



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**Desenvolvimento de técnicas diagnósticas quantitativas  
baseadas em decorrelação de speckle presente nos sinais de  
Tomografia de Coerência Óptica**

**LUCAS RAMOS DE PRETTO**

**Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências na Área  
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas**

**Coorientador:**

**Prof. Dr. Gesse Eduardo Calvo  
Nogueira**

**São Paulo  
2019**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**Desenvolvimento de técnicas diagnósticas quantitativas  
baseadas em decorrelação de speckle presente nos sinais de  
Tomografia de Coerência Óptica**

**Versão Corrigida**

**Versão Original disponível no IPEN**

**LUCAS RAMOS DE PRETTO**

**Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências na Área  
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas**

**Coorientador:**

**Prof. Dr. Gesse Eduardo Calvo  
Nogueira**

**São Paulo  
2019**

Fonte de Financiamento: FAPESP #2015/15775-3 e #2016/17342-0

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,  
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

DE PRETTO, L. R. **DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS QUANTITATIVAS BASEADAS EM DECORRELAÇÃO DE SPECKLE PRESENTE NOS SINAIS DE TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA**. 2019. 107 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

De Pretto, Lucas Ramos  
DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS QUANTITATIVAS  
BASEADAS EM DECORRELAÇÃO DE SPECKLE PRESENTE NOS SINAIS DE  
TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA / Lucas Ramos De Pretto;  
orientador Anderson Zanardi de Freitas; co-orientador Gesse  
Eduardo Calvo Nogueira. -- São Paulo, 2019.  
107 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia  
Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e  
Nucleares, São Paulo, 2019.

1. Tomografia por Coerência Óptica. 2. Decorrelação de  
Speckle. 3. Angiografia. 4. Retinopatia Diabética. I. Freitas,  
Anderson Zanardi de, orient. II. Nogueira, Gesse Eduardo  
Calvo, co-orient. III. Título.

Dedico este humilde trabalho a todos aqueles que tentam fazer o mundo ser cada vez melhor, seja como e onde for, com ações cotidianas ou grandes empreendimentos. Não parem.

Dedico, especialmente, a meus avós.

## **AGRADECIMENTOS**

A meus pais, por continuarem acreditando em mim. Por todo o apoio, incentivo, motivação, amor, suporte e ensinamentos. Por serem meus guias e modelos na vida. Vocês são meus ídolos. Amo vocês.

A toda a minha família (incluindo os agregados e meus companheiros[as] animais), por nunca me deixar desistir, e por sempre acreditarem que sou capaz, mesmo quando eu não acredito. Por todo suporte, amor, carinho, sugestões e opiniões. Vocês são meu porto seguro.

A Mariana Dominguez Alves, minha companheira da vida, pelo apoio e amor incondicionais. Por sempre me lembrar como é ser feliz. Por não só me fazer acreditar que é possível, mas também ajudar a realizar. Por fazer valer a pena. Te amo.

A todos os amigos que fiz durante minha história. Pessoas especiais na minha vida, que tive o prazer de conhecer pelos mais variados meios – na sala de aula, na sala de bolsistas, no laboratório, pelos corredores do instituto, na rua de casa, no dojo, num jogo, entre tantos outros, dentro e fora do Brasil. Cada um de vocês me permitiu crescer de alguma maneira, e contribuíram para que este momento da minha vida existisse. Vocês são, também, minha família.

Alguns amigos se tornam irmãos e irmãs ao longo da nossa vida. Gostaria de agradecer a eles de forma especial: Eduardo Ayala Fernandes Cruz (Porko), Matheus Costa Santos (Pinto), Renato Linhares Amaral e Dra. Tania Mateus Yoshimura.

Aos meus mentores: professor Dr. André Luiz Vizine Pereira, professor MSc. Alexandre Fernando Stucchi e Newton Antonio Arantes. Por me fazer gostar de aprender e ensinar. Por me apresentar uma nova forma de entender o mundo. Por me desafiar a continuar melhorando. Sem vocês pelo meu caminho, eu não seria quem sou hoje.

Ao Dr. Gesse Eduardo Calvo Nogueira, meu coorientador. Não há agradecimentos suficientes, e nada do que eu escreva aqui irá refletir o que seus ensinamentos e amizade me proporcionaram. Sou uma pessoa melhor por ter tido a sorte de lhe conhecer. Muito obrigado.

À Dra. Martha Simões Ribeiro, ao Dr. Niklaus Ursus Wetter, ao Dr. Wagner de Rossi, à Dra. Denise Maria Zezell, ao Dr. Eduardo Landulfo e ao Dr. Ricardo Elgul Samad, pelo apoio e presença constantes durante este trabalho. Para mim, vocês foram professores por todo este tempo, me ensinando algo a todo momento, mesmo nos corredores do Centro de Lasers e Aplicações.

Ao Dr. Marcus Paulo Raele por todo o apoio desde o meu projeto de mestrado, e por todos os trabalhos em colaboração, além da amizade, conversas, cafés e, até, hospedagem ofertada em momentos oportunos. Obrigado.

Ao Dr. Anderson Zanardi de Freitas. Não é possível expressar o quão grato sou por ter acreditado em mim desde o início. E, após isto, ainda me aturar por 7 anos, perturbando-o em sua sala, fazendo perguntas às vezes bobas, às vezes adequadas e às vezes demasiadamente complexas. Professor, agradeço pela confiança, tempo, dedicação, ensinamentos, orientação e amizade. O caminho que trilhamos juntos até aqui foi especial. E sei que podemos fazer ainda mais.

Sou uma combinação das contribuições de todas essas pessoas e de tantas outras mais, com suas histórias, lições e expressões. Por isso sou grato a todos vocês.

Agradeço ao IPEN e à Universidade de São Paulo, pela infraestrutura e aulas que possibilitaram a criação deste trabalho.

Agradeço ao grupo do laboratório de pesquisas em eletrônica do Massachusetts Institute of Technology e ao grupo de pesquisas do New England Eye Center pelas colaborações, aprendizados e amizades. Em especial, gostaria de agradecer: Yasin, Siyu, Akihiro, Dorothy, Eric, Lennart, Mike, Dra. Nadia e Prof. James Fujimoto.

Agradeço aos componentes da comissão julgadora, por aceitarem avaliar e continuar para este estudo: Dr. Adriano Mesquita de Alencar, Dr. Airton Abrahao Martin, Dr. Anderson Stevens Leonidas Gomes, Dr. Marcello Magri Amaral, Dr. Marcus Paulo Raele e Dr. Niklaus Ursus Wetter.

Agradeço à FAPESP Processos 2015/15775-3 e 2016/17342-0, pelo auxílio ao estudo.

*“When life leaves us blind, love keeps us kind.”*

Linkin Park.

*“They were not the same eyes with which he had last looked out at this particular scene, and the brain which interpreted the images the eyes resolved was not the same brain. There had been no surgery involved, just the continual wrenching of experience.”*

Douglas Adams.

# SUMÁRIO

RESUMO .....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. CONTEXTUALIZAÇÃO .....	21
3.1. Tomografia por Coerência Óptica – OCT.....	21
3.2. Speckle .....	26
3.2.1. Speckle variante no tempo .....	30
3.2.2. Speckle em OCT.....	31
4. OCT PARA MENSURAR GLICEMIA.....	35
4.1. Materiais e Métodos.....	35
4.1.1. Preparo das amostras de sangue ex-vivo.....	35
4.1.2. Valores de referência de glicemia.....	36
4.1.3. Aquisição de dados.....	36
4.1.4. Análise de dados .....	37
4.1.5. Análise de coeficiente de atenuação .....	37
4.1.6. Análise de autocorrelação do speckle .....	38
4.2. Resultados e Discussão.....	40
4.2.1. Análise de coeficiente de atenuação .....	40
4.2.2. Análise de speckle .....	44
5. NOVA TÉCNICA PARA QUANTIFICAR FLUXO COM SPECKLE EM OCT .....	47
5.1. Materiais e Métodos.....	49
5.1.1. Simulador microfluídico.....	49
5.1.2. Aquisição de dados.....	50
5.2. Resultados e Discussão.....	51

6.	ANÁLISE DE PROGRESSÃO DE RETINOPATIA DIABÉTICA.....	58
6.1.	Materiais e Métodos.....	58
6.1.1.	Software desenvolvido.....	58
6.1.2.	Recrutamento de pacientes.....	63
6.1.3.	Análise de dados.....	63
6.1.4.	Aquisição de dados.....	64
6.2.	Resultados e Discussão.....	64
7.	ESTUDO DA DISPERSÃO DAS ÁREAS DE NÃO-PERFUSÃO NAS REGIÕES ARTERIAL E VENOSA.....	69
7.1.	Materiais e métodos.....	70
7.1.1.	Recrutamento de pacientes.....	70
7.1.2.	Aquisição de dados.....	70
7.1.3.	Software para identificação de regiões de não-perfusão.....	71
7.1.4.	Delineamento de artérias e veias.....	71
7.1.5.	Software para associação arterial/venosa.....	71
7.1.6.	Análise Estatística.....	73
7.2.	Resultados e discussão.....	74
7.2.1.	Características da população.....	74
7.2.2.	Associação de não-perfusão com artérias e veias em imagens <i>widefield</i> de 12 mm x 12 mm.....	75
7.2.3.	Associação de não-perfusão com artérias e veias em <i>montages</i> 75	
7.2.4.	Casos Representativos.....	76
7.2.5.	Discussão.....	78
8.	ANÁLISE DE ARTEFATOS EM IMAGENS <i>WIDEFIELD</i> DE OCT.....	81
8.1.	Métodos.....	81
8.1.1.	Recrutamento de pacientes.....	81
8.1.2.	Aquisição de Dados.....	82

8.1.3.	Identificação de regiões de não-perfusão .....	82
8.1.4.	Causas do <i>low signal</i> em <i>widefield</i> OCTA .....	82
8.1.5.	Efeitos de <i>low signal</i> em <i>widefield</i> OCTA .....	85
	Como <i>low signal</i> influencia o processamento e análise de OCTA.....	85
	Como Artefatos <i>low signal</i> afetam a interpretação de dados OCTA.....	86
	Como Artefatos <i>low signal</i> afetam medições quantitativas em OCTA...	87
8.1.6.	Detecção de artefatos <i>low signal</i> em <i>widefield</i> OCTA .....	89
	Protocolo para Detecção de Artefatos .....	89
	Método do Corte Transversal para Detecção de Artefatos.....	90
	Método En Face para Detecção de Artefatos.....	92
	O Método Ortoplano de Detecção de Artefatos.....	93
	Algoritmo simples para Detecção Automatizada de Artefatos .....	93
	CONCLUSÕES.....	97
	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	99
	Artigos publicados em periódicos .....	99
	Trabalhos publicados em anais de eventos.....	100
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema básico para ilustrar o funcionamento de um OCT montado em um interferômetro de Michelson.....	22
<b>Figura 2</b> - Ilustração de diversos interferogramas adjacentes sendo adquiridos.....	22
<b>Figura 3</b> - Exemplo de imagem 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 sudoríparo. Reproduzido de [4].....	23
<b>Figura 4</b> - Espectros detectados no FD-OCT mostrados como Intensidade (unidade arbitrária) em função do número de onda $K$ ( $m^{-1}$ ). A) Espectro da fonte luminosa. B) Espectro detectado pelo arranjo quando a diferença de caminho óptico é nula. C) Espectro detectado com uma pequena diferença de caminhos óptico. Adaptado de Raele <sup>5</sup> .....	26
<b>Figura 5</b> - Padrão de speckle típico. Foto por Epzcaw, disponibilizada para reuso através de uma licença CC-BY-SA 3.0. ....	27
<b>Figura 6</b> - Diferentes modos de observação do Speckle. a) Modo de campo-distante em que toda a região iluminada contribui para a intensidade observada. b) Modo subjetivo, em que pontos dentro da resolução do sistema contribuem para a imagem formada. ....	28
<b>Figura 7</b> - Principais causas de speckle no OCT: espalhadores no volume de interesse, que causam efeitos similares a uma superfície rugosa; espalhamentos para frente, que geram distorções de fase na frente de onda incidente; múltiplos retroespalhamentos e espalhamentos fora do volume de interesse, normalmente filtrados pela baixa coerência temporal. Adaptado de Schmitt <i>et al</i> <sup>7</sup> .....	33
<b>Figura 8</b> - 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.....	41

<b>Figura 9</b> - 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. ....	43
<b>Figura 10</b> - 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 quadrado de 0,99, indicando que nossos resultados podem ser representados por um modelo linear. SE, erro padrão. ....	43
<b>Figura 11</b> - 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. ....	45
<b>Figura 12</b> - 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. ....	45
<b>Figura 13</b> - Valores de autocorrelação no primeiro atraso em função da velocidade de fluxo subjacente para aquisições a 2kHz. É possível notar o decaimento conforme as velocidades aumentam. ....	51
<b>Figura 14</b> - Valores de autocorrelação no primeiro atraso em função da velocidade de fluxo subjacente par aquisições a 1,33kHz. A tendência de decaimento continua visível, porém a técnica é saturada em velocidades inferiores àquelas reportadas com aquisições de 2 kHz. ....	53
<b>Figura 15</b> - Ilustração demonstrando a área de integração dos valores de autocorrelação para os testes com 660 Hz. ....	54
<b>Figura 16</b> - B-Scans de fluxo quantitativos. As imagens são projeções (médias) de seções transversais do microcanal, codificadas em cores falsas a partir de valores correspondentes a (1 – Autocorrelação no atraso 1). Note a diferença de cores para as velocidades de fluxo aplicada e, adicionalmente, a dispersão de velocidades dentro do microcanal. ....	56
<b>Figura 17</b> - Fluxograma demonstrando o funcionamento do software, com as diferentes etapas, para geração dos resultados. ....	60

**Figura 18** – Ilustração do processo de janela deslizante para processamento de imagens. Apenas os valores dentro da janela selecionada, como a janela de 3x3 pixels no topo à esquerda, são considerados. Para o algoritmo desenvolvido, o cálculo realizado é a variância de intensidade dos pixels da janela. O valor final ( $\sigma$ ) é aplicado ao pixel central, e a janela se desloca, de tal maneira que um novo pixel ocupe a posição central, e o processo é realizado novamente (como no topo à direita). Após o processo ser repetido para todos os pixels da imagem, uma nova imagem é gerada, com base nos valores  $\sigma$  atribuídos, denominada “Imagem de Variância Espacial” ou SVI. Este procedimento pode ser realizado com diversos tamanhos N x N de janela (N normalmente ímpar). Para o algoritmo, os tamanhos de 5x5 e 7x7 foram também utilizados (região azul na figura). .....61

**Figura 19** – Ilustração do processo de inundação. Pixels aleatórios são selecionados como fontes de água. Cada um destes pixels (marcados de acordo com a legenda de cores), começa a inundar a área à sua volta, a partir de uma vizinhança de 4 pontos (pixels diretamente acima, abaixo, e aos lados, sem diagonais). Isto é exemplificado para a fonte de água marcada com •. Os pixels da sua vizinhança de 4 pontos são analisados. Se possuem valores baixos, são inundados. Caso contrário, são uma barreira, e delimitam a inundação (a fonte de água não mais se expande naquela direção). Após todos os pixels na vizinhança serem analisados, a primeira iteração termina e a segunda se inicia. Todos os pixels inundados na iteração anterior terão sua vizinhança de 4 pontos analisada, e inundada caso não seja uma barreira, como demonstrado pelos pixels de primeira e segunda iteração na figura. O processo se repete até que uma iteração se inicie sem que pixels tenham sido inundados na iteração anterior. Novas fontes de água são, então selecionadas e o processo se repete por um número de vezes pré-determinado.....62

**Figura 20** - Demonstração dos resultados obtidos para diferentes progressões da RD. Da esquerda para a direita: Foto de fundo de olho; Imagem de OCT estrutural; imagem de OCTA; Resultado do Software. Na coluna de resultados: azul = áreas selecionadas como de não-perfusão; em vermelho: áreas manualmente excluídas da análise. É nítida a tendência de aumento de zonas isquêmicas para níveis mais severos de RD.....65

**Figura 21** - Boxplot demonstrando percentual de não-perfusão capilar medido. Para todas as parcelas, as bordas inferior e superior da caixa representam os percentis 25 e 75, respectivamente, enquanto a linha do meio representa a mediana. As barras de erro (tracejadas) estendem-se aos valores mais baixo e mais alto, excluindo *outliers*, que estão marcados com sinais de mais. Os *outliers* foram considerados como sendo os pontos de dados 1,5 intervalos interquartílicos acima do 75º quartil, ou 1,5 intervalos interquartílicos abaixo do 25º quartil.....66

**Figura 22** - Exemplo da performance do algoritmo em detectar não-perfusão capilar em diferentes campos de visão amostrados (nenhuma correção manual foi feita às áreas automaticamente identificadas). Áreas isquêmicas são marcadas em azul, enquanto exclusões pré-processamento são marcadas em vermelho. Esquerda: imagem de 12 mm x 12 mm de um olho com retinopatia diabética proliferativa. Direita: mesmo olho amostrado em uma área de 15 mm x 9 mm. ...68

**Figura 23** - Fluxograma descrevendo o algoritmo desenvolvido para calcular a associação arterial ou venosa de áreas de não-perfusão. O algoritmo utiliza três entradas principais: os mapas arterial, venoso e de não-perfusão. Após binarização e transformada de distância, o algoritmo seleciona as menores distâncias e calcula a associação, indicando em cores falsas (para visualização): vermelho para regiões arteriais e azul para regiões venosas.....73

**Figura 24** - Gráficos individuais mostrando a razão arterial/venosa em função da não-perfusão em olhos com RD-NP moderada, severa e RD-P. As linhas estão centralizadas na mediana, com o intervalo interquartil. À esquerda: 12 mm x 12 mm OCTA. À direita *montage* OCTA. Acima: dispersão da razão A/V em função da severidade. Abaixo: dispersão da razão A/V em função da % de não-perfusão total. Interessante notar a correlação negativa entre a razão AV e o percentual de não-perfusão total.....76

**Figura 25** - Caso representativo de um homem de 75 anos com RD-NP moderada e pequenas áreas de não-perfusão. Topo à esquerda: OCTA original (12 mm x 12 mm). Topo ao meio: Mapeamento das artérias e veias. Topo à direita: Resultado do algoritmo de associação. Abaixo à esquerda: Magnificação da zona destacada (topo ao meio), identificando áreas isquêmicas pequenas próximas aos vasos arteriais. Abaixo à direita: Magnificação da zona destacada

(topo à direita), mostrando a associação destas mesmas áreas, predominantemente arteriais.....77

**Figura 26-** Caso representativo de um homem de 34 anos com RD-NP severa e grandes áreas de não-perfusão. Topo à esquerda: OCTA original (*montage*) A região verde é um artefato de segmentação, excluído da análise. Topo ao meio: Mapeamento das artérias e veias. Topo à direita: Resultado do algoritmo de associação. Abaixo à esquerda: Magnificação da zona destacada (topo ao meio), identificando áreas isquêmicas largas e esparsas se aproximando das regiões venosas (círculos verdes). Abaixo à direita: Magnificação da zona destacada (topo à direita), mostrando a associação destas mesmas áreas, com mais contribuição venosa quando comparada à Figura 25.....78

**Figura 27** - Ilustração do alinhamento do feixe OCT com o olho humano. O pivô de rotação do feixe deve coincidir (lateral e axialmente) com a pupila. A) Alinhamento ideal. B) Desalinhamento axial, em que o pivô não fica localizado do plano da pupila e, conseqüentemente, o feixe é bloqueado pela íris, causando *vingetting*.....84

**Figura 28** - Fluxo de processamento comum para imagens de OCTA. ....86

**Figura 29-** Efeitos dos artefatos na porcentagem de não-perfusão calculada. A) Projeção *em face* OCTA poriginal. B) Cálculo de não-perfusão sem excluir áreas de artefato. Observe como as região de *low signal* influenciam o algoritmo e são erroneamente selecionadas. C) Cálculo de não-perfusão com exclusão de artefatos. Observe a diferença na quantidade de regiões selecionados pelo algoritmo. ....87

**Figura 30** – Ilustração da visualização ortoplano (corte-transversal e *en face*) para detecção de artefatos, utilizando o mesmo exemplo da Figura 29. A) Projeção OCTA *en face*; B) Projeção OCT *en face*; C-F) B-Scans correspondentes às regiões subjacentes (corte transversal) abaixo das setas azuis pontilhadas (identificadas na imagem). Setas laranjas apontam para as bordas de artefatos de segmentação; setas amarelas apontam para as bordas de artefatos de limiarização; asteriscos vermelhos indicam regiões de baixo sinal de OCTA causadas por *low signal* OCT; asteriscos verdes indicam regiões de baixo sinal de OCTA devido a fluxos baixos/ausentes. ....88

**Figura 31** - Fluxograma detalhando o protocolo de boas práticas sugerido para minimizar o impacto de artefatos em medidas de OCTA. A área pontilhada em B substitui a caixa pontilhada em A, caso o método ortoplano (discutido a seguir) esteja disponível. ....91

**Figura 32** - Fluxograma para detecção automática de artefatos com baixo sinal de OCT. (A) Imagem *en face* OCT de entrada. (B) Máscara de variância para detectar erros de segmentação, calculada com janela de 9 pixels x 9 pixels e, em seguida, binarizando a imagem resultante usando um limiar determinado empiricamente. Etapas morfológicas adicionais (fechamento e erosão) são usadas para remover regiões espúrias. (C) Máscara de baixo sinal OCT, formada por uma limiarização adaptativa da imagem da OCT de entrada. Em particular, um limite dinâmico (janela de 3 pixels x 3 pixels) é calculado em relação à intensidade média da imagem OCT. (D) Saída do algoritmo: máscara identificando regiões de artefato, formada pela combinação das máscaras dos painéis (B, C); novamente, processamento morfológico (erosão) é usado para remover regiões espúrias. (E) Sobreposição da máscara de artefato de saída com imagem OCT *en face* de entrada.....95

**Figura 33** - Exemplos de detecção automática de artefato. Todas as imagens são projeções totais da retina, com FOV de 12 mm x 12 mm. Coluna (A), paciente de 68 anos, com RD-NP leve; mesmo olho da Figura 29. Coluna (B), 74 anos, com RD-NP grave. Coluna (C), 54 anos, com RD-NP grave. Coluna (D) Olho direito do mesmo paciente da coluna (C), RDP. Linha 1: OCTA *en face* da vasculatura da retina. Linha 2: imagem OCT *en face* correspondente. Linha 3: Artefatos detectados automaticamente, mostrados em vermelho. Linha 4: Áreas de não-perfusão não corrigidas. Linha 5, áreas corrigidas de não-perfusão. Os PANP's estão listados no canto superior direito de cada painel, nas linhas 4 e 5. A seta branca na coluna (D) aponta para uma região que foi incorretamente classificada pelo algoritmo como livre de artefatos (ou seja, falso negativo). .....96

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Concentrações de glicose dos diferentes grupos analisados (sangue não diluído). .....	40
<b>Tabela 2</b> - Novos grupos oriundos da nossa análise por K-Means realizada para as amostras de sangue diluído (n=12). .....	42
<b>Tabela 3</b> - Concentrações médias de glicose plasmática para cada grupo (n=15). .....	44
<b>Tabela 4</b> - Valores de autocorrelação integrados ao longo de diferentes raios, através de diferentes velocidades. V = velocidade do fluxo (mm/s); Atraso 1 = valor de autocorrelação no atraso 1 (em ms); Desv. Padrão = Desvio Padrão. É possível ver a tendência de aumento do valor com o aumento do raio. ....	54
<b>Tabela 5</b> - Características dos olhos selecionados para o estudo. Os valores são medianas (intervalo interquartil). <sup>a</sup> Kruskal-Wallis usado para variáveis contínuas, Chi-quadrado para variáveis categóricas. <sup>b</sup> RD-NP moderada vs PDR, $p < 0,01$ , teste de Dunn's. <sup>c</sup> RD-NP moderada vs PDR, $p < 0,05$ , teste de Dunn's. ....	74

## RESUMO

DE PRETTO, L. R. ***Desenvolvimento de técnicas diagnósticas quantitativas baseadas em decorrelação de speckle presente nos sinais de Tomografia de Coerência Óptica***. 2019. 107 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), são uma das principais causas de morte no mundo, principalmente diabetes mellitus (DM). De particular importância para a DM, a manutenção de elevados níveis glicêmicos contribui de forma direta para o prejuízo das funções vasculares. Ainda, a DM impacta diretamente na qualidade de vida através de outros fatores associados à doença. Destaca-se a Retinopatia Diabética (RD), uma das principais causas de cegueira no mundo. A Tomografia por Coerência Óptica (OCT, do inglês, *Optical Coherence Tomography*) é uma modalidade de diagnóstico por imagem baseada em interferometria óptica que não utiliza radiação ionizante. Análise das flutuações de intensidade do sinal de OCT, devido ao padrão de ruído denominado speckle, possibilita análises angiográficas e de fluxo. Este estudo apresenta, então, o uso de OCT como ferramenta diagnóstica tanto para medir níveis glicêmicos no sangue de forma sem-contato, como para analisar *in vivo* a microvasculatura retinal. Desta maneira, novas técnicas diagnósticas para controle do nível glicêmico e para acompanhamento e estudo da retinopatia diabética são propostas. Os resultados de diferenciação da concentração de glicose no sangue obtidos, com métodos de análise espacial e temporal, são animadores e mostram boa sensibilidade do OCT para aplicações *ex vivo*, indicando uma potencial técnica de monitoramento glicêmico não-invasiva. Adicionalmente, as novas formas de análise microvascular da retina possibilitam um diagnóstico precoce da severidade da RD, o que possibilita melhor indicação do tratamento adequado a cada caso. Ainda, esta análise revela informações novas sobre a angiogênese da RD. É necessário, entretanto, um conhecimento adequado sobre as imagens adquiridas e métricas utilizadas, e um relatório sobre estes fatores foi desenvolvido. Com isto, esta tese demonstra a importância do desenvolvimento de técnicas de OCT para aplicações clínicas e para saúde dos pacientes com DM.

**Palavras-chave:** Tomografia por coerência óptica, Decorrelação de Speckle; Angiografia; Retinopatia Diabética

## ABSTRACT

DE PRETTO, L. R. ***Development of quantitative diagnostic techniques based on decorrelation of speckle present in Optical Coherence Tomography signals.*** 2019. 107 p. Thesis (PhD in Nuclear Technology), Nuclear and Energy Research Institute, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

According to data from the World Health Organization (WHO), noncommunicable chronic diseases (NCDs) are the major causes of death in the world, especially diabetes mellitus (DM). Of particular importance for DM, the maintenance of high glycemic levels contributes to the impairment of vascular functions. Still, DM directly impacts the quality of life through other factors associated with the disease. Noteworthy is the Diabetic Retinopathy (DR), one of the leading causes of blindness in the world. Optical Coherence Tomography (OCT) is a diagnostic imaging modality based on non-ionizing optical interferometry. Analysis of OCT signal intensity fluctuations, due to a noise pattern called speckle, enables angiographic and flow analysis. This study, then, presents the use of OCT as a diagnostic tool for both: measurement of blood glucose levels and retinal microvasculature analysis *in vivo*. Thus, new diagnostic techniques for glycemic level control and monitoring and study of diabetic retinopathy are proposed. The results of differentiating blood glucose concentration obtained by spatial and temporal analysis methods are encouraging, and show good sensitivity of OCT for *ex vivo* applications, indicating a potential noninvasive glycemic monitoring technique. In addition, new forms of retinal microvascular analysis allow for early diagnosis of DR severity, which provides information for appropriate treatment in each case. Also, this analysis reveals new information about the angiogenesis of DR. However, adequate knowledge about the acquired images and about the metrics used is required, and a report on these factors has been developed. This thesis demonstrates the importance of developing OCT techniques for clinical applications and health benefits of patients with DM.

**Keywords:** Optical Coherence Tomography Speckle decorrelation; Angiography; Diabetic Retinopathy

# 1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>1</sup>, 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.

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. De particular importância, a manutenção de elevados níveis glicêmicos contribui de forma direta para o prejuízo das funções vasculares.

Ainda, a DM impacta diretamente na qualidade de vida através de outros fatores associados à doença. Destaca-se a Retinopatia Diabética (RD), uma das principais causas de cegueira no mundo. A doença é caracterizada por alterações funcionais e estruturais da microcirculação presente na retina em decorrência de níveis glicêmicos elevados. Essas alterações ocasionam em microaneurismas e isquemia, além de possíveis vazamentos de sangue no centro do olho ou na mácula (Edema Macular), ocasionando em perda (parcial ou total) de visão.

O acompanhamento dos níveis de glicose tem, diante do exposto, importância especial para o tratamento de DM. O método mais comum para esse monitoramento é o uso de glicosímetros, 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. Assim, abordagens não-invasivas são de interesse para melhorar a aderência ao tratamento.

Não obstante, técnicas angiográficas para a microcirculação da retina, importantes para o estudo e acompanhamento da RD, normalmente necessitam de agentes externos para contraste, como é o caso de Angiografia por Fluoresceína (Fluorescein Angiography, FA). Isto limita a indicação deste tipo de exame a pacientes em estágios avançados da doença, por ser invasivo, trazer

desconforto ao paciente e oferecer risco de reações adversas. Portanto, técnicas não-invasivas também para monitoramento oftalmológico são de grande impacto na melhora do tratamento, e conseqüente qualidade de vida, de pacientes diabéticos.

A Tomografia por Coerência Óptica (OCT, do inglês, *Optical Coherence Tomography*) é uma modalidade de diagnóstico por imagem baseada em interferometria óptica que não utiliza radiação 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 pode ser aplicada *in vivo*. A intensidade do sinal de OCT diminui conforme a luz penetra no objeto analisado, em virtude das interações da luz com a amostra. Parte da radiação óptica é retroespalhada e retorna ao arranjo, enquanto outras porções são espalhadas em outras direções ou absorvidas. Esta atenuação do sinal é específica de cada amostra, e depende de seus coeficientes de espalhamento e absorção para o comprimento de onda utilizado. Além disso, múltiplos espalhamentos e espalhamentos de fora do volume de interesse podem ocasionar distorções nas frentes de onda, dando origem a um tipo de ruído chamado speckle. Este padrão de ruído carrega informações sobre os espalhadores de onde é originado, possibilitando, por exemplo, identificar e caracterizar fluxos subjacentes à amostra estudada, através de análise de séries temporais. Os algoritmos para análise de fluxos vasculares com técnicas OCT deste tipo são chamados de OCT Angiográfico (OCTA).

Este estudo apresenta resultados *ex vivo* do uso de OCT para monitoramento do nível de glicose no sangue, utilizando duas abordagens diferentes, uma atuando no domínio espacial (atenuação óptica) enquanto a outra tem base no domínio temporal (autocorrelação temporal de speckle). Isso demonstra a versatilidade do OCT como ferramenta de diagnóstico, permitindo que um mesmo fenômeno (retroespalhamento de luz) seja interpretado de duas maneiras distintas e não mutuamente exclusivas.

Além disso, através do mapeamento angiográfico por speckle de volumes tridimensionais (cada volume é uma coleção de imagens OCT adjacentes), este trabalho demonstra a capacidade da técnica de OCT de analisar a RD e diferenciar estágios de progressão da doença, são eles: olhos diabéticos sem RD,

RD não-proliferativa (isto é, sem surgimento de novos vasos) e RD proliferativa (o estágio mais severo de retinopatia). Esta discriminação é feita através da mensuração semi-automática de áreas de isquemia nas projeções de OCT da retina.

