Pesquisador Principal: Anderson Zanardi de Freitas

Co-autores: Lucas Ramos De Pretto (aluno de Doutorado); Tania Mateus Yoshimura (aluna de Doutorado); Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro (pesquisadora CLA)

Linha de Pesquisa do Plano Diretor do IPEN: 920 - Pesquisa e Desenvolvimento de Aplicações de Lasers

9.9.920.3P - Desenvolvimento de instrumentos, métodos e técnicas ópticas de medição e diagnóstico

Título: Medindo glicemia de forma não-invasiva: desenvolvimento de um glicosímetro por coerência óptica para monitoramento durante o tratamento do diabetes

Ano de início da Pesquisa: 2015

Ano previsto para o término: 2019

Caracterização da inovação tecnológica:

- Tecnologia ***inédita para medição*** simultânea de níveis glicêmicos e fluxo sanguíneo;
- Tecnologia ***não invasiva e sem contato***, para maior conforto e comodidade aos pacientes;
- Tecnologia de ***pré-diagnóstico*** para prevenir casos de diabetes e morbidades associadas;
- Tecnologia de ***monitoramento*** que permite acompanhamento frequente do nível glicêmico.
- Tecnologia ***sustentável***, pois reduz resíduos do tratamento, dispensando as tiras reagentes;
- Tecnologia ***economicamente atraente***, já que pode diminuir custos de internação hospitalar.

Apoio: FAPESP, projeto de pesquisa regular #2013/09311-9 "Utilização de padrões de speckle nas imagens de tomografia por coerência óptica para caracterização de circuitos microfluídicos e microcirculação em tecido"; bolsa de doutorado #2015/15775-3 "Algoritmo para análise de autocorrelação de sinal de tomografia por coerência óptica para acompanhamento de fluxo sanguíneo em camundongos com síndrome metabólica" e bolsa de mestrado # 2013/05492-9 aluno Lucas Ramos De Pretto; CNPq # 449440/2014-1 "Análise de speckle presente nas imagens de tomografia por coerência óptica para caracterização de circuitos microfluídicos". pesquisador responsável pelos projetos acima: Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas. FAPESP #2014/02564-1, “Tratando a meta-inflamação da síndrome metabólica usando terapia com luz de baixa potência”. Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Anderson Zanardi de Freitas	Martha Simões Ribeiro
Lucas Ramos De Pretto	Tania Mateus Yoshimura

RESUMO EXECUTIVO

O problema: Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), das 57 milhões de mortes ocorridas em 2008, 63 % (36 milhões) foram em decorrência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), principalmente diabetes mellitus (DM) e doenças cardiovasculares (DCV). Em 2005, o Brasil teve perdas de US$ 2,7 bilhões na renda nacional por conta dessas doenças, e este valor ultrapassou US$ 21 bilhões em 2015 (um aumento de 10 vezes em 10 anos). Não obstante os fatos, essas doenças podem ser prevenidas em 80 % dos casos, e ferramentas voltadas ao pré-diagnóstico e monitoramento são interessantes tanto para a prevenção dessas doenças como para a redução das morbidades associadas.

Atualmente, os aparelhos para acompanhamento dos níveis de glicemia utilizam amostras de sangue obtidas através de punção, analisadas com tiras reagentes de uso único. No entanto, a invasividade e os custos diminuem a adesão ao monitoramento frequente.

A nossa solução: A Tomografia por Coerência Óptica (OCT, do inglês, *Optical Coherence Tomography*) é uma modalidade de diagnóstico por imagem baseada em interferometria de radiação óptica não ionizante. Por ser uma técnica não invasiva, sem contato, com alta resolução e boa profundidade de penetração, se torna bastante atraente para aplicações biológicas, uma vez que não oferece riscos aos pacientes e não exige preparo prévio de amostras. A intensidade do sinal de OCT diminui conforme a luz penetra no tecido analisado, em virtude das interações da luz com a amostra, como absorção e espalhamento.

Realizamos neste projeto correlação entre a taxa de decaimento do sinal de OCT e a concentração de glicemia no sangue. Obtivemos uma relação linear entre o coeficiente de atenuação óptica e os níveis glicêmicos dentro da faixa fisiológica de interesse. A faixa estudada foi de 230 à 492 md/dL e o sistema atingiu uma resolução de 65mg/dL com limite inferior de detecção de 55,3mg/dL.

Outra característica deste sistema é a presença de padrões de speckle no sinal, com a análise desses padrões é possível medir fluxo microvascular e a mobilidade de espalhadores imersos em meios líquidos.

Pela análise de autocorrelação do sinal de speckle foi desenvolvido um sistema de OCT especial e demonstramos que existe uma dependência da mobilidade das hemácia no sangue em função dos níveis de glicose. Novamente obtivemos uma relação linear diretamente proporcional entre os níveis glicêmicos e os tempos de decorrelação do speckle presente no sinal de OCT. A faixa estudada foi de 20 à 354 mg/dL demonstrando que o sistema desenvolvido é suficientemente sensível mesmo para baixos níveis glicêmicos.

Demonstramos de maneira inédita, que a técnica de OCT e o sistema desenvolvido especialmente para esta finalidade servem como ferramenta de monitoramento e pré-diagnostico para esse importante problema de saúde pública..

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS)[1], das 57 milhões de mortes ocorridas em 2008, 63 % (36 milhões) foram em decorrência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), principalmente diabetes mellitus (DM), doenças cardiovasculares (DCV), cânceres e doenças respiratórias crônicas (Figura 1).

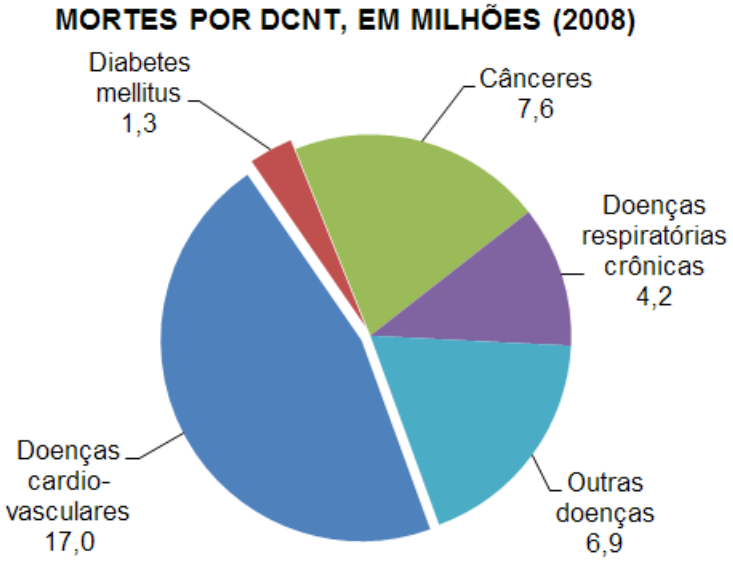

Figura 1 - Mortes por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) ocorridas no ano de 2008. Adaptado de World Health Organization, 2011[2].

