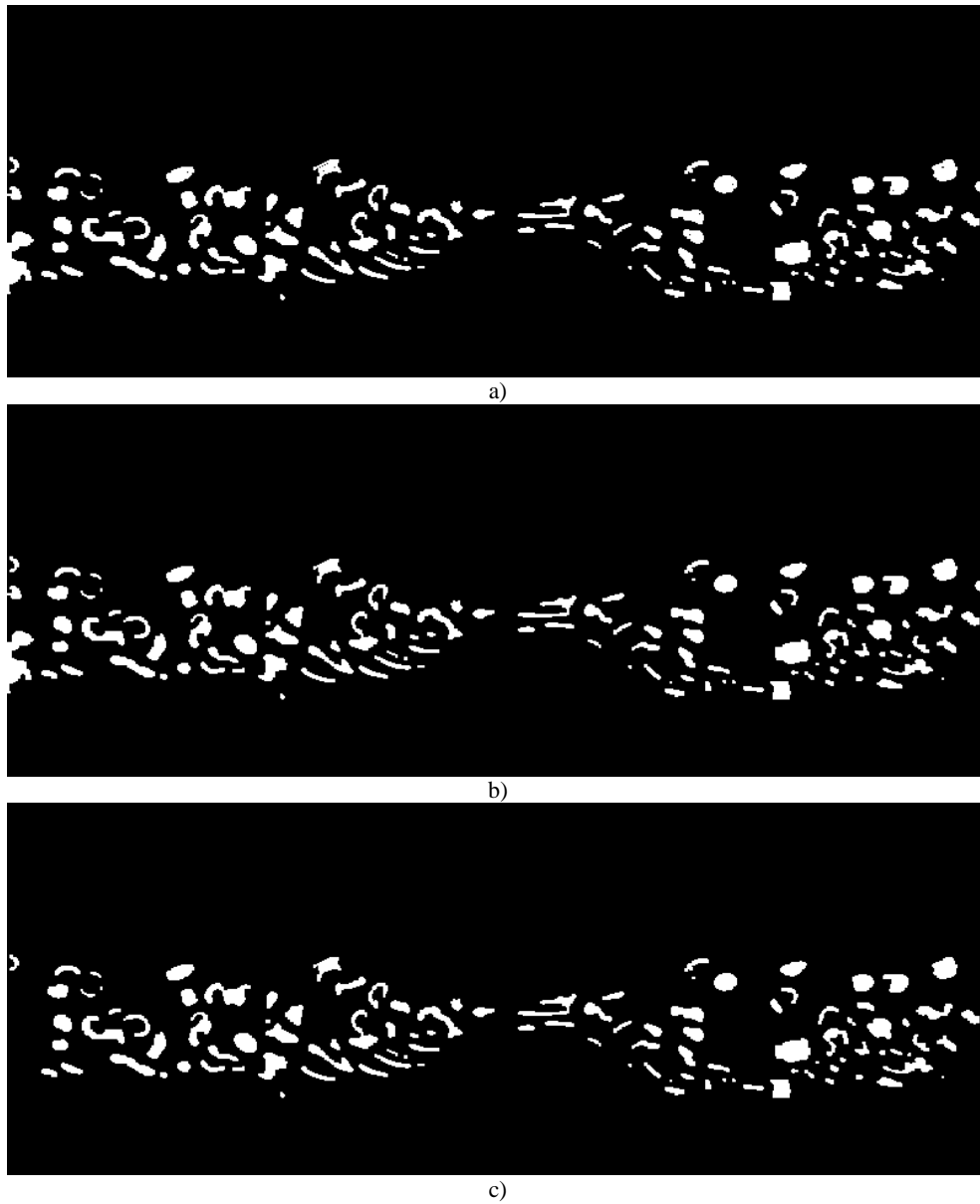
Para obter as características das várias regiões segmentadas, recorreu-se à binarização da imagem representada na Figura 5.9, obtendo uma imagem com o fundo preto e as regiões segmentadas a branco (Figura 5.11 a)).

Como algumas das regiões segmentadas apresentam orifícios no interior da região, procedeu-se ao preenchimento desses orifícios recorrendo à função *imfill* disponível no *Matlab*, obtendo a imagem da Figura 5.11 b)). Removeram-se ainda as células encostadas às bordas da imagem uma vez que podem não representar uma célula completa (Figura 5.11 c)).

Recorrendo à função *regionprops*, disponível no *Matlab*, foram obtidos os centróides, os eixos maiores, os eixos menores, as áreas e os *pixels* de cada região. Com estas características é possível determinar as propriedades das células que correspondem a cada região.

Assim, as diferentes posições do centróide obtidas para uma região ao longo de toda a sequência de imagens, fornecem informação acerca da trajetória da célula ao longo do escoamento.

Com as características acima referidas também é possível determinar a deformação da célula ao longo do escoamento, tendo em conta o cálculo do índice de deformação já representado na Figura 3.3.



**Figura 5.11:** a) Imagem resultante da binarização. b) Imagem obtida depois do preenchimento de orifícios. c) Imagem obtida depois de remover as bordas.

## 5.5 Seguimento

O seguimento das células ao longo do microcanal foi efetuado tendo em conta o modelo *keyhole* proposto por Reyes-Aldasoro *et al.* [47]. Neste modelo, considerando que uma célula-filha (célula em  $t$ ) se move com a mesma velocidade e na mesma direção que a célula-pai (célula em  $t-1$ ), pode-se prever a sua posição em  $t+1$ .

Para tal são definidas duas regiões onde é provável encontrar a célula-filha: uma fatia de circunferência com um ângulo de  $60^\circ$  e orientada para a posição prevista, e um círculo centrado na célula célula-pai. Estas duas regiões juntas fazem lembrar uma fechadura (em inglês *keyhole*), representada na Figura 5.12.



Figura 5.12: Modelo *keyhole* utilizado.

O modelo *keyhole* é então aplicado a cada uma das células da seguinte forma: o círculo do modelo *keyhole* é centrado na célula-pai e todo o modelo é orientado, de acordo com a direção de deslocamento da célula-pai, para uma dada posição na imagem seguinte; é procurado dentro do modelo uma região com características similares às da célula-pai (célula em  $t-1$ ); se a região for encontrada então é possível relacionar a célula-pai com a célula-filha. A Figura 5.13 ilustra o funcionamento do modelo.

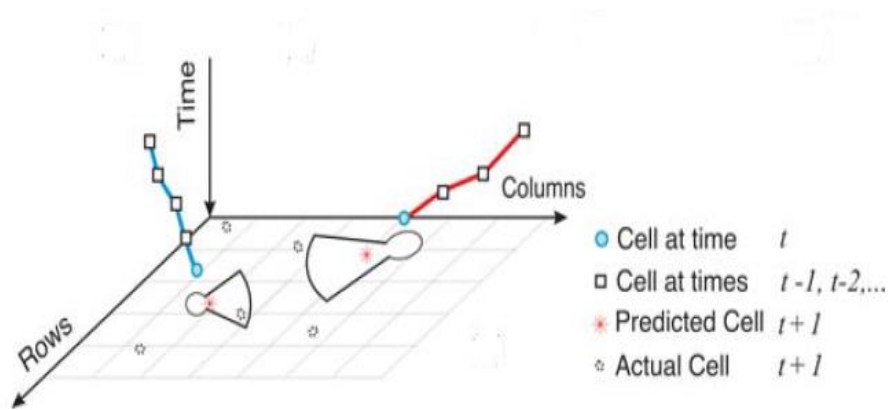


Figura 5.13: Funcionamento do modelo *keyhole* [47].

O modelo *keyhole* utilizado neste estudo foi desenhado numa imagem com  $141 \times 141$  *pixels* com um fundo preto e tendo em conta uma fatia com raio 60 *pixels* e ângulo aproximadamente  $45^\circ$  e um círculo com raio 15 *pixels*.

Uma vez posicionado o modelo, este pode apresentar mais do que uma solução para a célula-filha. Assim, se apenas se obtiver uma solução essa é automaticamente seleccionada como sendo a célula-filha. Se o modelo apresentar mais do que uma solução, a célula-filha é seleccionada tendo em conta a distância entre a célula-pai e as possíveis células filhas. Aquela que apresentar menor distância e características mais semelhantes com a célula-pai é considerada como sendo a célula-filha.

Na **Figura 5.14** está representado o seguimento de duas células ao longo do microcanal. Na Figura 5.15 estão representadas algumas imagens do seguimento dessas duas células ao longo do escoamento.