Ainda, este trabalho avança os métodos desenvolvidos anteriormente pelo presente autor<sup>2</sup> para quantificação de microfluxos presentes em amostras analisadas por OCT, através da análise de autocorrelação de speckle. Utilizando sistemas de OCT de alta taxa de aquisição, este estudo estabelece um novo parâmetro de observação na decorrelação temporal de speckle. Desenvolver técnicas deste tipo permitem novos estudos angiográficos para doenças relacionadas a DM que causam alterações vasculares, entre outras aplicações em que dados de angiografia sejam parâmetros diagnósticos úteis.

Com isto, esta tese pretende demonstrar que o OCT é uma ferramenta de diagnóstico não-invasivo com alto potencial para diversas análises funcionais relacionadas à diabetes, bem como uma forma de análise útil para o estudo de microfluxos – seja em contexto industrial ou biológico. Este documento apresenta diferentes estudos conduzidos pelo presente autor. Cada estudo contém sua própria seção de métodos e resultados e discussão, para apropriada organização das informações.

Parte deste estudo foi realizada em colaboração com o Massachusetts Institute of Technology (MIT), no laboratório de pesquisa em eletrônica (RLE), departamento da Engenharia Elétrica e Ciência da Computação (EECS), orientado pelo Prof. Dr. James G. Fujimoto.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é avançar o estado da arte das técnicas de fluxometria speckle em sistemas de OCT, bem como oferecer ferramentas não-invasivas para estudo e diagnóstico de doenças relacionadas à Diabete Mellitus e, desta forma, ampliar o uso clínico – já vasto – da Tomografia por Coerência Óptica.

Descrevem-se, então, os objetivos específicos dos estudos aqui apresentados:

- Analisar as características de diferentes concentrações de glicose no sangue, com OCT, para fornecer embasamento a futuras técnicas de diagnóstico não-invasivo;
- Avaliar um novo estimador de velocidade de fluxo baseado em decorrelação temporal de Speckle;
- Fornecer uma ferramenta diagnóstica não-invasiva para análise da patogênese e progressão da retinopatia diabética;
- Detalhar as dificuldades e oferecer soluções para obtenção de imagens OCT de campo largo na área oftalmológica.

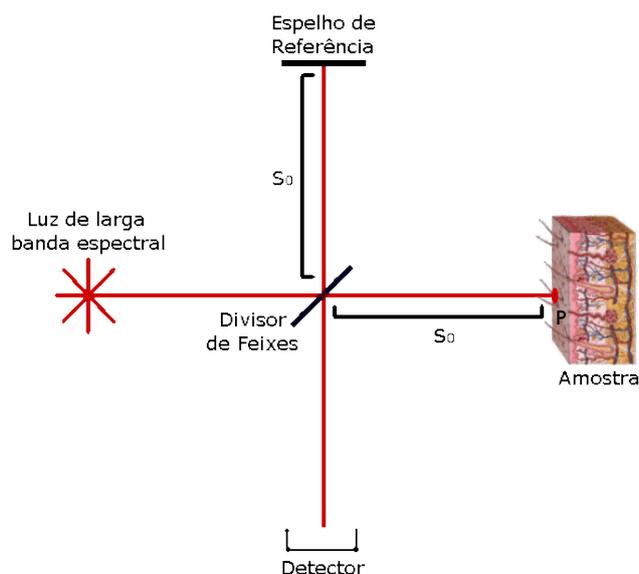
### 3. CONTEXTUALIZAÇÃO

Serão expostas nesta seção as informações necessárias para a realização dos estudos propostos.

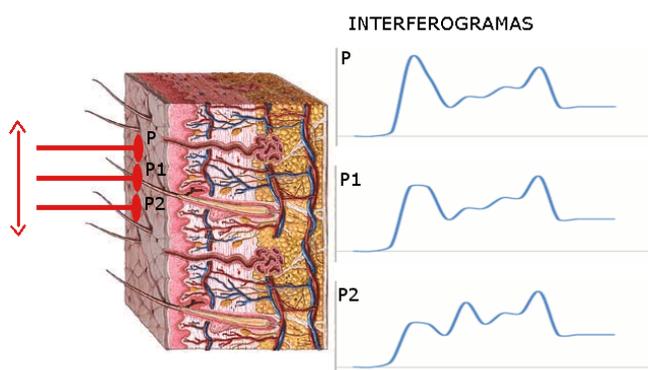
#### 3.1. Tomografia por Coerência Óptica – OCT

Derivada de técnicas de interferometria de luz branca, a Tomografia por Coerência Óptica, ou OCT (*Optical Coherence Tomography*) foi desenvolvida por Huang *et al.* em um grupo liderado por James G. Fujimoto, no ano de 1991<sup>3</sup>. A técnica de OCT é capaz de produzir imagens de corte transversal, com alta resolução e de forma não invasiva, de estruturas internas da amostra. A profundidade de penetração, da ordem de poucos milímetros em tecidos biológicos, é superior àquela de outras técnicas de alta resolução, como a Microscopia Confocal. Quando comparada a outras técnicas com alta penetração, é a resolução do sistema de OCT que o torna uma alternativa interessante. Desta maneira, a Tomografia por Coerência Óptica ocupa uma região oportuna na relação entre a profundidade de penetração e a resolução.

O sistema de OCT geralmente tem sua *montagem* baseada em um interferômetro de Michelson, empregando uma fonte de radiação eletromagnética de larga banda espectral. Neste tipo de interferômetro, ilustrado na Figura 1, a fonte direciona o feixe a um divisor (*Beam Splitter*), que a divide em duas partes. Uma parte é direcionada ao Braço de Referência, onde o feixe é retro refletido por um espelho e retorna ao divisor. No Braço de Amostra a radiação incide sobre o objeto de estudo em um determinado ponto P, e parte dela é retroespalhada, voltando pelo caminho original até o divisor. Os feixes são, então, recombinados e direcionados ao detector.



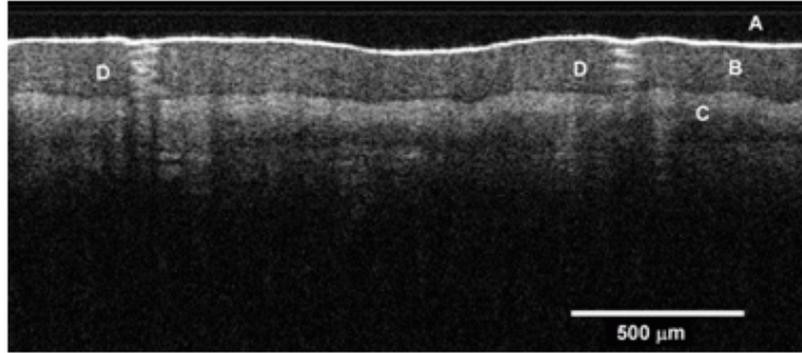
**Figura 1** - Esquema básico para ilustrar o funcionamento de um OCT montado em um interferômetro de Michelson.



**Figura 2** - Ilustração de diversos interferogramas adjacentes sendo adquiridos.

O OCT é baseado na interferência entre os dois feixes, e registra esta informação através do detector, gerando um interferograma, que é relacionado ao ponto  $P$  que foi estudado. Devido a baixa coerência da fonte de radiação utilizada, o padrão de interferência ocorre apenas para diferenças muito pequenas entre os braços do interferômetro, a manipulação do espelho de referência faz com que essa interferência possa ocorrer em diferentes profundidades da amostra, dando origem ao interferograma (A-scan). O feixe incidente na amostra é então, deslocado para um ponto imediatamente vizinho a  $P$ , e mais um interferograma é coletado. Este processo é repetido para um número designado de pontos adjacentes, o que pode ser observado na Figura 2. Os interferogramas, após processamento, são combinados e convertidos para uma imagem de cores falsas,

com cada *A-Scan* representando uma coluna da imagem. Deste modo, o número de pontos estudados define a largura da imagem. As imagens assim obtidas são denominadas *B-Scans*, e são as imagens típicas de corte transversal do OCT, e um exemplo desse tipo de imagem é apresentado na Figura 3.



**Figura 3** - Exemplo de imagem 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 sudorífero. Reproduzido de [4].

No entanto, abordagens diferentes foram propostas para OCT, com maneiras alternativas de obter os A-Scans. Uma destas técnicas se baseia no domínio temporal, e é conhecida por TD-OCT (*Time Domain Optical Coherence Tomography*), enquanto a outra tem base no domínio de frequências e é denominada de FD-OCT (*Frequency Domain Optical Coherence Tomography*). Para sistemas de OCT atuais a técnica de FD-OCT é padrão, por possibilitar uma alta taxa de aquisição.

Com uma fonte de larga banda espectral, o feixe é constituído por diversos comprimentos de onda, que podem ser decompostos em faixas espectrais para detecção e processamento. No contexto do FD-OCT, a intensidade do sinal interferométrico detectado  $I_d$ , assumindo-se feixes gaussianos, pode ser descrita em função destas diferentes componentes espectrais, ou números de onda  $k$  :

$$I_d(k) \propto \left( \left( \frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) \right)^2 \left[ R_r^2 + \int_0^\infty \int_0^\infty R_s(x_s) R_s(x'_s) e^{i(2kn(x_s)x_s - 2kn(x'_s)x'_s)} dx_s dx'_s + 2 R_r \int_0^\infty R_s(x_s) \cos(2k n(x_s) x_s - 2kx_0) dx_s \right] \quad (1)$$

onde  $E_{fo}$  é o espectro da fonte de luz utilizada,  $R_r$  é o parâmetro de refletividade do braço de referência,  $R_s$  é o parâmetro de refletividade do braço de amostra,  $n(x)$  é o índice de refração em um ponto  $x$ ,  $x_0$  é a posição do espelho de referência e, finalmente,  $x_s$  e  $x'_s$  são diferentes profundidades de espalhamento no interior da amostra.

O primeiro termo desta equação é uma constante, um sinal DC, oriundo apenas do braço de referência. O segundo termo é a contribuição da autocorrelação do braço de amostra (combinação dos retroespalhamentos de diferentes profundidades). Na teoria de OCT, entretanto, o terceiro termo, uma correlação cruzada entre o sinal da amostra e o sinal de referência, é o de maior importância para entender o funcionamento da técnica, e vamos destacá-lo:

$$\left( \left( \frac{1}{2} \right) E_{fo}(k) \right)^2 \left[ 2 R_r \int_0^{\infty} R_s(x_s) \cos(2k n(x_s) x_s - 2kx_0) dx_s \right] \quad (2)$$

A primeira coisa a se notar é que o sinal é envelopado pela distribuição espectral da fonte, e é essa distribuição que determinará a resolução axial do sistema. Em seguida, observa-se que a correlação cruzada é modulada por um sinal cosseínodal, cuja frequência depende de  $x_s - x_0$ , a diferença entre o caminho percorrido pelo feixe até o espelho e o caminho até a profundidade  $x_s$  na amostra. Esse termo é aptamente denominado “diferença de caminho óptico” ou OPD, da sigla em inglês para *optical path difference*. Perceba-se que, com o conhecimento prévio de  $x_0$  e o cálculo do OPD, é possível determinar a posição dentro da amostra em que o retroespalhamento aconteceu. Desta maneira, as frequências observadas em  $I_d(k)$  revelam as subsuperfícies espalhadoras de uma amostra.

A Figura 4 ilustra as diferentes frequências observadas quando ocorre alteração no caminho óptico, com a simulação de um interferômetro com dois espelhos e uma grade de difração, permitindo a análise do interferograma em função de diferentes componentes espectrais (K). Em B), os caminhos ópticos da Referência e da Amostra são idênticos, o OPD é zero, o cosseno é uma constante de valor 1 e, portanto, o espectro detectado é similar ao espectro da fonte utilizada, em A), apenas escalado em função de  $R_r$  e  $R_s$ . Já em C), uma diferença

de caminhos ópticos é introduzida, resultando em uma modulação por uma frequência específica – é a análise desta frequência que permite recuperar a profundidade em que se deu o espalhamento pela amostra.

Esta abordagem pode ser realizada tanto com a utilização de um espectrômetro, separando o feixe em diversas componentes espectrais para a aquisição (denominado *Spectral Domain* OCT ou SD-OCT), como utilizando-se uma fonte luminosa com banda espectral estreita, porém com comprimento de onda central variável. Assim, ao invés de utilizar uma grade de difração, as informações de interferência para diversos comprimentos de onda são obtidas através de varredura do comprimento de onda central da fonte e adquiridas por um único detector ao longo do tempo de varredura. Esta abordagem é conhecida como *Swept Source* OCT (SS-OCT).

Como citado, a resolução axial  $\Delta z$  do OCT é dependente a distribuição espectral da fonte utilizada, e pode ser calculada a partir de sua largura a meia altura (*full width half maximum* ou FWHM):

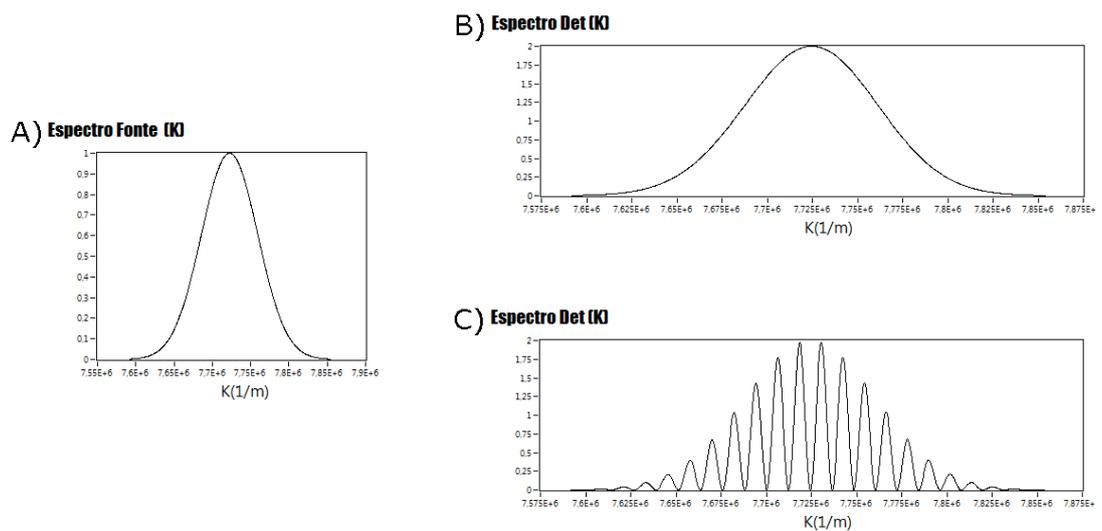
$$\Delta z = \frac{2 \ln 2 \lambda_0^2}{\pi n \Delta \lambda} \quad (3)$$

onde  $n$  é o índice de refração do meio,  $\lambda_0$  é o comprimento de onda central da fonte e  $\Delta \lambda$  é o FWHM.

A resolução lateral  $\Delta x$ , por sua vez, é calculada da mesma maneira que uma microscopia convencional, a partir do limite de difração:

$$\Delta x = 4 \frac{\lambda_0}{\pi} \left( \frac{f}{d} \right) \quad (4)$$

com  $f$  a distância focal da lente e  $d$  o diâmetro do feixe na lente.

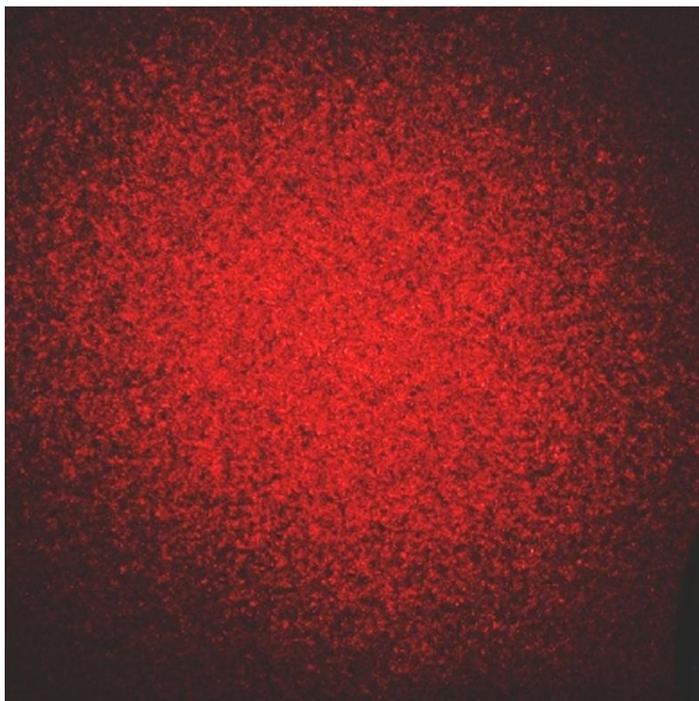


**Figura 4** - Espectros detectados no FD-OCT mostrados como Intensidade (unidade arbitrária) em função do número de onda  $K$  ( $m^{-1}$ ). A) Espectro da fonte luminosa. B) Espectro detectado pelo arranjo quando a diferença de caminho óptico é nula. C) Espectro detectado com uma pequena diferença de caminhos ópticos. Adaptado de Raelé<sup>5</sup>.

### 3.2. Speckle

Speckle é um fenômeno óptico observado em superfícies iluminadas por fontes coerentes. O speckle é visualizado como um padrão granular de alto contraste, em que “grãos” escuros e claros se apresentam distribuídos na região iluminada. Um exemplo do padrão de speckle está na Figura 5.

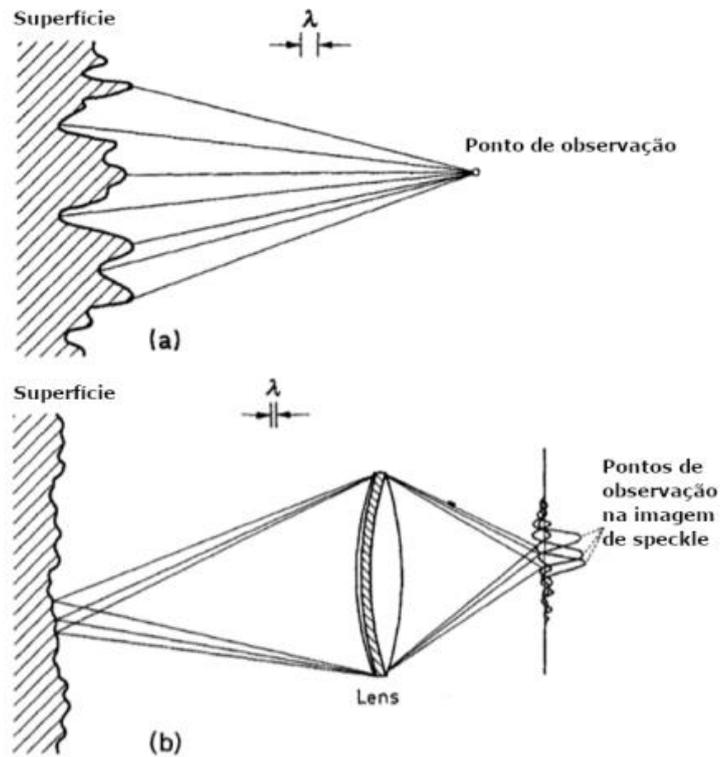
Os primeiros estudos e observações foram feitos pouco após as primeiras aplicações com lasers. Estes estudos permitiram descobrir que o padrão era oriundo da interferência da luz espalhada de diferentes pontos da superfície iluminada, contanto que esta superfície seja rugosa na escala de um comprimento de onda da fonte coerente utilizada, o que é comum para a maioria das amostras.



**Figura 5** - Padrão de speckle típico. Foto por Epzcaw, disponibilizada para reuso através de uma licença CC-BY-SA 3.0.

Consideremos um alvo rugoso iluminado por radiação coerente. O padrão speckle ocorre em todo espaço entre o alvo iluminado e um plano de observação. Assim existem muitas formas diferentes de observar o speckle. Duas são mais comuns. Uma, conhecida como Speckle objetivo ou de campo-distante, consiste em observar a radiação espalhada pelo alvo em uma tela (ou sensor). Outra, conhecida como speckle subjetivo ou speckle de imagem, ocorre quando o alvo iluminado é observado por imagens formadas por lentes<sup>6</sup>. Em ambos os casos o brilho de cada speckle é resultante da interferência da radiação espalhada pelo alvo. Mas a região do alvo que influencia o brilho de cada grão de speckle depende do modo de observação. Estes modos são exemplificados na Figura 6, adaptada de [4]. Observe que, no caso do speckle de campo-distante todos os pontos iluminados contribuem de alguma forma para um determinado “grão” observado. Os espalhamentos destes pontos chegam ao local deste grão”com diferentes fases, dependendo de sua distância até o grão observado e da rugosidade da superfície. A combinação destas fases, ou seja, a interferência destas frentes de onda, é que determinará a intensidade observada para o grão. Fenômeno análogo ocorre para o speckle subjetivo. Entretanto, o conjunto de lentes seleciona uma região limitada que contribuirá para a intensidade do grão, e

essa região é a resolução do sistema amostrando a superfície. Assim, os espalhamentos de diversos pontos dentro da resolução do sistema interferem entre si e suas fases, novamente, dependem da distância até o ponto de observação e da rugosidade da superfície amostrada.



**Figura 6** - Diferentes modos de observação do Speckle. a) Modo de campo-distante em que toda a região iluminada contribui para a intensidade observada. b) Modo subjetivo, em que pontos dentro da resolução do sistema contribuem para a imagem formada.

O speckle é, inerentemente, um fenômeno aleatório, já que cada ponto observado (por meios objetivos ou subjetivos) é o resultado de diversos espalhamentos. Assim, o padrão pode ser descrito apenas estatisticamente – com a probabilidade de um determinado ponto apresentar certa intensidade. A modelagem estatística completa para este tipo de padrão de speckle, também referido como “laser speckle”, foi realizada pelo Prof. Joseph W. Goodman. De especial interesse para este estudo são as estatísticas de primeira ordem, que revelam as probabilidades de intensidades e fases em um padrão de laser speckle.

Contudo, para realizar a modelagem estatística, prof. Goodman faz algumas hipóteses sobre o padrão sendo estudado. Notavelmente:

- A superfície é rugosa.

- Existem múltiplos espalhamentos, tal que o problema passe a ser composto de diversas partes aleatórias individuais. Isso o torna análogo a um problema de passeio aleatório ou *random walk*, constituído por diversos fasores, com a amplitude de um grão de speckle  $A$  em um determinado ponto no espaço  $(x, y, z)$  sendo descrita por:

$$A(x, y, z) = \sum_{k=1}^N \frac{1}{\sqrt{N}} a_k(x, y, z) = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N |a_k| e^{i\phi_k} \quad (5)$$

em que  $a_k$  é a magnitude e  $\phi_k$  é a fase de cada um dos  $N$  fasores.

- Amplitudes e fases dos fasores são estatisticamente independentes entre si e independentes das amplitudes e fases dos demais fasores.
- As fases são uniformemente distribuídas no intervalo  $[-\pi, \pi]$ .

A combinação destes dois últimos itens garantem que as partes real  $A^{(r)}$  e imaginária  $A^{(i)}$  da amplitude  $A$  não são correlacionadas, possuem média zero e variâncias idênticas. Os padrões de speckle que atendem a estas condições são chamados de *fully developed speckle* (speckle completamente desenvolvido).

É possível, então, demonstrar que a probabilidade de uma determinada fase  $\theta$  no padrão de speckle é:

$$P_I(\theta) = \begin{cases} \frac{1}{2\pi}, & -\pi \leq \theta < \pi \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (6)$$

como esperado. Já a probabilidade de uma determinada intensidade  $I$  é dada por:

$$P_I(I) = \begin{cases} \frac{1}{2\sigma^2} \exp\left(-\frac{I}{2\sigma^2}\right), & I \geq 0 \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (7)$$

uma exponencial negativa, o que permite demonstrar que seu enésimo momento  $\langle I^n \rangle$  é descrito por:

$$\langle I^n \rangle = n! (2\sigma^2)^n = n! \langle I \rangle^n \quad (8)$$

em que  $\sigma$  é o desvio padrão da intensidade e, notavelmente:

$$\sigma = \langle I \rangle \quad (9)$$

Dizemos, então, que a razão sinal-ruído do speckle completamente desenvolvido é 1. Adicionalmente, é conveniente, por isso, definir o contraste do speckle como  $\sigma/\langle I \rangle$ .

### 3.2.1. Speckle variante no tempo

Fica evidente, pela forma que o speckle é formado, que o padrão é dependente da superfície que o origina. É plausível supor, portanto, que alterações nesta superfície ocasionem variações nas intensidades observadas. Isto abre a possibilidade de obter informações sobre a superfície, a partir do comportamento do speckle.

Relevante para este cenário é a observação de que para pequenos deslocamentos da amostra o padrão de speckle se move juntamente com ela, ou seja, permanece correlacionado com a superfície. Isto foi explorado em técnicas como *Double Exposure Speckle Photography* (Fotografia de speckle com dupla exposição), para detectar movimentos pontuais em amostras.

Contudo, para grandes deslocamentos, ou deslocamentos de um grande número de espalhadores individuais, a intensidade do padrão de speckle se decorrelaciona da superfície. Para um ponto fixo no plano de observação, sua intensidade irá variar ao longo tempo. Apesar de não mais “acompanhar” a superfície, é ainda justificável presumir que estas variações temporais da intensidade estão relacionadas com o deslocamento, mas especificamente sua velocidade. E, desta maneira, o estudo da frequência destas flutuações pode revelar informações sobre a velocidade do objeto sendo analisado. Esta é a teoria do speckle variante no tempo, que originou diversas técnicas para fluxometria e angiografia em que as variações temporais do padrão de speckle são analisadas.

Uma dessas técnicas é denominada LASCA (*Laser Speckle Contrast Analysis* – Análise de contraste do laser speckle) ou LSCI (*Laser Speckle Contrast Imaging* – Imageamento por contraste de laser speckle), e é comumente

empregada para visualização angiográfica. A idéia desta técnica é obter uma foto, com tempo de exposição conhecido, do padrão de speckle oriundo de uma amostra que contém fluxo ou movimento. A flutuação de intensidade durante o tempo de exposição fará com que as regiões com algum movimento fiquem “borradas” (pela integração destas variações do speckle). Através destas regiões “borradas” é possível, então, mapear locais de fluxo. Indo além, é possível quantificar a perda de contraste do padrão por conta desses “borrões”, já que o contraste de speckle foi definido como  $\sigma/\langle I \rangle$ , e relacionar esta perda de contraste com velocidade de movimento – esta é a grande contribuição da técnica LASCA. Segundo esta metodologia, é possível demonstrar que:

$$\frac{\sigma_s(T)}{\langle I \rangle_s} = \left[ \left( \frac{\tau_c}{2T} \right) \left\{ 1 - e^{-\left( \frac{2T}{\tau_c} \right)} \right\} \right]^{1/2} \quad (10)$$

em que o subscritos “s” em  $\sigma_s$  e  $\langle I \rangle_s$  indicam que estes valores são calculados espacialmente e não temporalmente;  $T$  é o tempo de exposição da câmera e  $\tau_c$  é o parâmetro que se deseja calcular, denominado tempo de correlação, relacionado à velocidade de deslocamento na amostra. O tempo de correlação é um estimador obtido a partir da autocorrelação temporal da intensidade do padrão de speckle, é indicativo da velocidade de deslocamento, pois “quantifica” as flutuações de intensidade, e é a base para diversas outras técnicas de análise de fluxo.

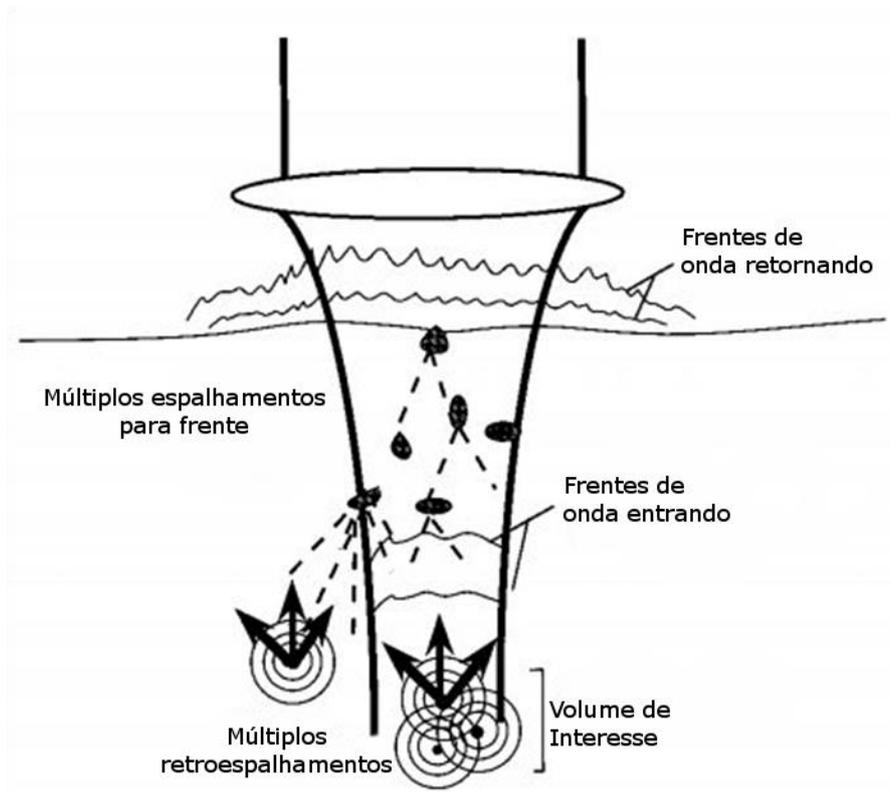
### 3.2.2. Speckle em OCT

A descrição clássica do laser speckle, como exposto aqui, indica sua origem na superfície de uma amostra. Entretanto o speckle não se limita e nem se origina somente da superfície. Para a maioria das amostras, em especial biológicas, parte da luz penetra em seu interior e, como comprovado pelo OCT, uma parcela desta luz que penetra também é retroespalhada. Podemos esperar, portanto, que esta parcela também contribua para o padrão de speckle. De outra maneira, a técnica LASCA não poderia ser utilizada para aplicações angiográficas, já que os fluxos sanguíneos são subjacentes às superfícies amostradas.

Posto isto, podemos considerar a formação de speckle no sinal de OCT. A amostra estudada pode ser considerada como um conjunto de espalhadores individuais. A distribuição destes diversos espalhadores pelo interior da amostra

tem o mesmo efeito de uma superfície rugosa, e fazem com que a luz retroespalhada seja composta por componentes com diferentes fases que interferem entre si antes de chegar ao detector. Além disso, atrasos provocados na frente de onda incidente, durante sua penetração no tecido, também causam distorções de fase e contribuem para a interferência mútua. Apesar de não empregar uma fonte altamente coerente (como no laser speckle), o OCT é sensível à fase e intensidade resultantes desta interferência – o speckle -, visto que é justamente a sensibilidade à fase do termo de correlação cruzada (o cosseno na Equação 2), que permite ao OCT formar imagens tomográficas.

As principais causas de speckle no OCT são estes espalhadores densamente distribuídos (ou espalhadores grandes o suficiente para contribuírem com mais de um retroespalhamento para o sinal de OCT) no volume de interesse amostrado. Espalhamentos no sentido de incidência do feixe (gerando os atrasos mencionados) contribuem em menor escala, enquanto espalhadores fora do volume de interesse (espalhando diretamente o feixe incidente ou espalhando novamente um fóton já espalhado na amostra, conhecido como múltiplo espalhamento) têm sua contribuição limitada pelo efeito de *coherence gating*, a consequência da baixa coerência das fontes de OCT (o envelope da fonte espectral, na Equação 2). A Figura 7 a seguir, adaptada de Schmitt *et al*<sup>7</sup>, ilustra os principais componentes de speckle no OCT.