Apesar de poderem ser prevenidos em 80 % dos casos[3], DM e DCV contribuem para praticamente metade dessas mortes, arrastando consigo o peso socioeconômico de envolver, além da mortalidade e dos gastos no tratamento, a diminuição da qualidade de vida e da produtividade. Em 2005, o Brasil teve perdas de US$ 2,7 bilhões na renda nacional por conta dessas doenças. Esse prejuízo ultrapassou US$ 21 bilhões em 2015, um aumento assustador de 10 vezes em 10 anos[4].

Os principais fatores de risco para doenças cardiovasculares e diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) se agrupam em uma condição conhecida como síndrome metabólica (SM). Hiperglicemia, pressão arterial elevada, dislipidemia aterogênica e obesidade (particularmente na região abdominal) são fortes preditores para o seu desenvolvimento e progressão. Sua proposição data de 1988, quando Reaven chamou a atenção para a frequência com que esses fatores de risco se apresentavam em um mesmo paciente[5]. Desde então, muitas foram as formas de classificar essa síndrome, e, atualmente, diversas sociedades de especialistas propuseram como critérios de diagnóstico a presença simultânea de três dos critérios[6, 7] apresentados na Tabela 1.

A associação de hiperglicemia, dislipidemia e resistência à insulina leva a um quadro de stress oxidativo e disfunção endotelial[8]. De particular importância nessa conjuntura, a manutenção de elevados níveis glicêmicos contribui de forma direta para o prejuízo das

funções vasculares, uma vez que a glicose, um açúcar de características redutoras, é capaz de alterar a função de diversas proteínas endoteliais através da formação de ligações covalentes[9, 10].

Tabela 1 - Critérios diagnósticos para síndrome metabólica.

Critérios	Pontos de corte
Circunferência abdominal aumentada	De acordo com definições específicas para cada país ou grupo étnico
Hipertrigliceridemia†	≥150 mg/dL (1,7 mmol/L)
HDL-colesterol baixo†, ‡	
Homens:	<40 mg/dL (1,0 mmol/L)
Mulheres:	<50 mg/dL (1,3mmol/L)
Pressão arterial aumentada†	
Sistólica:	≥ 130 mmHg e/ou
Diastólica:	≥ 85 mmHg
Hiperglicemia de jejum[1]	≥ 100 mg/dL

†Ou em uso de medicação para normalização. ‡HDL, do inglês *high density lipoprotein*.
Adaptado de Alberti *et al*[6] e Grundy *et al*[7].

O acompanhamento dos níveis de glicose tem, diante do exposto, importância especial para a prevenção e diagnóstico de SM. O método mais comum para esse monitoramento é o uso de glicosímetros[11], que necessitam de amostra de sangue. Contudo, estudos indicam que, entre as barreiras para o monitoramento dos pacientes, estão o medo de agulha e dor/desconforto do exame[12]. Assim, abordagens não-invasivas são de interesse para melhorar a aderência ao tratamento, e também para evitar produção de resíduos, como no caso das tiras reagentes. Evitar o uso de tiras ainda reduz o custo associado ao acompanhamento, outra barreira indicada nos estudos[12]. Nos Estados Unidos, em 2012, esse custo para cada paciente era, aproximadamente, US$ 770 ao ano[13].

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 SISTEMA DE OCT

A interferometria de luz branca, estudada desde o começo do século XX[14], é aplicada a diversas áreas, como em técnicas de detecção remota tal qual a Reflectometria Óptica no Domínio Coerente (OCDR - *Optical Coherence Domain Reflectometry*)[15]. Derivada de técnicas como esta, surge a Tomografia por Coerência Óptica, ou OCT (*Optical Coherence Tomography*), desenvolvida por Huang *et al*. em um grupo liderado por James G. Fujimoto[16], no ano de 1991. A técnica de OCT é capaz de produzir imagens de corte transversal de estruturas internas da amostra. Uma imagem típica de OCT é apresentada na Figura 2. A profundidade de penetração, da ordem de poucos milímetros[17], é superior àquela de outras técnicas de alta resolução, como microscopia confocal. Quando comparada a outras técnicas com alta penetração em tecidos biológicos, é a resolução do sistema de OCT que o torna uma alternativa interessante. Desta maneira, a Tomografia por Coerência Óptica

ocupa uma lacuna existente na relação entre a profundidade de penetração e a resolução, como demonstrado pelo diagrama na Figura 3.

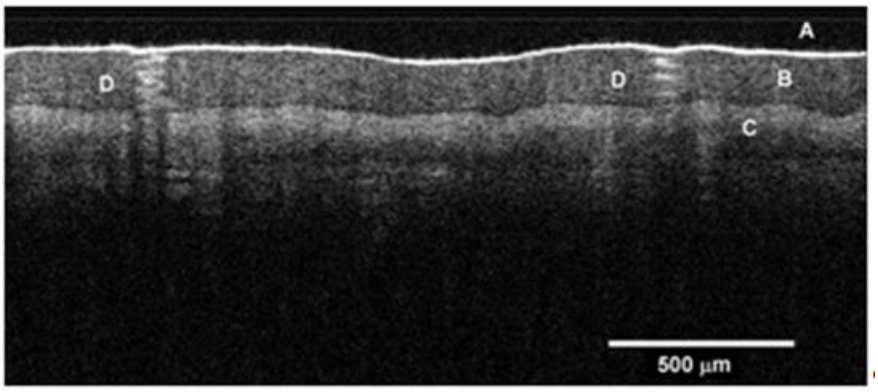

Figura 2 - Exemplo de imagem (*B-Scan)* da palma da mão gerada pela técnica OCT, onde é possível observar diversas estruturas da pele. A = Estrato córneo; B = Epiderme; C = Derme; D = Canal sudoríaparo.

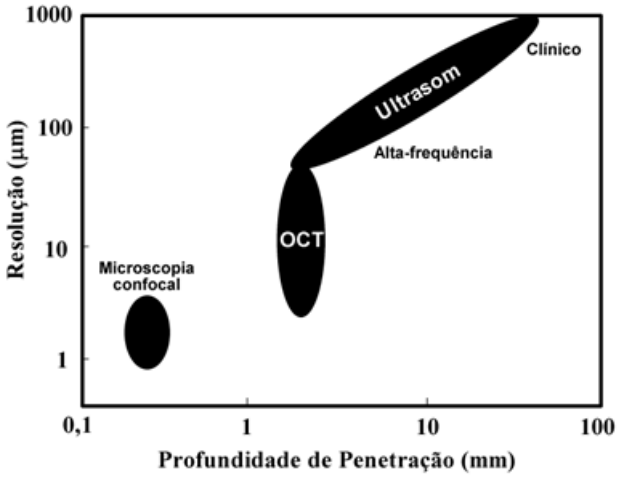

Figura 3 - Diagrama comparativo entre técnicas de diagnóstico por imagem, a partir da relação Profundidade de Penetração X Resolução (adaptado de [18]).