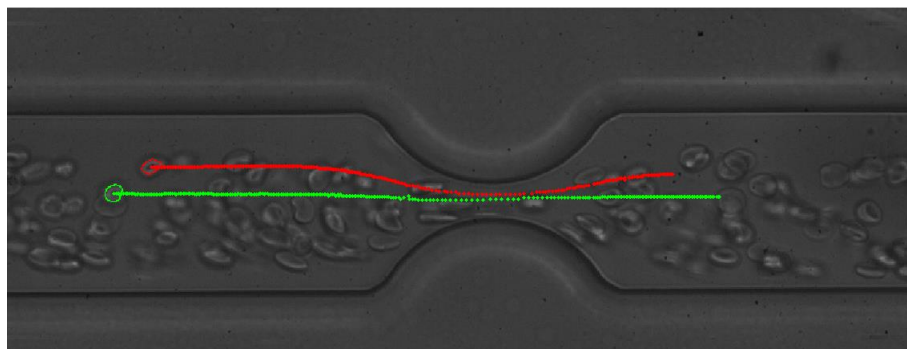
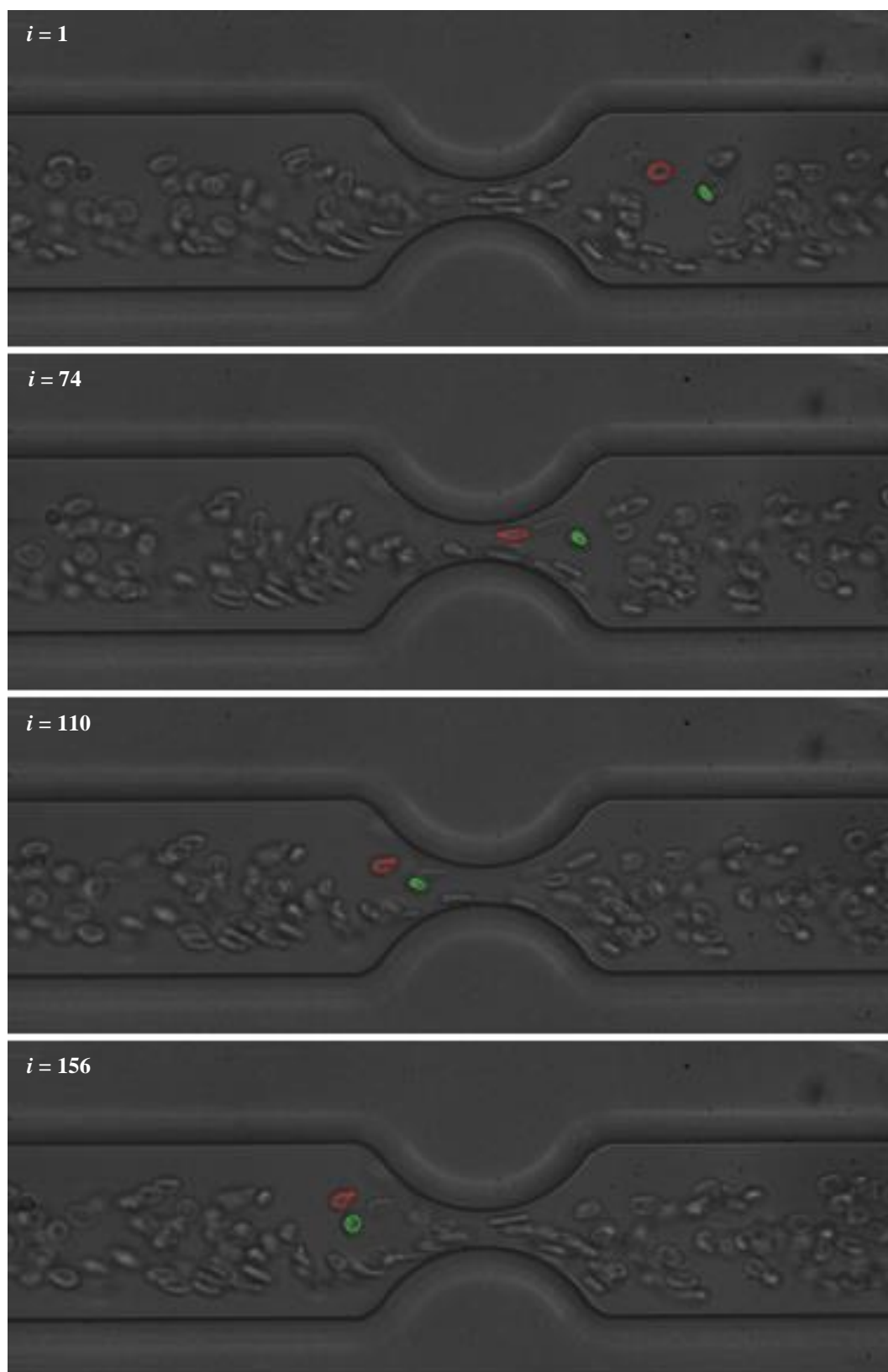


Figura 5.14: Seguimento de duas células usando o modelo *keyhole*.



**Figura 5.15:** Imagens resultantes do seguimento de células aplicando o modelo *keyhole*,  $i$  representa o número da imagem.

## Capítulo 6. Resultados e Discussões

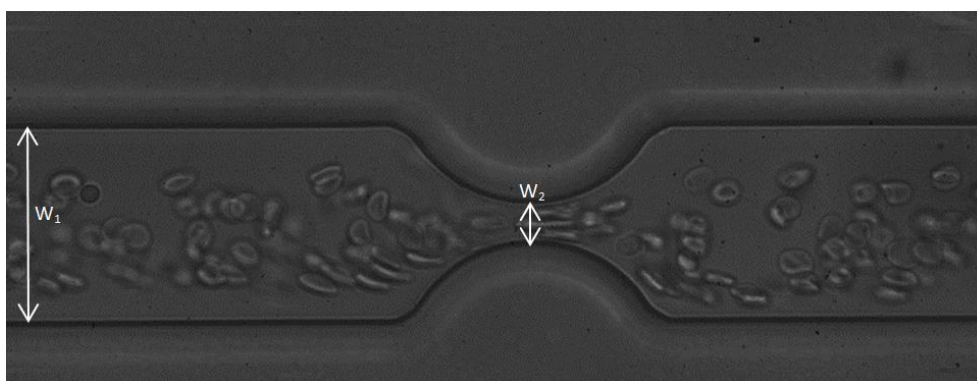
Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos com a aplicação do método *MKHtrackCells* e é feita uma pequena discussão sobre esses resultados.

O método proposto foi implementado em vários vídeos, representados por sequências de imagens, em dois microcanais diferentes, um microcanal com uma microestenose e um microcanal hiperbólico.

### 6.1 Microcanal com uma microestenose

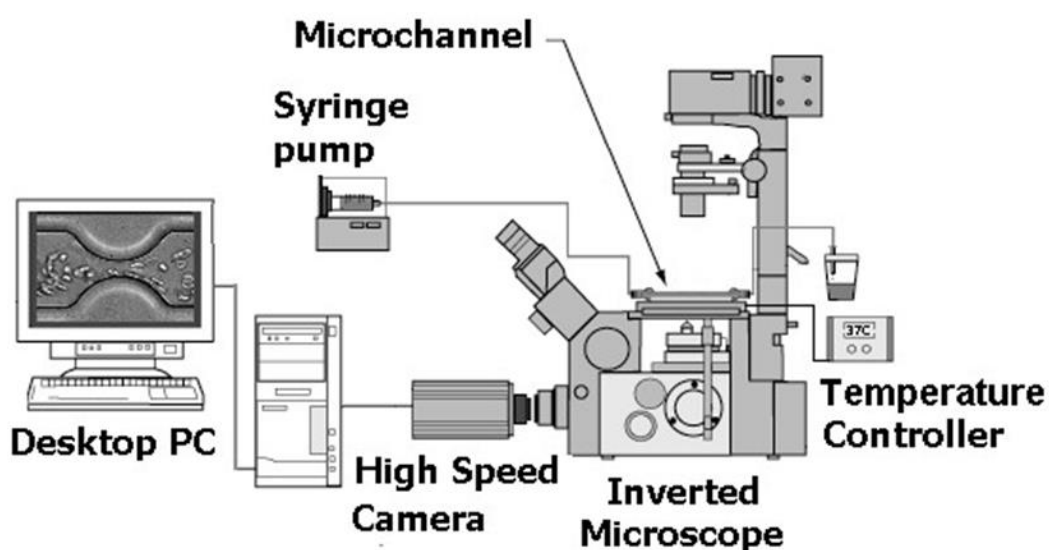
Para o microcanal com uma microestenose, o fluido analisado era composto por Dextrano 40 com cerca de 2% de GVs humanos em suspensão. O sangue utilizado foi recolhido de um adulto voluntário saudável e foi adicionado EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) para evitar a coagulação. As amostras sanguíneas foram lavadas e centrifugadas para separar os GVs dos outros constituintes do sangue e foram depois armazenadas a 4°C até à data da experiência.

Na Figura 6.1 está representado o microcanal com uma microestenose, fabricado em PDMS, utilizado para o escoamento de GVs humanos. A profundidade do microcanal em PDMS é constante ao longo de todo o dispositivo, e este apresenta uma largura  $W_1=50\mu m$ . A largura mínima do microcanal na microestenose é de  $W_2=10\mu m$ .



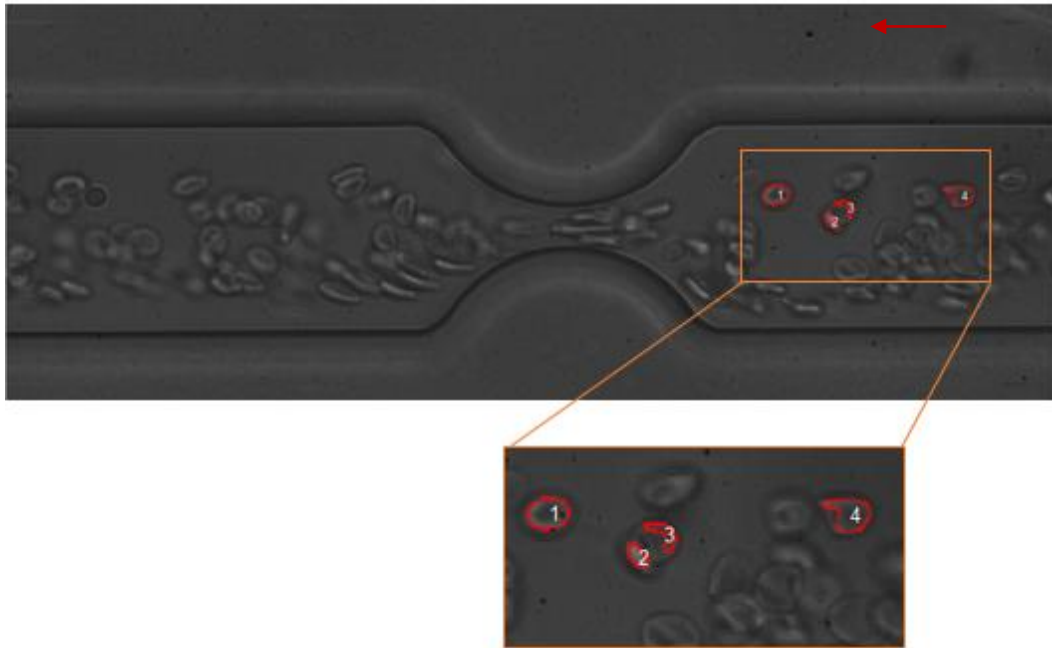
**Figura 6.1:** Representação do microcanal com uma microestenose em que  $W_1=50\mu\text{m}$  e  $W_2=10\mu\text{m}$ .

O microcanal foi colocado num microscópio invertido (*IX71, Olympus, Japão*) e a temperatura foi ajustada a  $37^\circ\text{C}$  com ajuda de um prato termo controlador (*Tokai Hit, Japão*). O caudal foi mantido constante a  $1\mu\text{L}/\text{min}$  com recurso a uma bomba de seringa (*KD Scirntif Inc, EUA*). O vídeo analisado foi capturado por uma câmara de alta velocidade (*Phantom v7.1, Vision Research, EUA*) e transferido para um computador onde foi convertido para um sequência de imagens (ver Figura 6.2).