**Figura 7** - Principais causas de speckle no OCT: espalhadores no volume de interesse, que causam efeitos similares a uma superfície rugosa; espalhamentos para frente, que geram distorções de fase na frente de onda incidente; múltiplos retroespalhamentos e espalhamentos fora do volume de interesse, normalmente filtrados pela baixa coerência temporal. Adaptado de Schmitt *et al*<sup>7</sup>.

De maneira geral, para que ocorra speckle no sinal de OCT somente é necessário que mais de um espalhador contribua para o sinal retroespalhado, e que estas contribuições cheguem ao detector fora de fase.

Finalmente, Schmitt, Xiang e Yung<sup>7</sup> demonstraram que o speckle de OCT é análogo ao speckle completamente desenvolvido, cumprindo as exigências do modelo proposto por Goodman: superfície rugosa (os espalhadores no interior da amostra com diferenças de caminho óptico na ordem de um comprimento de onda); fasores independentes; fases distribuídas uniformemente no intervalo de  $[-\pi, \pi]$ ; e um grande número de espalhamentos, o que normalmente é atendido pela maioria das amostras.

Com isso, os mesmos conceitos de speckle variante no tempo são utilizados para OCT. Diversas técnicas fluxométricas foram propostas e são habitualmente utilizadas em aplicações clínicas, analisando o speckle sob diferentes condições de amostragem, e obtendo tanto mapas angiográficos quanto informações

quantitativas de fluxo e de movimento de amostras. Estudos sobre a autocorrelação do sinal de speckle no OCT também geram interesse recente na literatura, e diversas modelagens são propostas para o sinal de OCT, permitindo extrair velocidade de fluxo e difusão, como no caso do DLS-OCT. Este interesse é justificado, tendo em vista que estes 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, e sem necessidade de modificar o arranjo óptico.

Este projeto dedica-se ao estudo de novas formas de análise desse speckle variante no tempo, bem como busca novas aplicações com impacto clínico para a angiografia a partir do OCT. Estes estudos são descritos a partir de agora.

## 4. OCT PARA MENSURAR GLICEMIA

Conforme descrito anteriormente, o acompanhamento de níveis glicêmicos tem grande importância no tratamento de pacientes com Diabetes Mellitus. Estima-se que mortes em decorrência de DCNT's, como DM e DCVs, podem ser prevenidas em até 80% dos casos<sup>8</sup>, com o tratamento adequado. Além do grande impacto social, o fator econômico também é significativo, com o Brasil, por exemplo, tendo gastos relacionados a DCNT's estimados em mais de US\$21 bi só em 2015<sup>9</sup>.

Como uma avaliação de viabilidade, este projeto propôs o estudo da influência, para o sinal de OCT, de diferentes níveis glicêmicos no sangue<sup>10</sup>. Desta forma, deseja-se estabelecer técnicas que possam ser aplicadas *in vivo* em próximos estudos, para possibilitar o acompanhamento de níveis glicêmicos de maneira não-invasiva.

### 4.1. Materiais e Métodos

#### 4.1.1. 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 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.

---

\* Solução de cloridrato de cetamina/xilazina: 80 mg/10 mg por quilograma de massa corporal, diluída em

Uma segunda rodada de experimentos foi realizada para simular os efeitos de um forte componente de múltiplos espalhamentos na atenuação do sinal de OCT, replicando o que ocorre durante investigações realizadas através de tecidos biológicos, tais como a pele<sup>11; 12</sup>. 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.*<sup>13</sup>. As soluções de glicose foram preparadas em SSI, e, por simples diluição, várias concentrações de glicose foram obtidas. Essas diversas soluções de glicose 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 °C) 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<sup>14</sup>.

#### **4.1.2. 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.

#### **4.1.3. Aquisição de dados**

Dois sistemas de OCT foram utilizados, sendo eles: OCT(I), comercial, OCP930SR (Thorlabs Inc.), com comprimento de onda central de 930 nm, e resolução espacial de 6 µm (lateral e axial) no ar – este sistema está disponível no laboratório multiusuário do Centro de Lasers e Aplicações do Ipen; para medidas que necessitaram de alta taxa de aquisição, foi necessário desenvolver no laboratório do CLA um sistema OCT (II) específico com alta taxa de aquisição não alcançada pelo equipamento comercial. A fonte de luz utilizada foi um laser

*swept source*<sup>†</sup> 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.

#### **4.1.4. Análise de dados**

Reporta-se, aqui os valores de glicemia como médias aritméticas e seus respectivos desvio padrão. O coeficiente médio de atenuação óptica é obtido a partir de 100 medições para cada amostra e apresentado em função da concentração de glicose.

Os dados dos coeficientes de atenuação foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, que atestaram pertencerem a uma população normalmente distribuída, assim, comparações múltiplas de médias foram realizada usando o teste de Kruskal-Wallis com Dunn como pós-teste.

O sangue diluído foi posteriormente submetido ao agrupamento K-means para identificar grupos de dados semelhantes.

Dados de decorrelação de Speckle são retirados de uma distribuição normal, de acordo com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Portanto, uma análise de variância unidirecional (ANOVA) foi realizada, seguido por Bonferroni para um teste de comparação múltipla.

Todas as análises de dados foram realizadas com o GraphPad Prism 5 e OriginPro 9.1, e assumimos estatisticamente significante valores para  $p < 0,05$ .

#### **4.1.5. 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<sup>15</sup>, como segue:

$$I(z) = I_0 \cdot e^{-2\alpha z} + C \quad (11)$$

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  $\alpha$  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  $\alpha$  é recuperado através de ajuste exponencial do sinal adquirido pelo OCT. Dois

---

<sup>†</sup> Técnica de varredura por diferentes comprimentos de onda.

*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*<sup>‡</sup> adjacentes para o OCT(I), ou consecutivos (no tempo) para o OCT(II). 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  $\alpha$  calculados é utilizada como coeficiente de atenuação para a amostra.

No presente estudo foram realizados testes *ex vivo* para investigar as propriedades ópticas das amostras, calibração do sistema e viabilidade da técnica.

#### 4.1.6. 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(II).

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

$$Autocorr_{p,\tau} = \frac{\sum_{t=0}^{N-1} I_{p,t} I_{p,t+\tau}}{\sum_{t=0}^{N-1} I_p^2} \quad (12)$$

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

---

<sup>‡</sup> A-Scan é o termo utilizado para se referir a um interferograma processado, ou seja, uma coluna de imagem típica de OCT. Em contrapartida, denomina-se a imagem, como um todo, de B-Scan.

$$Autocorr_{p,\tau} = \frac{\sum_{t=0}^{N-1} (I_{p,t} - \langle I_p \rangle)(I_{p,t+\tau} - \langle I_p \rangle)}{\sum_{t=0}^{N-1} (I_{p,t} - \langle I_p \rangle)^2} \quad (13)$$

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

$$W = [g(p, 0), g(p, 1), \dots, g(p, N - 1)] \quad (14)$$

onde  $W$  é o vetor de autocorrelação de atrasos crescentes. Este é o resultado calculado pelo algoritmo utilizado. Espera-se que para um  $\tau=0$  (sem atraso) exista 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 com o tempo de trânsito dos espalhadores através do volume de interesse na amostra, portanto, estas flutuações têm relação com a velocidade destes espalhadores, como comentado na seção 3.2.1. Uma vez que as flutuações influenciam o comportamento da autocorrelação, uma análise de  $W$  revela informações quantitativas sobre o fluxo, através do estabelecimento de parâmetros de observação, como o tempo de decorrelação, definido em nossos estudos anteriores<sup>16</sup> 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<sup>17</sup>. 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.

## 4.2. Resultados e Discussão

### 4.2.1. Análise de coeficiente de atenuação

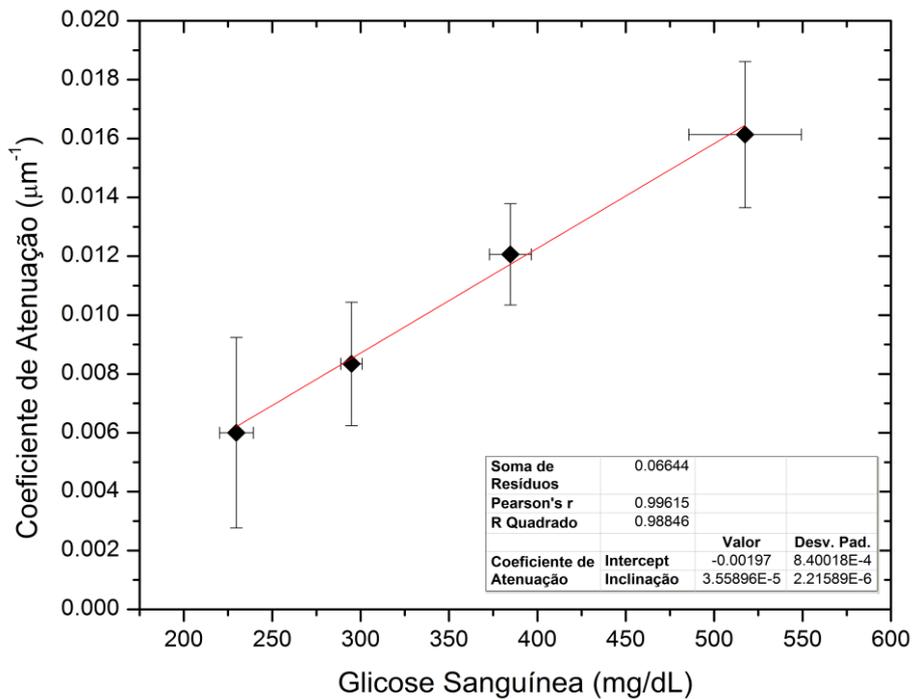
Seguindo a metodologia descrita, os diferentes grupos sem SSI foram analisados com o glucosímetro OneTouch Ultra para obter os valores de referência de concentração de glicose. Os valores são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Concentrações de glicose dos diferentes grupos analisados (sangue não diluído).

<b>Grupos</b>	<b>Glicose Média (mg/dL)</b>	<b>Desvio Padrão (mg/dL)</b>
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  $\mu$ L), 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 8.



**Figura 8** - 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.*<sup>18</sup> demonstrou, na região do infravermelho, que o choque osmótico oriundo da condição hiperglicêmica causa uma deformação das hemácias, alterando suas propriedades de espalhamento<sup>19</sup>. 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<sup>20</sup>.

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 (Kruskall-Wallis, seguido de Dunn's como pós teste). Como os espaçamentos (em níveis de glicose) entre nossos grupos varia, não é possível definir uma resolução de diferenciação para a abordagem, mas diferenças de pelo menos 65 mg/dL (entre grupos 1 e 2) foram detectadas.

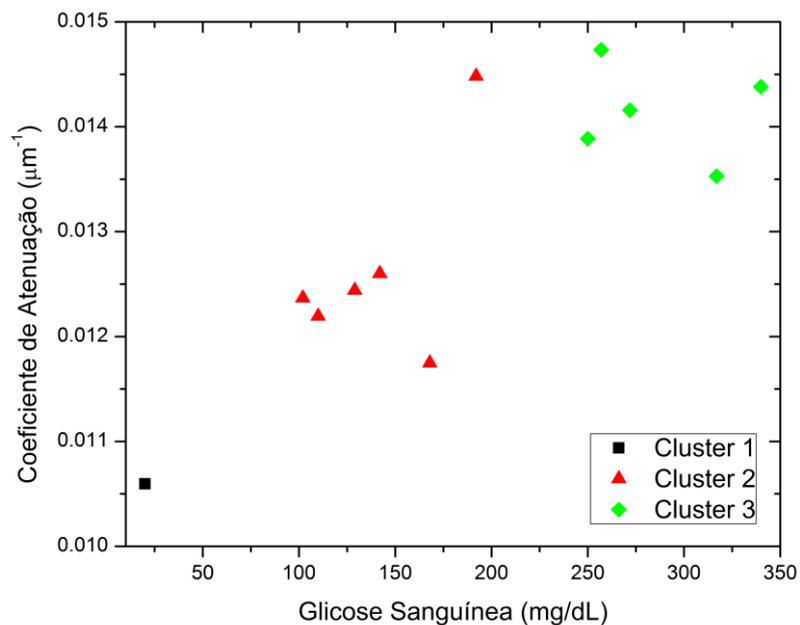
O segundo experimento foi realizado com o sangue diluído em SSI simulando o comportamento esperado em aplicações *in vivo*, com isso níveis de glicose mais baixos foram alcançados. A diluição em SSI em até 40% aumenta

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, afetando a resolução da técnica. Para confirmar esta hipótese K-Means *clustering* foi realizado para determinar a diferença mínima nos níveis de glicose que a técnica consiga diferenciar. Três grupos foram encontrados nos dados testados, como demonstrado na Figura 9.

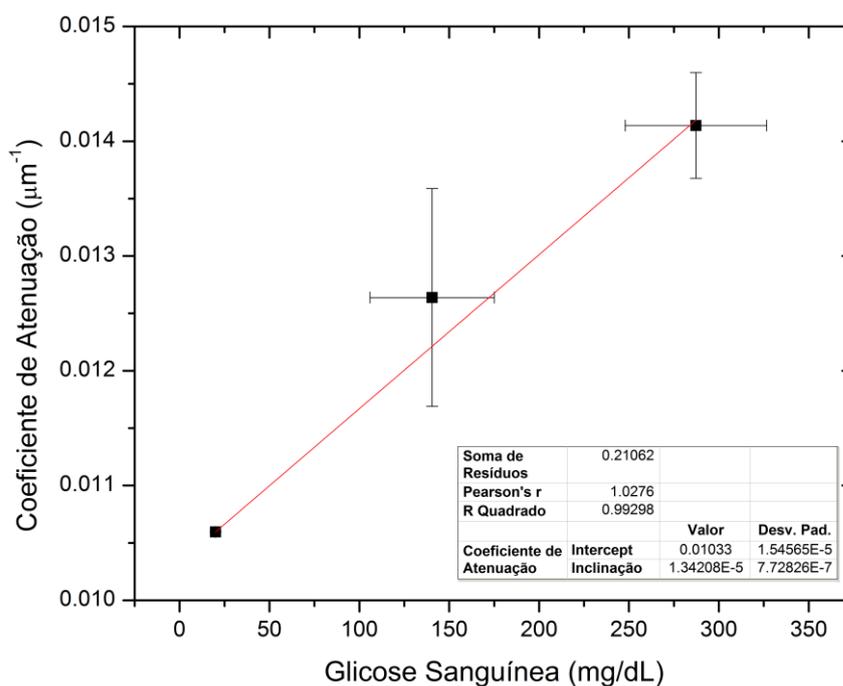
A média das distâncias entre os centros dos grupos identificados pelo K-Means é de, aproximadamente, 133 mg/dL, que pode ser interpretado como uma estimativa da resolução da técnica para o cenário proposto - comparando com o experimento sem diluição em SSI, a resolução caiu pela metade. Os centros dos *clusters* foram plotados em um gráfico como novos pontos, apresentados na Figura 9, e os respectivos valores são descritos na Tabela 2. Uma vez mais é possível observar a tendência linear de crescimento entre concentração de glicose e o coeficiente de atenuação, com um ajuste linear (linha vermelha na Figura 10) obtendo um R quadrado de mais de 0,99. Os *clusters* foram submetidos à análise estatística, reportando diferenças entre todos, com  $p < 0,05$ .

**Tabela 2** - Novos grupos oriundos da nossa análise por K-Means realizada para as amostras de sangue diluído (n=12).

<b>Grupos</b>	<b>Glicose Média (mg/dL)</b>	<b>Desvio Padrão (mg/dL)</b>
Cluster 1	20	0
Cluster 2	140	34
Cluster 3	287	34



**Figura 9** - 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 10** - 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 (Kruskal-Wallis com Dunn's como pós-teste). A linha vermelha indica a melhor correlação linear obtida, com um R quadrado de 0,99, indicando que nossos resultados podem ser representados por um modelo linear. SE, erro padrão.

### 4.2.2. Análise de speckle

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

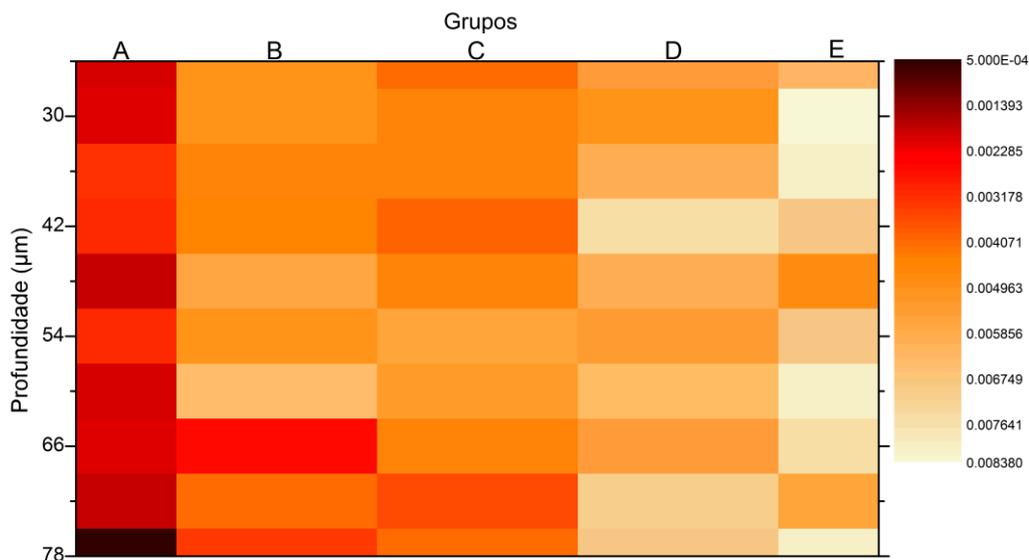
As concentrações testadas para este experimento são listadas na Tabela 3, e são todas alíquotas oriundas da mesma amostra sanguínea. Como o glucosímetro portátil utilizado não permite obtenção de concentrações abaixo de 20 mg/dL, não foi possível ter uma medição completa do grupo A, que não recebeu adição de glicose. Como anteriormente, as amostras de sangue foram diluídas em SSI, para acrescentar uma forte componente de múltiplos espalhamentos.

Análises foram realizadas 18  $\mu\text{m}$  abaixo do primeiro pico do sinal (superfície da amostra), e consistem de 10 pontos, ou 60  $\mu\text{m}$  de profundidade. Houve flutuações intra-amostras, em profundidade, que podem ter relação com o rápido decaimento do sinal. Não obstante isto, há uma nítida tendência de aumento do tempo de decorrelação com o nível glicêmico, como pode ser observado no gráfico em cores falsas na Figura 11 (cores mais escuras indicam tempos menores). Apesar das colunas (diferentes grupos) apresentarem variações ao longo da profundidade, elas ainda se concentram em torno de diferentes tons, e seguem o comportamento esperado.

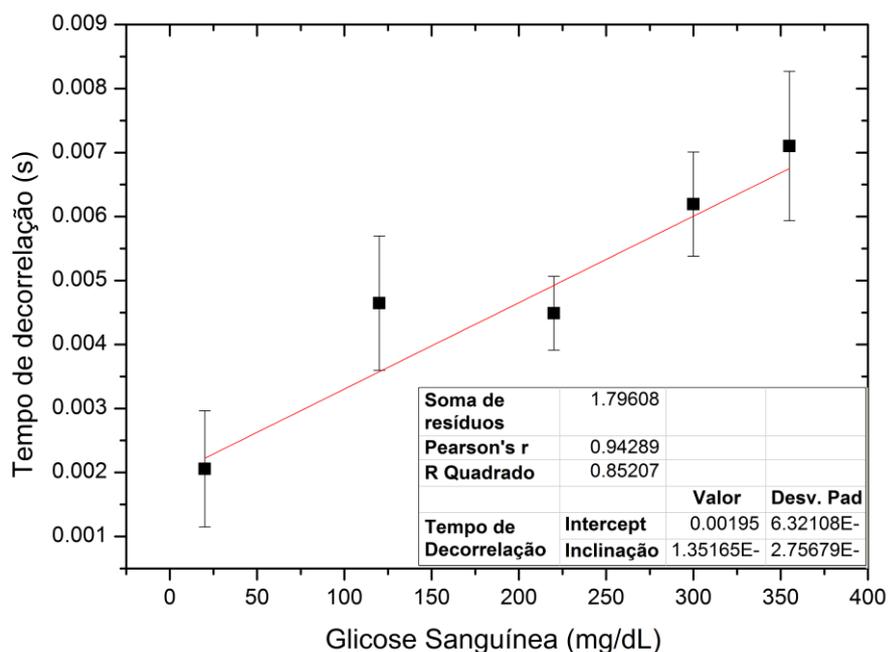
**Tabela 3** - Concentrações médias de glicose plasmática para cada grupo (n=15)

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 12.



**Figura 11** - 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 12** - 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. No entanto, o ponto correspondente à concentração de 120 mg/dL merece atenção. Uma possibilidade é de que o grupo

de 120 mg/dL necessite que mais amostras sejam coletadas para que a média seja representativa do comportamento geral.

Nossos testes demonstraram que a glicose aumenta a viscosidade do sangue, e isto é detectável com o OCT na faixa de interesse clínico. Associado com outros estudos da literatura<sup>21</sup>, este é um indicador positivo para o uso de OCT como ferramenta de diagnóstico não-invasivo. Estudos *in vivo* ainda são necessários para consolidar a técnica, mas a capacidade do OCT de detectar speckle variante no tempo a partir do sangue de amostras *in vivo* já foi demonstrada<sup>22</sup> sem correlacionar com a glicemia. Este fato, aliado ao estudo *ex vivo* aqui apresentado, suporta a viabilidade da técnica.

## 5. NOVA TÉCNICA PARA QUANTIFICAR FLUXO COM SPECKLE EM OCT

Muitas das técnicas de autocorrelação propostas na literatura modelam o comportamento do Speckle variante no tempo no sinal de OCT com base na técnica de Dynamic Light Scattering (DLS)<sup>23; 24; 25; 26</sup>, possibilitando obter o tempo de decorrelação de maneira a determinar a velocidade de fluxo. Modelos robustos, como o proposto pelo grupo de David Boas<sup>23</sup> ou por Popov *et al*<sup>27</sup> para movimento Browniano de espalhadores, apresentam bons resultados, com capacidade de discernir diferentes componentes de velocidade. Entretanto, estes métodos são computacionalmente caros e de processamento demorado, inviabilizando seu uso para aplicações diagnósticas, onde, normalmente, um resultado rápido é desejado. A abordagem previamente desenvolvida pelo presente autor<sup>16</sup>, e descrita anteriormente neste documento, evita estes obstáculos, usando uma abordagem híbrida entre uma análise simples da curva de autocorrelação, como proposto por Wang e Wang<sup>28</sup>, mas com um estimador<sup>§</sup> associado ao modelo DLS, visando obter resultados proporcionais à velocidade de fluxo de maneira robusta e rápida. Contudo, esta técnica exige amostragem de séries temporais longas, em que se supõe estacionaridade de fluxo. Essa suposição, no entanto, limita aplicação da técnica a fluxos com dinâmicas de variação lentas – o que não é ideal para cenários biológicos. Assim, a presente tese investiga diferentes estimadores de fluxo para séries temporais curtas, quando suposição de estacionaridade é menos restritiva. Adicionalmente, apesar deste estimador poder ser computado rapidamente, o cálculo do vetor inteiro de autocorrelação (necessário para o estimador) ainda é lento. Portanto, para flexibilizar as aplicações de quantificação de fluxo, é necessário um estimador de cálculo rápido e que se comporte bem em amostragens rápidas.

Um estimador amplamente empregado em ultrassonografia e radar Doppler é conhecido como *Kasai estimator* (ou *pulse-pair estimator*)<sup>29</sup>. Baseado na autocorrelação temporal dos sinais Doppler em quadratura, este algoritmo é capaz de estimar os dois primeiros momentos da densidade espectral de potência (*Power Spectral Density*, PSD), a saber: sua média e variância. Para as

---

<sup>§</sup> Estimador é um valor calculado, proporcional à uma grandeza que se deseja mensurar.

aplicações em imagens de ultrassom, contexto da publicação original, a frequência média é o valor de interesse para medidas de velocidade de fluxo. Entretanto, este estimador depende explicitamente da fase do sinal, o que exige aquisição em quadratura – nem sempre disponível nos sistemas OCT. Contudo, a estimativa da variância depende somente da função de autocorrelação. Assumindo o modelo de autocorrelação para um sinal complexo de OCT proposto por Weiss *et al.* <sup>26</sup>, usado como base para a proposta anteriormente descrita, a contribuição de um fluxo transversal ao feixe para o sinal é dada por uma Gaussiana. Pode ser demonstrado, por fim, que a velocidade é proporcional à sua largura efetiva. Considerando as propriedades de transformada de Fourier (FT) para distribuições Gaussianas, espera-se que a largura da Densidade Espectral de Potência (*Power Spectral Density*, PSD) do sinal de OCT esteja correlacionada com a largura da autocorrelação<sup>\*\*</sup>. Neste contexto, estimar a variância da PSD forneceria um indicador da largura média da função de autocorrelação e, portanto, da velocidade transversal dos espalhadores. De acordo com o algoritmo de Kasai, a variância da PSD é proporcional à razão entre autocorrelação em um atraso T, em que T é o menor intervalo entre amostras (primeiro atraso, T = 1), e a autocorrelação no atraso 0, como segue:

$$var(PSD) = \frac{2}{N} \left( 1 - \frac{|Autocorr(1)|}{Autocorr(0)} \right) \quad (15)$$

onde N é o número de amostras colhidas. Contudo, para aquisições realizadas em alta taxa de amostragem, o intervalo entre amostras pode ser curto o suficiente de tal maneira que os espalhadores no fluxo não percorram distâncias significativas, conseqüentemente não ocasionando decorrelação suficiente do sinal, em uma situação semelhante ao que ocorre em algoritmos como o OCT *Variable Interscan Time Analysis* – VISTA (Análise de tempo entre aquisições variável)<sup>30</sup>.

Com uma alta taxa de amostragem, o intervalo entre aquisições (*inter-scan time*) curto e, conseqüentemente, pouca dinâmica ocorre na amostra neste período – i.e., se existem espalhadores em movimento, estes possuem uma velocidade finita, e seu deslocamento entre aquisições (que ocasiona a decorrelação temporal de Speckle) será diretamente proporcional ao *inter-scan*

---

<sup>\*\*</sup> Relembrando que a PSD é obtida a partir da transformada de Fourier da autocorrelação do sinal.

*time*. Contudo, se a velocidade de deslocamento dos espalhadores for baixa quando comparada à taxa de aquisição, o movimento dos espalhadores neste *inter-scan time* não produz decorrelação apreciável no sinal, e não é detectado. Por outro lado, se o deslocamento for muito veloz para uma taxa de aquisição baixa, o sinal é imediatamente decorrelacionado, e a detecção é saturada.

Para ilustrar este cenário, considere um sistema de OCT fictício com taxa de aquisição de 100 kHz e um voxel<sup>††</sup> isométrico de 10 μm x 10 μm x 10 μm. Considere, agora, um espalhador em velocidade constante (transversal ao feixe OCT) de 2 mm/s, entrando no volume de interesse deste voxel. O *inter-scan time* (para repetição de A-Scans) deste sistema é de 0,01 ms. Portanto, no intervalo de tempo entre uma amostra e outra, o espalhador se move apenas 0,02 μm, muito abaixo da resolução do sistema, e não causa decorrelação no sinal. Em contrapartida, considere agora que o sistema adquire a uma taxa de 1 kHz. O *inter-scan time* agora é de 1 ms, e o espalhador se desloca 2 μm, percorrendo uma fração significativa do volume de interesse, e alterando a intensidade do sinal – induzindo decorrelação. Finalmente, considere um sistema de apenas 100 Hz de aquisição, com *inter-scan time* de 10 ms. O espalhador se desloca 20 μm entre as aquisições, sai do volume de interesse, e não mais contribui para o sinal. As amostras, portanto, se tornam completamente decorrelacionadas. Fenômeno similar ocorre ao variar a velocidade do espalhador ao invés da taxa de aquisição do sistema – é justamente isto que observamos com o estimador proposto.

É recomendada, assim, cautela na tomada de decisão do atraso da autocorrelação a ser utilizado para o estimador. Para as taxas de amostragem utilizadas neste estudo, o primeiro atraso forneceu sensibilidade suficiente.

## **5.1. Materiais e Métodos**

### **5.1.1. Simulador microfluídico**

Para estudar o algoritmo e sua resposta a diferentes velocidades de fluxo, testes *in vitro* foram realizados. Para isso, foram usados simuladores, ou *phantoms*, de fluxo juntamente a uma bomba microfluídica de seringa, para controlar o fluxo. A bomba de seringa utilizada foi a 11Elite (Harvard Apparatus,

---

<sup>††</sup> Menor unidade discreta de um conjunto de dados tridimensional. Equivalente 3D do pixel de uma imagem.

Holliston, MA), que pode produzir vazões de 1,26 pl/min até 88,4 ml/min com precisão de 0,5%.

Um *phantom* microfluídico foi fabricado usando um tubo de poliestireno (diâmetro interno: 250  $\mu\text{m}$ ) preenchido com 0,5% de intralipídio. O *phantom* foi embutido em gel de agarose (concentração de 2,5%) para imitar um vaso sanguíneo na retina, conforme descrito no trabalho de Siyu Chen *et al*<sup>β1</sup>. A escolha de intralipídio é justificada por suas propriedades de espalhamento serem semelhantes às do sangue. Entretanto, sua absorção óptica é diferente, e *phantoms* com fluxo de sangue heparinizado podem ser necessários após a validação da técnica, para simulações mais realistas. O presente estudo, entretanto, não abrange esta etapa.

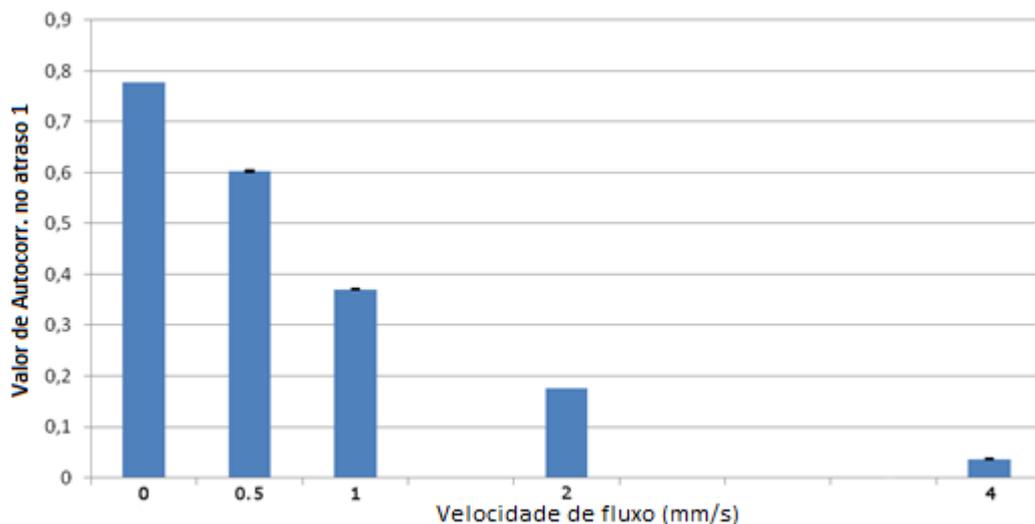
### **5.1.2. Aquisição de dados**

O sistema OCT empregado para amostragem é um *Swept-Source*, que emprega um VCSEL (Laser de Emissão de Superfície de Cavidade Vertical) como fonte laser. O sistema opera em comprimento de onda central de 1310 nm com alcance de varredura superior a 100 nm, resolução axial de 14,5  $\mu\text{m}$  (no ar; 10,36  $\mu\text{m}$  em tecido com índice de refração de 1,4), resolução lateral de 14,6  $\mu\text{m}$  (também no ar) e taxa de aquisição de até 400 kHz para o A-Scans. Este sistema estava disponível no laboratório do Massachusetts Institute of Technology (MIT) durante a colaboração lá desenvolvida.