O OCT é baseado na ocorrência de interferência entre dois feixes de radiação eletromagnética (um direcionado a um espelho de referência e um direcionado a algum ponto *P* na amostra), e registra esta informação através de um detector, gerando um interferograma chamado de A-scan que contém as informações de estruturas espalhadoras abaixo do ponto *P.* A-scans são obtidos em pontos adjacentes (como pode ser observado na Figura 4) e, após processamento, são combinados e convertidos para uma imagem de cores falsas, com cada *A-Scan* representando uma coluna da imagem. As imagens assim obtidas são denominadas *B-Scans* (Figura 2), e são as imagens típicas de OCT.

Esta capacidade de gerar mapas tomográficos de diversas superfícies espalhadoras internas a uma amostra, *in vivo*, de maneira não invasiva e em tempo real, sem utilizar radiação ionizante (normalmente utilizando fontes com comprimento de onda central na faixa do infravermelho próximo) motivou o interesse pela técnica nas áreas biológicas. As primeiras aplicações de OCT foram em estudos biológicos, especialmente na oftalmologia[19-22], por possibilitar a visualização do fundo de olho em tempo real e, mais recentemente, na

dermatologia, que tem utilizado o OCT para diferenciar tecidos biológicos a partir de seu retroespalhamento[23-25].

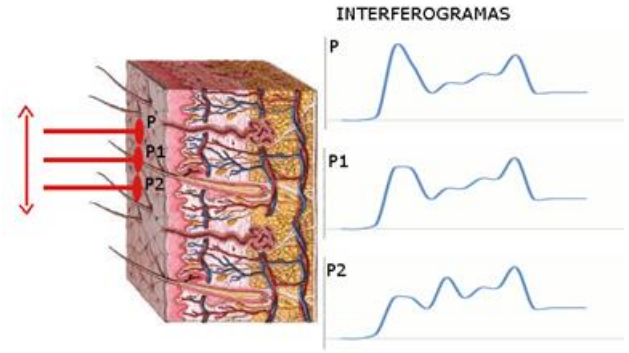

Figura 4 - Ilustração de diversos interferogramas adjacentes sendo adquiridos.

Muitos estudos, no entanto, requerem informações além da morfologia da amostra, aspectos que sirvam de base para diagnóstico e identificação de diversas patologias. Por isto, foram desenvolvidos sistemas de OCT que pudessem fornecer este tipo de dado, são os chamados OCT's funcionais, que ampliaram o horizonte de aplicações clínicas da técnica e são ativamente estudados[26]. Dentre eles, destacamos os que utilizam o padrão de speckle, que é oriundo da natureza coerente das fontes utilizadas.

Originado por múltiplos retroespalhamentos ou atrasos causados por espalhamentos no sentido de incidência, o speckle observado no OCT se deve aos espalhadores internos à amostra que interagem com o feixe[27]. Para que haja speckle no sinal OCT, basta que mais de um espalhador retroespalhe a mesma frente de onda, de tal forma que ela chegue ao detector fora de fase – mas ainda dentro do tempo de coerência, contribuindo para o sinal. O comportamento do padrão de speckle no tempo é, portanto, dependente do comportamento destes espalhadores, causando o chamado speckle variante no tempo ou *time-varying speckle*. OCT com Variância de Speckle (SV-OCT, Speckle Variance OCT)[28], é um exemplo amplamente utilizado na literatura[29-33]. Esta modalidade de análise, porém, não fornece informações quantitativas[34], gerando apenas mapas das regiões com fluxo. Estudos sobre a autocorrelação temporal de speckle no sinal de OCT geram interesse recente na literatura, e diversas modelagens são propostas, permitindo extrair velocidade de fluxo e difusão[35-37]. Tais métodos são capazes de combinar a alta resolução e informações morfológicas do OCT com informações relevantes de fluxo, podendo ser aplicado a fluxos microvasculares, sem dependência de ângulo, sem necessidade de preparo especial para as amostras, baseado em artefato que ocorre naturalmente no sinal de OCT (speckle), e sem necessidade de modificar o arranjo óptico. O Centro de Lasers e Aplicações (CLA) do IPEN, já demonstrou a capacidade de avaliar o sinal de OCT em microcanais com fluxo controlado[38], propondo uma nova metodologia de análise da autocorrelação do sinal de OCT, semi-quantitativa.

Outra análise funcional de OCT tem base no decaimento da intensidade do sinal em função da profundidade. Conforme a radiação utilizada para estudar a amostra se propaga pelo interior desta, ela interage com os espalhadores, com parte sendo retroespalhada e contribuindo para o sinal de OCT. Outra parte, no entanto, pode ser espalhada para outras direções (com múltiplos espalhamentos ocorrendo) ou absorvida, mas as interações específicas são complexas[39]. Na prática, isto significa que o sinal é atenuado conforme penetra na amostra, dependendo, por exemplo, dos coeficientes de retroespalhamento e absorção da amostra, bem como da dependência destes com o comprimento de onda utilizado[40]. Desta maneira, é possível obter informações específicas sobre a amostra com base na atenuação do sinal, a partir do cálculo de coeficiente de atenuação. O CLA possui experiência com análises de coeficiente de atenuação[41] sendo o primeiro grupo a reportar na literatura internacional aplicações em odontologia[42].

Assim, o OCT funciona como uma ferramenta de diagnóstico por imagem capaz de fornecer mais do que apenas informações morfológicas, ampliando sua aplicabilidade clínica.

Através da análise da atenuação do sinal é possível diferenciar amostras sanguíneas com diferentes níveis de glicose. As alterações glicêmicas causam respostas anormais do fluxo sanguíneo[43], que podem ser caracterizadas pela análise de autocorrelação no sinal de OCT. Ambas abordagens podem ser feitas sem contato e *in vivo* (a partir do sistema microvascular da pele) e de forma concomitante, com um único sistema, visto que os fenômenos associados (atenuação e autocorrelação) ocorrem naturalmente no sinal de OCT. Isto diminui o desconforto ao paciente, elimina a geração de resíduos e, com isso, potencializa o diagnóstico precoce.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS DE SANGUE *EX-VIVO*

Amostras de sangue foram obtidas através de punção cardíaca de camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com idades entre 6 e 8 semanas, após prévia anestesia[*]. Ao término das coletas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após overdose de anestésicos.

Para prevenir coagulação, o volume de sangue obtido (3 mL) foi acrescido de 750 µL de heparina (5.000 U.I./mL, Hepamax-S, Blausiegel) imediatamente após a coleta. Alíquotas de 90 µL do sangue heparinizado foram distribuídas em uma placa para cultura celular de 96

[*] solução de cloridrato de cetamina/xilazina: 80 mg/10 mg por quilograma de massa corporal, diluída em solução-tampão estéril, administrada por via intraperitoneal.

poços, sendo as amostras subdivididas em quatro grupos, em triplicata, com diferentes concentrações de glicose.