**Figura 6.2:** Sistema de microscopia utilizado para obter as imagens do microcanal com uma microestenose [40].

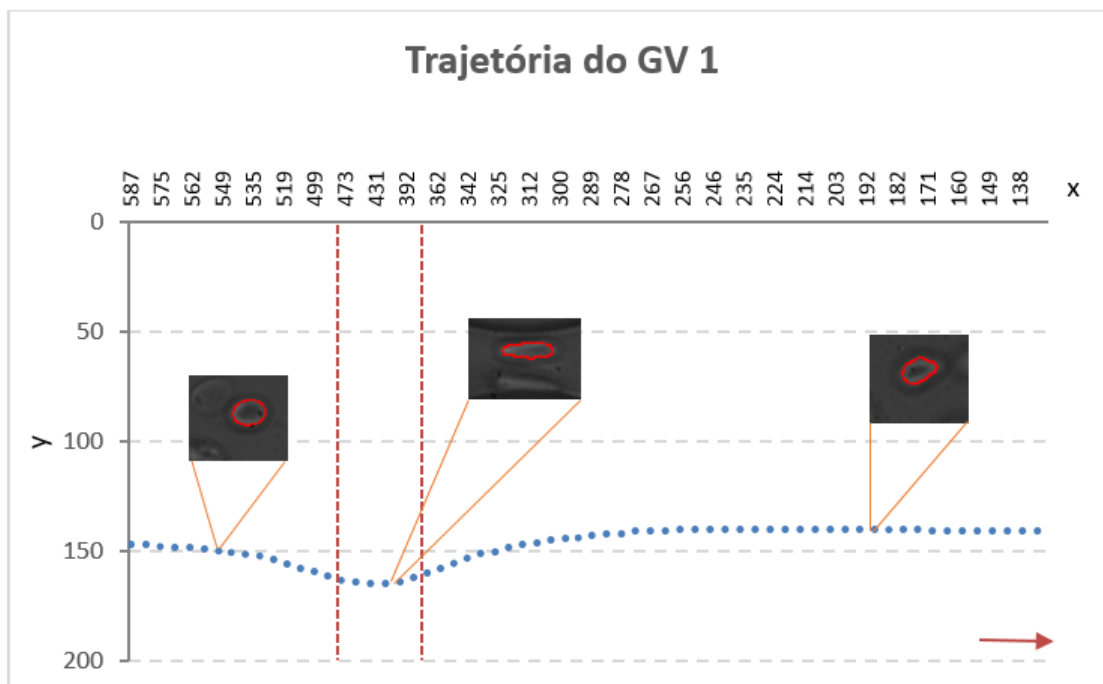
O método proposto foi implementado para o seguimento de quatro GVs, representadas na Figura 6.3, ao longo de todo o microcanal.



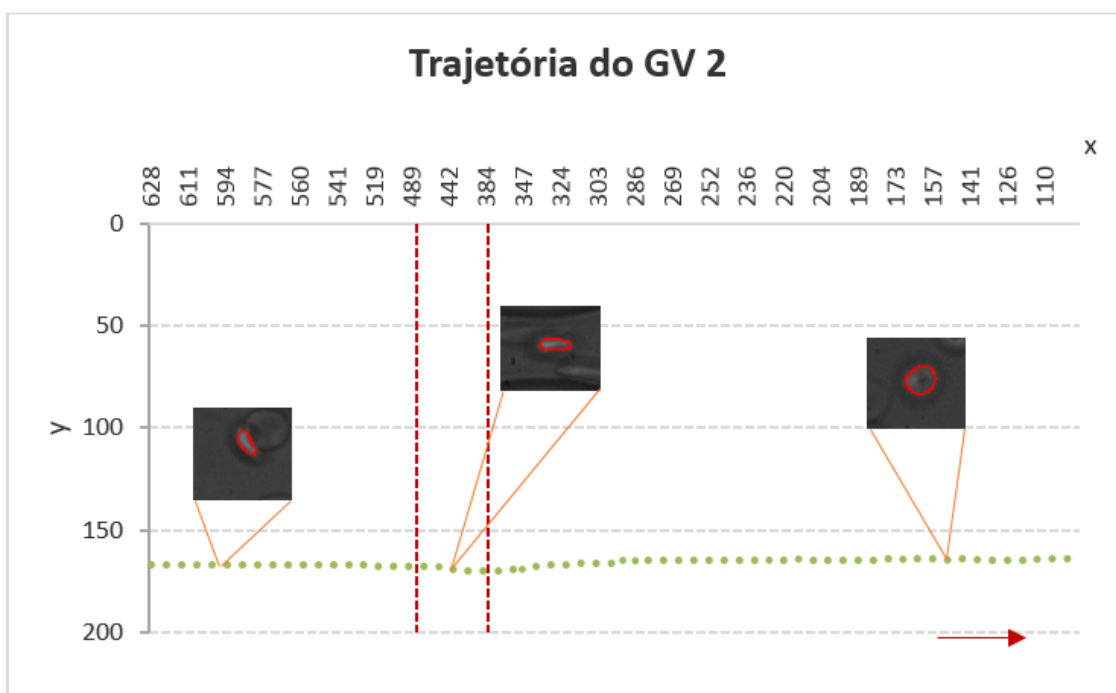
**Figura 6.3:** Células estudadas ao longo do microcanal com uma microestenose.

Para o GV 1, o método proposto conseguiu fazer o seguimento correto ao longo do escoamento, podendo ver-se a representação da trajetória desta célula ao longo do microcanal no gráfico da Figura 6.4. As linhas verticais vermelhas representam os limites da microestenose, que estão entre os valores 375 e 484 *pixels* aproximadamente. Como se pode verificar o GV 1 assume uma trajetória quase linear no início do escoamento, começando a descer à medida que se aproxima da microestenose.

Quanto ao GV 2, este assume uma trajetória praticamente linear ao longo de todo o microcanal, como se pode verificar no gráfico da Figura 6.5. Isto deve-se ao facto de esta célula se encontrar no centro do microcanal, não necessitando de desviar o seu trajeto para entrar na microestenose.

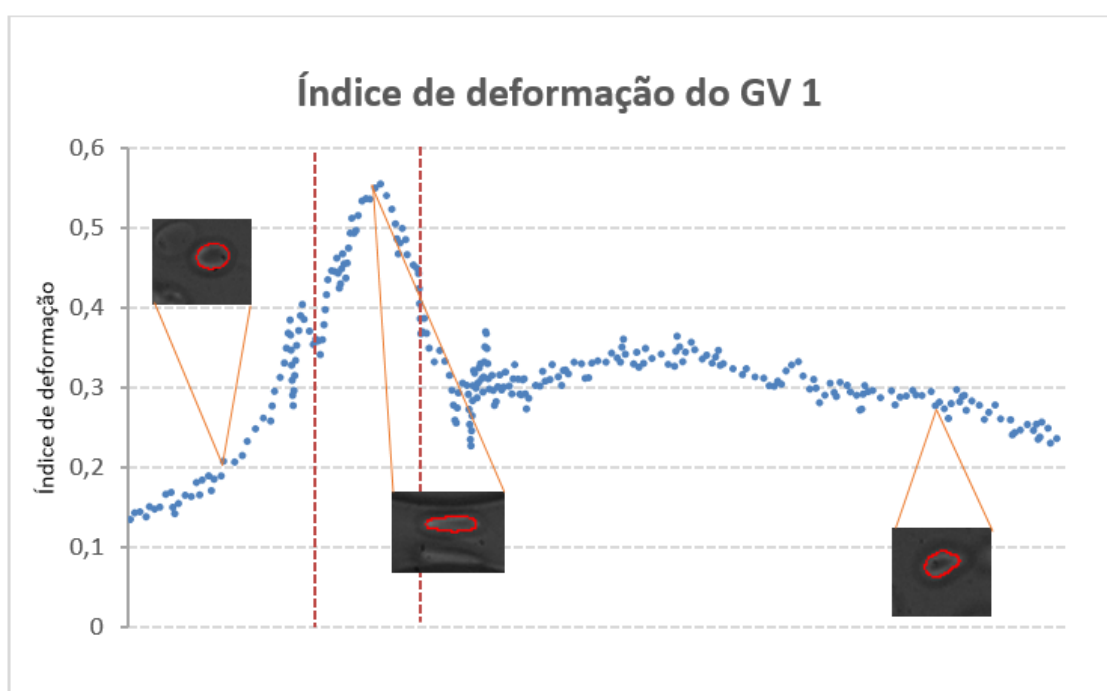


**Figura 6.4:** Trajetória do GV 1 ao longo do microcanal com uma microestenose.



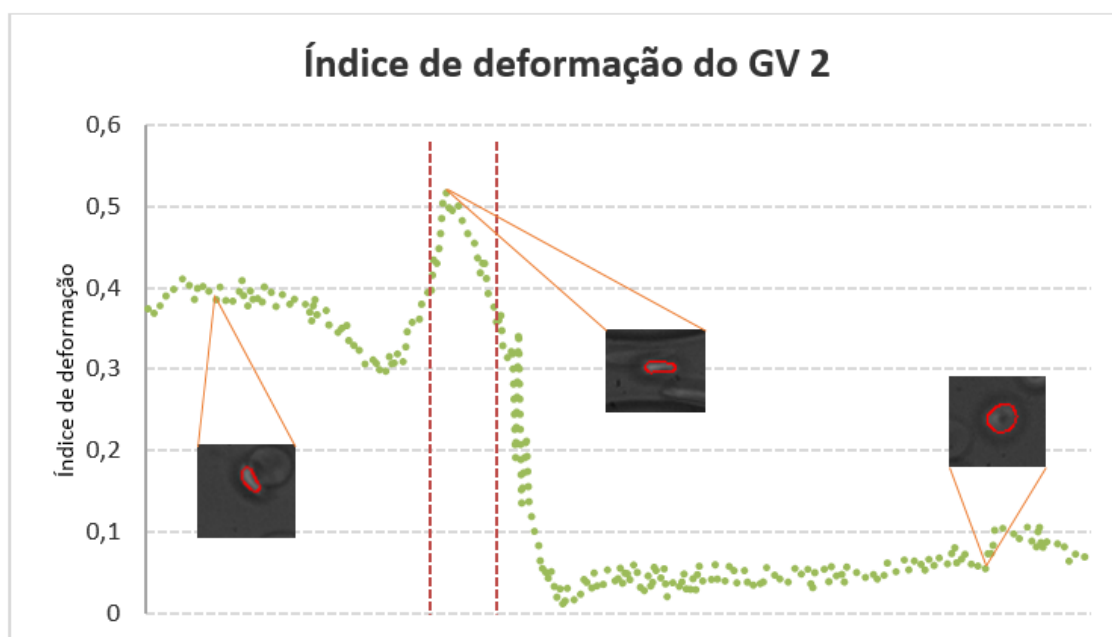
**Figura 6.5:** Trajetória do GV 2 ao longo do microcanal com uma microestenose.