Solução intralipídica foi bombeada a diferentes velocidades, variando de 0,16 mm/s até 4 mm/s. Protocolos de amostragem diferentes também foram testados. O primeiro protocolo é próximo àquele empregado aplicações clínicas reais, mas com um campo de visão (FOV – Field of View) pouco menor, de 2mm x 2mm (300 B-Scans com 300 A-Scans cada), adquirindo volumes 3D a 1,33 kHz com 1000 repetições. Um segundo protocolo, experimental, foi estabelecido para adquirir um FOV não-padrão de 1 mm x 0,2 mm (5 B-Scans com 100 A-Scans cada), a 2 kHz e 1000 repetições. O protocolo de padrão clínico (oftalmológico) utilizado no sistema OCT do MIT, adquirindo volumes 3D em 660 Hz com 20 repetições por volume, cobrindo uma área de 3 mm x 3 mm da amostra (500 B-Scans com 500 A-Scans cada) foi utilizado posteriormente, para diferentes testes da técnica.

## 5.2. Resultados e Discussão

Seguindo o raciocínio para o estimador Kasai, a autocorrelação temporal foi calculada para os dados coletados. A autocorrelação no primeiro atraso (referido como "lag 1") é calculada e usada como um *proxy*<sup>‡‡</sup> para a velocidade de fluxo subjacente. O objetivo destes testes é elucidar a viabilidade da abordagem e o efeito dos diferentes protocolos de amostragem nos resultados finais. O protocolo mais apropriado para um cálculo de autocorrelação é aquele com a maior taxa de aquisição (2 kHz). O tempo entre varreduras (*inter-scan time*) é de 0,5 ms. Cinco diferentes velocidades de fluxo foram testadas: sem fluxo (0 mm/s, com apenas movimento browniano), 0,5 mm/s, 1 mm/s, 2 mm/s e 4 mm/s. A autocorrelação foi computada em uma janela de 1000 repetições. Os resultados são calculados sobre 5 experimentos que ocorreram em dias diferentes. Os valores de autocorrelação foram integrados em um círculo com raio de 5 pixels no centro do perfil transversal do microcanal, para evitar influências da variação de fluxo dentro do microcanal devido ao arraste nas paredes (levando a um perfil de fluxo parabólico). Os resultados são plotados na Figura 13.



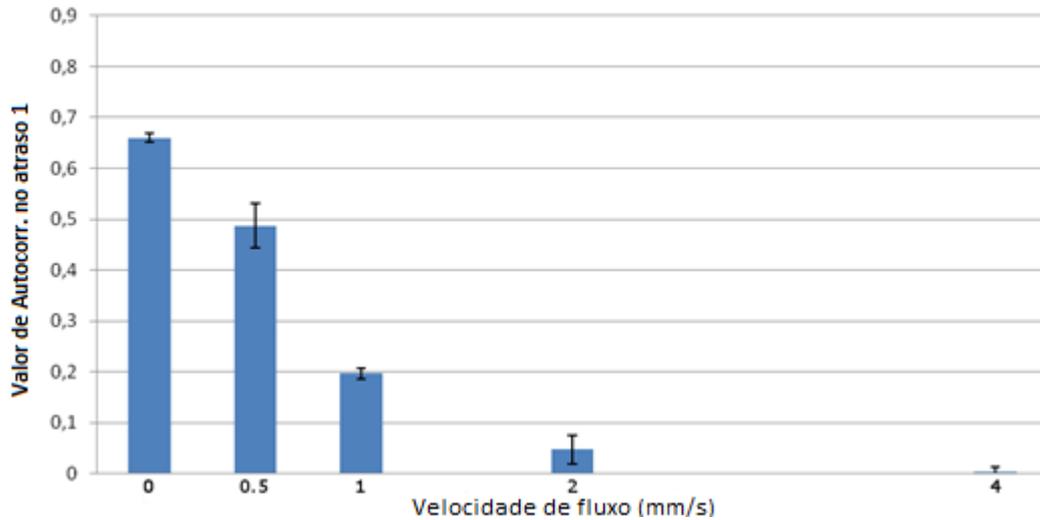
**Figura 13** - Valores de autocorrelação no primeiro atraso em função da velocidade de fluxo subjacente para aquisições a 2kHz. É possível notar o decaimento conforme as velocidades aumentam.

Os resultados são os esperados, com os valores de autocorrelação diminuindo para maiores velocidades de fluxo - os espalhadores se movimentam mais entre aquisições com velocidades mais altas, o que causa maior

<sup>‡‡</sup> Um valor correspondente.

decorrelação no sinal de OCT. A abordagem tem melhor resolução (mínima variação de velocidade que pode ser discriminada) do que a técnica desenvolvida anteriormente, mesmo com taxas de repetição mais baixas - o que se deve ao fato de este protocolo estar adquirindo um volume 3D a 2 kHz, enquanto o sistema empregado no laboratório do Centro de Laser de Aplicações adquire 8 kHz para um **único A-Scan**. O novo estimador apresenta diferença estatística ( $p < 0,001$ , usando One-Way ANOVA) mesmo para um intervalo de fluxo de apenas 0,5 mm/s, enquanto a resolução para o método anterior foi inferior a 1 mm/s. No entanto, a influência da taxa de aquisição (veja o comentário no início desta seção) é facilmente observada na rápida saturação da técnica. A velocidade de fluxo de 4 mm/s apresenta um valor de correlação de 0,5 ms - o tempo entre as varreduras, indicando que o sinal já está decorrelacionado. Ao usar o estimador anterior, com 8 kHz, essa saturação ocorreu apenas a 6 mm/s. No entanto, esta é uma limitação do protocolo de aquisição, não da técnica - um sistema mais rápido poderia melhorar a gama de velocidades discrimináveis.

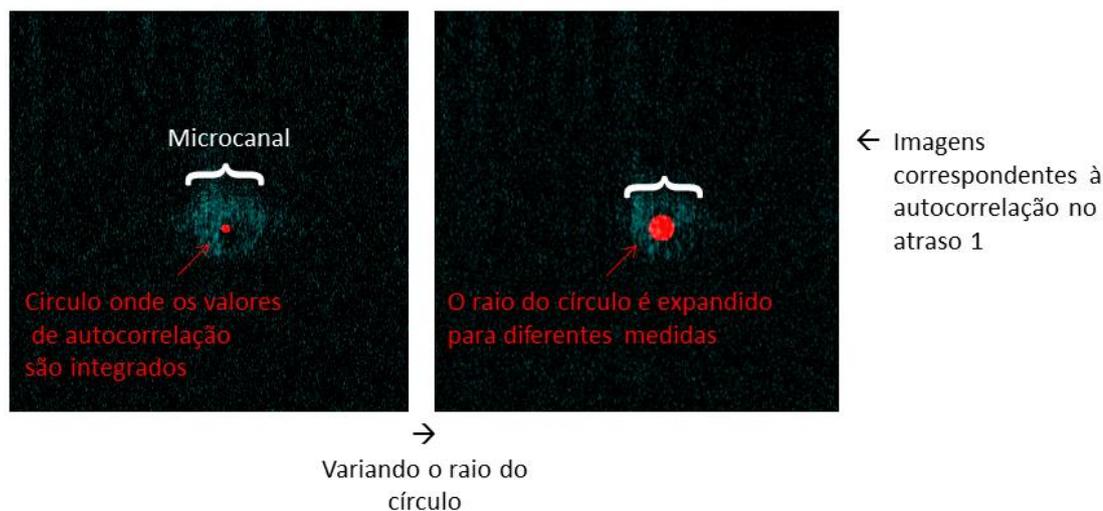
A seguir a mesma análise é realizada, mas usando o protocolo com taxa de aquisição de 1,33 kHz. Os resultados são plotados na Figura 14. Mais uma vez a abordagem tem bom desempenho em resposta à velocidade, servindo como um boa inferência para a velocidade de fluxo subjacente. Embora o desvio padrão tenha sido superior àquele obtido com 2 kHz, o sistema ainda se comporta bem em um protocolo de imagem próximo ao utilizado na prática clínica e apresenta diferença estatisticamente significativa entre todas as velocidades de fluxo testadas, excetuando 4 mm/s. Essa alta velocidade, que já estava fora da aplicabilidade para o protocolo de 2 kHz, tem decorrelação total neste cenário, com valor médio zero, como esperado. No entanto, as medições de 2 mm/s também não são confiáveis, já que o valor médio de autocorrelação é de, aproximadamente, 0,8 ms - muito próximo ao tempo entre amostragens, de 0,75 ms. Assim, quanto menor a velocidade de aquisição, mais rapidamente a técnica fica saturada.



**Figura 14** - Valores de autocorrelação no primeiro atraso em função da velocidade de fluxo subjacente par aquisições a 1,33kHz. A tendência de decaimento continua visível, porém a técnica é saturada em velocidades inferiores àquelas reportadas com aquisições de 2 kHz.

Para o protocolo de aquisição de 660 Hz, de uso clínico, as análises anteriores foram repetidas e, como esperado pela baixa taxa de aquisição, a decorrelação acontece já para a velocidade de 1 mm/s – ou seja, a velocidade máxima detectável é comprometida. Estes resultados são omitidos aqui para brevidade da discussão. Entretanto, o teste de maior interesse neste protocolo não é sobre uma larga gama de velocidades, uma vez que velocidades abaixo de 2 mm/s são observadas nos capilares da retina (foco de experimentos desta tese de doutorado). Com as imagens de corte transversal geradas por este protocolo, é possível analisar a sensibilidade à variação de fluxo dentro de um capilar.

Utilizando, agora, velocidades mais baixas para o fluxo, variando de 0,16 mm/s a 1,00 mm/s, os valores de autocorrelação foram, novamente, integrados sobre um círculo de raio 5 pixels no centro do microcanal. Mas, para este experimento, diferentes tamanhos de raio de círculo (concêntricos) foram usados, a fim de capturar a influência do fluxo parabólico no interior do tubo do *phantom*. Isso é ilustrado pela Figura 15. O raio interno total do tubo resulta próximo a 20 pixels. Os resultados para diferentes raios utilizados neste teste estão resumidos na Tabela 4, e representam a média de 5 experimentos para cada velocidade.



**Figura 15** - Ilustração demonstrando a área de integração dos valores de autocorrelação para os testes com 660 Hz.

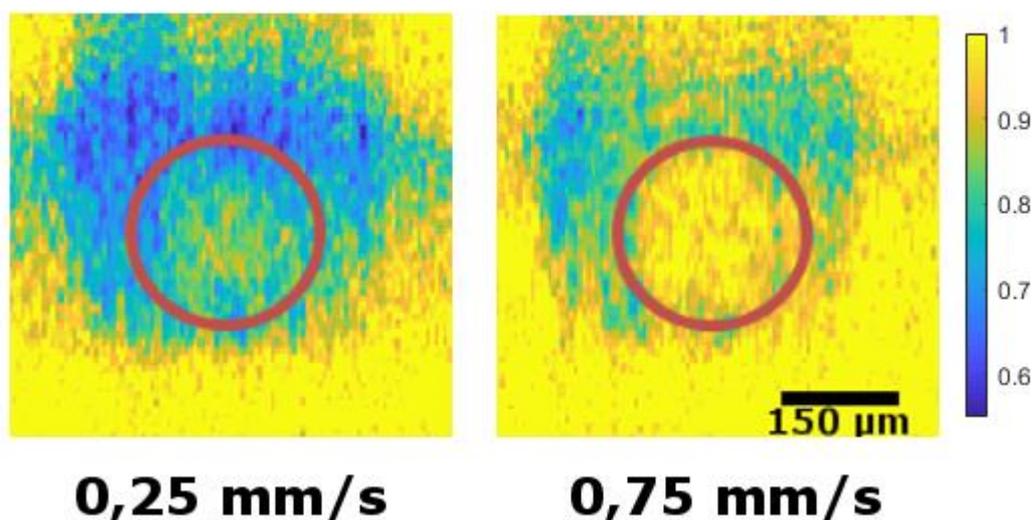
**Tabela 4** - Valores de autocorrelação integrados ao longo de diferentes raios, através de diferentes velocidades. V = velocidade do fluxo (mm/s); Atraso 1 = valor de autocorrelação no atraso 1 (em ms); Desv. Padrão = Desvio Padrão. É possível ver a tendência de aumento do valor com o aumento do raio.

Raio	V = 0,16 mm/s		V = 0,25 mm/s		V = 0,5 mm/s		V = 0,75 mm/s		V = 1,0 mm/s	
	Atraso 1	Desv. Padrão	Atraso 1	Desv. Padrão	Atraso 1	Desv. Padrão	Atraso 1	Desv. Padrão	Atraso 1	Desv. Padrão
5 px	0,243	0,047	0,202	0,029	0,083	0,055	0,025	0,054	-0,022	0,054
10 px	0,257	0,034	0,199	0,024	0,101	0,043	0,035	0,054	-0,006	0,033
15 px	0,274	0,028	0,226	0,019	0,126	0,032	0,054	0,040	0,012	0,028
20 px	0,281	0,023	0,244	0,014	0,151	0,023	0,075	0,029	0,033	0,021

Os resultados mostram que, para todas as velocidades, com o aumento do raio os valores de autocorrelação aumentam. Isso corresponde a um fluxo mais lento, que é o resultado desejado. O aumento do raio faz com que pixels mais próximos das paredes internas do microcanal sejam integrados, locais estes em que o fluxo sofre arraste e, assim, tem velocidade menor. Esses valores diminuem a velocidade média de fluxo amostrado e, portanto, esperam-se maiores valores de decorrelação, conforme demonstrado pela nossa abordagem. O novo estimador, portanto, é sensível até mesmo à variação de fluxo dentro do microcanal. A consequência de uma baixa taxa de repetição é, novamente, a velocidade máxima aplicável, que é inferior a 1 mm/s neste cenário (porém, mesmo para a amostra de 1 mm/s, é possível observar o efeito de fluxo parabólico).

A Figura 16 demonstra a sensibilidade à dispersão de velocidades dentro do microcanal. As imagens presentes são projeções (médias) de uma seção transversal de 20-Bscans do microcanal, codificada em cores falsas. As cores dos pixels correspondem a  $1 - |Autocorr(1)|$ , ou seja, são proporcionais à velocidade. Como demonstrado na barra de escala, cores mais próximas ao amarelo correspondem a 1 (ou seja, decorrelação total, velocidades altas), enquanto cores mais azuladas correspondem a valores cada vez mais baixos (maior correlação, menor velocidade). A região interna do microcanal é marcada com um círculo vermelho. A zona de alta correlação (azulada) em torno do círculo corresponde às paredes do tubo utilizado no *phantom* – e, como esperado para uma superfície estática, têm decorrelação lenta. Supõe-se que região em torno das paredes, de valores de correlação mais baixos, se deve a *bulk motion* – movimentos axiais induzidos pela passagem do fluxo. Note que o fundo inteiro das imagens é amarelo, já que o ruído de fundo é totalmente decorrelacionado.

Finalmente, observa-se a região interna (dentro do círculo). Para a velocidade de 0,25 mm/s, fica evidente a concentração de fluxos mais altos no centro do microcanal, e é possível visualizar a dispersão de velocidades: um B-Scan quantitativo para fluxo. Perceba a diferença para a velocidade de 0,75 mm/s – não apenas as velocidades são mais altas (mais amareladas), mas parecem com o fundo, indicando que estão próximas de decorrelação total, como sugerido pela Tabela 4. Além disso, a dispersão de fluxo é mais sutil, já que a técnica, com esta taxa de aquisição, está sendo saturada.



**Figura 16** - B-Scans de fluxo quantitativos. As imagens são projeções (médias) de seções transversais do microcanal, codificadas em cores falsas a partir de valores correspondentes a (1 – Autocorrelação no atraso 1). Note a diferença de cores para as velocidades de fluxo aplicada e, adicionalmente, a dispersão de velocidades dentro do microcanal.

Destaca-se, por fim, o fato de que esses resultados são obtidos com um protocolo que é utilizado clinicamente. Portanto, é possível - para velocidades de vazão limitadas - aplicar essa técnica diretamente a dados de pacientes com FOV de 3 mm x 3 mm, criando dados volumétricos com informação de velocidade em uma reconstrução tridimensional. Assim, com limitada gama de velocidades de fluxo (porém ainda dentro das velocidades encontradas na microvascularização), apresenta-se, aqui, um estimador rápido e flexível. Rápido devido ao fato de que **não necessita do cálculo do vetor inteiro de autocorrelação**, apenas um único atraso é suficiente, reduzindo drasticamente a quantidade de cálculos necessária e, conseqüentemente, o tempo de processamento. E flexível pois **permanece apresentando o comportamento esperado para diversas taxas de aquisição** e tempos de amostragem, o que facilita sua adoção clínica.

A etapa de aplicação clínica deve ser desenvolvida em estudos futuros, e outras análises relevantes para a adaptação do método ao protocolo clínico também podem ser estudadas, entre elas: o diferente número de amostras temporais, pois a amostragem clínica, por questão de tempo de exposição e fixação do paciente, possui apenas 20 pontos temporais para cálculo da autocorrelação, enquanto os protocolos experimentais possuem 1000, o que pode influenciar na variância da média do valor calculado; o período de amostragem,

pois o ciclo de trabalho (ou *duty cycle*) dos protocolos experimentais difere do protocolo clínico, o que acarreta em um período total de amostragem diferente, e sabemos que este período é importante, pois influencia a distância percorrida pelos espalhadores dentro do volume amostrado. Entretanto, os resultados aqui obtidos demonstram a aplicabilidade da técnica (limitada pelo sistema de aquisição) em fornecer informações quantitativas proporcionais à velocidade de fluxo mesmo em amostras adquiridas sob as limitações impostas ao uso clínico, e em um simulador de fluxo embebido em um meio espalhador. Desta maneira, espera-se que os resultados obtidos possam ser replicados *in vivo*, dentro das normas de exposição dos pacientes a feixes lasers de baixa intensidade (como foi demonstrado ser possível), para disponibilizar resultados angiográficos mais precisos e quantitativos.

## 6. ANÁLISE DE PROGRESSÃO DE RETINOPATIA DIABÉTICA

A retinopatia diabética, uma das principais causas de cegueira em todo o mundo<sup>32</sup>, é caracterizada por isquemia decorrente de alterações estruturais e funcionais da microcirculação presente na retina que ocorrem precocemente no processo da doença<sup>33</sup>. Portanto, a quantificação da isquemia tem o potencial de servir como um biomarcador para a progressão da doença.

Anteriormente, os estudos de Angiografia OCT (OCTA) mostraram associações entre a não-perfusão capilar e a gravidade da RD<sup>34; 35; 36</sup>. Devido a limitações técnicas nas taxas de aquisição de A-scan, esses estudos se concentraram nos campos de visão de 3 mm x 3 mm ou 6 mm x 6 mm centrados na mácula. No entanto, a literatura de Angiografia por Fluorescência de Campo Largo (o método primário para avaliar a não perfusão capilar; em inglês *widefield FA*) sugere que a maioria da não-perfusão capilar no início da RD ocorre fora da região macular<sup>37; 38; 39</sup>. Entretanto, este método é invasivo e, por isso, sua indicação se limita a pacientes em estágios avançados de RD. O desenvolvimento recente de sistemas OCTA de alta taxa de varredura comercialmente disponíveis possibilitou a visualização da vasculatura da retina em campos de visão de 12mm x 12mm e 15mm x 9mm - normalmente denominado *widefield OCT*<sup>40</sup>. Portanto, uma necessidade clínica de um sistema para identificar regiões isquêmicas em *widefield OCT* foi identificado. Esta parte do estudo se dedica a atender a referida demanda. Este projeto foi desenvolvido em colaboração com o MIT e com o New England Eye Center (NEEC), parte do Tufts Medical Center<sup>41</sup>.

### 6.1. Materiais e Métodos

#### 6.1.1. Software desenvolvido

Um software personalizado, semi-automático, escrito em Matlab (MathWorks, Natick, MA), foi desenvolvido para segmentar áreas de não-perfusão capilar em imagens de OCTA. As imagens de entrada são, portanto, já processadas para a decorrelação speckle.

O *pipeline*<sup>§§</sup> de segmentação prossegue em três etapas (Figura 17). Primeiro, o usuário analisa, com o auxílio do software, as imagens OCT e OCTA concomitantemente, com um cursor compartilhado em ambas as imagens, e manualmente identifica regiões “corrompidas” - como regiões de baixo sinal e/ou áreas com erros de processamento - que devem ser excluídas da análise. Em seguida, o algoritmo segmenta automaticamente áreas de não-perfusão (NPA) na imagem de OCTA usando um algoritmo de identificação baseado em textura, descrito nos parágrafos a seguir. Por fim, o usuário revisa e corrige manualmente a segmentação automática, se necessário, excluindo, adicionando e/ou corrigindo as regiões automaticamente selecionadas de isquemia capilar, auxiliado pela interface do software que conta com análise de componentes conectados (para facilitar a inclusão / exclusão de áreas). A porcentagem da área de não-perfusão é definida como segue:

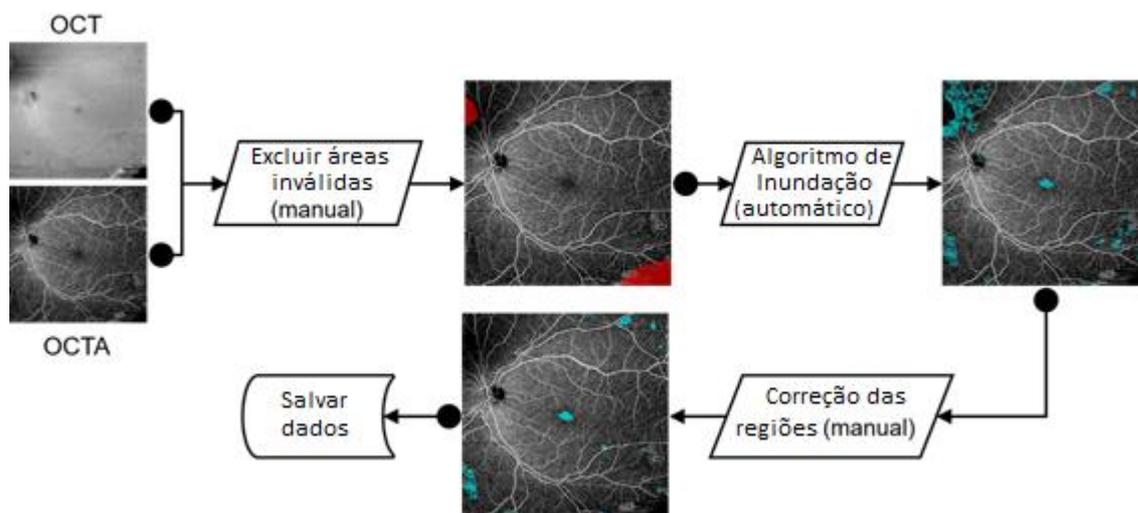
$$\text{Porcentagem de não - perfusão} = \frac{\text{Área de não perfusão}}{(\text{Área total} - \text{Área inválida})} \times 100\% \quad (16)$$

A segunda etapa do pipeline de segmentação - segmentação automática de áreas isquêmicas - merece descrição mais detalhada. O algoritmo base foi desenvolvido usando linguagem de programação Java e emprega reconhecimento de padrões com análise baseada em textura. Nesta análise, a variância espacial da imagem de OCTA é calculada usando janelas (ou *kernels*) deslizantes de tamanhos 3 x 3, 5 x 5 e 7 x 7 pixels; três imagens de variância são, assim, geradas. As diferentes dimensões de janela (determinadas empiricamente a partir do tamanho das áreas de interesse nas imagens) são utilizadas para compensar sensibilidade e especificidade. Uma imagem de variância final é calculada a partir da média destas três primárias. O cálculo da variância espacial é ilustrado na Figura 18. O uso de variância espacial - que mede a variação nos valores de pixels dentro do *kernel* deslizante - foi motivado pela observação de que a variância espacial em regiões de não-perfusão é baixa (já que os valores dos pixels referentes a regiões sem fluxo oscilam ao redor de um valor de *background*, tipicamente próximo a 0 nas imagens processadas), enquanto a variância espacial na fronteira entre um vaso e uma área de não-perfusão é relativamente alta (porque esta região contém tanto pixels mais

---

<sup>§§</sup> Sequência ordenada de ações.

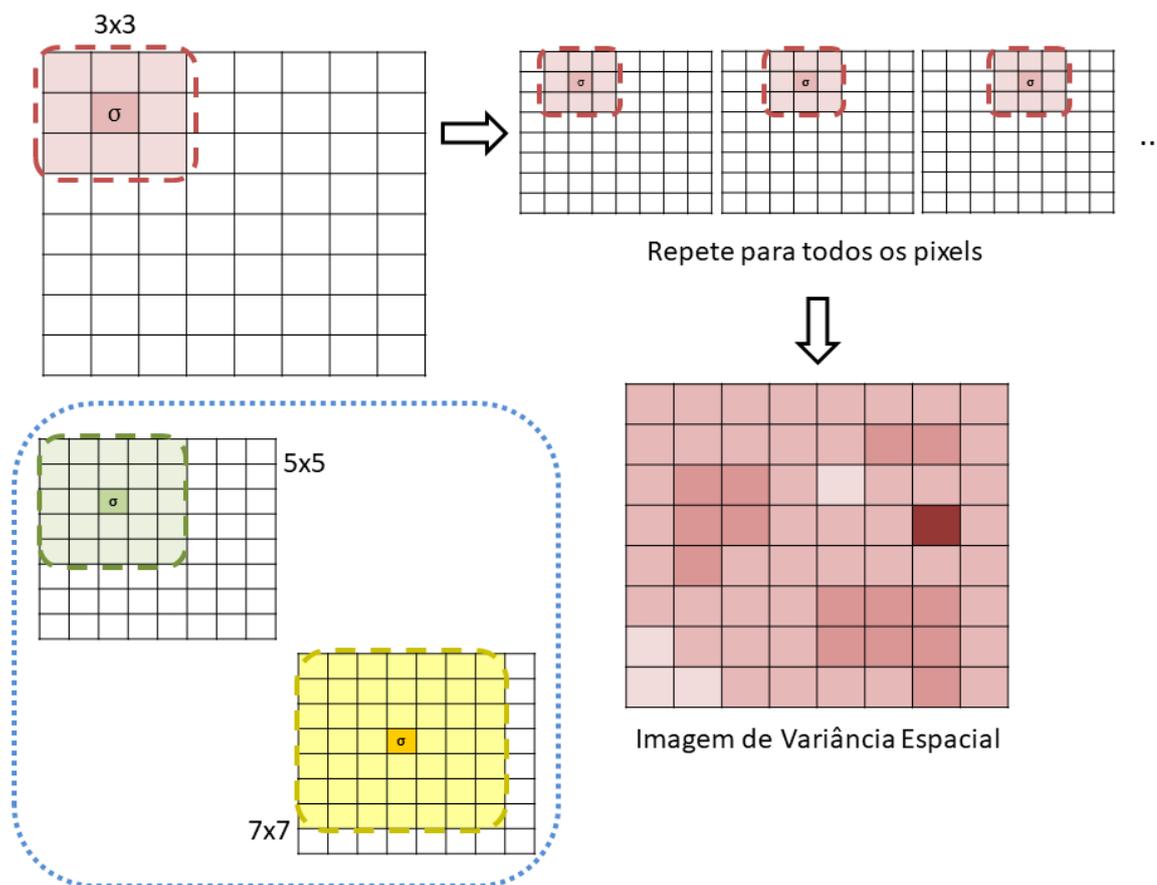
escuros, pertencentes à área de não-perfusão, quanto pixels mais claros, pertencentes aos vasos sanguíneos<sup>\*\*\*</sup>).



**Figura 17** - Fluxograma demonstrando o funcionamento do software, com as diferentes etapas, para geração dos resultados.

Com a imagem de variância espacial (SVI) computada, as áreas de baixa variância espacial foram segmentadas usando uma variação do algoritmo de “inundação”, em que pixels específicos, denominados “fontes de água”, começam a espalhar sua influência a vizinhos (inundar), até que encontre a zona de influência de outra fonte de água. Contudo, em vez de se espalhar até alcançar outra região inundada, o algoritmo proposto permite que a inundação continue até alcançar uma “barreira”, um valor limite na imagem SVI, que corresponde à detecção de um vaso sanguíneo. A inundação é realizada com vizinhança de 4 pixels.

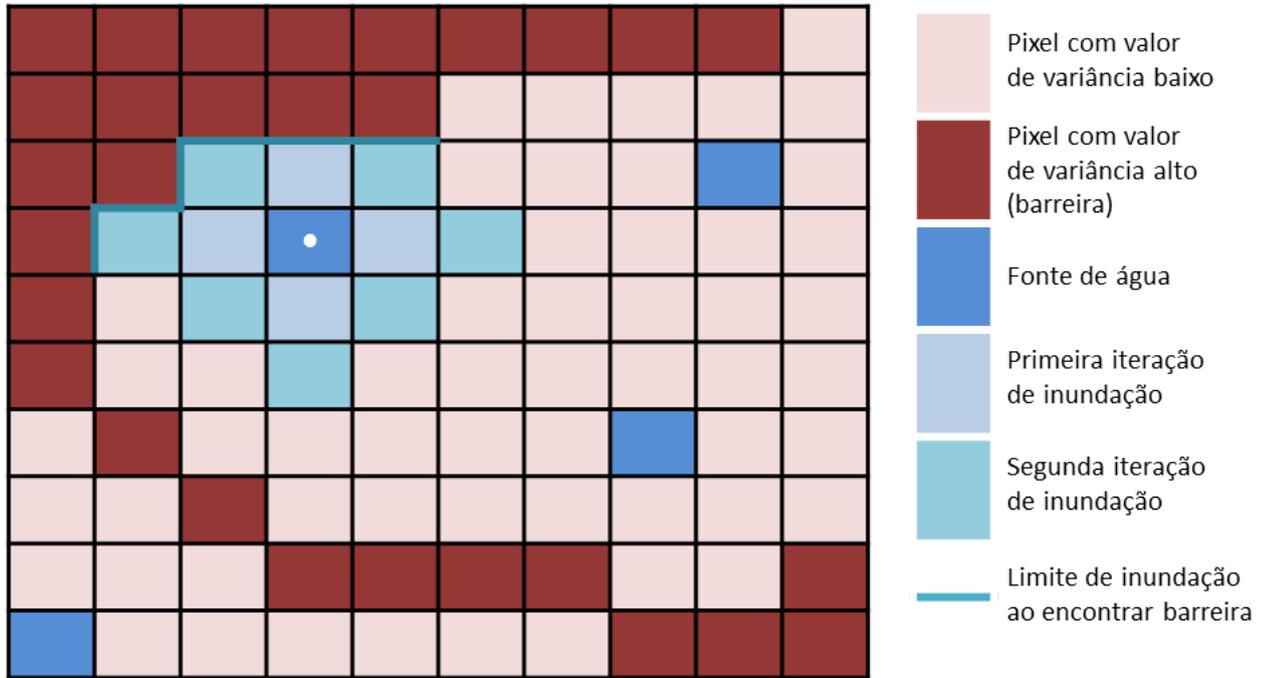
<sup>\*\*\*</sup> Valores baixos são convertidos em pixels escuros e valores altos em pixels claros



**Figura 18** – Ilustração do processo de janela deslizante para processamento de imagens. Apenas os valores dentro da janela selecionada, como a janela de 3x3 pixels no topo à esquerda, são considerados. Para o algoritmo desenvolvido, o cálculo realizado é a variância de intensidade dos pixels da janela. O valor final ( $\sigma$ ) é aplicado ao pixel central, e a janela se desloca, de tal maneira que um novo pixel ocupe a posição central, e o processo é realizado novamente (como no topo à direita). Após o processo ser repetido para todos os pixels da imagem, uma nova imagem é gerada, com base nos valores  $\sigma$  atribuídos, denominada “Imagem de Variância Espacial” ou SVI. Este procedimento pode ser realizado com diversos tamanhos  $N \times N$  de janela ( $N$  normalmente ímpar). Para o algoritmo, os tamanhos de 5x5 e 7x7 foram também utilizados (região azul na figura).