Para alcançar variações nos níveis glicêmicos, quatro soluções de PBS (*Phosphate-buffered Saline*, 1 M, pH 7,4) foram preparadas com concentrações crescentes de glicose (D-(+)-Glucose, Sigma-Aldrich). Volumes de 10 µL foram adicionados aos poços previamente preenchidos com o sangue heparinizado, resultando em um volume final de 100 µL.

Outro experimento foi realizado para simular os efeitos de múltiplos espalhamentos na atenuação do sinal de OCT, replicando o que ocorre durante investigações realizadas através de tecidos biológicos, tais como a pele[44, 45]. Dessa forma, novas amostras de sangue foram coletadas, heparinizadas e diluídas em soluções de glicose preparadas com solução salina isotônica (SSI) para obtenção dos múltiplos espalhamentos desejados, como previamente descrito por Popescu *et al.*[46]. As soluções diferentes concentrações de glicose, obtidas por simples diluição, foram adicionadas às amostras de sangue e dispostas em placas de microtitulação (96 poços) com volumes finais de 100 µL compostos por sangue heparinizado (40 µL) e solução de glicose (60 µL).

Em todos os experimentos as amostras foram manuseadas com cautela e mantidas sob temperatura controlada (18 ºC) para evitar degradação e hemólise no decorrer das análises. Antes de cada aquisição de dados (análise com glucosímetro, obtenção de imagens e sinal de OCT), as amostras foram lentamente homogeneizadas com uma micropipeta para evitar sedimentação, uma vez que o OCT é sensível à agregação e sedimentação do sangue[47].

3.2 VALORES DE REFERÊNCIA DE GLICEMIA

As concentrações de glicose plasmática nos experimentos *ex vivo* foram mensuradas utilizando o glicosímetro portátil OneTouch Ultra (LifeScan Inc - Johnson & Johnson) e fitas reagentes correspondentes. Medidas foram realizadas diretamente nos poços, em triplicata.

3.3 SISTEMAS DE OCT

O laboratório de Tomografia por Coerência Óptica do Centro de Lasers e Aplicações (CLA) do IPEN conta com dois sistemas de OCT comerciais, sendo eles: OCT (I) OCP930SR (Thorlabs Inc.), com comprimento de onda central de 930 nm, e resolução espacial de 6 µm (lateral e axial) no ar; e OCT (II) SS1300 (Thorlabs Inc.) com 16 kHz de varredura *A-scan*, operando em 1325 nm, com resolução 25 µm e 12 µm (lateral e axial respectivamente) no ar.

Para medidas que necessitaram de alta taxa de aquisição, foi necessário desenvolver no laboratório do CLA um sistema OCT (III) específico com alta taxa de aquisição não alcançada pelo equipamento comercial. A fonte de luz utilizada foi um laser *swept source* SL1325-P16 (Thorlabs Inc.), com comprimento de onda central de 1325 nm, faixa de operação de 120 nm e taxa de repetição de 16 kHz com resolução no ar calculada de 6 µm.

3.4 ANÁLISE DE COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO

A análise realizada no sinal de OCT utiliza um modelo simples para cálculo do coeficiente de atenuação, a partir de um decaimento exponencial baseado na lei de Beer-Lambert[48], como segue:

$$I(z) = I_0 . e^{-2\alpha z} + C \qquad (1)$$

onde $I(z)$ é a intensidade detectada na profundidade z, I_0 é a intensidade da fonte luminosa, C é uma constante para compensar o ruído de fundo no sinal e α é o coeficiente de atenuação. O fator dois no expoente se deve ao percurso de ida e volta da radiação pela amostra até a profundidade *z*. O valor de α é recuperado através de ajuste exponencial do sinal adquirido pelo OCT. Dois *softwares* foram desenvolvidos, em ambiente de programação LabVIEW (National Instruments), para esta finalidade, o primeiro voltado para o sistema OCT(I) e o segundo para o sistema desenvolvido no CLA.

O perfil de decaimento utilizado para análise é resultado de média aritmética de A-Scans adjacentes para o OCT(I), ou consecutivos (no tempo) para o OCT(III). Os *softwares* permitem a seleção de uma região de interesse do perfil de decaimento sobre a qual o ajuste é realizado, para evitar influência de ruídos. Além disso, uma detecção de picos é executada para alinhar as amostras e eliminar o problema de curvatura e/ou deslocamento das amostras. A análise é, então, repetida para diversas aquisições sequenciais e a média aritmética dos valores α calculados é utilizada como coeficiente de atenuação para a amostra.

Na presente proposta, os primeiros testes foram realizados *ex vivo* para investigar as propriedades ópticas das amostras, calibração do sistema e viabilidade da técnica. Posteriormente, testes *in vivo* serão efetuados para verificar a viabilidade do método como ferramenta de diagnóstico. Nos estudos *in vivo*, *B-Scans* da região dorsal dos animais serão adquiridos. Os resultados obtidos serão, por fim, confrontados com os valores de glicemia de referência.

3.5 ANÁLISE DE AUTOCORRELAÇÃO DO SPECKLE

Para as análises de autocorrelação de speckle é necessária uma alta taxa de aquisição de dados, para que o padrão do ruído oriundo dos espalhadores em movimento

permaneça correlacionado entre *A-Scans* consecutivos no tempo. Por isto, para esta modalidade de análise, será utilizado o sistema de OCT(III).

No *software* desenvolvido para o sistema OCT (III), um único ponto p (uma determinada profundidade na amostra) é selecionado para análise temporal. A autocorrelação normalizada pode, então, ser escrita como:

$$Autocorr_{p,\tau} = \frac{\sum_{t=0}^{N-1} I_{p,t}\, I_{p,t+\tau}}{\sum_{t=0}^{N-1} {I_p}^2} \qquad (2)$$

com $I_{p,t}$ a intensidade do ponto p no tempo t; τ é o atraso temporal e N o número de *A-Scans* consecutivos adquiridos. Para cada valor de intensidade, a sua média temporal $\langle \mathrm{I_p} \rangle$ é subtraída, a fim de considerar apenas as flutuações de intensidade, e torna-se:

$$Autocorr_{p,\tau} = \frac{\sum_{\mathrm{t=0}}^{\mathrm{N-1}} \left(\mathrm{I_{p,t}} - \langle \mathrm{I_p} \rangle\right)\left(\mathrm{I_{p,t+\tau}} - \langle \mathrm{I_p} \rangle\right)}{\sum_{\mathrm{t=0}}^{\mathrm{N-1}} \left(\mathrm{I_{p,t}} - \langle \mathrm{I_p} \rangle\right)^2} \qquad (3)$$

Portanto, por meio da equação (3) é possível calcular a autocorrelação de um ponto p em um atraso τ. Ao variar este atraso monta-se um vetor de valores de autocorrelação. Fazendo $Autocorr_{p,\tau} = g(p,\tau)$ pode-se escrever:

$$W = [g(p,0), g(p,1), \dots, g(p,N-1)] \qquad (4)$$

onde W é o vetor de autocorrelação de atrasos crescentes. Este é o resultado calculado pelo algoritmo utilizado. Para um τ=0 (sem atraso) temos correlação total, e o valor resultante é 1. No entanto, ao aumentar o atraso, o sinal começa a decorrelacionar, e os valores calculados irão diminuir até 0, ponto em que o sinal não mais está correlacionado consigo mesmo.