O índice de deformação (ID) calculado ao longo do escoamento para o GV 1 pode ser observado no gráfico da Figura 6.6, e pode verificar-se que, apesar de existirem algumas oscilações no ID, este apresenta maior valor quando o GV 1 passa na microestenose, apresentando um valor máximo de 0,556 no centro da microestenose.



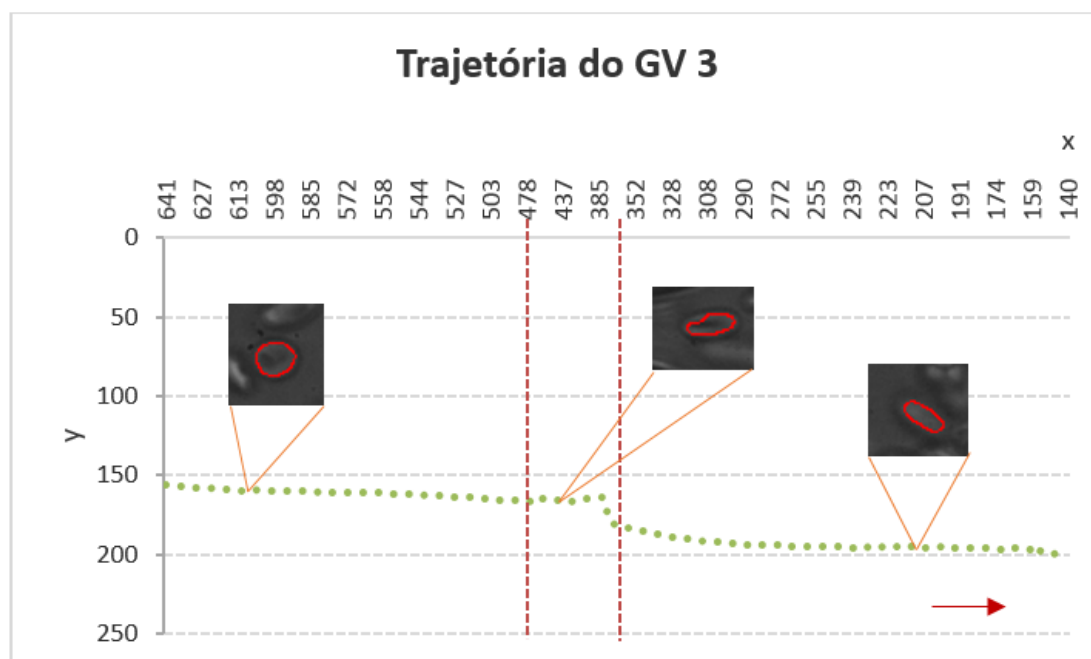
**Figura 6.6:** Índice de deformação do GV 1 ao longo do microcanal com uma microestenose.

Para o GV 2 o ID está representado no gráfico da Figura 6.7. Como se pode observar, este índice também apresenta algumas oscilações e verifica-se que antes da microestenose este valor é elevado para um ID inicial. Isto deve-se ao facto de o GV 2 se encontrar encostado a outro GV vizinho e por isso a sua geometria original não é esférica. No entanto, ao passar a microestenose esse valor aumenta ainda mais, devido ao aumento do alongamento da célula, apresentando um ID máximo no centro da microestenose. Depois da microestenose o GV 2 começa a recuperar a forma normal diminuindo o seu ID.



**Figura 6.7:** Índice de deformação do GV 2 ao longo do microcanal com uma microestenose.

Relativamente ao GV 3, o método não conseguiu seguir a célula até ao final, pois, como a cor das células se confunde com a cor do fundo e assim o processamento das imagens, nomeadamente a segmentação, não conseguiu identificar esta célula corretamente, perdendo-se a região correspondente ao GV 3 à saída da microestenose. Assim, o método de seguimento perde o rasto da célula à saída da microestenose, identificando outra célula como sendo o GV 3. O pico observado no gráfico da Figura 6.8 corresponde ao momento em que o algoritmo de seguimento perde o rasto ao GV 3 e identifica outra célula.

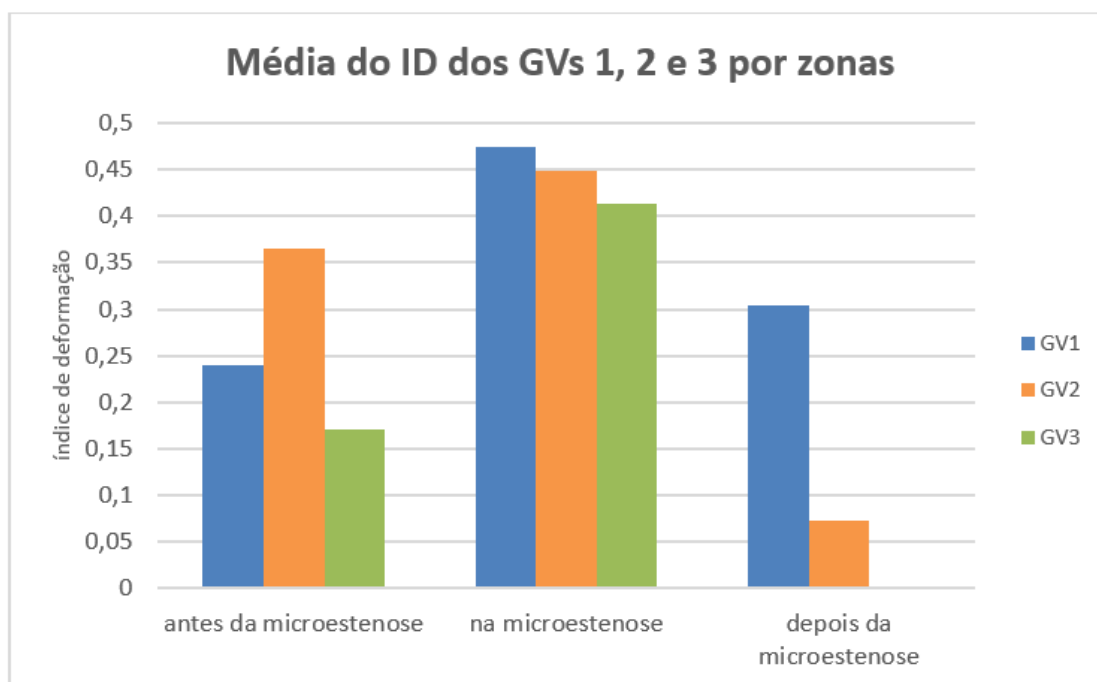


**Figura 6.8:** Trajetória obtida para o GV 3 ao longo do microcanal com uma microestenose.

Na Figura 6.9 é apresentado o ID médios dos GVs 1, 2 e 3 ao longo do escoamento, verificando-se que o GV 1 apresenta um valor médio do ID inferior na zona antes da microestenose. Este valor aumenta na zona da microestenose voltando a diminuir à saída desta.

Relativamente ao GV 2, verifica-se o mesmo efeito, contudo, esta célula inicia o escoamento já com um ID ligeiramente elevado devido ao facto de se encontrar encostada a outra célula, como já foi anteriormente referido.

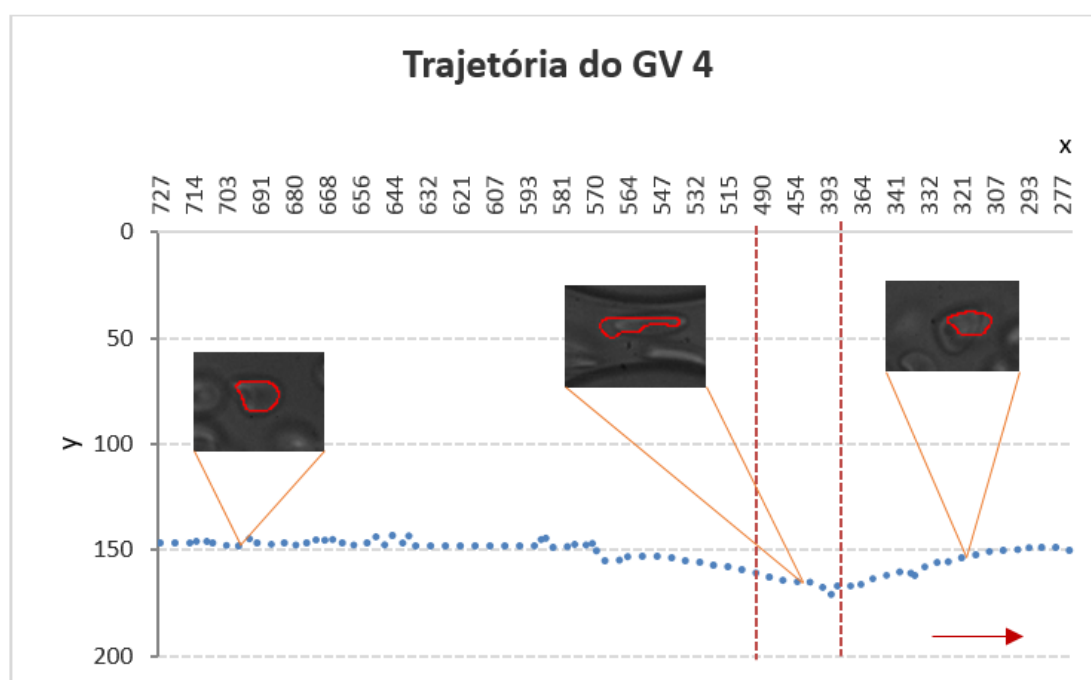
Uma vez que o seguimento do GV 3 não é realizado corretamente, o cálculo do seu ID ao longo do escoamento só é possível de determinar até ao instante imediatamente antes de detetar a outra célula vizinha, ou seja, antes de este GV sair da microestenose.