Fontes de água aleatórias são selecionadas. Elas se espalham até que sejam cercadas por barreiras. O processo de inundação é ilustrado na Figura 19. Em seguida, uma nova iteração começa, onde cada fonte de água gera um "filho", 10 pixels para cima (se não estiver fora dos limites) de sua localização original e inunda. Repete este procedimento para “filhos” 10 pixels para a esquerda, para a direita e para baixo. Outra rodada de fontes de água começa, mas agora os “filhos” são gerados a 20 pixels da localização original, e assim por diante, por 4 iterações. Para melhorar o desempenho, o algoritmo memoriza os pixels que já

foram visitados por uma fonte de água e impede que esse pixel seja considerado para inundação novamente.



**Figura 19** – Ilustração do processo de inundação. Pixels aleatórios são selecionados como fontes de água. Cada um destes pixels (marcados de acordo com a legenda de cores), começa a inundar a área à sua volta, a partir de uma vizinhança de 4 pontos (pixels diretamente acima, abaixo, e aos lados, sem diagonais). Isto é exemplificado para a fonte de água marcada com \*. Os pixels da sua vizinhança de 4 pontos são analisados. Se possuem valores baixos, são inundados. Caso contrário, são uma barreira, e delimitam a inundação (a fonte de água não mais se expande naquela direção). Após todos os pixels na vizinhança serem analisados, a primeira iteração termina e a segunda se inicia. Todos os pixels inundados na iteração anterior terão sua vizinhança de 4 pontos analisada, e inundada caso não seja uma barreira, como demonstrado pelos pixels de primeira e segunda iteração na figura. O processo se repete até que uma iteração se inicie sem que pixels tenham sido inundados na iteração anterior. Novas fontes de água são, então selecionadas e o processo se repete por um número de vezes pré-determinado.

Finalmente, todas as regiões segmentadas compostas por menos de 250 pixels são eliminadas. Para os propósitos deste estudo, uma área de não-perfusão é definida como qualquer região sem fluxo, contígua, composta por mais de 250 pixels ( $\sim 0,15 \text{ mm}^2$ ). A lógica para tal limiar é a limitada densidade de amostras A-scan do dos dados *widefield*, que faz com áreas menores de intercapilaridade sejam mal resolvidas (por pouca amostragem) e induz erros de segmentação do algoritmo. Especificamente,  $0,15 \text{ mm}^2$  representa uma estimativa

da menor área de não-perfusão circular que pode ser confiavelmente detectado com a resolução do sistema OCT empregado.

### **6.1.2. Recrutamento de pacientes**

Este estudo foi aprovado pelos conselhos de revisão institucional do MIT e do Tufts Medical Center. A pesquisa aderiu à Declaração de Helsinque e à Lei estadunidense de Portabilidade e Responsabilidade de Seguros de Saúde.

Pacientes com diabetes foram recrutados prospectivamente da clínica de retina no New England Eye Center, Boston, entre janeiro e julho de 2017. Cada indivíduo recebeu um exame de fundo de olho com dilatação, fotografia colorida de fundo de olho, imagem de OCT estrutural e, se indicado clinicamente, FA. Os pacientes foram classificados usando o protocolo de classificação padrão do ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study) como: Diabetes Mellitus sem RD (DM sem RD), RD não-proliferativa leve, moderada ou grave (RD-NP) ou RD proliferativa (RD-P) <sup>42</sup>. Um total de 73 olhos de 64 pacientes foram analisados. Dos 73 olhos, 28 olhos não tinham evidência clínica de retinopatia, 9 olhos foram classificados como tendo RD-NP leve, 10 olhos como RD-NP moderada, 5 olhos como RD-NP grave e 21 olhos como RD-P.

### **6.1.3. Análise de dados**

Para comparar a área percentual de não-perfusão em olhos com DM sem RD, com RD-NP e com RD-P, foram empregadas duas abordagens estatísticas diferentes. Primeiro, arredondando a área percentual de não-perfusão para o ponto percentual mais próximo, foi empregado um modelo linear generalizado para analisar os percentuais usando a regressão de Poisson. Em segundo lugar, realizamos três testes de soma de *ranks* de Wilcoxon que incorporaram efeitos de agrupamento. Utilizamos o mesmo procedimento de análise para comparar a área percentual de não-perfusão em olhos com DM com olhos sem DM.

A análise ROC (Receiver Operating Characteristic) foi usada para discriminar entre olhos com DM sem RD e olhos com RD (de qualquer severidade). A análise ROC também foi usada para discriminar entre olhos com DM sem RD e olhos com RD-NP.

#### 6.1.4. Aquisição de dados

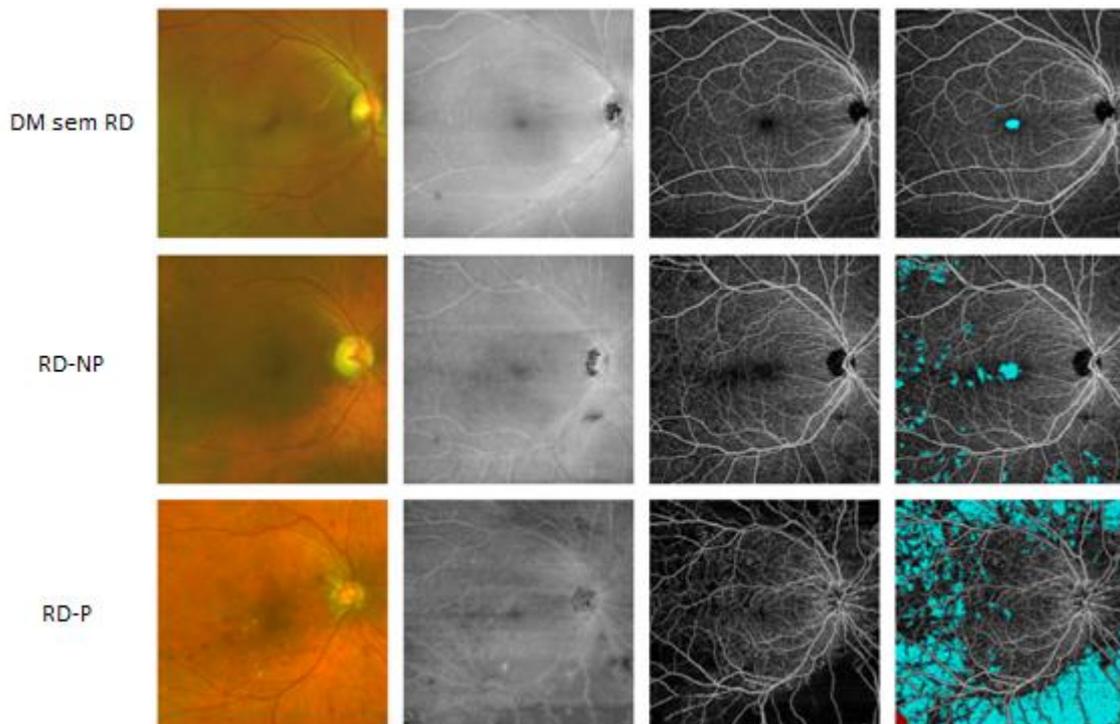
Todos os indivíduos tiveram dados OCTA coletados usando um sistema OCT *Swept Source* de 100 kHz (PLEX Elite 9000, Carl Zeiss Meditec Inc., Dublin, CA, EUA) com comprimento de onda central de 1050 nm  $\pm$ 50nm, resolução axial de 6,3  $\mu$ m e uma resolução lateral de 20  $\mu$ m. Volumes cobrindo uma área de 12 mm x 12 mm centrada na fóvea foram adquiridos. Dois B-Scans consecutivos foram adquiridos em cada localização, para cálculo de decorrelação temporal. Cada volume consiste de 500 B-Scans, com 500 A-Scans por B-scan. Um algoritmo proprietário da Carl Zeiss Meditec., baseado em *Optical Microangiography* (OMAG) e disponibilizado de forma embarcado no sistema PLEX Elite 9000, foi usado para gerar imagens OCTA. As imagens geradas são de mapas vasculares, similares àquelas geradas pelo algoritmo de decorrelação descrito na Equação 16. Um segundo algoritmo embarcado é utilizado para geração das projeções *en face*.

## 6.2. Resultados e Discussão

A área percentual de não-perfusão para os diferentes níveis de gravidade da retinopatia diabética, calculada pelo software anteriormente descrito, é exemplificada na Figura 20. Nos casos de DM sem RD, a área percentual média de não-perfusão foi de 0,1% (margem de erro: 0,0-0,4%); no grupo RD-NP (leve, moderado e grave), a área percentual média foi de 2,1% (1,2-3,7%); no grupo RD-P, a área percentual média foi de 8,5% (5,0-14,3%). Estes resultados são demonstrados na Figura 21. A porcentagem de área de isquemia aumentou de maneira estatisticamente significativa de diabéticos sem retinopatia, para olhos com RD-NP, e para olhos com RD-P.

A análise ROC para discriminação entre olhos com DM sem DR e olhos com DR (de qualquer severidade) produziu uma área sob a curva (AUC) média de 0,93 (margem de erro: 0,918-0,939). Para a discriminação entre olhos com DM sem DR e olhos com RD-NP, a AUC média foi de 0,875 (0,854-0,89).

Os resultados mostram que há um aumento estatisticamente significativo na área percentual de não perfusão, à medida que a gravidade da RD aumenta; este resultado está de acordo com a literatura como discutido abaixo.

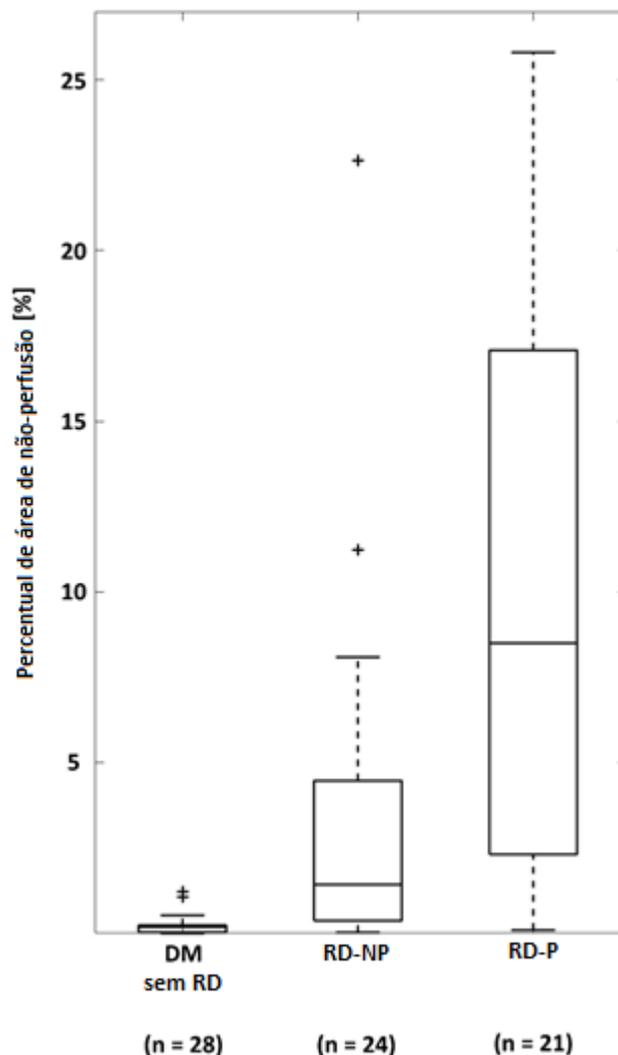


**Figura 20** - Demonstração dos resultados obtidos para diferentes progressões da RD. Da esquerda para a direita: Foto de fundo de olho; Imagem de OCT estrutural; imagem de OCTA; Resultado do Software. Na coluna de resultados: azul = áreas selecionadas como de não-perfusão; em vermelho: áreas manualmente excluídas da análise. É nítida a tendência de aumento de zonas isquêmicas para níveis mais severos de RD.

Em um estudo OCTA usando imagens de 3 mm x 3 mm e 6 mm x 6 mm centradas na fóvea, Salz et al. <sup>34</sup> realizaram a segmentação manual das áreas intercapilares<sup>†††</sup> e mostraram que a área intercapilar total aumentou de pacientes normais para pacientes com DM sem RD, para pacientes com RD-NP, para pacientes com RD-P; outro estudo com OCTA, por Hwang et al. <sup>35</sup>, calculou automaticamente as áreas isquêmicas em exames centrados fóvea de 6mm x 6mm e descobriu que a área de não-perfusão era estatisticamente maior em pacientes com RD do que nos controles; e em outro estudo Schottenhamml et al. <sup>36</sup> mediram as 20 maiores áreas intercapilares em imagens de 3 mm x 3 mm usando um algoritmo automático e encontraram uma tendência consistente de aumento de tamanho com o aumento da gravidade da RD. Vários outros estudos de OCTA utilizam métricas de vasos que medem quantidades relacionadas indiretamente a área de não-perfusão, como densidade de vasos, e encontraram

<sup>†††</sup> Áreas sem perfusão entre os vasos capilares

menor perfusão com o aumento da gravidade da RD<sup>43; 44; 45</sup>. Embora todos esses estudos estejam de acordo com os resultados aqui relatados, é importante notar que esses estudos prévios foram realizados usando FOV's de 3 mm x 3 mm e 6 mm x 6 mm e, conseqüentemente, informações capturadas sobre áreas relativamente pequenas de não-perfusão. Em contraste, dada a densidade de amostragem do campo de visão de 12 mm x 12 mm usada aqui, esta análise captura áreas maiores de não perfusão, que tendem a estar além da central de 6 mm x 6 mm.

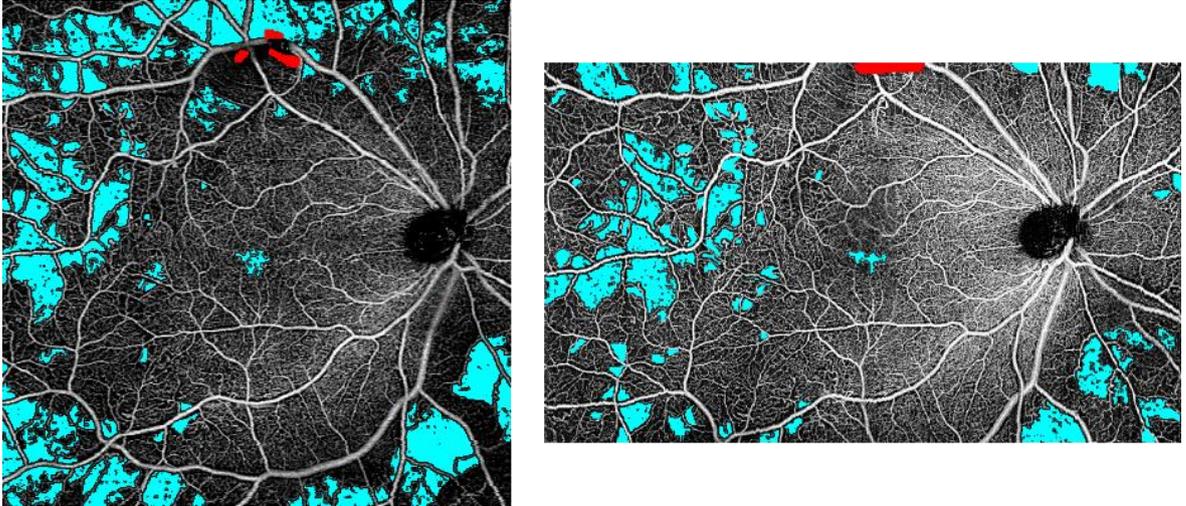


**Figura 21** - Boxplot demonstrando percentual de não-perfusão capilar medido. Para todas as parcelas, as bordas inferior e superior da caixa representam os percentis 25 e 75, respectivamente, enquanto a linha do meio representa a mediana. As barras de erro (tracejadas) estendem-se aos valores mais baixo e mais alto, excluindo *outliers*, que estão marcados com sinais de mais. Os *outliers* foram considerados como sendo os pontos de dados 1,5 intervalos interquartílicos acima do 75º quartil, ou 1,5 intervalos interquartílicos abaixo do 25º quartil.

Vários estudos de *widefield* FA mostraram que a maioria da não-perfusão no início da RD está localizada fora da mácula e progride posteriormente à medida que a gravidade da doença aumenta<sup>37; 38; 39</sup>. No mais recente desses estudos, Silva *et al.*<sup>39</sup> relatam que em pacientes diabéticos sem RD, a não-perfusão estava localizada predominantemente na periferia distante (>15 mm da fóvea) e que com aumento da severidade de RD as regiões periférica (10-15mm da fóvea) e posterior (<10mm da fóvea) tornaram-se mais significativas na área isquêmica total. Esse estudo sugere que campos de visão ainda mais amplos podem ser desejáveis para detecção e monitoramento precoce de doenças, como os 12mm x 12mm usados no presente projeto. Esses resultados, juntamente com os obtidos por este estudo, indicam que o *widefield* OCTA pode ser uma ferramenta valiosa para o monitoramento de RD.

A precisão do diagnóstico do software na classificação de olhos com RD (qualquer gravidade) versus olhos diabéticos sem retinopatia foi alta, com uma AUC de 0,93. Isto está de acordo com a AUC de 1,0 relatada por Hwang *et al.*,<sup>35</sup> para a capacidade do seu algoritmo em classificar RD versus controles, utilizando a área total de não-perfusão de OCTA de 6 mm x 6 mm.

Assim, mais estudos OCTA são necessários para entender melhor a distribuição da não-perfusão em função da distância da fóvea. Infelizmente, nas velocidades de aquisição dos atuais sistemas de OCT disponíveis comercialmente, a geração de imagens OCTA de alta densidade e de campo ultra-amplo é proibitivamente lenta, embora outras abordagens, como a *montagem* de imagens, seja plausível. No entanto, se FOV's mais amplos se tornem disponíveis, as técnicas de análise deste estudo permanecerão aplicáveis. Para exemplificar este fato, imagens de um mesmo olho de paciente diabético foram adquiridas em dois campos de visão diferentes, em 12 mm x 12 mm (como nas anteriores) e em 15 mm x 9 mm (recentemente proposto pela Carl Zeiss Meditec), e processadas para angiografia por OCT. O algoritmo identificou as áreas de não-perfusão apropriadas e compatíveis entre os dois campos de visão, como demonstrado na Figura 22.



**Figura 22** - Exemplo da performance do algoritmo em detectar não-perfusão capilar em diferentes campos de visão amostrados (nenhuma correção manual foi feita às áreas automaticamente identificadas). Áreas isquêmicas são marcadas em azul, enquanto exclusões pré-processamento são marcadas em vermelho. Esquerda: imagem de 12 mm x 12 mm de um olho com retinopatia diabética proliferativa. Direita: mesmo olho amostrado em uma área de 15 mm x 9 mm.

## 7. ESTUDO DA DISPERSÃO DAS ÁREAS DE NÃO-PERFUSÃO NAS REGIÕES ARTERIAL E VENOSA

Como citado anteriormente, a isquemia retinal é um dos processos subjacentes relacionados com a progressão da RD e é causado em parte pela não-perfusão capilar retinal, devido à oclusão capilar intrarretiniana ou à perda de capilares. Esta isquemia retinal resulta na deficiência de oxigenação dos neurônios retiniais, assim como o aumento de agentes pró-angiogênicos, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) <sup>46</sup>. Portanto, estudar as características da isquemia retinal é essencial para compreender a etiologia do dano microvascular na RD.

Diversos estudos enfatizam que o dano do lado vascular arterial desempenha um papel crítico na progressão de lesões patológicas da RD<sup>47; 48; 49; 50; 51; 52; 53</sup>. Estudos histológicos mostram uma distribuição periarteriolar (próxima das artérias) das lesões vasculares na RD, e a progressão da perda capilar a partir do lado arterial<sup>47</sup>. Além disso, mesmo em alterações microvasculares diabéticas precoces, são reportadas na literatura alterações morfológicas capilares predominantemente no lado arterial, e que microaneurismas são, também, predominantemente distribuídos no lado arterial<sup>50; 51; 52; 53</sup>.

Estes estudos são avaliações qualitativas em olhos *post mortem*. Entretanto, aproximações quantitativas *in vivo* podem gerar introspecções mais amplas na patogênese e na progressão da participação arterial ou venosa na RD.

Para o presente estudo, utilizamos a técnica de quantificação de não-perfusão previamente descrita, e desenvolvemos um novo método para visualização e associação automatizada destas regiões isquêmicas com as zonas arterial ou venosa, avaliando seu crescimento e progressão usando o *widfield* OCTA. Este projeto foi, também, desenvolvido em colaboração com o MIT e o NEEC<sup>54</sup>.

## **7.1. Materiais e métodos**

### **7.1.1. Recrutamento de pacientes**

Este estudo foi aprovado pelos conselhos de revisão institucional do MIT e do Tufts Medical Center. A pesquisa aderiu à Declaração de Helsinque e à Lei estadunidense de Portabilidade e Responsabilidade de Seguros de Saúde.

Foram retrospectivamente selecionados pacientes que tiveram dados adquiridos no NEEC durante o período de um ano (de janeiro 2017 a janeiro 2018). Como parte da sua rotina de cuidados, estes pacientes foram submetidos a exames oftalmológicos detalhados. Os pacientes foram classificados usando o protocolo de classificação padrão do ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study) como: Diabetes Mellitus sem RD (Dm sem RD), RD não-proliferativa leve, moderada ou grave (RD-NP) ou RD proliferativa (RD-P). A presença ou ausência de edema macular diabético foi determinada com base nos dados estruturais de OCT. No presente estudo, foram excluídos os olhos com opacidades severas nos centros, tais como a catarata severa ou a hemorragia vítrea. Os olhos que foram submetidos a tratamento com injeções de anti-VEGF e/ou o fotocoagulação panretiniana (PRP) dentro de 3 meses não foram incluídos.

### **7.1.2. Aquisição de dados**

Imagens dos pacientes foram adquiridas de forma idêntica à descrita na seção anterior, utilizando um sistema OCT Swept Source de 100 kHz (PLEX Elite 9000, Carl Zeiss Meditec Inc., Dublin, CA, EUA) com comprimento de onda central de 1050 nm (50 nm de distribuição espectral). Dois volumes foram adquiridos em cada localização (com repetições realizadas a nível de B-Scan) para cálculo de decorrelação. Os volumes adquiridos têm campo de visão de 12 mm x 12 mm. Cada volume consiste de 500 B-Scans, com 500 A-Scans por B-Scan. Os algoritmos proprietários da Carl Zeiss Meditec., embarcados no sistema de OCT, foram utilizados para geração de imagens de OCTA e projeções *en face*.

Adicionalmente, para um subconjunto de olhos, volumes de 12 mm x 12 mm foram adquiridos em cinco diferentes regiões do olho: central, nasal superior, nasal inferior, temporal inferior e temporal superior. Estes dados foram utilizados para a criação de imagens compostas (chamadas de *montages*), com o software embarcado da Carl Zeiss Meditec. Estas imagens oferecem campo de visão

maior, porém mantendo a resolução das imagens de *widefield* de 12 mm x 12 mm.

### **7.1.3. Software para identificação de regiões de não-perfusão**

O software desenvolvido para o projeto anteriormente descrito foi novamente utilizado para este novo estudo, utilizando a abordagem de “inundação” para quantificação de regiões isquêmicas. Adicionalmente, este software foi modificado para permitir, como entrada, imagens *montages*. Para tal, aplica-se, preliminarmente ao primeiro passo do pipeline já descrito, uma máscara de exclusão criada automaticamente, cobrindo regiões sem dados (regiões de costura) comumente presentes em *montages*. Essa máscara é uma simples limiarização (thresholding) feita a partir das bordas, já que as regiões de costura possuem valor zero. A máscara assim criada é adicionada às regiões de exclusão inseridas pelo usuário, conforme o pipeline usual do software. A partir daí o processamento segue normalmente.

### **7.1.4. Delineamento de artérias e veias**

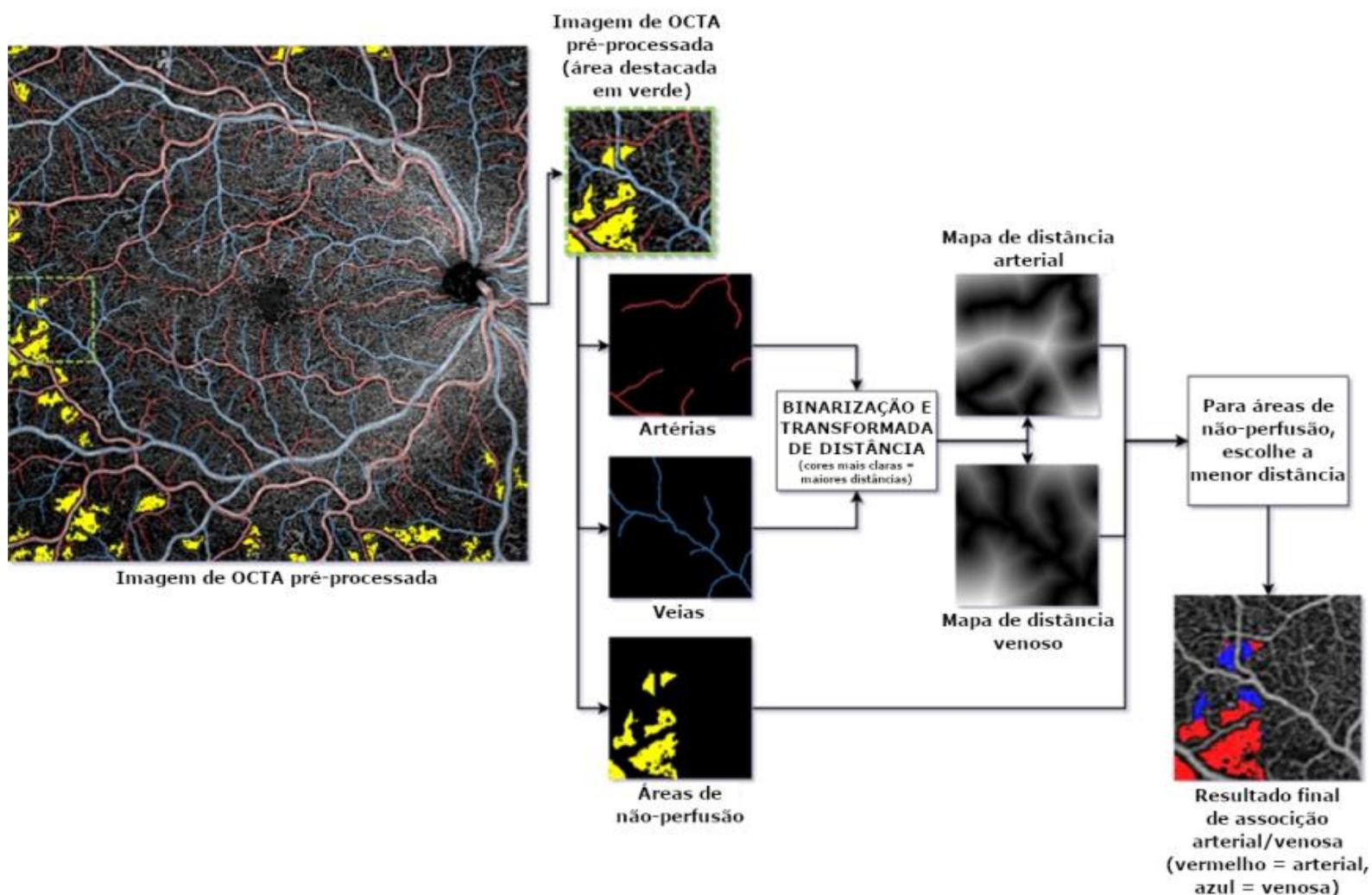
Usando fotografias de fundo e imagens de FA (quando disponíveis), as artérias e as veias retiniais são demarcadas. As imagens de OCTA permitem a visualização de ramos arteriais que são claramente distinguíveis das veias pela presença de regiões “escuras” ao seu redor, representando a *capillary-free zone* (zona sem capilaridade), característica de artérias<sup>55; 56; 57</sup>. Adicionalmente, é conhecido que artérias não cruzam outras artérias, e veias não cruzam outras veias. Baseado nestas características, as artérias e as veias foram traçadas manualmente até o nível de arteríolas e de vênulas precapilares. O tecido neovascular não foi traçado porque não contribui à circulação retinal. Os traçados de veias e artérias são, então, exportados como imagens separadas.

### **7.1.5. Software para associação arterial/venosa**

Para determinar se a não-perfusão capilar foi adjacente às artérias ou veias, as projeções *en face* de OCTA foram utilizadas juntamente com os mapas de veias e artérias traçados manualmente e com o mapa de áreas de não-perfusão obtido automaticamente. Estas são as entradas para o software desenvolvido em MATLAB.

Todas as imagens são binarizadas e os mapas de artérias/veias são sujeitos a uma transformada de distância Euclidiana<sup>58</sup>. Após essa transformada, a cada pixel é atribuído um valor correspondente à sua distância do elemento não-zero mais próximo na imagem (ou seja, um pixel correspondente a um vaso da retina). Dois mapas distintos são criados com valores que indicam, respectivamente, a artéria (Mapa de Distâncias Arterial - MDA) e veia (Mapa de Distâncias Venoso - MDV) mais próximas.

Então, para cada pixel de não-perfusão, a adjacência ao vaso mais próximo, artéria ou veia, é atribuída, comparando os valores para o pixels correspondentes (de mesma localização) nos mapas MDA e MDV. Caso o pixel correspondente em MDA possua valor menor que em MDV, o pixel é associado ao lado arterial. Se o valor em MDV for menor, o pixel é associado ao lado venoso. No caso de distâncias iguais, a adjacência é atribuída aleatoriamente. Finalmente, uma imagem de cores falsas é gerada para fins de visualização (vermelho: lado arterial, azul: lado venoso). Os valores de adjacência de não-perfusão são definidos como a porcentagem de não-perfusão adjacente ao lado arterial (não-perfusão arterial) e o percentual de não- perfusão adjacente ao lado venoso (não perfusão venosa). A não-perfusão arterial dividida pela não-perfusão venosa resulta na relação A/V. O fluxo de trabalho para este software é apresentado na Figura 23.