As flutuações de intensidade do speckle no tempo estão relacionadas ao tempo de trânsito dos espalhadores através do volume de interesse na amostra, portanto, estas flutuações têm relação com a velocidade destes espalhadores. Como as flutuações influenciam o comportamento da autocorrelação, uma análise de W revela informações quantitativas sobre o fluxo, através do parâmetro tempo de decorrelação, definido em nossos estudos anteriores[38], como sendo o tempo necessário para o valor de autocorrelação cair para 1/e de seu valor inicial.

A média temporal é calculada para diversos pontos p, e esse procedimento é repetido para diferentes profundidades caracterizando o fluxo da amostra.

Como nossos testes foram realizados *ex vivo,* as amostras não possuem fluxo. Entretanto isso não invalida o método, já que este é suficientemente sensível para detectar alterações no movimento browniano (difusão). Por sua vez, o movimento browniano é dependente da viscosidade do meio em que os espalhadores estão imersos, e a concentração de glicose altera a viscosidade sanguínea[49]. Assim os tempos de decorrelação obtidos *in vitro* estão ainda relacionados a diferentes níveis de glicose no sangue, e esses

resultados foram comparados com os valores de glicemia de referência, comprovando a viabilidade da técnica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DE COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO

Seguindo a metodologia apontada na seção 3.1, os diferentes grupos sem SSI foram analisados com o glucosímetro OneTouch Ultra para obter os valores de referência de concentração de glicose. Os valores são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações de glicose dos diferentes grupos analisados (sangue não diluído).

Grupos	[Glicose Média] (mg/dL)	Desvio Padrão (mg/dL)
1	229,75	9,55
2	294,83	6,03
3	384,78	11,91
4	492,00	4,24

Os poços, então, foram posicionados para aquisição individual de imagens com o sistema de OCT (I). Para cada poço, 100 imagens foram adquiridas sequencialmente da mesma posição. Gotas de sangue (0,5 µL), posicionadas sobre lâminas de vidro, foram imageadas por OCT para o cálculo do índice de refração de cada grupo, para correção do caminho óptico.

Os resultados de coeficiente de atenuação mostraram boa correlação com o nível de glicose, como reportado na Figura 5.

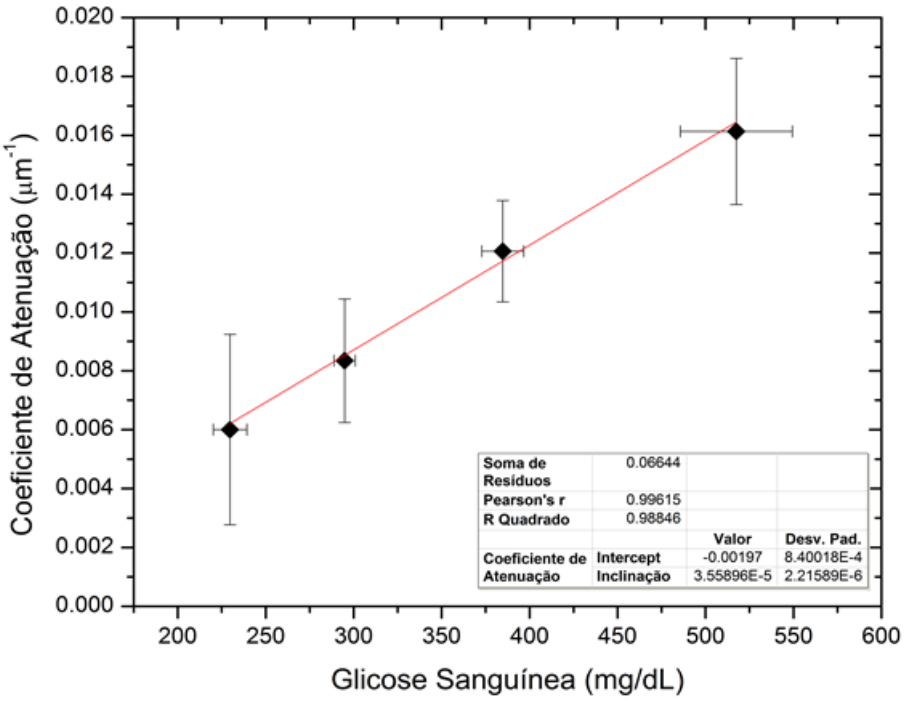

Figura 5 - coeficientes de atenuação relativos à glicemia média do sangue (não diluído), calculados após correção do índice de refração (IR=1,26). Análises de múltiplas comparações atestaram *p*<0,001 entre todos os grupos (Kruskall-Wallis,

seguido de Dunn's como pós teste). A linha vermelha representa a melhor correlação linear obtida, com inclinação de 3,55e-5 e um R quadrado ajustado de 0,98, indicando que um modelo linear é adequado para nossos resultados. SE, erro padrão.

Observamos um comportamento linear do coeficiente de atenuação em função da concentração de glicose. Bednov *et al.*[50] demonstrou, na região do infravermelho, que o choque osmótico oriundo da condição hiperglicêmica causa uma deformação das hemácias, alterando suas propriedades de espalhamento[51]. Estas alterações de espalhamento aumentam o coeficiente de atenuação, como observado em nosso sistema de OCT, em concentrações de glicose acima de valores normoglicêmicos, mas ainda dentro de níveis fisiológicos[52].

A análise reportou diferenças significantes para o coeficiente de atenuação entre todos os grupos com $p<0,001$, para concentrações de glicose entre 230 mg/dL e 517 mg/dL, e diferenças de pelo menos 65 mg/dL (entre grupos 1 e 2) foram detectadas.

O segundo experimento foi realizado com o sangue diluído em SSI simulando o comportamento esperado em aplicações *in vivo*, com isso níveis de glicose mais baixos foram alcançados. A diluição em SSI em até 40% aumenta os múltiplos retroespalhamentos dentro da amostra, prejudicando o sinal de OCT. Associado a isto está o fato de que a diluição afeta diretamente a quantidade de glicose necessária para que a diferença osmótica entre os eritrócitos e o soro sanguíneo produza efeitos apreciáveis nas propriedades de espalhamento. Isto significa que pequenos intervalos de concentração de glicose não serão diferenciados pelo OCT. Mas uma análise de clusters tipo K-Means *clustering* foi realizada para determinar a diferença mínima nos níveis de glicose que a técnica consiga diferenciar. Três grupos foram encontrados nos dados testados, como demonstrado na

.