**Figura 6.9:** Índice de deformação dos GVs ao longo do microcanal com uma microestenose por zonas.

Para a GV 4 o processo de segmentação não consegue identificar a célula corretamente ao longo de todo o escoamento, deformando a região correspondente ao GV 4. Contudo, uma vez que essa região aparece em todas as imagens, é possível fazer o seu seguimento ao longo do escoamento, porém, o ID obtido não é real uma vez que este é afetado pela deformação induzida pelo processo de segmentação.

O gráfico da Figura 6.10 representa a trajetória do GV 4 ao longo do escoamento e como se pode verificar, a trajetória da célula começa por ser relativamente linear e vai descendo à medida que se aproxima da microestenose. Ao sair da microestenose o GV 4 volta a ter uma posição semelhante à inicial.



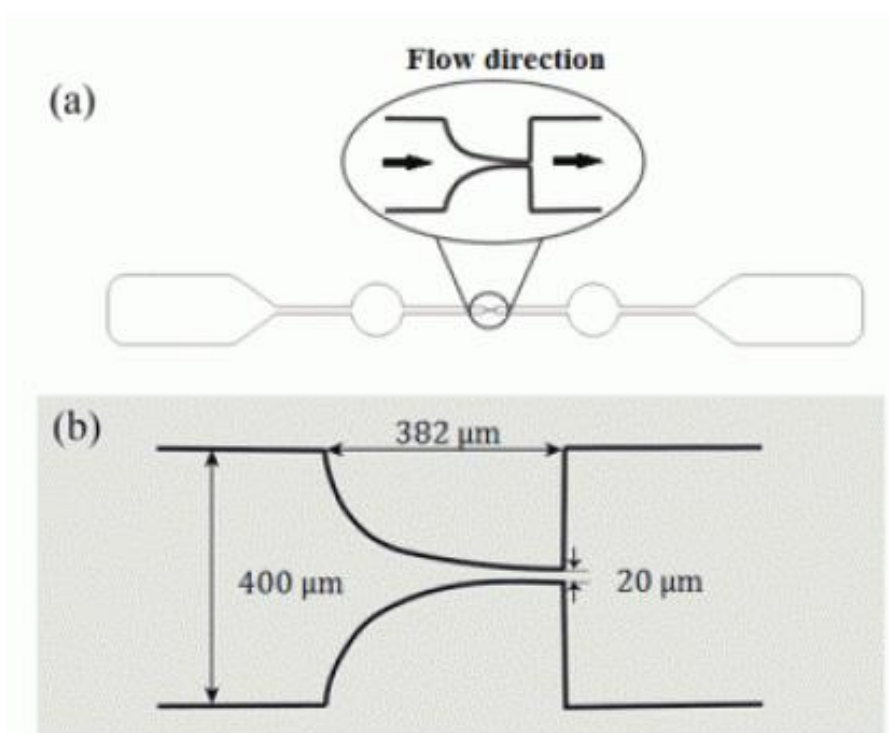
**Figura 6.10:** Trajetória obtida para o GV 4 ao longo do microcanal com uma microestenose.

## 6.2 Microcanal hiperbólico

Para este trabalho, o método proposto foi também aplicado a alguns vídeos do escoamento de células ao longo de um microcanal hiperbólico.

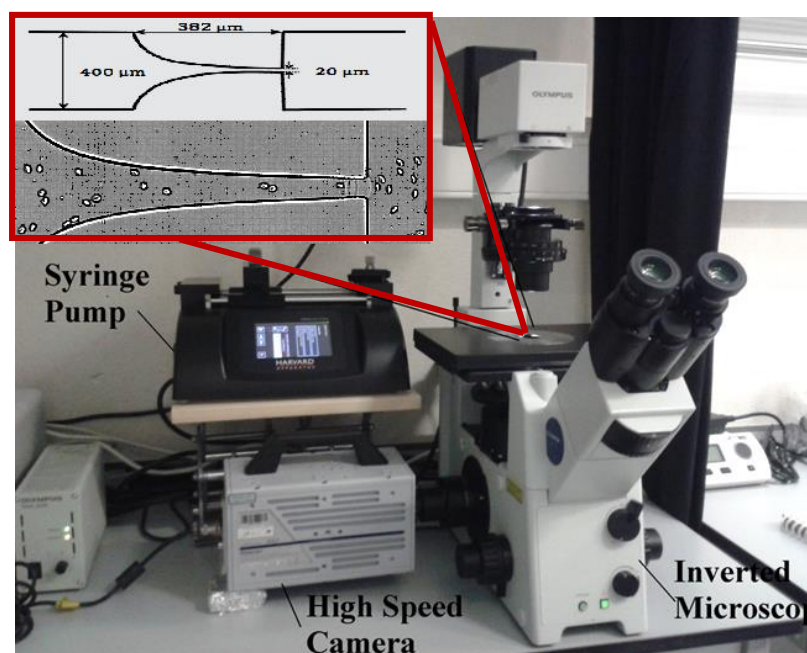
O microcanal representado na Figura 6.11 foi fabricado em PDMS recorrendo à técnica de litografia suave e foi utilizado um fluido composto por Dx40 e por 2% de glóbulos vermelhos humanos em suspensão. O fluido foi recolhido de um adulto saudável e adicionou-se EDTA para evitar a coagulação. As amostras foram guardadas a 4° até à data da experiência, que foi efetuada a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Algumas amostras contendo glóbulos vermelhos foram expostas durante 10 minutos a uma concentração de 0.02% de diamida, a fim de se poder estudar o efeito deste químico na deformabilidade das células.



**Figura 6.11:** Microcanal hiperbólico. a) Ilustração de todo o microcanal. b) Dimensões do microcanal.

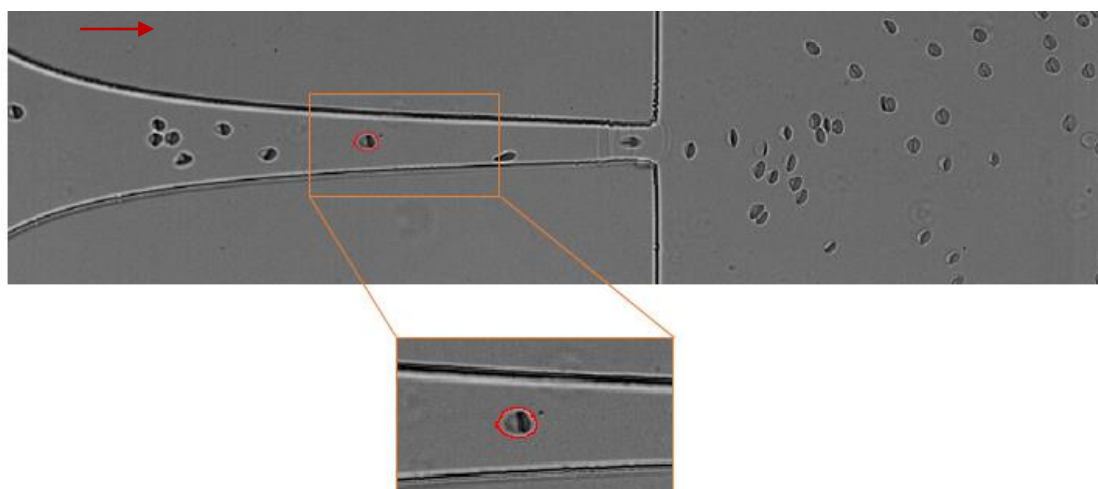
Para a captura dos vídeos o microcanal foi colocado num microscópio invertido (*IX71, Olympus*) combinado com uma câmara de alta velocidade (*FASTCAM SA3, Photron*) (Figura 6.12). O caudal foi mantido contante a  $0.5\mu L/min$  com ajuda de uma bomba de seringa (*PHD ULTRA*).



**Figura 6.12:** Sistema de microscopia utilizado para obter as imagens do microcanal hiperbólico.

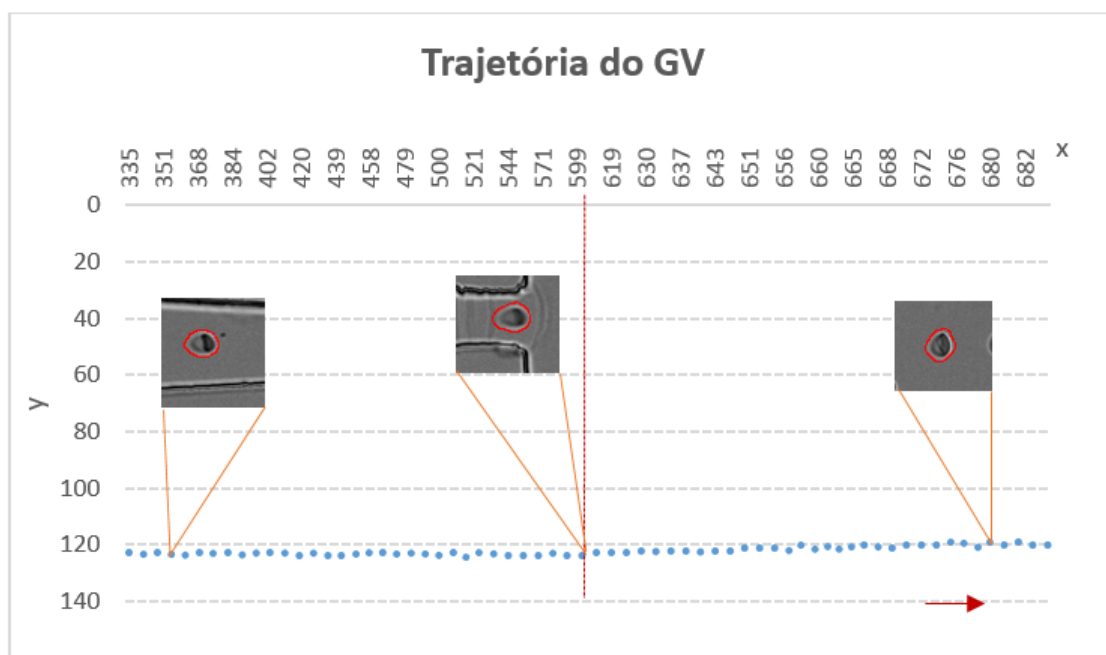
### Glóbulos vermelhos humanos saudáveis

Para o seguimento contendo GVs humanos saudáveis foi estudado o comportamento de um GV representativo (ver Figura 6.13).