**Figura 23** - Fluxograma descrevendo o algoritmo desenvolvido para calcular a associação arterial ou venosa de áreas de não-perfusão. O algoritmo utiliza três entradas principais: os mapas arterial, venoso e de não-perfusão. Após binarização e transformada de distância, o algoritmo seleciona as menores distâncias e calcula a associação, indicando em cores falsas (para visualização): vermelho para regiões arteriais e azul para regiões venosas.

### 7.1.6. Análise Estatística

Os resultados são expressos como mediana (intervalo interquartil), pois os dados não são normalmente distribuídos (teste de normalidade de D' Agostino & Pearson). A relação A/V foi avaliada utilizando-se o coeficiente de correlação intraclasse (ICC) para 25 olhos em imagens de 12 x 12 mm e 20 olhos nas *montages*. Os dados foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para avaliar as diferenças entre os grupos. A não-perfusão arterial e a não-perfusão venosa dentro de cada grupo foram comparadas pelo teste de pares combinados de Wilcoxon. Prism 7 (Graph Pad Software Inc., CA, Estados Unidos) e SPSS v25 (SPSS, Inc.,

Chicago, Estados Unidos) foram utilizados para análise estatística. Um valor de  $p$  inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## 7.2. Resultados e discussão

### 7.2.1. Características da população

63 olhos de 44 indivíduos (28 homens e 16 mulheres) foram utilizados. A idade mediana dos pacientes é de 61 anos (escala interquartil: 51-68 anos). A mediana da duração do diabetes é de 16 anos (6-25 anos). Dos 63 olhos, 22 foram clinicamente classificados como RD não proliferativa moderada, 16 como RD não proliferativa grave, e 25 como RD-P. Os parâmetros oculares e as características dos olhos incluídos são mostrados na Tabela 5. 17 olhos (68,0%) com RD-P tinham sido tratados com PRP.

**Tabela 5** - Características dos olhos selecionados para o estudo. Os valores são medianas (intervalo interquartil).<sup>a</sup> Kruskal-Wallis usado para variáveis contínuas, Chi-quadrado para variáveis categóricas. <sup>b</sup> RD-NP moderada vs PDR,  $p < 0,01$ , teste de Dunn's. <sup>c</sup> RD-NP moderada vs PDR,  $p < 0,05$ , teste de Dunn's.

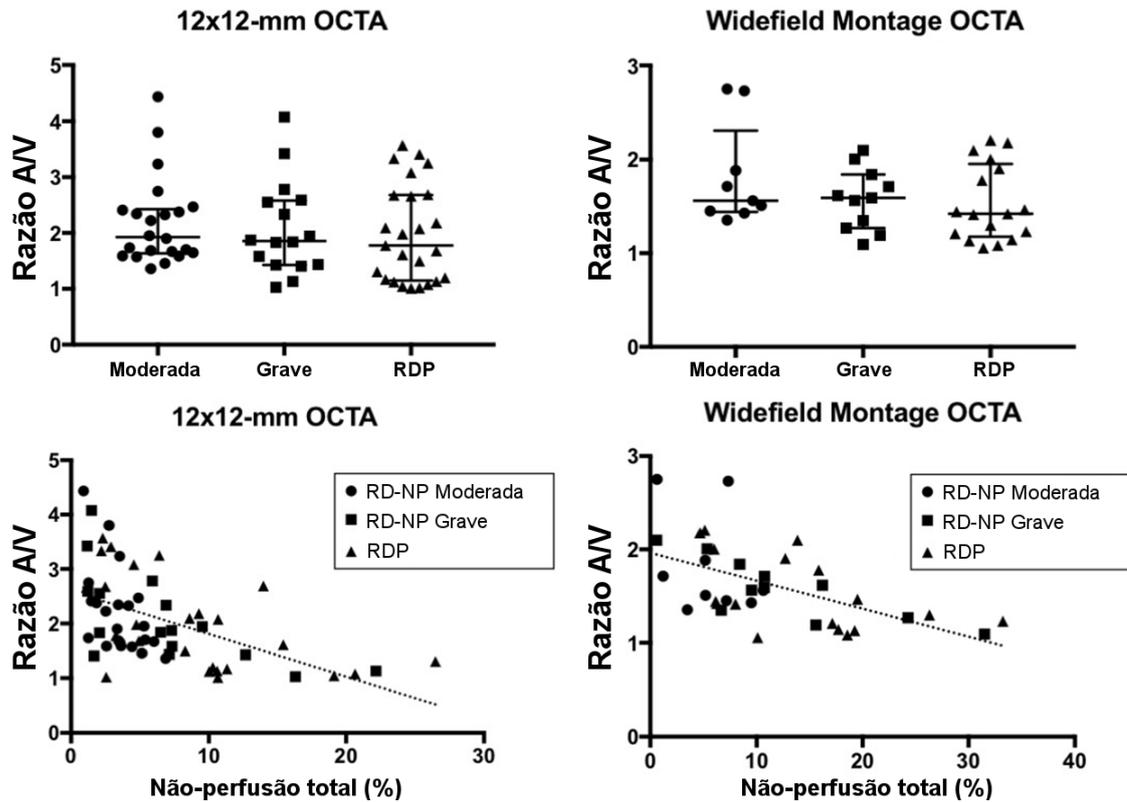
	RD-NP Moderada	RD-NP Severa	RD-P	valor $p^a$
<b>12 mm x 12 mm OCTA</b>				
Olhos, n	22	16	25	
Injeção Anti-VEGF, n (%)	4 (18%)	4 (25%)	11 (44%)	0.1371
Tratamento PRP, n (%)	-	-	17 (68%)	
Área de não-perfusão total, %	3.49 (2.36-4.96)	6.69 (1.78-8.97)	8.59 (3.07-10.99) <sup>b</sup>	0.0073
Área de não-perfusão Arterial, %	2.22 (1.50-3.13)	4.27 (1.23-5.92)	5.30 (2.16-6.78) <sup>b</sup>	0.0030
Área de não-perfusão Venosa, %	1.20 (0.57-1.74)	2.18 (0.61-3.16)	2.92 (1.17-5.10) <sup>b</sup>	0.0129
Razão A/V	1.93 (1.63-2.43)	1.86 (1.43-2.58)	1.78 (1.15-2.68)	0.5545
<b>montage OCTA</b>				
Olhos, n	9	11	17	
Injeção Anti-VEGF, n (%)	2 (22%)	4 (36%)	8 (47%)	0.4589
Tratamento PRP, n (%)	-	-	17 (100%)	
Área de não-perfusão total, %	5.18 (2.35-8.42)	10.72 (6.68-16.22)	13.85 (6.19-18.91) <sup>c</sup>	0.0183
Área de não-perfusão Arterial, %	3.38 (1.39-5.48)	6.58 (3.83-10.20)	9.38 (3.84-10.18) <sup>c</sup>	0.0188
Área de não-perfusão Venosa, %	1.97 (0.97-3.42)	3.97 (2.84-7.11)	4.92 (2.55-8.59) <sup>c</sup>	0.0189
Razão A/V	1.56 (1.44-2.31)	1.59 (1.27-1.84)	1.42 (1.18-1.95)	0.3509

### **7.2.2.Associação de não-perfusão com artérias e veias em imagens *widefield* de 12 mm x 12 mm**

O resumo dos resultados também é mostrado na Tabela 5. Nas imagens de OCTA macular de 12 x 12 mm, a área de não perfusão total mediana foi de 3,49% em RD-NP moderada, 6,62% em RD-NP grave, e 8,56% em RD-P. Houve diferença significativa na não-perfusão entre os grupos RD-NP moderada e RD-P ( $p < 0,001$ ). A não-perfusão arterial e a não-perfusão venosa apresentam as mesmas tendências que a não-perfusão total: ambas aumentam com a severidade da RD. Para todas as severidades, a não-perfusão arterial foi significativamente maior do que a venosa ( $p < 0,001$ ). As medianas da razão A/V foram 1,93 em RD-NP moderada, 1,84 em RD-NP grave e 1,78 em RD-P, porém sem diferença estatística ( $p = 0,49$ ). Entretanto, quando plotada em função do percentual total de não-perfusão, a razão A/V apresenta correlação negativa ( $R^2 = 0,600$ ), como demonstrado na Figura 24.

### **7.2.3.Associação de não-perfusão com artérias e veias em *montages***

Este estudo contou com 37 olhos (9 olhos com RD não-proliferativa moderada, 11 olhos com RD-NP grave, e 17 olhos com RD-P). Os resultados também são mostrados na Tabela 5 e seguiram as mesmas tendências observadas nas imagens centrais de 12 x 12 mm: a não-perfusão total, a não perfusão arterial e a não perfusão venosa aumentaram gradualmente com o aumento da severidade da RD. As razões A/V nas imagens *montage* foram menores que aquelas observadas nas imagens de 12 x 12 mm: mediana de 1,56 em RD-NP moderada, 1,59 em RD-NP grave e 1,42 em RD-P. A relação A/V para as imagens *montage* também foi negativamente correlacionada com a não-perfusão total ( $R^2 = -0,598$ , Figura 24).

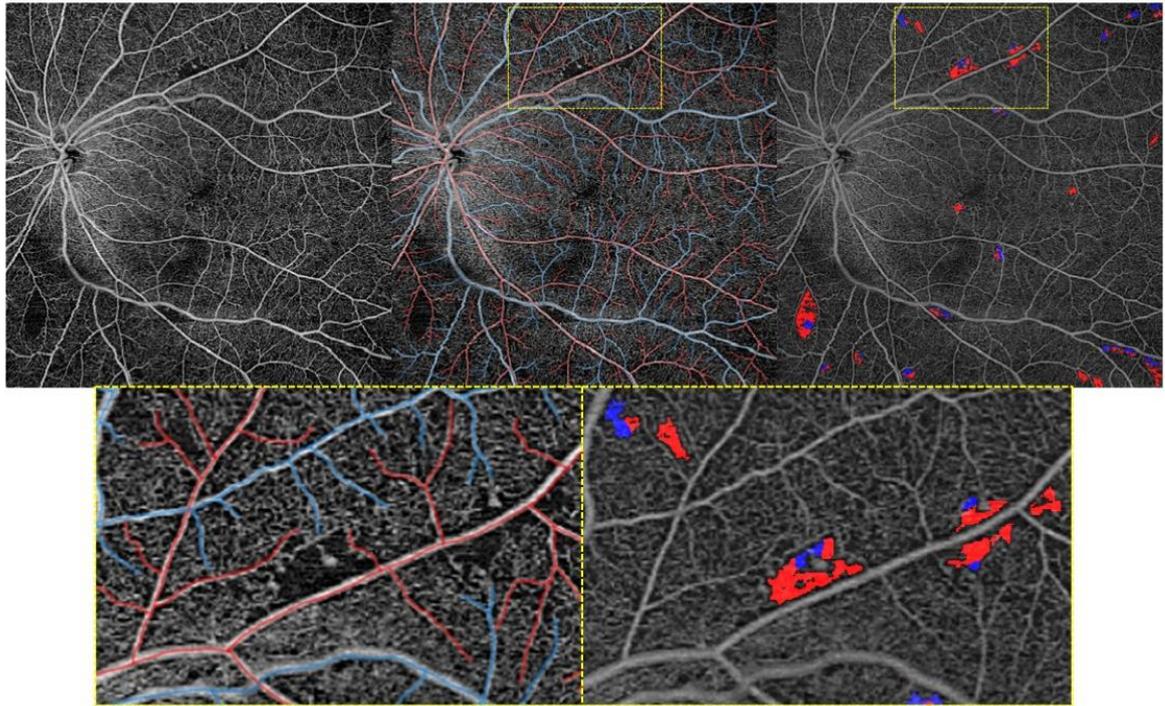


**Figura 24** - Gráficos individuais mostrando a razão arterial/venosa em função da não-perfusão em olhos com RD-NP moderada, severa e RD-P. As linhas estão centralizadas na mediana, com o intervalo interquartil. À esquerda: 12 mm x 12 mm OCTA. À direita *montage* OCTA. Acima: dispersão da razão A/V em função da severidade. Abaixo: dispersão da razão A/V em função da % de não-perfusão total. Interessante notar a correlação negativa entre a razão AV e o percentual de não-perfusão total.

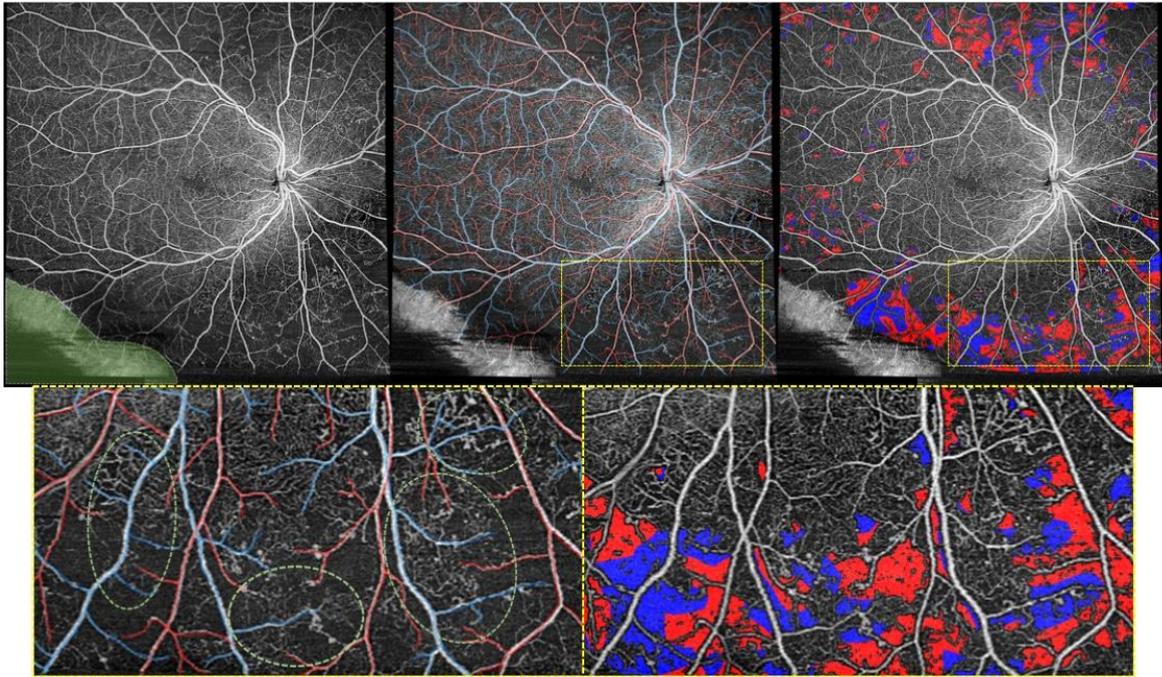
### 7.2.4.Casos Representativos

Os casos representativos são mostrados na Figura 25 e Figura 26. A não-perfusão total imagens *widefield* do olho esquerdo de um homem de 75 anos com RD-NP moderada é de 1,28%, e a relação A/V é 2,75. Pequenas áreas de não-perfusão foram claramente localizadas, adjacentes aos ramos arteriais retinianos (Figura 25).

A seguir, a imagem *montage* do olho direito de um homem de 34 anos com RD-NP grave, com não-perfusão total calculada de 10,72%, e a relação A/V de 1,59. As áreas pequenas de não-perfusão, novamente, tendem a ocorrer no lado arterial. No entanto, algumas áreas de não perfusão severamente ampliadas na regiões externas se estendem em direção ao lado venoso (Figura 26). Capilares esparsos e irregulares próximos ao lado venoso são observados de forma residual.



**Figura 25** - Caso representativo de um homem de 75 anos com RD-NP moderada e pequenas áreas de não-perfusão. Topo à esquerda: OCTA original (12 mm x 12 mm). Topo ao meio: Mapeamento das artérias e veias. Topo à direita: Resultado do algoritmo de associação. Abaixo à esquerda: Magnificação da zona destacada (topo ao meio), identificando áreas isquêmicas pequenas próximas aos vasos arteriais. Abaixo à direita: Magnificação da zona destacada (topo à direita), mostrando a associação destas mesmas áreas, predominantemente arteriais.



**Figura 26-** Caso representativo de um homem de 34 anos com RD-NP severa e grandes áreas de não-perfusão. Topo à esquerda: OCTA original (*montage*) A região verde é um artefato de segmentação, excluído da análise. Topo ao meio: Mapeamento das artérias e veias. Topo à direita: Resultado do algoritmo de associação. Abaixo à esquerda: Magnificação da zona destacada (topo ao meio), identificando áreas isquêmicas largas e esparsas se aproximando das regiões venosas (círculos verdes). Abaixo à direita: Magnificação da zona destacada (topo à direita), mostrando a associação destas mesmas áreas, com mais contribuição venosa quando comparada à Figura 25.

### 7.2.5. Discussão

Esta análise piloto de OCTA revelou dois resultados principais para a adjacência da não-perfusão em RD. Primeiro, a não-perfusão capilar adjacente ao lado arterial foi maior do que o lado venoso em todos os estágios de RD (Tabela 5). Os olhos em que as áreas menores da não-perfusão foram detectadas tenderam a ter relações maiores de A/V sem nenhuma relação com a severidade da doença (Figura 24). Estes resultados indicam que a não-perfusão capilar do diabético pode começar predominantemente perto do lado arterial. Estudos histológicos precedentes na literatura indicam que a vasculatura do lado arterial é implicada na patogênese das lesões microvasculares do diabético<sup>52; 53</sup>, corroborando para os resultados obtidos. Além disso, foi relatado histologicamente que os microaneurismas ocorreram em grande parte no lado arterial<sup>51</sup>. Os resultados atuais das imagens de OCTA fornecem uma estimativa

da participação vascular no lado arterial na iniciação de anomalias microvasculares retiniais da RD.

O segundo achado importante é que a relação A/V para a não-perfusão capilar diminui com o aumento da não perfusão total (Figura 24). Isto sugere que a não-perfusão capilar na RD pode ocorrer a partir da ampliação de áreas isquêmicas do lado arterial para o lado venoso, com progressão da doença. Este resultado é consistente com as alterações fisiopatológicas diabéticas conhecidas<sup>59; 60; 61; 62</sup>, e pode permitir estimar os mecanismos de ampliação da não-perfusão.

Além disso, verificou-se que a relação A/V de não-perfusão nas imagens *montage* é negativamente correlacionada com a não-perfusão total, e as proporções foram menores do que as das imagens de 12 x 12 mm. Isto pode ser explicado parcialmente pelo fato de que a não-perfusão total detectada nas imagens *montage* é maior do que aquela em imagens *widefield*, porque a maioria da não-perfusão capilar na DR ocorre fora da região macular, como comentado em seção anterior. A não-perfusão capilar periférica também tende a estar concentrada em áreas maiores, sendo mais comumente ampliada para o lado venoso (Figura 26).

Como este estudo se concentrou pacientes com RD em estágio relativamente avançado, as diferenças nas áreas de não perfusão total atingiram significância apenas entre RD-NP moderada e RD-P. Além disso, a razão A/V foi negativamente e significativamente correlacionada com a área de não perfusão total, porém, devido ao baixo número de pacientes amostrados, A/V teve grande variação dentro de cada nível de severidade, e não teve diferença significativa entre estes estágios da RD. Estes resultados sugerem que a relação A/V pode não ter poder suficiente para diferenciar entre estágios de RD, especialmente em casos graves, mas é mais útil como uma métrica para entender como ocorre a ampliação da não-perfusão capilar. Futuros estudos prospectivos devem ser realizados, acompanhando os mesmos olhos com e sem RD longitudinalmente, para elucidar mais precisamente a progressão da isquemia da retina diabética. Adicionalmente, foram incluídos olhos que tinham sido tratados previamente com as injeções de anti-VEGF e o PRP, que podem interferir nos resultados de não-perfusão observados, já que induzem à reperfusão microvascular. Estudos

adicionais com OCTA são necessários para investigar completamente não-perfusão retinal sem tratamento e verificar se reperfusão após tratamento ocorre predominante no lado arterial ou venoso.

Vale ressaltar que, como mencionado previamente, a OCTA visualiza a *capillary free-zone* que existe em torno das artérias retiniais. A quantificação automatizada pode, erroneamente, detectar essa zona fisiológica como uma área não-perfusão, fazendo com que a relação A/V seja superestimada. Entretanto, através da correção manual esta zona fisiológica não foi computada como área de não-perfusão. Ainda, um estudo recente demonstrou quantitativamente que a *capillary-free zone* periarterial na RD não-proliferativa grave é aumentada, quando comparada aos olhos controle<sup>63</sup>. Como demonstrado na Figura 25, o software desenvolvido também foi capaz de estimar que as áreas de não-perfusão precoces na RD ocorreram pelo alargamento desta *capillary-free zone*.

Em resumo, este foi um estudo piloto usando imagens de *widefield* OCTA. Os resultados sugerem que a não-perfusão na RD pode ocorrer predominantemente perto das artérias, e se expandir para regiões próximas às veias. Estes achados fornecem reflexões novas para avaliar o desenvolvimento de doenças vasculares retiniais.

## 8. ANÁLISE DE ARTEFATOS EM IMAGENS *WIDEFIELD* DE OCT

Como demonstrado nos outros estudos da presente tese, a utilização de *widefield* OCT e OCTA é vantajosa para fins diagnósticos, possibilitando visualização de regiões periféricas que podem conter dados importantes sobre a progressão e origem da RD. Contudo, alcançar resultados *widefield* confiáveis é mais desafiador – técnica e processualmente – do que o estudo de menores campos de visão, e pode permitir o aumento de número de artefatos (ruídos ou erros) que tornam as imagens mais difíceis de interpretar. Ademais, artefatos fazem medidas quantitativas serem menos confiáveis, limitando o uso clínico das métricas para *widefield* OCT (como as áreas de não-perfusão anteriormente abordadas) e fazendo a tecnologia menos eficaz no diagnóstico, monitoramento de progressão de doenças e avaliação resposta de tratamentos. Desta maneira, minimizar os efeitos dos artefatos, que podem causar variações indesejáveis na análise, é essencial para promover melhor repetibilidade das métricas – o que, em estudos clínicos, significa necessitar de menos pacientes e/ou um menor período de acompanhamento.

Embora diversos tipos de artefatos afetem as imagens *widefield*, aqueles causados por baixo nível de sinal (denominados *low signal*) se tornam significativamente numerosos com o aumento do campo de visão. Com isso em mente, os objetivos desse estudo são: primeiro, descrever as causas de *low signal* em *widefield* OCT; segundo, investigar os efeitos do *low signal* em OCT; e terceiro, desenvolver soluções para o manuseio e identificação de artefatos em *widefield* OCTA. Este estudo foi, também, desenvolvido em colaboração com o MIT e o NEEC.

### 8.1. Métodos

#### 8.1.1. Recrutamento de pacientes

Este estudo foi aprovado pelos conselhos de revisão institucional do MIT e do Tufts Medical Center. A pesquisa aderiu à Declaração de Helsinki e à Lei estadunidense de Portabilidade e Responsabilidade de Seguros de Saúde. Esse estudo inclui dados selecionados retrospectivamente de pacientes diabéticos que

tiveram dados adquiridos no NEEC entre Janeiro e Julho de 2017. Cada indivíduo recebeu exame de fundo de olho com dilatação, fotografia colorida de fundo de olho, imagem de OCT estrutural e, se indicado clinicamente, FA. Novamente, Os pacientes foram classificados usando o protocolo de classificação padrão do ETDRS como: Diabete Mellitus sem RD (Dm sem RD), RD não-proliferativa leve, moderada ou grave (RD-NP) ou RD proliferativa (RD-P).

### **8.1.2.Aquisição de Dados**

Como ocorrido nos estudos anteriores, dados dos pacientes foram coletados usando um sistema OCT *Swept Source* de 100 kHz (PLEX Elite 9000) com comprimento de onda central de 1050 nm  $\pm$ 50nm. Volumes cobrindo uma área de 12 mm x 12 mm centrada na fóvea foram adquiridos. Dois B-Scans consecutivos foram adquiridos em cada localização, para cálculo de decorrelação temporal. Cada volume consiste de 500 B-Scans, com 500 A-Scans por B-scan. Novamente, o algoritmo proprietário da Carl Zeiss Meditec. foi utilizado para geração de imagens de OCTA. Projeções *en face* da vasculatura retinal completa (toda a espessura da retina) foram formadas também usando um algoritmo padrão de segmentação automática da Carl Zeiss Meditec .

### **8.1.3.Identificação de regiões de não-perfusão**

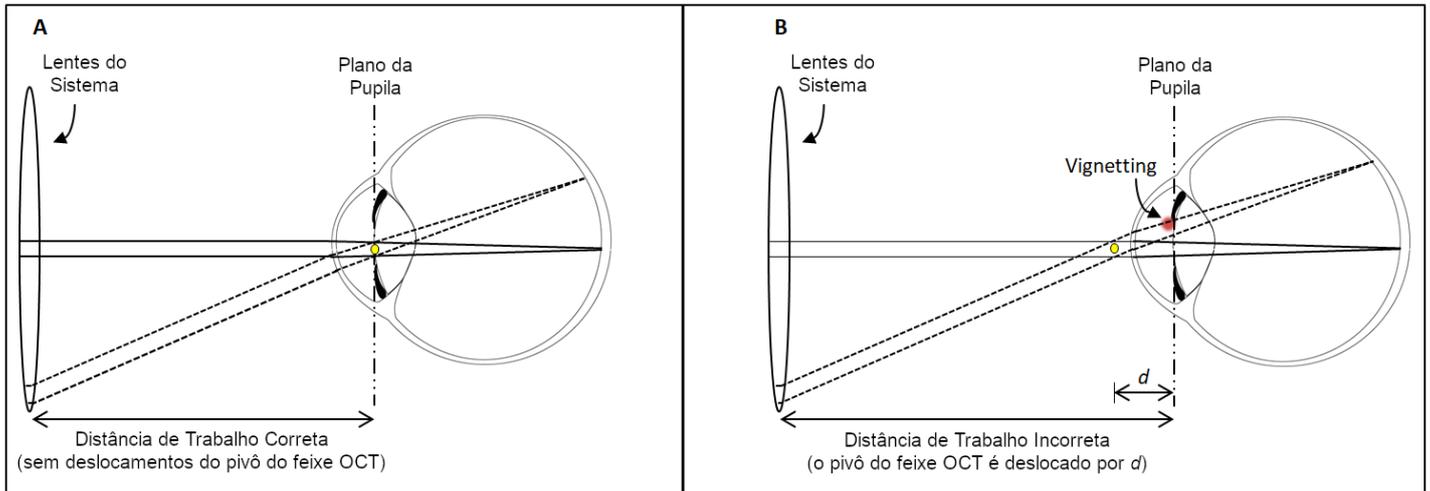
O algoritmo desenvolvido pelo presente autor e previamente descrito (seção 6.1.1) foi utilizado para identificação automática de regiões de não-perfusão para esta parte do estudo.

### **8.1.4.Causas do *low signal* em *widefield* OCTA**

Como dados OCTA são derivados dos dados de OCT estruturais (i.e., as imagens regulares de OCT), é necessário um entendimento das causas de *low signal* nos dados estruturais para só então compreender os artefatos nos dados angiográficos. Para isso, destaca-se abaixo aspectos relevantes sobre aquisição de dados OCT oftalmológicos:

1. O OCT utiliza varredura de feixe, onde A-scans são sequencialmente adquiridos conforme o feixe é movimentado pelo campo de visão.

2. Sistemas de OCT normalmente fazem a varredura de feixe usando um par de espelhos arranjados de tal forma que a rotação de um espelho escaneie o feixe pelo eixo horizontal, e a rotação do outro espelho escaneie o feixe pelo eixo vertical.
3. Com um sistema de alinhamento correto, o ponto pivô de rotação dos espelhos de escaneamento (i.e., as posições nas quais os espelhos rotacionam) são ópticamente retransmitidas para o plano da pupila do paciente (i.e., o plano contendo a pupila) para que a rotação dos espelhos mude o ângulo entre o feixe e o plano da pupila, mas não altere a posição transversal do feixe na pupila. Em outras palavras, a rotação deve se dar ao redor de um ponto fixo localizado na pupila. Isso requer que o instrumento esteja alinhado em uma distância de trabalho específica em relação ao olho como ilustrado na Figura 27. O alinhamento incorreto faz com que o feixe tenha sua posição transversal alterada, o que facilita a ocorrência do chamado *vignetting*, um efeito de obstrução do feixe.
4. O feixe de OCT é focalizado utilizando a combinação do olho e do sistema óptico montado. Como em qualquer sistema de imageamento, a profundidade de campo é limitada. Em aplicações oftalmológicas de OCT, o parâmetro confocal usual é de, aproximadamente, 0,5 mm.
5. O feixe OCT é retroespalhado pelos tecidos da retina, coletado pelo sistema, e então processado para gerar a imagem OCT. É importante ressaltar que o OCT usa aquisição “confocal”, o que significa que apenas a luz retroespalhada de dentro do volume de interesse e que refaz sua trajetória incidente contribui para o sinal.
6. A amostragem axial (A-Scan) tem limitações diferentes dependendo da metodologia de aquisição utilizada: em SD-OCT o intervalo é limitado pela resolução do espectrômetro, e em SS-OCT o intervalo é limitado pela largura instantânea do laser de varredura (*instantaneous line-width*).



**Figura 27** - Ilustração do alinhamento do feixe OCT com o olho humano. O pivô de rotação do feixe deve coincidir (lateral e axialmente) com a pupila. A) Alinhamento ideal. B) Desalinhamento axial, em que o pivô não fica localizado do plano da pupila e, conseqüentemente, o feixe é bloqueado pela íris, causando *vignetting*.

Essas características fornecem uma estrutura para a compreensão das causas do *low signal*. Kolb et al.<sup>64</sup> resume as causas comuns para *low signal*, e um trabalho publicado pelo presente autor e colaboradores<sup>65</sup> discute o porquê algumas causas são exacerbadas no caso de *widefield*. Destaca-se, aqui: superfícies fora de foco (fazendo com que menos luz retroespalhada por elas seja coletada) e a perda de sensibilidade para maiores diferenças de caminho óptico (para sistemas OCT baseados no domínio espectral)<sup>66</sup>. Ambos fatores são mais comuns em *widefield*, devido ao maior campo de visão associado à curvatura da retina, fazendo com que a posição axial da superfície da retina varie amplamente em um único B-Scan.

Das causas de *low signal* para FOV's de 12 mm x 12 mm, entretanto, *vignetting* usualmente predomina e, assim, merece maior discussão. *Vignetting* ocorre quando o feixe incidente é parcial ou totalmente bloqueado pela íris. Enquanto esse bloqueio pode ser causado por um feixe muito largo e/ou uma pupila pequena, utilizando tamanhos de feixe padrão e uma pupila dilatada, *vignetting* é principalmente causado por desalinhamento entre o instrumento e o olho. Desalinhamentos podem ser transversais ou axiais: desalinhamentos transversais causam desencontro entre o ponto pivô do feixe e o centro da pupila, enquanto desalinhamentos axiais causam desencontro entre o ponto pivô do feixe e o plano da pupila. Desalinhamentos axiais são comuns em aplicações oftalmológicas de OCT, graças a uma distância de trabalho incorreta e/ou

movimentação do paciente, gerando efeitos de *vignetting* mais severos com o aumento do ângulo de varredura (Figura 27). Portanto, *widefield* OCT(A) é mais sensível para desalinhamentos axiais do que OCT com campos de visão menores.