A média das distâncias entre os centros dos grupos identificados pelo K-Means é de, aproximadamente, 133 mg/dL, que pode ser interpretado como uma estimativa da resolução da técnica para o cenário proposto - comparando com o experimento sem diluição em SSI, a resolução caiu pela metade. Um gráfico com os centros dos *clusters* é apresentados na , e os respectivos valores são descritos na Tabela 3. Uma vez mais é possível observar a relação linear direta entre concentração de glicose e o coeficiente de atenuação, com o ajuste linear (linha vermelha na Figura 7) obtendo um R^2 de mais de 0,99. Os *clusters* foram submetidos à analise estatística, reportando diferenças entre todos, com $p<0,05$.

Tabela 3 - Novos grupos oriundos da nossa análise por K-Means realizada para as amostras de sangue diluído (n=12).

Grupos	[Glicose Média] (mg/dL)	Desvio Padrão (mg/dL)
Cluster 1	20	0
Cluster 2	140	34
Cluster 3	287	34

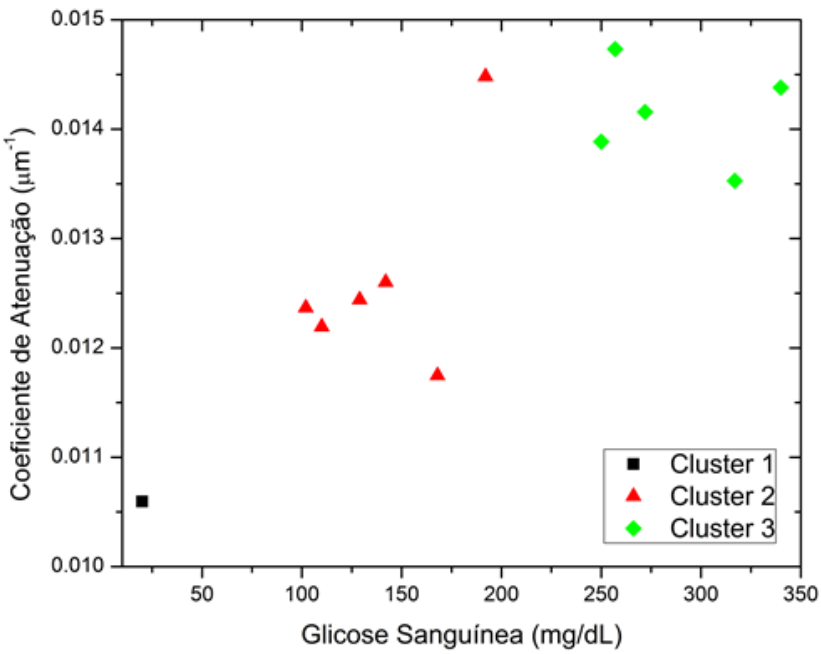

Figura 6 - Coeficientes de atenuação, calculados após correção de índice de refração (IR=1,45), relativos às concentrações de glicose do sangue diluído em SSI, após agrupamento em clusters pelo método de K-Means.

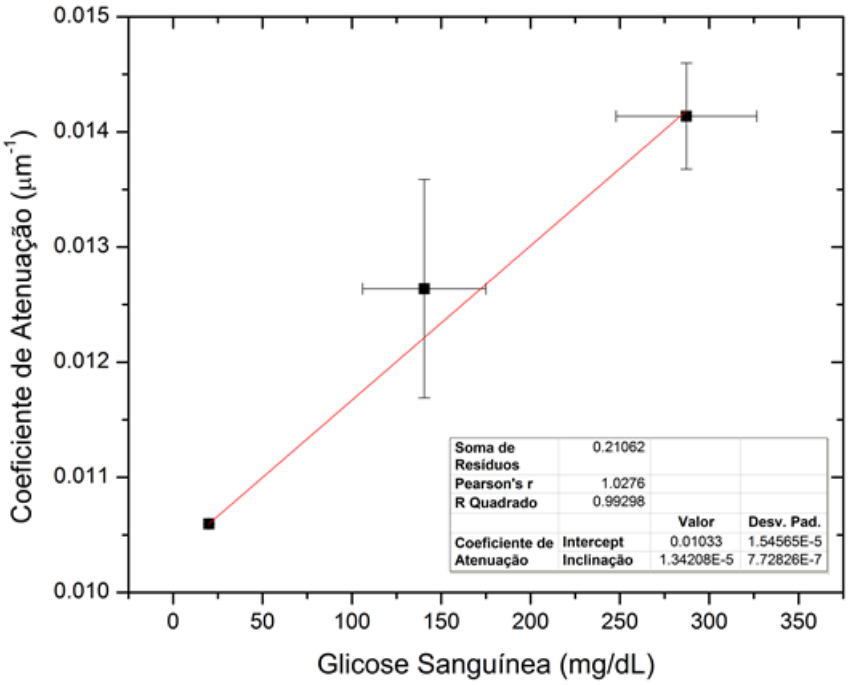

Figura 7 - Coeficientes de atenuação médios relativos às concentrações médias de glicose obtidas de amostras de sangue diluído. Análises de múltiplas comparações mostraram *p*<0,001 entre todos os clusters (Kruskall-Wallis com Dunn's como pós-teste). A linha vermelha indica a melhor correlação linear obtida, com um R^2 de 0,99, indicando que nossos resultados podem ser representados por um modelo linear. SE, erro padrão.

4.2 ANÁLISE DE SPECKLE

O comportamento esperado é que o tempo de decorrelação aumente com o aumento da concentração de glicose (menor movimento browniano devido ao meio mais viscoso).

As concentrações testadas para este experimento são listadas na Tabela 4, e são todas alíquotas oriundas da mesma amostra sanguínea. Como o glucosímetro portátil utilizado não permite obtenção de concentrações abaixo de 20 mg/dL, não foi possível ter uma medição completa do grupo A, que não recebeu adição de glicose. Como anteriormente, as amostras de sangue foram diluídas em SSI, para acrescentar uma forte componente de múltiplos espalhamentos.

Análises foram realizadas a 60 µm de profundidade, observamos um aumento do tempo de decorrelação com o nível glicêmico, como pode ser observado no gráfico em cores falsas na Figura 8 onde cores mais escuras indicam tempos menores.

Tabela 4 - Concentrações médias de glicose plasmática para cada grupo (n=15)

Grupos	[Glicose Média] (mg/dL)	[Desvio Padrão] (mg/dL)
A	<20	
B	119,0	0,5
C	220	3
D	300	1
E	354	2

Para observar somente a diferença inter-grupos, a média em profundidade foi calculada e usada como valor representativo do grupo. Um novo gráfico foi montado, e é apresentado na Figura 9.