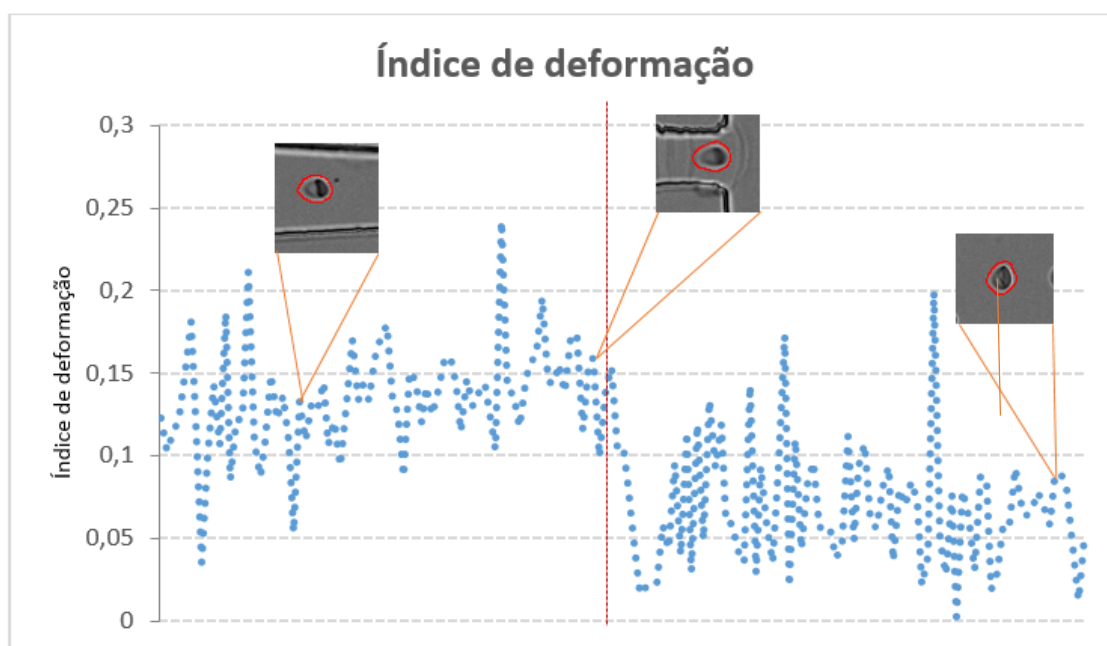
**Figura 6.13:** GV seguido ao longo microcanal hiperbólico.

Para o GV selecionado, o método proposto conseguiu fazer o seguimento correto ao longo do microcanal. Na Figura 6.14 pode observar-se a trajetória deste GV, verificando-se que apresenta um comportamento linear ao longo de todo o microcanal. A linha vermelha delimita o local onde termina a zona de contração do microcanal.



**Figura 6.14:** Trajetória do GV1 ao longo do microcanal hiperbólico.

Também foi possível determinar o ID deste GV como pode ser observado na Figura 6.15.

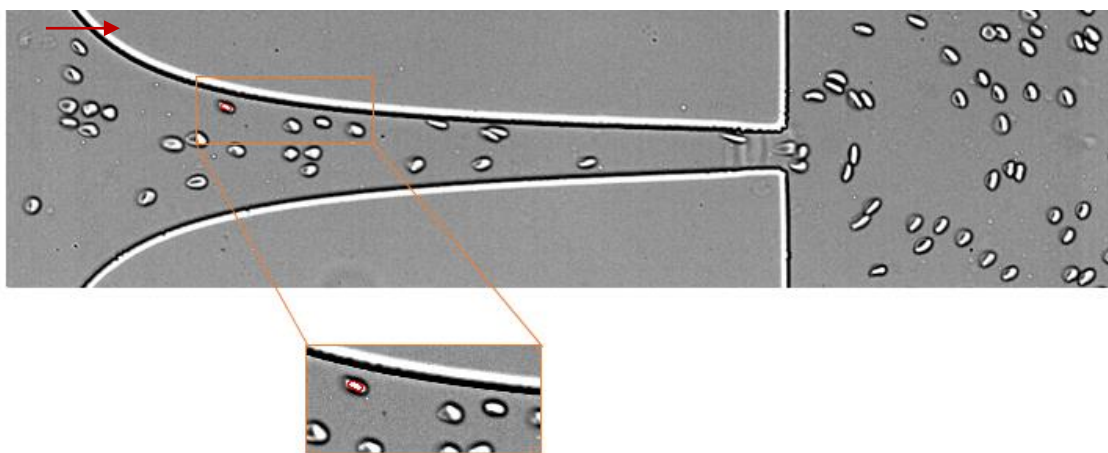


**Figura 6.15:** Índice de deformação do GV normal ao longo do microcanal hiperbólico.

Analisando a figura do ID observa-se que o cálculo deste parâmetro não é muito correto, pois os valores obtidos apresentam grandes oscilações ao longo de todo o microcanal. Contudo, é possível verificar que ao longo da zona de contração do microcanal as células apresentam valores de ID mais elevados que na zona após a contração.

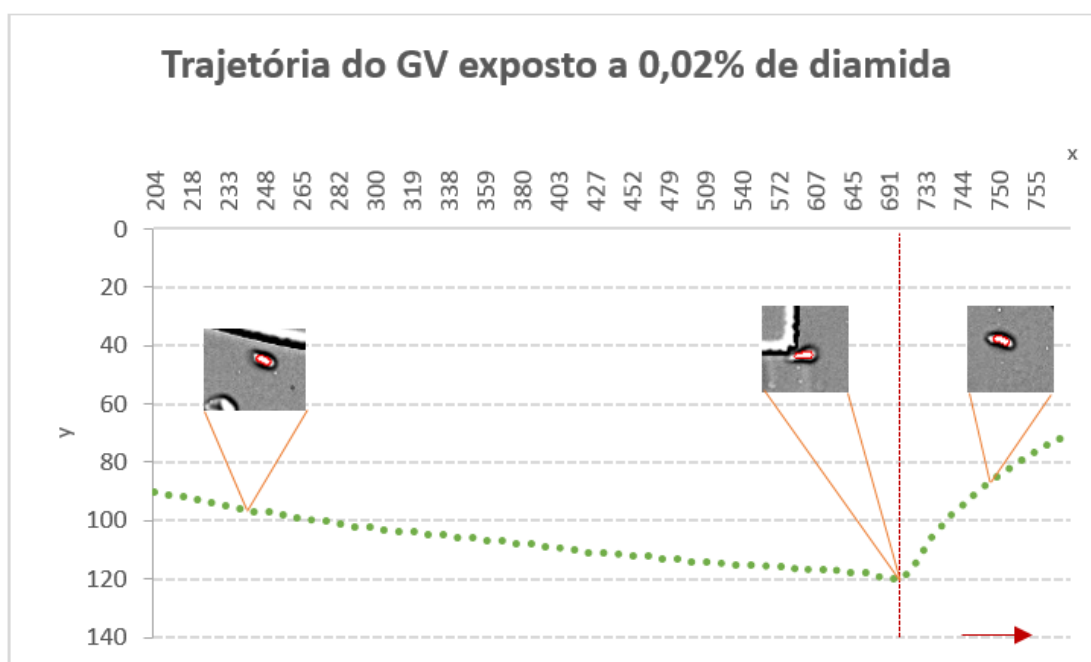
### Glóbulos vermelhos humanos expostos a 0.02% de diamida

O seguimento de GVs humanos expostos a 0.02% de diamida foi estudado analisando também uma célula representativa (ver Figura 6.16).



**Figura 6.16:** Célula exposta a 0.02% de diamida, seguida ao longo do microcanal hiperbólico.

O resultado obtido para a trajetória do GV pode ser observado na Figura 6.17, onde se verifica que a trajetória é descendente até chegar perto do fim da zona de contração. Esta descida é esperada uma vez que a parede superior do microcanal não é linear mas sim ligeiramente descendente. Depois de passar a zona de contração o GV sobe, o que era também esperado pois esta célula encontra-se próxima da parede superior do microcanal.



**Figura 6.17:** Trajetória do GV exposto a 0.02% de diamida, ao longo do microcanal hiperbólico.

O ID obtido para o GV exposto a 0.025 de diamida é apresentado na Figura 6.18, onde se verifica que este parâmetro vai aumentando ao longo da zona de contração. Também se pode verificar que esta célula apresenta valores iniciais para o ID relativamente elevados, isto deve-se ao facto de o GV se encontrar numa trajetória descendente e perto da parede do microcanal. Após passar a zona de contração o ID do GV diminui, mantendo-se quase constante em valores na ordem dos 0,4%.

Na Figura 6.19 é apresentado o ID médio do GV saudável e do GV exposto a 0.02% de diamida ao longo do microcanal hiperbólico.

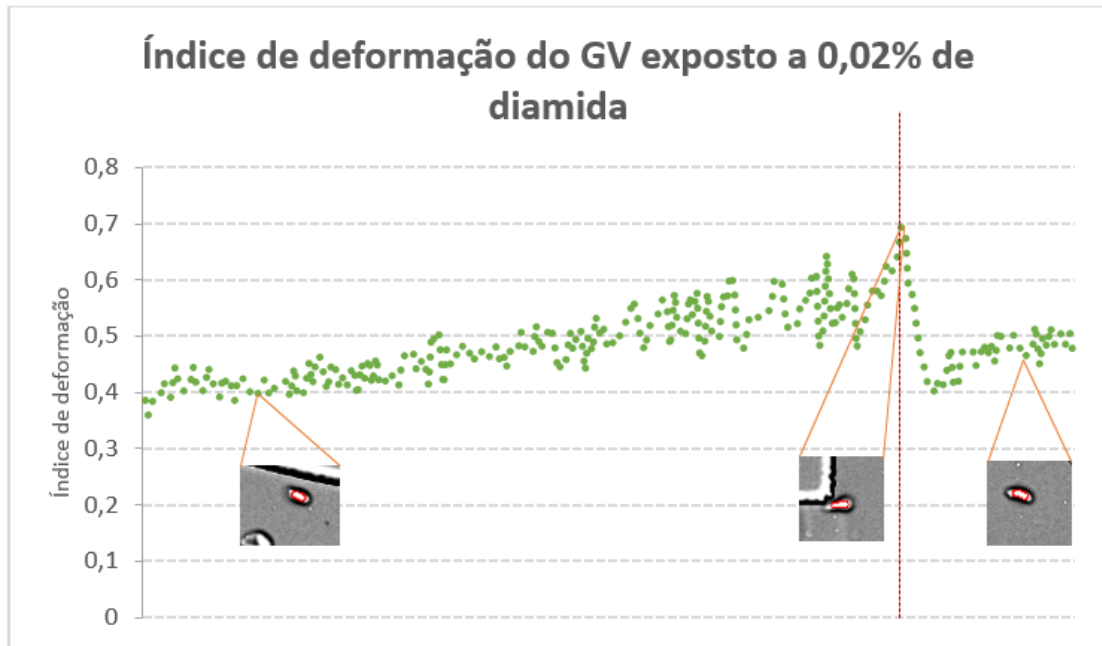


Figura 6.18: Índice de deformação do GV exposto a 0.02% de diamida, ao longo ao microcanal hiperbólico.