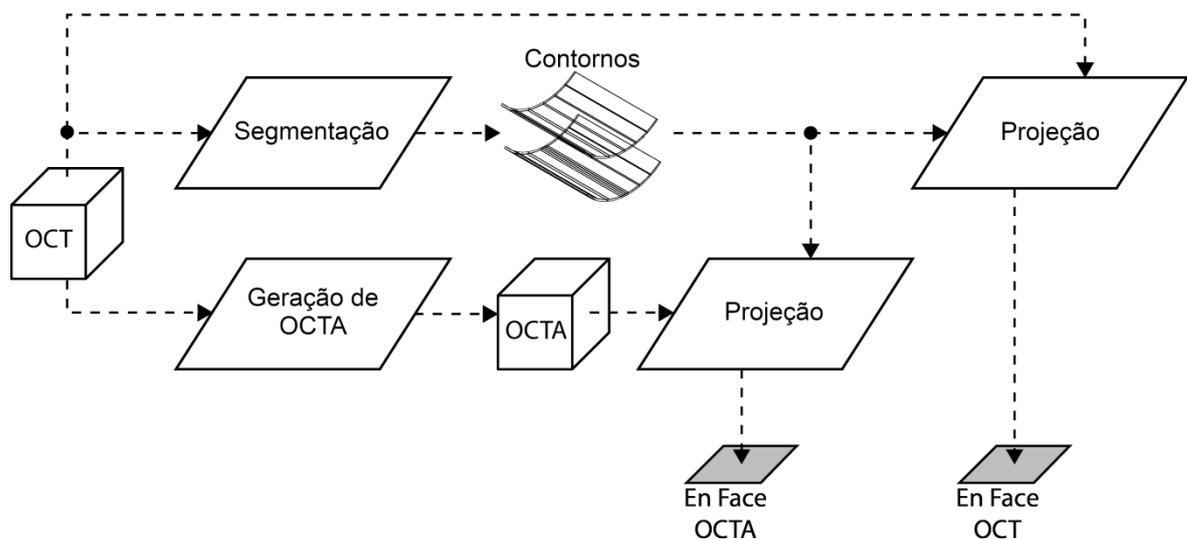
### **8.1.5. Efeitos de *low signal* em *widefield* OCTA**

Tendo estabelecido que *widefield* é mais suscetível a produzir regiões de *low signal*, focamos nossa atenção em compreender como estes últimos produzem artefatos em OCTA. A discussão a seguir é focada em métricas para áreas de não-perfusão, objetos de estudo desta tese.

#### ***Como low signal influencia o processamento e análise de OCTA***

*Low signal* afeta não apenas dados OCT, mas também todas as medições derivadas de dados OCT (Figura 28). Em particular, OCTA é computado a partir de dados OCT detectando flutuações de intensidade entre repetidos B-scans, causados por espalhadores em movimento. Como dados OCTA válidos não podem ser obtidos de regiões com sinais de OCT baixos ou ruidosos, essas regiões são removidas em pré-processamento, através de limiarização (*thresholding*)<sup>67</sup>. Esta remoção significa que as regiões de *low signal* não são computadas por algoritmos de decorrelação, e são reproduzidas (na imagem final) como zonas sem flutuação de intensidade – valores baixos (pixels escuros), assim como regiões sem fluxo. Portanto, regiões de baixo sinal OCT causam regiões com artefatos de baixo sinal (machas escuras) no OCTA, independentemente da presença/ausência de fluxo sanguíneo.

Adicionalmente, como a maioria da vasculatura retinal está no plano transversal ao feixe de OCT, dados OCTA são tipicamente vistos como projeções *en face*. Para formar uma projeção *en face*, o volume OCT deve ser segmentado para determinar os contornos (as diferentes profundidades) que serão projetadas. Entretanto, regiões de *low signal* possuem contraste reduzido entre os diferentes camadas da retina, o que pode causar erros de segmentação (escolha errada de contornos). Deste modo, *low signal* em OCT podem afetar imagens OCTA *en face* através de erros de segmentação.



**Figura 28** - Fluxo de processamento comum para imagens de OCTA.

Em resumo, *low signal* pode produzir dois tipos de artefatos em imagens OCTA *en face*:

- **Artefatos de limiarização:** artefatos gerados graças ao pré-processamento de imagens de OCT, que exclui regiões inválidas. Nesse tipo de artefato, *low signal* resulta em dados OCTA inválidos.
- **Artefatos de segmentação:** artefatos graças à erros de segmentação. Nesse tipo de artefato, sinais baixos causam erros de segmentação de camadas para projeção, resultando em imagens OCTA *en face* não precisas.

### **Como Artefatos *low signal* afetam a interpretação de dados OCTA**

Quando uma imagem OCTA é clinicamente interpretada, assume-se implicitamente que valores altos (pixels claros) implicam em fluxo sanguíneo, e que valores baixos (pixels escuros) implicam fluxo sanguíneo baixo ou inexistente. Sem artefatos, a presença ou ausência de fluxo sanguíneo é a única determinante do sinal OCTA e essa hipótese implícita é válida. Entretanto, conforme descrito, artefatos de limiarização e segmentação afetam as projeções *en face* de OCTA, fazendo com que não seja necessariamente correto afirmar que pixels claros implicam em fluxo sanguíneo, nem que pixels escuros implicam na ausência de fluxo. Por isso, atenção é necessária para detectar possíveis artefatos e excluí-los da análise quantitativa. A Figura 29 corrobora para este fato, o que pode ser observado a Figura 29-A. Nem todas as regiões com baixo sinal de OCTA (pixels

escuros) correspondem à regiões com baixo ou nenhum fluxo sanguíneo. Isto é revelado na Figura 29-C, e detalhada na Figura 30.



**Figura 29-** Efeitos dos artefatos na porcentagem de não-perfusão calculada. A) Projeção *em face* OCTA poriginal. B) Cálculo de não-perfusão sem excluir áreas de artefato. Observe como as região de *low signal* influenciam o algoritmo e são erroneamente selecionadas. C) Cálculo de não-perfusão com exclusão de artefatos. Observe a diferença na quantidade de regiões selecionados pelo algoritmo.

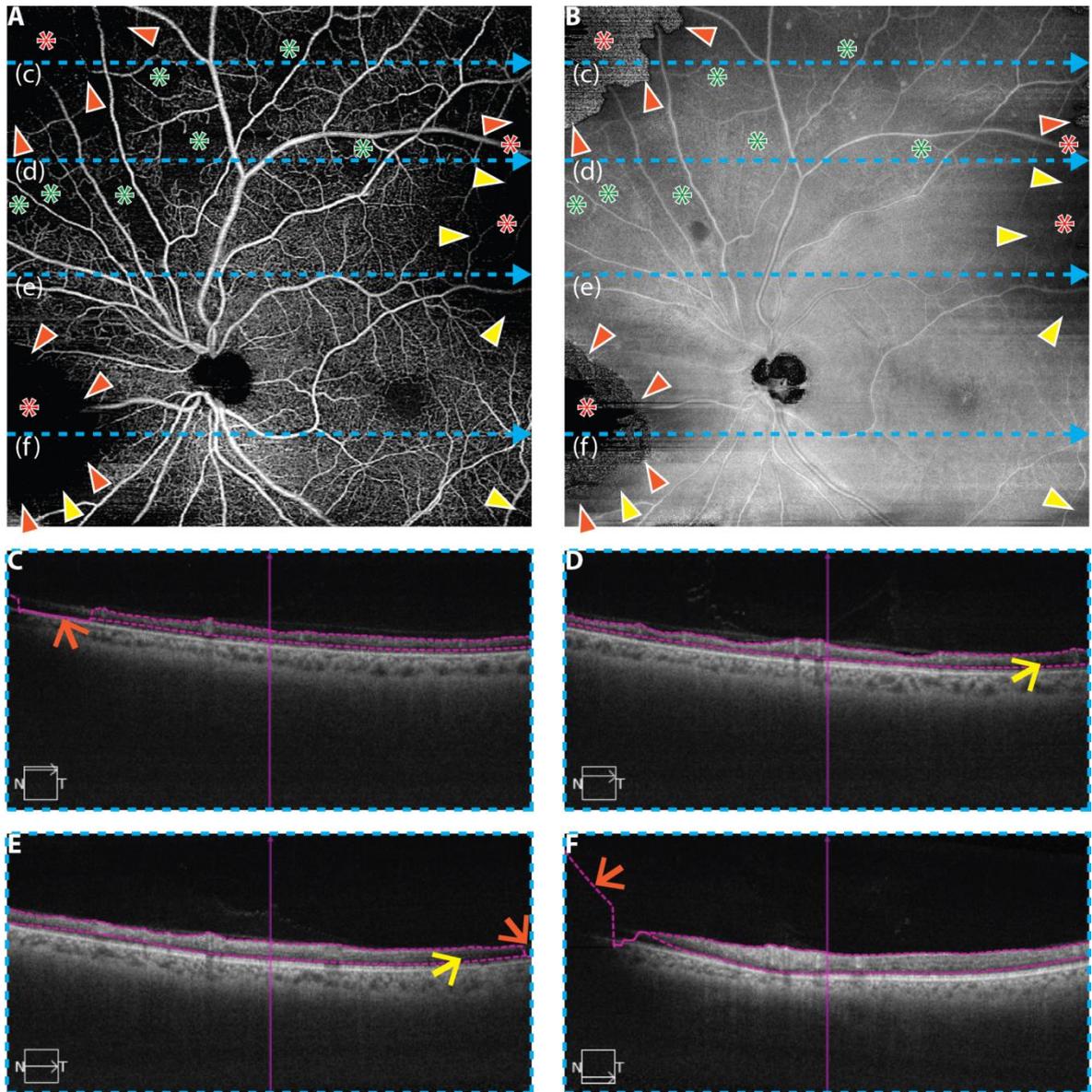
### ***Como Artefatos low signal afetam medições quantitativas em OCTA***

Reconhecendo que artefatos com baixo sinal de OCT dificultam a interpretação de imagens OCTA, agora veremos como tais artefatos afetam medições quantitativas. Para ilustrar esse conceito, considere a porcentagem de área de não-perfusão (PANP), definida de forma ligeiramente diferente daquela descrita na equação 16 :

$$PANP = \frac{\text{Área de baixo sinal OCT}}{\text{Área total}} \times 100\% \quad (17)$$

Agora, considere a PANP “corrigida”:

$$PANP \text{ corrigida} = \frac{\text{Área de baixo sinal OCT} - \text{Área de artefatos low signal}}{\text{Área total} - \text{Área de artefatos}} \times 100\% \quad (18)$$



**Figura 30** – Ilustração da visualização ortoplano (corte-transversal e *en face*) para detecção de artefatos, utilizando o mesmo exemplo da Figura 29. A) Projeção OCTA *en face*; B) Projeção OCT *en face*; C-F) B-Scans correspondentes às regiões subjacentes (corte transversal) abaixo das setas azuis pontilhadas (identificadas na imagem). Setas laranjas apontam para as bordas de artefatos de segmentação; setas amarelas apontam para as bordas de artefatos de limiarização; asteriscos vermelhos indicam regiões de baixo sinal de OCTA causadas por *low signal* OCT; asteriscos verdes indicam regiões de baixo sinal de OCTA devido a fluxos baixos/ausentes.

Diferentemente da PANP sem correção, a PANP corrigida exclui regiões afetadas por artefatos de medição. Ao comparar essas duas medidas é possível compreender melhor sobre como artefatos afetam medições quantitativas de OCTA. Como exemplo, considere as PANP's corrigida e não corrigida do *widefield* OCTA da Figura 29, calculadas através do algoritmo de "inundação".

Importante ressaltar, o algoritmo implicitamente assume que uma área de baixo sinal OCTA corresponde à uma área de não-perfusão (i.e., ele não considera a possibilidade de artefatos de baixo sinal OCT).

A PANP corrigida é obtida da não-corrigida, excluindo regiões de artefatos, conforme fórmula acima. Áreas de artefatos foram manualmente identificadas via revisão de corte transversal e de imagens *en face* – Figura 30 mostra um exemplo da visualização para revisão. Estas metodologias para revisão de artefatos serão discutidas adiante.

PANP's não-corrigida e corrigida são mostradas na Figura 29-B e Figura 29-C. Como esperado, a presença de artefatos *low signal* gera um falso positivo para áreas de não-perfusão, o que muda substancialmente a PANP não-corrigida. Tal exemplo demonstra que a detecção e exclusão destes artefatos são críticas na obtenção de medidas quantitativas válidas.

#### **8.1.6. Detecção de artefatos *low signal* em *widefield* OCTA**

Tendo estabelecido as causas e efeitos de artefatos de baixo sinal OCT, agora veremos sua detecção e manuseio. Implementar processos de detecção e manuseio é importante para obter medidas precisas de não-perfusão, e assim melhorar a repetibilidade de medições.

Como ilustrado na seção anterior (Figura 29-A), artefatos de baixo sinal OCT podem ser difíceis de detectar usando apenas as projeções OCTA *en face*. Propõe-se aqui métodos que usam dados do conjuntos de OCTA e OCT (estrutural) para identificar artefatos *low signal*.

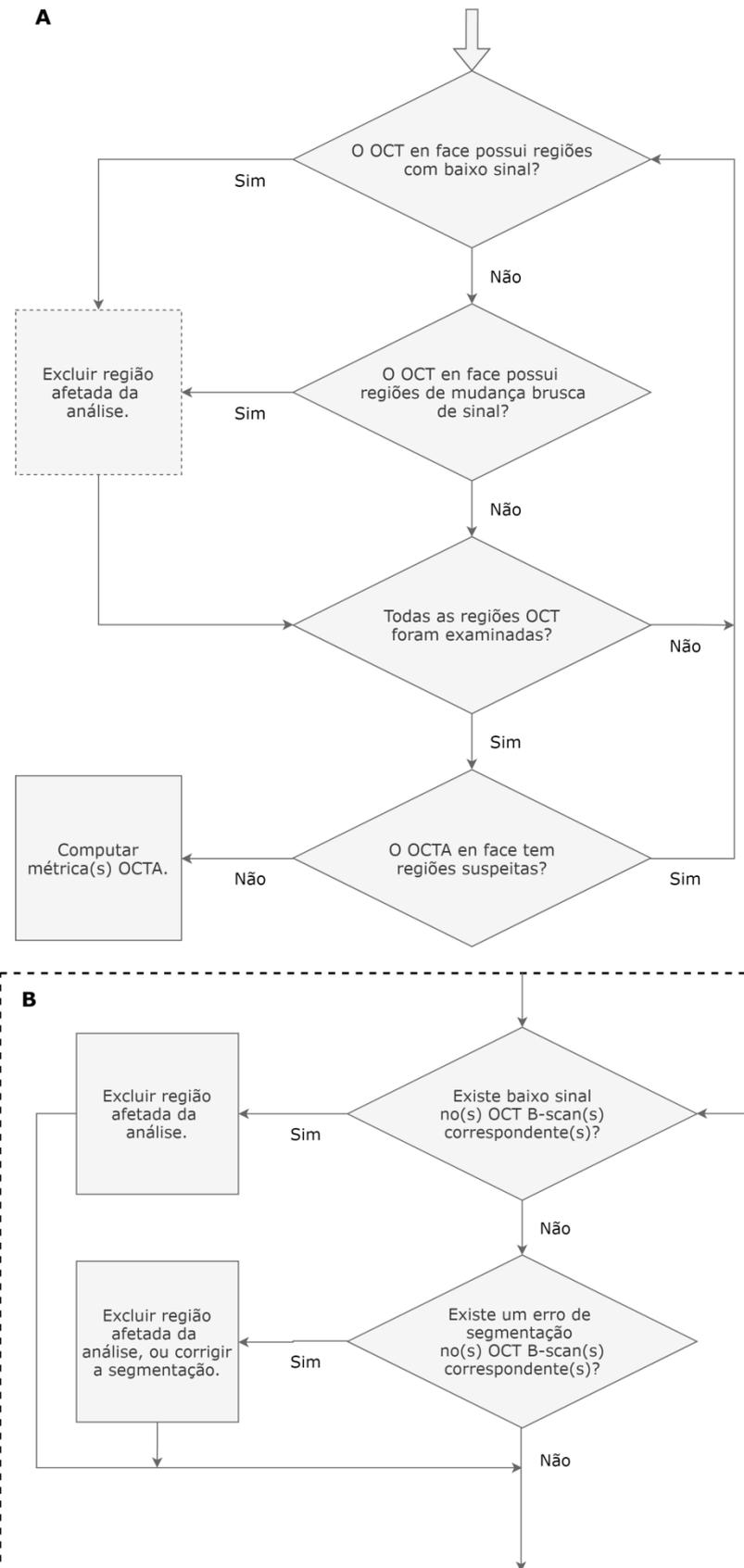
#### ***Protocolo para Detecção de Artefatos***

Pelo discutido até aqui, é nítido que artefatos por conta de baixo sinal OCT são intrínsecos aos dados, e complicam a interpretação de dados angiográficos subsequentes. É impossível eliminar totalmente a possibilidade destes artefatos, inclusive por conta da aplicação clínica (foco deste estudo), já que o paciente tem influência direta na qualidade de dados obtidos. Assim, o entendimento, prevenção e gerenciamento de artefatos no OCTA *widefield* são críticos para alcançar medidas quantitativas confiáveis e, conseqüentemente, serão parte integrante dos estudos longitudinais usando o OCTA para avaliar a progressão de

doenças e / ou respostas à terapia. Assim, este estudo oferece uma sugestão de protocolo de melhores práticas para avaliação e identificação de artefatos em dados OCT/OCTA *widefield*, expresso como um fluxograma na Figura 31. As diferentes etapas para revisão de dados nele contidas serão discutidas a seguir.

### ***Método do Corte Transversal para Detecção de Artefatos***

No método do corte transversal, dados OCT são revisados com base em visualização B-scan-por-B-scan (também chamada de *fly through*). Regiões de baixo sinal OCT são claramente visíveis com B-scans estruturais e, se as linhas de segmentação são sobrepostas nos B-scans, a revisão de imagens do corte transversal permite que erros de segmentação sejam facilmente identificados. A limitação do método do corte transversal é que uma meticulosa análise de B-scan-por-B-scan consome muito tempo, já que o volume de dados é composto por centenas de imagens. Contudo, um rápido *fly-through* nos B-scans pode ser útil para detectar erros grosseiros. Uma limitação adicional da revisão do corte transversal é que este não permite uma comparação direta de quaisquer duas regiões que não sejam contidas no mesmo B-scan. Assim, pode ser difícil obter um entendimento (interpretação) global dos dados, ou comparar intensidades de sinal OCT através diferentes regiões de volume. Ainda assim, um *fly-through* pelos B-scans é, talvez, a abordagem mais simples e confiável para identificação de artefatos em bases de dados OCT volumétricos.



**Figura 31** - Fluxograma detalhando o protocolo de boas práticas sugerido para minimizar o impacto de artefatos em medidas de OCTA. A área pontilhada em B substitui a caixa pontilhada em A, caso o método ortoplano (discutido a seguir) esteja disponível.

### ***Método En Face para Detecção de Artefatos***

No método *en face*, dados OCT são revisados por inspeção de uma projeção *en face* dos dados OCT. Em geral, a projeção OCT *en face* pode ser formada usando diferentes contornos daqueles usados para formar a imagem OCTA *en face*. Porém, usar os mesmos contornos facilita a detecção de artefatos de segmentação e, por isso, foi o método escolhido nesse estudo.

Como no método do corte transversal, regiões de baixo sinal OCT são facilmente identificadas na projeção estrutural *en face*. Artefatos de segmentação causados por baixos sinais OCT, porém, são mais sutis: embora esses artefatos sejam causados por *low signal*, eles não necessariamente aparecem como baixo sinal na projeção *en face*. Em particular, uma imagem OCT *en face* é formada projetando-se os dados entre dois limites (contornos) segmentados (ver Figura 28), erros de segmentação podem causar a inclusão de voxels que estão fora das camadas de interesse, ou exclusão errônea de voxels que estão dentro das camadas de interesse. Portanto, erros de segmentação podem produzir uma variedade (alto contraste, baixo contraste, ruído granular, entre outros) de tipos de artefato na correspondente projeção OCTA *en face*. Porém, erros de segmentação possuem uma característica em comum: eles geram uma mudança abrupta de sinal na projeção estrutural *en face*. Em particular, indo de uma região de segmentação correta para uma região de segmentação incorreta significa que os voxels incluídos (ou excluídos) na projeção mudam abruptamente, assim gerando uma clara descontinuidade na imagem OCT *en face*. Um exemplo de detecção de artefato de segmentação *en face* é mostrado na Figura 30.

Com o método *em face*, um volume inteiro pode ser resumido em uma única imagem (projeção), acelerando a revisão; ainda, uma imagem global dos dados pode ser formada, permitindo que dados de diferentes B-scans possam ser comparados. A desvantagem primária da análise *en face* é que, ao contrário da análise do corte transversal, pode ser difícil distinguir entre artefatos de segmentação e de limiarização. Adicionalmente, o método *en face* não facilita a correção de erros de segmentação, apenas a sua identificação.

O software para identificação de não-perfusão desenvolvido nesta tese oferece o método *en face* para detecção de artefatos. O método *en face* foi

escolhido, ao invés dos métodos ortoplano (discutido a seguir) e do corte transversal, pela facilidade com a qual dados *en face* podem ser exportados de sistemas comerciais (a maioria dos sistemas não facilita a exportação de conjuntos volumétricos de dados, apenas as projeções).

### **O Método Ortoplano de Detecção de Artefatos**

O método ortoplano, que é utilizado comumente na radiologia para revisão de dados de tomografia computadorizada (CT) e imageamento por ressonância magnética (MRI), é uma combinação dos métodos do corte transversal e *en face*. Visualização geral do ortoplano envolve observar os dados em três planos ortogonais de maneira co-registrada (i.e., a mesma seção de dados é observada nos três planos), porém, como nem sempre esta visualização é possível em sistemas OCT comerciais, considera-se aqui uma combinação de uma única imagem *en face* (como na seção anterior) e um conjunto de B-scans correspondentes.

O método do ortoplano, então, utiliza o método *en face* para marcar regiões de interesse – nomeadamente regiões de baixo sinal OCT, ou regiões que possuem mudanças abruptas do sinal OCT – e então utilizar o método do corte transversal para analisar tais regiões de interesse. Comparado ao método *en face*, a revisão do ortoplano permite que artefatos de segmentação sejam distinguidos de artefatos de *thresholding* e também facilita a correção de erros de segmentação. Comparado ao método do corte transversal, a identificação *en face* inicial de regiões suspeitas reduz drasticamente a quantidade de dados a ser analisada pelo corte transversal, acelerando o processo. A Figura 30 é um exemplo de aplicação do método ortoplano.

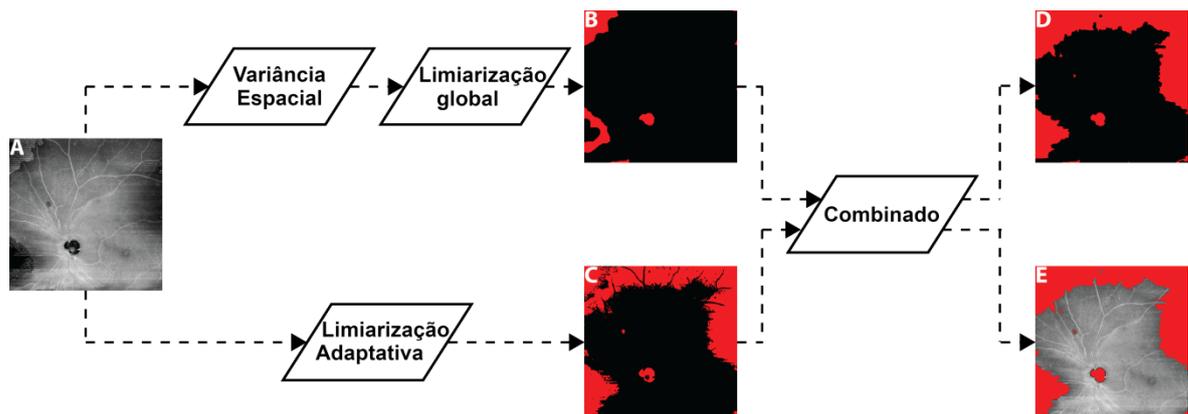
### **Algoritmo simples para Detecção Automatizada de Artefatos**

Embora os métodos *en face* e ortoplano sejam mais rápidos que o método do corte transversal, revisão manual de imagens continua indesejada em várias situações. Além disso, métodos manuais são inerentemente influenciados por variabilidade de avaliador – o que é qualificado como “baixo sinal” para um avaliador pode não ser para outro. Por tais razões, é importante desenvolver

métodos automáticos para detecção de artefatos, ainda que para guiar e estabelecer um patamar comum aos avaliadores. Por fim, neste estudo, propõe-se um algoritmo simples, prova de conceito, para detectar automaticamente artefatos OCTA *widefield*. Novamente, pela dificuldade de exportação de dados volumétricos na maioria dos sistemas comerciais, o algoritmo será baseado no método *en face* de dados OCT estruturais.

Com referência à Figura 30-B, este algoritmo detecta artefatos de baixo sinal OCT usando uma estratégia dupla, paralela, de identificar (1) regiões que possuem sinais OCT com grande variância espacial, e (2) regiões de baixo sinal OCT. A lógica para identificar regiões de grande variância espacial é que, como discutido previamente, são propensas a corresponder com artefatos de segmentação, devido às mudanças abruptas nos valores dos pixels. A lógica para identificar regiões de baixo sinal OCT é sua associação com artefatos de limiarização – e, algumas vezes, com artefatos de segmentação. Para (1), utiliza-se uma abordagem semelhante àquela empregada no algoritmo para identificação de não-perfusão, com uma janela 9 x 9 pixels para cálculo da variância. Em seguida, uma limiarização é aplicada, para que apenas pixels com valores de variância acima de um limite empiricamente determinado sejam considerados. Para (2) é realizada uma limiarização adaptativa, em que o valor limite é determinado em relação ao histograma da imagem, para que regiões de baixo sinal sejam determinadas com base na distribuição de intensidades da imagem sendo analisada. Os resultados de (1) e (2) são combinados para montar a máscara de regiões consideradas como artefatos. O fluxo desse algoritmo é ilustrado na Figura 32.

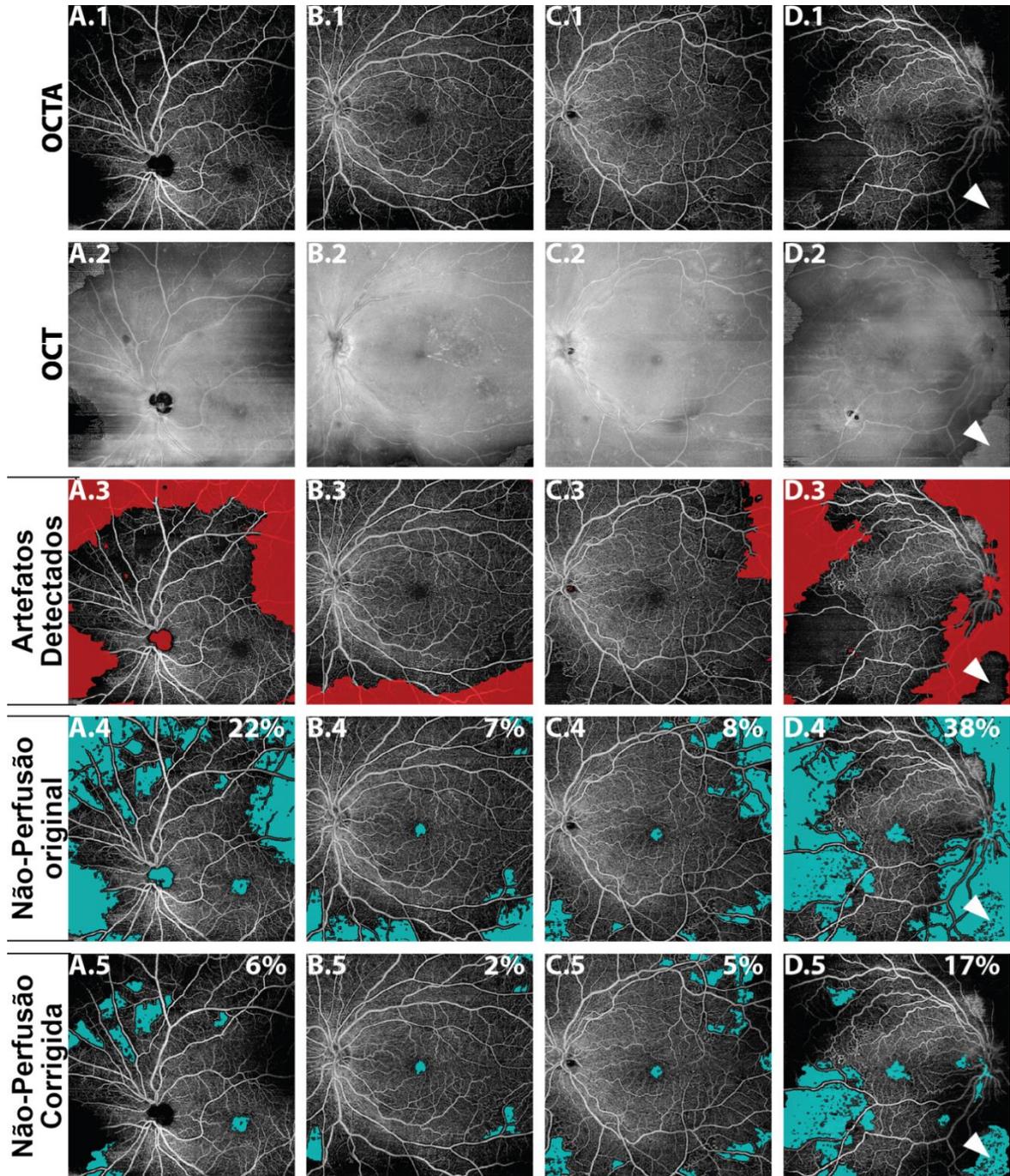
Exemplos de detecção automática de artefatos são mostrados na Figura 33. PANP's foram computados usando o algoritmo desenvolvido anteriormente.



**Figura 32** - Fluxograma para detecção automática de artefatos com baixo sinal de OCT. (A) Imagem *en face* OCT de entrada. (B) Máscara de variância para detectar erros de segmentação, calculada com janela de 9 pixels  $\times$  9 pixels e, em seguida, binarizando a imagem resultante usando um limiar determinado empiricamente. Etapas morfológicas adicionais (fechamento e erosão) são usadas para remover regiões espúrias. (C) Máscara de baixo sinal OCT, formada por uma limiarização adaptativa da imagem da OCT de entrada. Em particular, um limite dinâmico (janela de 3 pixels  $\times$  3 pixels) é calculado em relação à intensidade média da imagem OCT. (D) Saída do algoritmo: máscara identificando regiões de artefato, formada pela combinação das máscaras dos painéis (B, C); novamente, processamento morfológico (erosão) é usado para remover regiões espúrias. (E) Sobreposição da máscara de artefato de saída com imagem OCT *en face* de entrada.