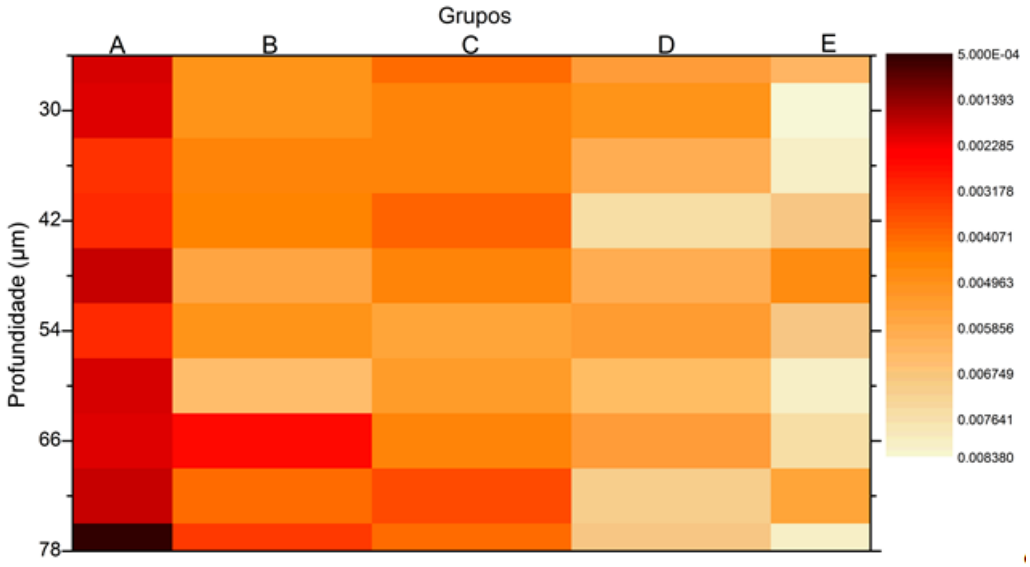

Figura 8 - Tempos de decorrelação apresentados em função da profundidade e concentração de glicose, para os diferentes grupos, apresentados como imagem em cores falsas. As cores escuras representam os menores tempos.

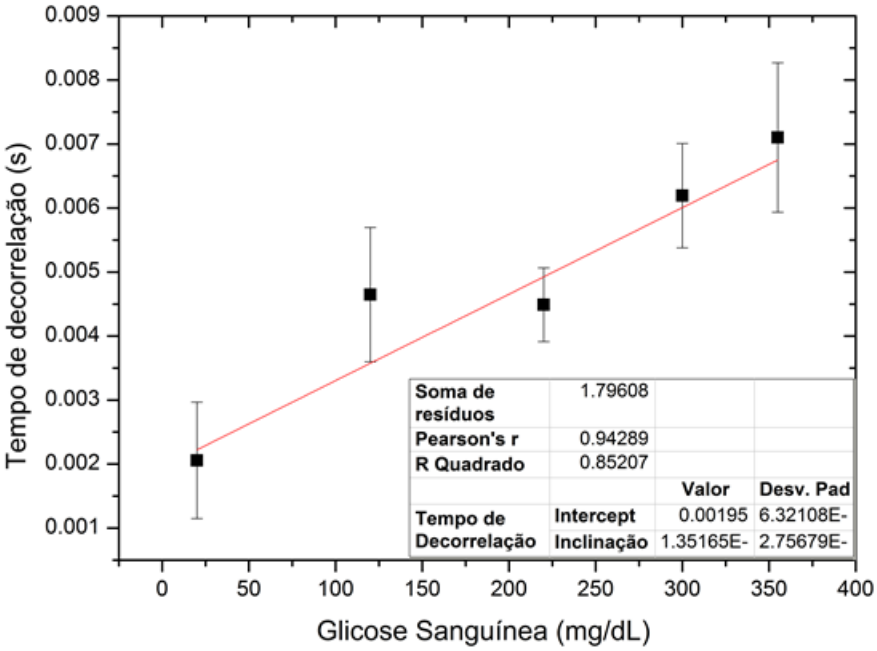

Figura 9 - Tempos de decorrelação médios para as diferentes concentrações de glicose. Análise de variância de um caminho mostrou $p<0,05$ entre todos os grupos, após análise de Bonferroni para múltiplas comparações. A linha vermelha representa o melhor ajuste linear obtido.

Novamente, uma relação direta entre decorrelação de speckle e concentração de glicose é observada. O ponto correspondente à concentração de 120 mg/dL pode ser um artefato de medida.

Nossos testes demonstraram que a glicose aumenta a viscosidade do sangue, que é detectável com o OCT, apesar de não ser possível determinar, nesta fase do estudo, uma resolução para a técnica, demostramos que ela pode ser aplicada na faixa de interesse clínico. Associado com outros estudos da literatura[53], este é um indicador positivo para o uso de OCT como ferramenta de diagnóstico não-invasivo. Estudos *in vivo* são necessários para consolidar a técnica, mas a capacidade do OCT de detectar speckle variante no tempo a partir de amostras *in vivo* já foi demonstrada[28] mas sem correlacionar com a glicemia. Este fato, aliado ao estudo *ex vivo* aqui apresentado, demonstra a viabilidade da técnica.

5. CONCLUSÕES

Este estudo apresentou resultados *ex vivo* do uso de OCT para monitoramento do nível de glicose no sangue, utilizando duas abordagens diferentes, uma atuando no domínio espacial e outra no domínio temporal. Demonstramos a versatilidade do OCT como ferramenta de diagnóstico, permitindo que um mesmo fenômeno (retroespalhamento de luz) seja interpretado de duas maneiras distintas não mutuamente exclusivas e relacionadas à glicemia. Vale destacar a relação linear obtida em ambas as abordagens entre o parâmetro do OCT, seja ele o coeficiente de atenuação ou o tempo de decorrelação, e os níveis glicêmicos.

Resultados de ambas as técnicas apontaram boa correlação com a concentração de glicose no sangue. A maior causa das respostas obtidas com o coeficiente de atenuação é o choque osmótico, enquanto que as medidas de speckle dependendem apenas do movimento dos eritrócitos, e apresentam resultados consistentes mesmo para o sangue misturado com SSI. Para amostras com fluxo, a análise de speckle pode, ainda, caracterizar a velocidade de fluxo de maneira semi-quantitativa, estudo já desenvolvido pelo grupo.

Estes resultados *ex vivo* servem de base para fortalecer e fornecer parâmetros iniciais para aplicações *in vivo*. O que possibilitará uma abordagem confiável e não-invasiva, resultando em maior conforto e comodidade aos pacientes, dispensando a necessidade de punções para obtenção de amostras, além de eliminar o descarte das fitas reagentes com material biológico contaminado.

Ainda que, atualmente, sistemas de OCT não estejam disponíveis comercialmente para uso doméstico, existe uma tendência para que estes equipamentos sejam mais acessíveis com o uso de celulares[54], por exemplo, tornando-se uma ferramenta de monitoramento doméstico. Ter uma técnica de análise já desenvolvida para esta finalidade é de grande importância pelo seu impacto social

O alto custo deste sistema poderá ser contornado quando sua aplicação se tornar atrativa. A produção em alta escala pode baratear a tecnologia, como por exemplo aconteceu com os lasers, dentre outras.