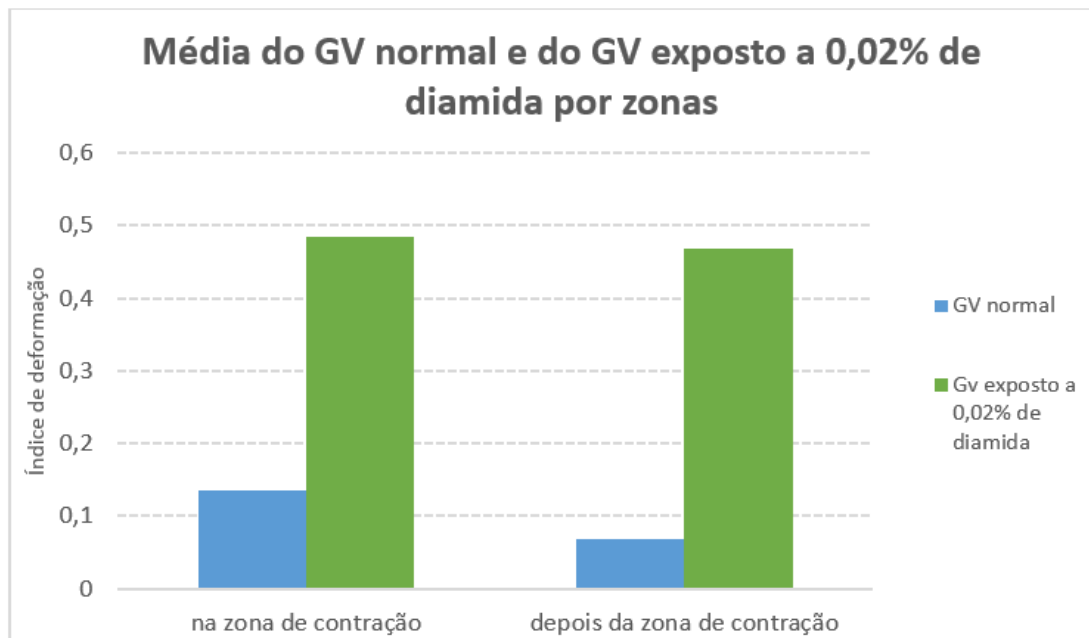


Figura 6.19: Índice de deformação do GV normal e do GV exposto a 0.02% de diamida por zonas.

Analisando a Figura 6.19 pode observar-se que o GV saudável apresenta um ID na zona de contração do microcanal hiperbólico superior ao ID depois da zona de contração, ou seja, na zona de expansão a velocidade do GV diminui e consequentemente a taxa de deformação responsável pela sua deformação é reduzida.

Relativamente ao GV exposto a diamida, verifica-se que depois da zona de contração o ID diminui bastante pouco quando comparado com o GV saudável. Este GV apresenta também um ID superior ao ID do GV saudável. Isto pode dever-se ao facto não só de o GV estar junto da parede, mas também devido aos GVs expostos à diamida alterarem a rigidez das suas membranas.



# Capítulo 7. Conclusões e Trabalhos Futuros

## 7.1 Conclusões

Ao longo deste trabalho foi desenvolvido um método automático, *MKHtrackCells*, que permite não só o seguimento de células ao longo de microcanais, mas também o cálculo do seu índice de deformação. O principal fator de motivação para a realização deste trabalho deveu-se ao facto de os métodos existentes para realizar o seguimento de células serem bastante morosos e propícios à ocorrência de erros por parte dos utilizadores.

No método desenvolvido foram aplicadas várias estratégias de processamento de imagens, incluindo uma etapa de pré-processamento, a segmentação da imagem e o cálculo do fluxo ótico. O pré-processamento da imagem revelou ser uma fase importante, pois permitiu melhorar realmente as imagens originais, facilitando assim o processo de segmentação.

Relativamente à segmentação das imagens, esta representou uma etapa fundamental, uma vez que os resultados finais obtidos com este método foram influenciados por este processo. Sendo que o fundo das imagens nem sempre se distingue das restantes regiões, a segmentação produziu resultados onde nem todas as regiões, que correspondiam às células, foram corretamente segmentadas. Assim, ao longo das sequências de imagens, apareciam células segmentadas cuja região diferia bastante em relação à região presente na imagem anterior ou na imagem seguinte.

A dificuldade na segmentação das imagens influenciou, portanto, os resultados obtidos para os índices de deformação, uma vez que a região na imagem  $t$  podia estar

perfeitamente definida e, na imagem  $t+1$  podia ter uma forma irregular, ou mesmo estar aglomerada com regiões correspondentes a outras células.

A estimação do fluxo ótico mostrou ser uma boa estratégia para realizar o seguimento de células. Os resultados obtidos com o cálculo do fluxo ótico permitiram posicionar o modelo *keyhole* utilizado de forma a este incluir as células-filhas ao longo das seqüências de imagens. Porém, a estimação do movimento com recurso ao cálculo do fluxo ótico mostrou ser computacionalmente difícil e lenta, não permitindo a realização de estudos em tempo real.

O método desenvolvido mostrou contudo ser uma técnica promissora para o seguimento de células, uma vez que permitiu a determinação da posição das células estudadas ao longo dos microcanais.

Adicionalmente ao seguimento das células, o método proposto calcula os seus índices de deformação, permitindo estudar o comportamento dinâmico da deformabilidade das células ao longo do microcanal. Como já foi referido, o cálculo dos índices de deformação foi afetado pela segmentação das imagens, todavia, os resultados obtidos permitiram ainda tirar algumas conclusões.

Relativamente ao microcanal com uma microestenose estudado, é possível concluir que o estreitamento da área do microcanal leva a um aumento da deformação dos glóbulos vermelhos. Este aumento no índice de deformação é devido à necessidade das células se alongarem para passarem pela estenose.

Para o microcanal hiperbólico foi possível fazer o seguimento das células estudadas bem como calcular os seus índices de deformação. Os resultados demonstram que os GVs normais têm tendência a apresentar índices de deformação superiores na zona de contração do microcanal, diminuindo esses valores depois de passar essa zona.

Relativamente ao efeito da diamida na deformabilidade das células, verificou-se que esta influencia a geometria das células, uma vez que o GV exposto a diamida apresenta uma forma alongada com uma espécie de cauda, o que conseqüentemente aumenta o seu índice de deformação. Os resultados sugerem que com a diamida o índice

de deformação dos GVs não varia muito entre a zona de contração e depois de passar essa zona.

## 7.2 Trabalhos futuros

Como trabalho futuro destaca-se a necessidade de otimizar o processo de segmentação, aplicando e testando outras técnicas, a fim de se conseguirem resultados melhores e mais fiáveis. A continuidade deste trabalho visa aperfeiçoar o método a fim de se conseguir fazer o seguimento das células e a determinação das suas características em tempo real, bem como quando há oclusão total das células ao longo do escoamento. Também é importante conseguir determinar outras características relevantes no escoamento sanguíneo, como a velocidade das células e até mesmo as dimensões da camada de plasma.

A fim de conhecer melhor a influência da diamida na deformabilidade das células seria importante estudar esse efeito com recurso a outros tipos de microcanais e também com células expostas a outras concentrações de diamida. A utilização do glutaraldeído para o estudo da deformabilidade das células ao longo do escoamento também é pertinente.

A aplicação do método desenvolvido a outros escoamentos com microcanais com geometrias diferentes também é importante. Igualmente, o estudo do comportamento de outras células sanguíneas, como é o caso dos glóbulos brancos, pode ser relevante. Uma vez que estas células têm a capacidade de atravessar os capilares sanguíneos, o estudo da sua deformabilidade pode ser interessante.

Sendo que a deformabilidade das células está diretamente relacionada com diversas doenças, para trabalhos futuros seria também interessante aplicar este método em células patológicas e verificar a potencialidade deste método para auxiliar o diagnóstico precoce de doenças relacionadas com a deformabilidade das células, como por exemplo os diabetes e a malária.



## Referências Bibliográficas

- [1] <http://gfugedordefrequecia.blogspot.pt/2011/03/9.html>
- [2] <http://www.mathworks.com/company/newsletters/articles/the-watershed-transform-strategies-for-image-segmentation.html>
- [3] Moderna Enciclopédia Universal, vol. 16, 1987.
- [4] Nova Enciclopédia Médica, vol. 9, 1979.
- [5] ABKARIAN, M., FAIVRE, M., HORTON, R., SMISTRUP, K., BEST-POPESCU C. A. e STONE, H., Cellular-scale hydrodynamics, *Biomed Mater*, vol. 3, 2008.
- [6] ACHARYA, T. e RAY, A. K., *Image Processing Principles and Applications*, Wiley-Interscience, 2005.
- [7] BARRON, J. L. e THACKER, N. A., Tutorial: computing 2D and 3D optical flow, *Tina Memo*, 2005.
- [8] BANKMAN, I. N., Segmentation, *Handbook of Medical Imaging Processing and Analysis*, Academic Press, 2000.
- [9] BARTHOLOMEUSZ, D. A., BOUTTÉ, R. W. e ANDRADE, J. D., Xurography: rapid prototyping of microstructures using a cutting plotter, *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 14 (6), 2005.
- [10] BROX, T., BRUHN, A., PAPPENBERG, N. e WEICKERT, J., High accuracy optical flow estimation based on a theory for warping, *8th European Conference on Computer Vision*, vol. 4, pp. 25-36, 2004.
- [11] BROX, T. e MALIK, J., Large displacement optical flow descriptor matching in variational motion estimation, *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 33, pp. 500-513, 2011.
- [12] Dobbe, J. G. G., Hardeman, M. R., Streeckee, J., Ince, C. e Grimbergen, C. A., Analyzing red blood cell-deformability distributions, *Blood Cells, Molecules and Diseases*, vol. 28 (3), pp. 373-384, 2002.