Finalmente, deve-se notar que o algoritmo proposto é preliminar e simplista, e deve ser usado como um guia para a identificação de artefatos. Percebem-se algumas de suas limitações: o falso-negativo incorreto mostrado na coluna D (seta branca); e a discrepância entre a medida PANP corrigida automaticamente de 6% (para o caso da Figura 33- A.5) e a medida PANP corrigida manualmente de 13% para o mesmo caso (Figura 29). Vale ressaltar que esta última pode não ser de todo uma limitação: os sinais baixos de OCT induzidos por *vignetting* podem produzir uma gama contínua de efeitos, desde apenas uma ligeira redução do sinal OCT até a completa ausência de sinal. Como tal, normalmente não há delimitação clara entre regiões de sinal baixo e regiões com sinal suficiente; ao contrário, o avaliador usa seu julgamento para demarcar uma linha de transição. Assim, espera-se que diferentes avaliadores escolham diferentes delineamentos, resultando em diferentes regiões excluídas. Embora o algoritmo automático não tenha escolhido o mesmo delineamento que o avaliador traçou manualmente - o algoritmo não foi projetado para fazê-lo -, ele será sempre consistente em sua escolha, que é uma das vantagens da detecção automática de artefatos. Entretanto, ressalta-se, com o final deste estudo, que independente da forma de

deteção escolhida, o manuseio e análise de artefatos são imprescindíveis para obtenção de resultados confiáveis em *widefield* OCT/OCTA.



**Figura 33** - Exemplos de detecção automática de artefato. Todas as imagens são projeções totais da retina, com FOV de 12 mm x 12 mm. Coluna (A), paciente de 68 anos, com RD-NP leve; mesmo olho da Figura 29. Coluna (B), 74 anos, com RD-NP grave. Coluna (C), 54 anos, com RD-NP grave. Coluna (D) Olho direito do mesmo paciente da coluna (C), RDP. Linha 1: OCTA *en face* da vasculatura da retina. Linha 2: imagem OCT *en face* correspondente. Linha 3: Artefatos detectados automaticamente, mostrados em vermelho. Linha 4: Áreas de não-perfusão não corrigidas. Linha 5, áreas corrigidas de não-perfusão. Os PANP's estão listados no canto superior direito de cada painel, nas linhas 4 e 5. A seta branca na coluna (D) aponta para uma região que foi incorretamente classificada pelo algoritmo como livre de artefatos (ou seja, falso negativo).

## CONCLUSÕES

Esta tese visou demonstrar que a técnica de OCT possui ferramentas de análise adequadas não apenas a visualizações morfológicas de tecidos biológicos, mas também a informações fisiológicas que podem ser utilizadas para caracterizar ou identificar patologias. Em especial, o presente estudo voltou sua atenção à aplicação destas análises em doenças relacionadas à Diabete Mellitus.

Durante o primeiro dos estudos aqui apresentados, foi possível confirmar a sensibilidade do OCT para alterações glicêmicas no sangue *in vitro*, através de estatísticas espaciais e temporais, um resultado inédito na literatura. Resultados de ambas as técnicas apontaram boa correlação com a concentração de glicose, apesar de uma perda de resolução ter sido observada para análise de coeficiente de atenuação sob forte influência de múltiplos retroespalhamentos. A maior causa das respostas obtidas com o coeficiente de atenuação é o choque osmótico, enquanto que as medidas de speckle dependem apenas do movimento dos eritrócitos, e apresentam resultados consistentes mesmo para o sangue misturado com SSI. É notório que existem diversas dificuldades para a aplicação *in vivo*, como movimentos respiratórios, que fazem a imagem se decorrelacionar, e a variabilidade do fluxo ao longo do tempo. Mas, estes resultados *ex vivo* servem de base para fortalecer a viabilidade e fornecer parâmetros iniciais para as referidas aplicações. Isto possibilitaria uma eventual abordagem confiável e não-invasiva que trará mais conforto e comodidade aos pacientes.

Em contrapartida, a técnica para quantificação de áreas isquêmicas em olhos com retinopatia diabética já foi aplicada a imagens de pacientes humanos e teve sua eficácia comprovada pelos resultados. Portanto, para a área oftalmológica, este estudo possibilitou a criação de uma técnica diagnóstica já disponível para uso clínico - uso este que segue sendo feito pelo grupo de colaboradores do MIT e do New England Eye Center, em Boston. Esta análise permite ao usuário identificar o estágio de progressão da RD, e indicar novos exames ou tratamentos, de maneira indolor ao paciente. Adicionalmente, a análise da distribuição de áreas isquêmicas permitiu nova compreensão sobre a origem da RD, e como ela pode estar associada a uma progressão da zona arterial para a zona venosa. Estas revelações, se confirmadas com estudos

adicionais, permitirão melhorar ainda mais a precisão diagnóstica desta retinopatia, mesmo em outros equipamentos que não o OCT.

Contudo, foi demonstrado que estas métricas baseadas em OCTA devem ser analisadas cuidadosamente, em especial ao utilizarmos imagens de campo largo para o OCT, já que uma série de complicações podem ocorrer, dando origem a regiões de baixo sinal nas imagens. Estas regiões geram artefatos nas imagens, o que pode influenciar na sua interpretação. Por isto, um estudo foi realizado para entender as origens destes artefatos e propor soluções e melhores práticas, para que as ferramentas aqui desenvolvidas possam ser utilizadas de forma confiável e reproduzível.

Finalmente, investigou-se como a autocorrelação de speckle do OCT pode fornecer informações de fluxo de maneira mais precisa. O novo estimador pode parecer apenas uma mudança simples em relação à técnica anteriormente desenvolvida, porém representa a diferença entre ser necessário calcular o vetor de autocorrelação inteiro, ou apenas seus dois primeiros pontos (atrasos 0 e 1), o que reduz drasticamente o tempo de computação necessário. Este estudo apresenta resultados com boa sensibilidade para diferenciação de fluxos, e investigações sobre a influência do número de amostras temporais na variância da média da autocorrelação devem ser realizadas em trabalhos futuros. Novos estudos permitirão definir de maneira mais precisa os parâmetros de amostragem necessários, e sua adaptação à protocolos clínicos – que, como demonstrado, é viável – e pode expandir a capacidade diagnóstica das demais técnicas descritas, associando a elas a velocidade de fluxo.

Conclui-se, portanto, que o OCT é uma ferramenta com grande potencial para melhorar a qualidade diagnóstica (e qualidade de vida) para pacientes com Diabetes Mellitus, em diversas de suas ramificações, e esta tese avançou o estado da arte para esta finalidade.

# PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

## *Artigos publicados em periódicos*

1. **DE PRETTO, LUCAS R.**; MOULT, E. M.; ALIBHAI, A. Y.; CARRASCO-ZEVALLOS, O.; CHEN, S.; LEE, B.; WITKIN, A. J.; BAUMAL, C.; REICHEL, E.; FREITAS, A. Z.; DUKER, J.; WAHEED, N. K.; FUJIMOTO, J. G.

Controlling for artifacts in widefield Optical Coherence Tomography Angiography measurements of Non-Perfusion Area. *Scientific Reports*, v.9, p.9096, 2019.

2. ISHIBAZAWA, A.; **DE PRETTO, LUCAS R.**; ALIBHAI, A. Y.; MOULT, ERIC M.; ARYA, M.; SOROUR, O.; MEHTA, N.; BAUMAL, CAROLINE R.; WITKIN, ANDRE J.; YOSHIDA, A.; DUKER, JAY S.; FUJIMOTO, JAMES G.; WAHEED, NADIA K.

Retinal Non-Perfusion Relationship to Arteries or Veins Observed on Widefield Optical Coherence Tomography Angiography in Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.60 (9), p.5339, 2019.

3. RAELE, MARCUS PAULO; **DE PRETTO, LUCAS R.**; DE ROSSI, WAGNER; VIEIRA, NILSON DIAS; Samad, R. E.

Focus Tracking System for Femtosecond Laser Machining using Low Coherence Interferometry. *Scientific Reports*, v.9, p.4167, 2019.

4. ALIBHAI, A. YASIN; **DE PRETTO, LUCAS R.**; MOULT, ERIC M.; OR, CHRIS; ARYA, MALVIKA; MCGOWAN, MITCHELL; CARRASCO-ZEVALLOS, OSCAR; LEE, BYUNGKUN; CHEN, SIYU; BAUMAL, CAROLINE R.; WITKIN, ANDRE J.; REICHEL, ELIAS; DE FREITAS, ANDERSON ZANARDI; DUKER, JAY S.; FUJIMOTO, JAMES G.; WAHEED, NADIA K.

Quantification Of Retinal Capillary Nonperfusion In Diabetics Using Wide-Field Optical Coherence Tomography Angiography. *Retina - The Journal Of Retinal And Vitreous Diseases*, published ahead of print, 2018.

5. BELINELLO-SOUZA, ESTÉFANI L.; ALVARENGA, LETÍCIA H.; LIMA-LEAL, CINTIA; ALMEIDA, PATRÍCIA; LEITE, CAROLINA GUIMARÃES; LIMA, TAIRINE R.; GODOY-MIRANDA, BIANCA; PREVIATI-OLIVEIRA, JHOSEPHER; **DE PRETTO, LUCAS R.**; DE FREITAS, ANDERSON ZANARDI; FERNANDES, ADJACI U.; LABAT MARCOS, RODRIGO; PRATES, RENATO A.

Antimicrobial photodynamic therapy combined to periodontal treatment: Experimental model. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v.18, p.275, 2017.

6. RAELE, MARCUS PAULO; **DE PRETTO, LUCAS R.**; ZECELL, DENISE MARIA

Soldering mask laser removal from printed circuit boards aiming copper recycling. *Waste Management*, v.68, p.475, 2017.

7. **DE PRETTO, LUCAS R.**; NOGUEIRA, GESSE E. C.; FREITAS, ANDERSON Z.

Microfluidic volumetric flow determination using optical coherence tomography speckle: An autocorrelation approach. *Journal of Applied Physics*, v.119, p.163105, 2016.

8. **DE PRETTO, LUCAS R.**; YOSHIMURA, TANIA MATEUS; RIBEIRO, MARTHA SIMÕES; ZANARDI DE FREITAS, ANDERSON.

Optical coherence tomography for blood glucose monitoring through spatial and temporal approaches. *Journal of Biomedical Optics*, v.21, p.086007, 2016.

### ***Trabalhos publicados em anais de eventos***

1. RAELE, M. P.; SAMAD, R. E.; FREITAS, A. Z.; **DE PRETTO, L. R.**; AMARAL, M. M.; VIEIRA JUNIOR, N. D.; WETTER, N. U.  
Backscattered light properties during femtosecond laser ablation and development of a dynamic interferometric focusing system In: SPIE LASE, 2018, San Francisco, CA.  
**High-Power Laser Materials Processing: Applications, Diagnostics, and Systems VII**, 2018.
2. **DE PRETTO, L. R.**; SAMAD, R. E.; DE ROSSI, W.; FREITAS, A. Z.  
Optical coherence tomography characterization of femtosecond laser manufactured microfluidic circuits In: SPIE BIOS, 2018, San Francisco, CA.  
**Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XVI**, 2018.
3. ALIBHAI, A. YASIN; **DE PRETTO, L. R.**; MOULT, E. M.; SCHOTTENHAMML, J.; OR, C.; ARYA, M.; MCGOWAN, M.; BAUMAL, C.; WITKIN, A. J.; DUKER, J.; FUJIMOTO, J. G.; WAHEED, N. K.  
Quantitative Analysis of Capillary Non-Perfusion in Diabetic Retinopathy using Widefield OCT-Angiography In: ARVO Annual Meeting, 2018, Honolulu, HI.  
**Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 2018.
4. RAELE, M. P.; **DE PRETTO, L. R.**; SAMAD, R. E.; FREITAS, A. Z.; DE ROSSI, W.; VIEIRA JUNIOR, N. D.; WETTER, N. U.  
Development of a dynamic interferometric focusing system for femtosecond laser machining In: SPIE LASE, 2017, San Francisco, CA.  
**Frontiers in Ultrafast Optics: Biomedical, Scientific, and Industrial Applications XVII**, 2017.
5. **DE PRETTO, L. R.**; YOSHIMURA, T. M.; RIBEIRO, M. S.; FREITAS, A. Z.  
Optical Coherence Tomography for blood glucose monitoring through signal attenuation In: SPIE BIOS, 2016, San Francisco, CA.  
**Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XX**, 2016.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Burden: mortality, morbidity and risk factors. In: ORGANIZATION, W. H. (Ed.). **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. Geneva: WHO Press, 2010. cap. 1, p.9-32.
- 2 DE PRETTO, L. R. **Desenvolvimento de um algoritmo otimizado para caracterização de fluxos microfluídicos utilizando padrões de speckle presentes no sinal de Tomografia por Coerência Óptica**. 2015. 124 (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- 3 HUANG, D. et al. OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY. **Science**, v. 254, n. 5035, p. 1178-1181, Nov 1991. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991GQ83400038 >.
- 4 FREITAS, A. Z. D.; AMARAL, M. M.; RAELE, M. P. Optical Coherence Tomography: Development and Applications. In: DUARTE, F. J. (Ed.). **Laser Pulse Phenomena and Applications**. Rijeka, Croácia: InTech, 2010.
- 5 RAELE, M. P. **Desenvolvimento de um sistema de tomografia por coerência óptica no domínio de Fourier sinsível á polarização e sua utilização na determinação das matrizes de Mueller**. 2009. 84 (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- 6 THOMPSON, O. B.; ANDREWS, M. K. Tissue perfusion measurements: multiple-exposure laser speckle analysis generates laser Doppler-like spectra. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 2, p. 027015-1 - 027015-7, 2010/03/01 2010. ISSN 1083-3668. Disponível em: < [http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/data/Journals/BIOMEDO/22429/027015\\_1.pdf](http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/data/Journals/BIOMEDO/22429/027015_1.pdf) >.
- 7 SCHMITT, J. M.; XIANG, S. H.; YUNG, K. M. Speckle in optical coherence tomography. **Journal of Biomedical Optics**, v. 4, n. 1, p. 95-105, Jan 1999. ISSN 1083-3668. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000082183900014 >.
- 8 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preventing Chronic Diseases: A vital Investment**. WHO Press, 2005. 200 ISBN 92 4 156300 1.
- 9 FEDERATION, I. D. **IDF Diabetes Atlas**. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation: 142 p. 2015.
- 10 DE PRETTO, L. R. et al. Optical coherence tomography for blood glucose monitoring in vitro through spatial and temporal approaches. **Journal of Biomedical Optics**, v. 21, n. 8, p. 086007, 2016. ISSN 1083-3668.
- 11 SCHMITT, J. M. Optical coherence tomography (OCT): A review. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 5, n. 4, p. 1205-1215, Jul-Aug 1999. ISSN 1077-260X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000083257800044 >.

- 12 WANG, R. K. Signal degradation by multiple scattering in optical coherence tomography of dense tissue: a Monte Carlo study towards optical clearing of biotissues. **Physics in Medicine and Biology**, v. 47, n. 13, p. 19, 2002.
- 13 POPESCU, D. P. et al. Propagation properties of 1300-nm light in blood-saline mixtures determined through optical coherence tomography. **Proc. SPIE**, v. 6864, p. 686408-686408-9, 2008.
- 14 TUCHIN, V. V.; XU, X.; WANG, R. K. Dynamic optical coherence tomography in studies of optical clearing, sedimentation, and aggregation of immersed blood. **Appl Opt**, v. 41, n. 1, p. 258-71, Jan 1 2002. ISSN 0003-6935 (Print)0003-6935. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 15 POPESCU, D. P. et al. Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images. **Journal of Biomedical Optics**, v. 13, n. 5, p. 8, Sep-Oct 2008. ISSN 1083-3668. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261764900062 >.
- 16 DE PRETTO, L. R.; NOGUEIRA, G. E. C.; FREITAS, A. Z. Microfluidic volumetric flow determination using optical coherence tomography speckle: An autocorrelation approach. **Journal of Applied Physics**, v. 119, n. 16, p. 5, Apr 2016. ISSN 0021-8979. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000375929900005 >.
- 17 IRACE, C. et al. Blood Viscosity in Subjects With Normoglycemia and Prediabetes. **Diabetes Care**, v. 37, n. 2, p. 488-492, Feb 2014.
- 18 BEDNOV, A. A. et al. Monitoring glucose in vivo by measuring laser-induced acoustic profiles. **Proc. SPIE**, v. 3916, n. Biomedical Optoacoustics 9, p. 9-18, 2000. Disponível em: < [http://proceedings.spiedigitallibrary.org/data/Conferences/SPIEP/37121/9\\_1.pdf](http://proceedings.spiedigitallibrary.org/data/Conferences/SPIEP/37121/9_1.pdf) >.
- 19 KINNUNEN, M. et al. Effect of the size and shape of a red blood cell on elastic light scattering properties at the single-cell level. **Biomed Opt Express**, v. 2, n. 7, p. 1803-14, Jul 1 2011. ISSN 2156-7085. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1364/boe.2.001803> >.
- 20 KITABCHI, A. E. et al. Hyperglycemic Crises in Adult Patients with Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 7, p. 1335-1343, Jul 2009. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267878300042 >.
- 21 ULLAH, H. et al. M-mode swept source optical coherence tomography for quantification of salt concentration in blood: An in vitro study. **Laser Physics**, v. 22, n. 5, p. 1002-1010, May 2012. ISSN 1054-660X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303868600040 >.
- 22 MARIAMPILLAI, A. et al. Speckle variance detection of microvasculature using swept-source optical coherence tomography. **Optics Letters**, v. 33, n. 13, p. 1530-1532, 2008-07-01 2008. Disponível em: < <http://www.opticsinfobase.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-33-13-1530> >.
- 23 LEE, J. et al. Dynamic light scattering optical coherence tomography. **Optics Express**, v. 20, n. 20, p. 22262-77, Sep 24 2012 2012. ISSN 1094-4087. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1364/oe.20.022262> >.

- 24 LIU, X. et al. Quantitative transverse flow measurement using optical coherence tomography speckle decorrelation analysis. **Optics Letters**, v. 38, n. 5, p. 805-807, Mar 2013. ISSN 0146-9592. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315602600070 >.
- 25 URIBE-PATARROYO, N.; VILLIGER, M.; BOUMA, B. E. Quantitative technique for robust and noise-tolerant speed measurements based on speckle decorrelation in optical coherence tomography. **Optics Express**, v. 22, n. 20, p. 24411-29, 2014. ISSN 1094-4087 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1364/oe.22.024411> >.
- 26 WEISS, N.; VAN LEEUWEN, T. G.; KALKMAN, J. Localized measurement of longitudinal and transverse flow velocities in colloidal suspensions using optical coherence tomography. **Physical Review E**, v. 88, n. 4, p. 7, Oct 2013. ISSN 1539-3755. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000326163800006 >.
- 27 POPOV, I.; WEATHERBEE, A.; VITKIN, I. A. Statistical properties of dynamic speckles from flowing Brownian scatterers in the vicinity of the image plane in optical coherence tomography. **Biomedical Optics Express**, v. 8, n. 4, p. 2004-2017, Apr 2017. ISSN 2156-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000400499300001 >.
- 28 WANG, Y.; WANG, R. Autocorrelation optical coherence tomography for mapping transverse particle-flow velocity. **Optics Letters**, v. 35, n. 21, p. 4, 2010-11-01 2010. Disponível em: < <http://www.opticsinfobase.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-35-21-3538> >.
- 29 KASAI, C. et al. Real-Time Two-Dimensional Blood Flow Imaging Using an Autocorrelation Technique. **Sonics and Ultrasonics, IEEE Transactions on**, v. 32, n. 3, p. 458-464, 1985. ISSN 0018-9537.
- 30 PLONER, S. B. et al. TOWARD QUANTITATIVE OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY ANGIOGRAPHY Visualizing Blood Flow Speeds in Ocular Pathology Using Variable Interscan Time Analysis. **Retina-the Journal of Retinal and Vitreous Diseases**, v. 36, n. 12, p. S118-S126, Dec 2016. ISSN 0275-004X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000391946700013 >.
- 31 CHEN, S. Y.; YI, J.; ZHANG, H. F. Measuring oxygen saturation in retinal and choroidal circulations in rats using visible light optical coherence tomography angiography. **Biomedical Optics Express**, v. 6, n. 8, p. 2840-2853, Aug 2015. ISSN 2156-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000359006000010 >.
- 32 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. 2016. Disponível em: < [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf) >. Acesso em: August 15, 2016.
- 33 YAMANA, Y. et al. Early Signs of Diabetic Retinopathy By Fluorescein Angiography. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 27, p. 218-227, 1983. ISSN 0021-5155 (Print) 0021-5155 (Linking).

- 34 SALZ, D. A. et al. Select Features of Diabetic Retinopathy on Swept-Source Optical Coherence Tomographic Angiography Compared With Fluorescein Angiography and Normal Eyes. **JAMA ophthalmology**, 2016.
- 35 HWANG, T. S. et al. Automated Quantification of Capillary Nonperfusion Using Optical Coherence Tomography Angiography in Diabetic Retinopathy. **JAMA Ophthalmol**, p. 1-7, Jan 21 2016. ISSN 2168-6173 (Electronic) 2168-6165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26795548> >.
- 36 SCHOTTENHAMML, J. et al. An Automatic, Intercapillary Area-Based Algorithm For Quantifying Diabetes-Related Capillary Dropout Using Optical Coherence Tomography Angiography. **Retina (Philadelphia, Pa.)**, 2016.
- 37 SHIMIZU, K.; KOBAYASHI, Y.; MURAOKA, K. Midperipheral fundus involvement in diabetic retinopathy. **Ophthalmology**, v. 88, n. 7, p. 601-12, Jul 1981. ISSN 0161-6420 (Print) 0161-6420.
- 38 NIKI, T.; MURAOKA, K.; SHIMIZU, K. Distribution of capillary nonperfusion in early-stage diabetic retinopathy. **Ophthalmology**, v. 91, n. 12, p. 1431-9, Dec 1984. ISSN 0161-6420 (Print) 0161-6420.
- 39 SILVA, P. S. et al. Diabetic Retinopathy Severity and Peripheral Lesions Are Associated with Nonperfusion on Ultrawide Field Angiography. **Ophthalmology**, v. 122, n. 12, p. 2465-72, Dec 2015. ISSN 0161-6420.
- 40 HIRANO, T. et al. Wide-field en face swept-source optical coherence tomography angiography using extended field imaging in diabetic retinopathy. **Br J Ophthalmol**, Nov 29 2017. ISSN 0007-1161.
- 41 ALIBHAI, A. Y. et al. Quantification Of Retinal Capillary Nonperfusion In Diabetics Using Wide-Field Optical Coherence Tomography Angiography. **Retina**, v. 40, n. 3, p. 412-420, 2020. ISSN 0275-004X. Disponível em: < [https://journals.lww.com/retinajournal/Fulltext/publishahead/QUANTIFICATION\\_OF\\_RETINAL\\_CAPILLARY\\_NONPERFUSION.96268.aspx](https://journals.lww.com/retinajournal/Fulltext/publishahead/QUANTIFICATION_OF_RETINAL_CAPILLARY_NONPERFUSION.96268.aspx) >.
- 42 Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs--an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. **Ophthalmology**, v. 98, n. 5 Suppl, p. 786-806, May 1991. ISSN 0161-6420 (Print) 0161-6420.
- 43 AGEMY, S. A. et al. Retinal Vascular Perfusion Density Mapping Using Optical Coherence Tomography Angiography in Normals and Diabetic Retinopathy Patients. **Retina**, v. 35, n. 11, p. 2353-63, Nov 2015. ISSN 1539-2864 (Electronic) 0275-004X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26465617> >.
- 44 KIM, A. Y. et al. Quantifying Microvascular Density and Morphology in Diabetic Retinopathy Using Spectral-Domain Optical Coherence Tomography Angiography. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 57, p. OCT362-70, 2016.
- 45 ALIBHAI, A. Y. et al. Quantifying Microvascular Changes Using OCT Angiography in Diabetic Eyes without Clinical Evidence of Retinopathy. **Ophthalmology**

- Retina**, ISSN 2468-7219. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.oret.2017.09.011> >. Acesso em: 2017/12/01.
- 46 DUH, E. J.; SUN, J. K.; STITT, A. W. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. **JCI Insight**, v. 2, n. 14, Jul 20 2017. ISSN 2379-3708 (Electronic)  
2379-3708 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28724805> >.Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5518557/pdf/jciinsight-2-93751.pdf> >.
- 47 ASHTON, N. Arteriolar involvement in diabetic retinopathy. **Br J Ophthalmol**, v. 37, n. 5, p. 282-92, May 1953. ISSN 0007-1161 (Print)  
0007-1161 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13042023> >.Disponível em: < <http://bjo.bmj.com/content/bjophthalmol/37/5/282.full.pdf> >.
- 48 ASHTON, N. Vascular basement membrane changes in diabetic retinopathy. Montgomery lecture, 1973. **Br J Ophthalmol**, v. 58, n. 4, p. 344-66, Apr 1974. ISSN 0007-1161 (Print)  
0007-1161 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4138036> >.Disponível em: < <http://bjo.bmj.com/content/bjophthalmol/58/4/344.full.pdf> >.
- 49 GARNER, A. Histopathology of diabetic retinopathy in man. **Eye (Lond)**, v. 7 ( Pt 2), p. 250-3, 1993. ISSN 0950-222X (Print)  
0950-222X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7607344> >.Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/eye199358.pdf> >.
- 50 STITT, A. W. et al. Diabetic retinopathy: quantitative variation in capillary basement membrane thickening in arterial or venous environments. **Br J Ophthalmol**, v. 78, n. 2, p. 133-7, Feb 1994. ISSN 0007-1161 (Print)  
0007-1161 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8123622> >.Disponível em: < <http://bjo.bmj.com/content/bjophthalmol/78/2/133.full.pdf> >.
- 51 STITT, A. W.; GARDINER, T. A.; ARCHER, D. B. Histological and ultrastructural investigation of retinal microaneurysm development in diabetic patients. **Br J Ophthalmol**, v. 79, n. 4, p. 362-7, Apr 1995. ISSN 0007-1161 (Print)  
0007-1161 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7742285> >.Disponível em: < <http://bjo.bmj.com/content/bjophthalmol/79/4/362.full.pdf> >.
- 52 GARDINER, T. A. et al. Arteriolar involvement in the microvascular lesions of diabetic retinopathy: implications for pathogenesis. **Microcirculation**, v. 14, n. 1, p. 25-38, Jan 2007. ISSN 1073-9688 (Print)  
1073-9688 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17365659> >.Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1080/10739680601072123/abstract> >.
- 53 CURTIS, T. M.; GARDINER, T. A.; STITT, A. W. Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis? **Eye (Lond)**, v. 23, n. 7, p. 1496-508, Jul 2009. ISSN 1476-5454 (Electronic)  
0950-222X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19444297> >.Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/eye2009108.pdf> >.
- 54 ISHIBAZAWA, A. et al. Retinal Non-Perfusion Relationship to Arteries or Veins Observed on Widefield Optical Coherence Tomography Angiography in

Diabetic Retinopathy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 60, n. 9, 2019.

55 MASE, T. et al. Radial Peripapillary Capillary Network Visualized Using Wide-Field Montage Optical Coherence Tomography Angiography. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 57, n. 9, p. OCT504-10, Jul 01 2016. ISSN 1552-5783 (Electronic) 0146-0404 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27454659> >.

56 COSCAS, G. et al. Optical Coherence Tomography Angiography in Healthy Subjects and Diabetic Patients. **Ophthalmologica**, v. 239, n. 2-3, p. 61-73, 2018. ISSN 1423-0267 (Electronic) 0030-3755 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29268269> >.Disponível em: < <https://www.karger.com/Article/Pdf/485323> >.

57 BALARATNASINGAM, C. et al. Comparisons Between Histology and Optical Coherence Tomography Angiography of the Periarterial Capillary-Free Zone. **Am J Ophthalmol**, v. 189, p. 55-64, May 2018. ISSN 1879-1891 (Electronic) 0002-9394 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29470970> >.

58 MAURER, C.; QI, R.; RAGHAVAN, V. A linear time algorithm for computing exact Euclidean distance transforms of binary images in arbitrary dimensions. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, v. 25, n. 2, p. 265-270, Feb 2003. Disponível em: < <https://ieeexplore.ieee.org/document/1177156/> >.

59 JOUSSEN, A. M. et al. Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. **Am J Pathol**, v. 158, n. 1, p. 147-52, Jan 2001. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11141487> >.Disponível em: < [http://ac.els-cdn.com/S0002944010639521/1-s2.0-S0002944010639521-main.pdf?\\_tid=da80606944c719f3b850d8850d66f950&acdnat=1334918447\\_9cfbc e5d83cc3f06312427dc3f011494](http://ac.els-cdn.com/S0002944010639521/1-s2.0-S0002944010639521-main.pdf?_tid=da80606944c719f3b850d8850d66f950&acdnat=1334918447_9cfbc e5d83cc3f06312427dc3f011494) >.

60 JOUSSEN, A. M. et al. Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo. **Am J Pathol**, v. 160, n. 2, p. 501-9, Feb 2002. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839570> >.Disponível em: < [http://ac.els-cdn.com/S0002944010648699/1-s2.0-S0002944010648699-main.pdf?\\_tid=0d4c000c-62d6-11e2-8ee2-00000aab0f27&acdnat=1358668406\\_fd056c3772173eea203223968248eadb](http://ac.els-cdn.com/S0002944010648699/1-s2.0-S0002944010648699-main.pdf?_tid=0d4c000c-62d6-11e2-8ee2-00000aab0f27&acdnat=1358668406_fd056c3772173eea203223968248eadb) >.

61 KERN, T. S. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. **Exp Diabetes Res**, v. 2007, p. 95103, 2007. ISSN 1687-5303 (Electronic) 1687-5214 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18274606> >.Disponível em: < <http://downloads.hindawi.com/journals/edr/2007/095103.pdf> >.

62 TSUJIKAWA, A.; OGURA, Y. Evaluation of leukocyte-endothelial interactions in retinal diseases. **Ophthalmologica**, v. 227, n. 2, p. 68-79, 2012. ISSN 1423-0267 (Electronic) 0030-3755 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21997258> >.Disponível em: < em: <

<http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Aktion=ShowPDF&ArtikelNr=000332080&Ausgabe=256753&ProduktNr=224269&filename=000332080.pdf> >.

- <sup>63</sup> LI, H. et al. Morphometry of the normal retinal periarteral capillary-free zone and changes during severe nonproliferative diabetic retinopathy. **Clin Hemorheol Microcirc**, Feb 23 2019. ISSN 1875-8622 (Electronic) 1386-0291 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30829616> >.
- <sup>64</sup> KOLB, J. P. et al. Ultra-widefield retinal MHz-OCT imaging with up to 100 degrees viewing angle. **Biomedical Optics Express**, v. 6, n. 5, p. 1534-1552, May 2015. ISSN 2156-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000353927100001 >.
- <sup>65</sup> DE PRETTO, L. R. et al. Controlling for Artifacts in Widefield Optical Coherence Tomography Angiography Measurements of Non-Perfusion Area. **Scientific Reports**, v. 9, p. 15, Jun 2019. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000472597100024 >.
- <sup>66</sup> POTSAID, B. et al. Ultrahigh speed Spectral/Fourier domain OCT ophthalmic imaging at 70,000 to 312,500 axial scans per second. **Optics Express**, v. 16, n. 19, p. 15149-15169, Sep 2008. ISSN 1094-4087. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259271900089 >.
- <sup>67</sup> COLE, E. D. et al. The Definition, Rationale, and Effects of Thresholding in OCT Angiography. **Ophthalmology Retina**, v. 1, n. 5, p. 435-447, 2017/09/01/ 2017. ISSN 2468-6530. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468653017300283> >.

---

---

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino**  
**Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000**  
**Fone/Fax(0XX11) 3133-8908**  
**SÃO PAULO – São Paulo – Brasil**  
**<http://www.ipen.br>**

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.**

---

---

---