Nossos resultados propiciam os meios necessários para sua implementação. Este estudo gerou um trabalho completo apresentado em congresso internacional[55] e um artigo completo aceito para publicação (Journal of Biomedical Optics).

6. ESTUDOS FUTUROS

Para validar a aplicação clínica da técnica, os próximos passos deste estudo objetivam realizar experimentos *in vivo* em camundongos. Vale ressaltar que a técnica não necessita de nenhum preparo especial de amostras, portanto as abordagens aqui apresentadas já estão prontas para aplicação *in vivo*.

Serão utilizados sessenta camundongos (projeto já aprovado pelo comitê de ética em utilização animal), fornecidos pelo Biotério do IPEN, que receberão dieta hiperlipídica para indução da síndrome metabólica.

A análise de speckle será utilizada para acompanhamento do fluxo sanguíneo nos animais, que pode sofrer alterações na presença de níveis hiperglicêmicos. Esta ideia original, proposta pelo nosso grupo, será em parte realizada em colaboração com o *Massachusetts Institute of Technology (MIT),* com o apoio da FAPESP com uma bolsa de dourado sanduiche de 12 meses para o aluno Lucas Ramos De Pretto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] W. H. Organization, in *Global status report on noncommunicable diseases 2010*, edited by W. H. Organization (WHO Press, Geneva, 2010), pp. 9.
[2] in *Global status report on noncommunicable diseases 2010* (WHO Press, Genebra, Suíça, 2011).
[3] W. H. Organization, *Preventing chronic diseases: a vital investment. WHO global report* (WHO Press, 2005),
[4] I. D. Federation, (International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 2015), p. 142.
[5] G. M. Reaven, Diabetes **37** (1988) 1595.
[6] K. G. Alberti *et al.*, Circulation **120** (2009) 1640.
[7] S. M. Grundy *et al.*, Circulation **109** (2004) 433.
[8] R. S. Xu, World J Diabetes **6** (2015) 54.
[9] R. Bucala, J Clin Invest **124** (2014) 1887.
[10] H. Vlassara, and J. Uribarri, Curr Diab Rep **14** (2014) 453.
[11] S. K. Vashist, Diagnostics **3** (2013) 385.
[12] W. M. Ong, S. S. Chua, and C. J. Ng, Patient Prefer Adherence **8** (2014) 237.
[13] J. Yeaw *et al.*, J Manag Care Pharm **18** (2012) 21.
[14] A. A. Michelson, *Studies in Optics* (Dover Publications, Mineola, New York, 1995), 1 edn.,
[15] R. C. Youngquist, S. Carr, and D. E. N. Davies, Optics Letters **22** (1987) 158.
[16] D. Huang *et al.*, Science **254** (1991) 1178.
[17] V. M. Kodach *et al.*, Biomedical Optics Express **1** (2010) 176.
[18] B. E. Bouma, and G. J. Tearney, *Handbook of Optical Coherence Tomography* (CRC Press, 2001), 1 edn.,
[19] J. A. Izatt *et al.*, Investigative Ophthalmology & Visual Science **33** (1992) 1300.
[20] J. A. Izatt *et al.*, in *Conf on Ophthalmic Technologies 3* (Spie - Int Soc Optical Engineering, Los Angeles, Ca, 1993), pp. 136.
[21] J. A. Izatt *et al.*, Archives of Ophthalmology **112** (1994) 1584.
[22] E. A. Swanson *et al.*, Optics Letters **18** (1993) 1864.
[23] S. H. Han *et al.*, in *Conference on Photonic Therapeutics and Diagnostics VIII* (Spie-Int Soc Optical Engineering, San Francisco, CA, 2012).
[24] E. Sattler, R. Kästle, and J. Welzel, Journal of Biomedical Optics **18** (2013) 061224.
[25] A. Sergeev *et al.*, in *Conference on Biomedical Optoelectronic Devices and Systems II* (Spie - Int Soc Optical Engineering, Lille, France, 1994), pp. 144.
[26] W. Drexler *et al.*, Journal of Biomedical Optics **19** (2014)
[27] J. M. Schmitt, S. H. Xiang, and K. M. Yung, Journal of Biomedical Optics **4** (1999) 95.
[28] A. Mariampillai *et al.*, Optics Letters **33** (2008) 1530.
[29] K. M. Poole *et al.*, Biomedical Optics Express **5** (2014) 4118.
[30] M. Cua *et al.*, in *Conference on Photonic Therapeutics and Diagnostics VIII* (Spie-Int Soc Optical Engineering, San Francisco, CA, 2012).
[31] K. K. C. Lee *et al.*, Biomedical Optics Express **3** (2012) 1557.
[32] X. Liu *et al.*, Biomedical Optics Express **2** (2011) 2995.
[33] N. Sudheendran *et al.*, Laser Physics Letters **8** (2011)
[34] A. Mariampillai *et al.*, Optics Letters **35** (2010) 1257.
[35] N. Weiss, T. G. v. Leeuwen, and J. Kalkman, Optics Express **23** (2015) 12.
[36] N. Weiss, T. G. van Leeuwen, and J. Kalkman, Physical Review E **88**, 042312 (2013) 7.
[37] Y. Wang, and R. Wang, Optics Letters **35** (2010) 4.
[38] L. R. De Pretto, G. E. C. Nogueira, and A. Z. Freitas, Journal of Applied Physics **119**, 163105 (2016) 5.
[39] J. M. Schmitt *et al.*, Physics in Medicine and Biology **39** (1994) 1705.
[40] W. Drexler, and J. G. Fujimoto, *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications* (Springer, 2008),
[41] A. C. B. d. Cara, in *Center for Lasers and Applications* (Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012), p. 93.

[42] A. Z. Freitas *et al.*, Journal of Applied Physics **99**, 024906 (2006) 6.
[43] G. Bounous, and H. B. Shumacker, Annals of Surgery **151** (1960) 441.
[44] J. M. Schmitt, Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics **5** (1999) 1205.
[45] R. K. Wang, Physics in Medicine and Biology **47** (2002) 19.
[46] D. P. Popescu *et al.*, Proc. SPIE **6864** (2008) 686408.
[47] V. V. Tuchin, X. Xu, and R. K. Wang, Appl Opt **41** (2002) 258.
[48] D. P. Popescu *et al.*, Journal of Biomedical Optics **13**, 054053 (2008) 8.
[49] C. Irace *et al.*, Diabetes Care **37** (2014) 488.
[50] A. A. Bednov *et al.*, Proc. SPIE **3916** (2000) 9.
[51] M. Kinnunen *et al.*, Biomed Opt Express **2** (2011) 1803.
[52] A. E. Kitabchi *et al.*, Diabetes Care **32** (2009) 1335.
[53] H. Ullah *et al.*, Laser Physics **22** (2012) 1002.
[54] F. C. Staff, (FastCompany, 2015).
[55] L. R. De Pretto *et al.*, in *Conference on Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XX* (Spie-Int Soc Optical Engineering, San Francisco, CA, 2016).