- [13] DOUGHERTY, G., *Digital Image Processing for Medical Application*, Cambridge University Press, 2009.
- [14] EDEN, E., WAISMAN, D., RUDZSKY, M., BITTERMAN, H., BROD, V. e RIVLIN, E., An automated method for analysis of flow characteristics of circulating particles from *in vivo* video microscopy, *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 24 (8), 2005.
- [15] Fustino, V., Pinho, D., Yaginuma, T., Calhelha, R. C., Man-Kim, G., Arana, S., Lima, R., Ferreira, I. C. F. R. e Oliveira, M. S. N., Measurement of red blood cells deformation index in a hyperbolic microchannel, 5th Portuguese Congress on Biomechanics, 8 e 9 Fevereiro, Espinho, Portugal, 2013.
- [16] FUJIWARA, H., ISHIKAWA, T., LIMA, R., MATSUKI, N., IMAI, Y., KAJI, H., NISHIZAWA, M. e YAMAGUCHI, T., Red blood cell motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel, *Journal of Biomechanics*, vol. 42, pp. 832-843, 2009.
- [17] GARCIA, V., DIAS, R. e LIMA, R., In vitro blood flow behaviour in microchannels with simple and complex geometries, *Applied Biological Engineering – Principles and Practice*, 2012, disponível em: <http://www.intechopen.com/books/applied-biological-engineering-principles-and-practice/in-vitro-blood-flow-behaviour-in-microchannels-with-simple-and-complex-geometries>
- [18] GOLDSMITH, H. e TURITTO, V., Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic and applications, *ICTH-Report-Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Hemostasis*, vol. 55 (3), pp. 415-443, 1986.
- [19] GONZALEZ, R. C. e WOODS, R. E., *Digital Image Processing*, 2nd ed., Prentice-Hall, 2002.
- [20] GONZALEZ, R. C., WOODS, R. E e Eddins, S. L., *Digital Image Processing using Matlab*, 2nd ed., Pearson Prentice Hall, 2004.
- [21] GUÉGUEN, M., BIDET, J. M., DURAND F., DRISS, F., JOFFRE, A. e GENETET, B., Filtration pressure and red blood cell deformability: evaluation of a new device: erythrometre. *Biorheology Suppl.*, vol. 1, pp. 261-265, 1984.

- 
- [22] HOEHN, M., WIEDERMAN, D., JUSTICIA, C., RAMOS-CABRER, P., KRUTTWIG, K., FARR, T. e HIMMELREICH, U., Cell tracking using resonance imaging, *The Journal of Physiology*, vol. 584 (1), pp. 25-30, 2009.
- [23] JAQAMAN, K. e DANUSER, G., Computational image analysis of cellular Dynamics: a case study based on particle tracking, *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 4, 2009.
- [24] KAMOUN, W. S., SCHMUGGE, S. J., KRAFTCHICK, J. P., CLEMENS, M. G. e SHIN, M. C., Liver microcirculation analysis by red blood cell motion modeling in intravital microscopy images, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 55 (1), 2008.
- [25] KUROKAWA, H., NODA, H., SUGIYAMA, M., SAKAUE-SAWANO, A., FUKAMI, K. e MIYAWAKI, A., Software for precise tracking of cell proliferation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 417, pp. 1080-1085, 2012.
- [26] LEBLE, V., LIMA, R., DIAS, R., FERNANDES, C., ISHIKAWA, T., IMAI, Y. e YAMAGUCHI, T., Asymmetry of red blood cell motions in a microchannel with a diverging and converging bifurcation, *Biomicrofluidics*, vol. 5, 2011.
- [27] LEE, S. S.; YIM, Y. e AHN, K. H., Extensional flow-based assessment of red blood cell deformability using hyperbolic converging microchannel, *Biomed Microdevices*, 2009.
- [28] Lima, R. Sebenta teórica de micro/nanotecnologias e aplicações biomédicas, *Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança*, 2012.
- [29] LIMA, R., ISHIKAWA, T., IMAI, Y., TAKEDA, M., WADA, S. e YAMAGUCHI, T., Measurement of individual red blood cell motions under high hematocrit conditions using a confocal micro-PTV system, *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 37 (8), pp. 1546-1559, 2009.
- [30] LIMA, R., ISHIKAWA, T., IMAI, Y. e YAMAGUCHI, T., Blood flow behavior in microchannels: past, current and future trends, *Single and two-Phase on Chemical and Biomedical Engineering*, pp. 513-547, 2012.
-

- [31] LIMA, R., OLIVEIRA, M. S. N., ISHIKAWA, T., KAJI, H., TANAKA, S., NISHIZAWA, M. e YAMAGUCHI, T., Axiymmetric polydimethylsiloxane microchannels for *in vitro* hemodynamic studies, *Biofabrication*, vol. 1, 2009.
- [32] MAEDA, N., Erythrocyte rheology in microcirculation, *Japanese Journal of Physiology*, vol. 46, pp. 1-14, 1996.
- [33] MEIJERING, E., DZYUBACHYK, O. e SMAL, I., Methods for cell and particle tracking, *Imaging and Spectroscopic Analysis of Living Cells*, vol. 504, pp. 183-200, 2012.
- [34] MEIJERING, E., DZYUBACHYK, O., SMAL, I. e CAPPELLEN, W. A., Tracking in cell and developmental biology, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 20, pp. 894-902, 2009.
- [35] MEIJERING, E., SMAL, I. e DANUSER, G., Tracking in molecular bioimaging, *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 23 (3), pp. 46-53, 2006.
- [36] MOKKEN, F.C., KEDARIA, M., HENNY, C. P., HARDEMAN, M., R. e GELB, A. W., The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorrheological parameter, *Annals of Hematology*, vol. 64, pp. 113-122, 1992.
- [37] MONTEIRO, F. C., Region-based spatial and temporal image segmentation, *Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto*, 2007.
- [38] MONTEIRO, F. C., Sebenta teórica de processamento de imagens médicas, *Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança*, 2010.
- [39] MONTEIRO, F. C., Sebenta teórica de análise e interpretação de imagem médica, *Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança*, 2013.
- [40] MONTEIRO, F. C., TABOADA, B. e LIMA, R., Visualization of red blood cells flowing through a PDMS microchannel with a microstenosis: an image analysis assessment, in *Proceedings of IV ECCOMAS Thematic Conference on Computational Vision and Medical Image Processing*, pp. 369-373, Madeira, Portugal, 2013.

- 
- [41] PINHO, D., Determinação e caracterização das trajetórias dos glóbulos vermelhos: um método semi-automático, *Relatório final do trabalho de projecto para obtenção do grau de mestre, Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança*, 2011.
- [42] PINHO, D., LIMA, R., PEREIRA, A. I. e GAYUBO, F., Automatic tracking of labeled red blood cells in microchannels, *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*, 2012.
- [43] PINTO, E., TABOADA, B., FAUSTINO, V., CIDRE, D., RODRIGUES, R., MIRANDA, J., GARCIA, V., DIAS, R. e LIMA, R., Blood flow in microchannels manufactured by a low cost technique: xurography, *Perspectives in Fundamental and Applied Rheology*, 2013.
- [44] POPEL, A. S. e JOHNSON, P. C., Microcirculation and hemorheology, *Annual Review of Fluid Mechanics*, vol. 37, pp.43-69, 2005.
- [45] PRIES, A. R., SECOMB, T. W., GESSNER, T., SPERANDIO, M. B., GROSS, J. F. e GAEHTGENS, P., Resistance to blood flow in microvessels *in vivo*, *Circulation Research*, vol. 75, pp. 904-915, 1994.
- [46] REYES-ALDASORO, C. C., AKERMAN, S. e TOZER, G. M., Measuring red blood cell velocity with a keyhole tracking algorithm, *IFMBE Proceedings*, vol. 16, pp. 810-813, 2007.
- [47] REYES-ALDASORO, C. C., AKERMAN, S. e TOZER G. M., Measuring the velocity of fluorescently labelled red blood cells with a keyhole tracking algorithm, *Journal of Microscopy*, vol. 229, pp. 162-173, 2008.
- [48] RODRIGUES, R. O., FAUSTINO, V., PINHO, D. PINTO, E., CIDRE, D., YAGINUMA, T., TABOADA, B., BENTO, D. e LIMA, R., Separation and deformation of red blood cells in PDMS microchannels, *Perspectives in Fundamental and Applied Rheology*, 2013.
- [49] RODRIGUES, R. O., FAUSTINO, V., PINTO, E., PINHO, D. e LIMA, R., Red blood cells deformability index assessment in a hyperbolic microchannel: the diamide and glurraldehyde effect, *Webmed Central*, 2013.
- [50] ROGOWSKA, J., Overview and fundamentals of medical image segmentation, *Handbook of Medical Imaging Processing Analysis*, Academic Press, 2000.
-

- [51] ROSA, S. Sebenta teórica de biofluidos, *Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança*, 2010.
- [52] RUSS, J. C., *The Image Processing Handbook*, 5th ed., Taylor & Francis, 2007.
- [53] SAADATMAND, M., ISHIKAWA, T., MATSUKI, N., ABDEKHODAIE, M. J., IMAI, Y., UENO, H. e YAMAGUCHI, T., Fluid particle diffusion through high-hematocrit blood flow within a capillary tube, *Journal of Biomechanics*, vol. 44, pp. 170-175, 2011.
- [54] SANTOS, N., Estudo da reologia de fluidos análogos ao sangue, *BII Faculdade de Engenharia do Porto*, 2009.
- [55] SHIN, S., KU, Y., PARK, M. e SUH, J., Measurement of red blood cell deformability and whole viscosity using laser-diffraction slit rheometer, *Korea-Australia Rheology Journal*, vol. 16 (2), pp.85-90, 2004.
- [56] WAITE, L. e FINE, J., *Applied Biofluid Mechanics*, McGraw-Hill, 2007.
- [57] YAGINUMA, T., OLIVEIRA, M. S. N., LIMA, R., ISHIKAWA, T. e YAMAGUCHI, T., Human red blood cell behavior under homogeneous extensional flow in a , hyperbolic-shaped microchannel, *Biomicrofluidics*, vol. 7, 2013.
- [58] YILMAZ, A., JAVED, O. e SHAH, M., Object tracking: a survey, *ACM Computing Surveys*, vol. 38 (4), 2006.