



José Pedro Dias de Oliveira

# Deteção Não Invasiva da Diabetes Mellitus através das Alterações da Ecogenicidade do Segmento Anterior do Olho em Modelos Animais Usando Ultrassons de Alta Frequência

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Engenharia Biomédica

Setembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA





FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS  
E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

José Pedro Dias de Oliveira

# **Deteção Não Invasiva da Diabetes Mellitus através das Alterações da Ecogenicidade do Segmento Anterior do Olho em Modelos Animais Usando Ultrassons de Alta Frequência**

*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra  
para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção  
do grau de Mestre em Engenharia Biomédica*

Orientador:

Jaime B. Santos (DEEC - FCTUC)

Supervisor:

Miguel Caixinha (CEMUC - FCTUC)

Coimbra, 2016



Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com:

Departamento de Engenharia Electrotécnica e de Computadores  
(DEEC)

da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

*Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences*  
(IBILI)

Centro de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra  
(CEMUC)



Esta cópia da dissertação é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da dissertação e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the dissertation has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the dissertation and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.





*"God does not play dice with the universe"*

*Albert Einstein*



# Agradecimentos

O trabalho apresentado nesta dissertação não teria sido possível sem o apoio e colaboração de várias pessoas e instituições às quais dirijo os meus sinceros agradecimentos.

À minha família, particularmente aos meus pais, pelo incentivo e apoio incondicional, e por todos os sacrifícios em prol da minha formação pessoal e académica. A eles dedico este trabalho!

Ao meu orientador, Professor Doutor Jaime B. Santos, pela orientação científica, disponibilidade e por todo o apoio prestado durante o desenvolvimento de todo o projeto. Um agradecimento em especial por toda a revisão e críticas construtivas à dissertação, bem como pela partilha de conhecimento e experiência científica.

A Miguel Caixinha, pela amizade e pela excelência na orientação, pela sua total disponibilidade, pelo exemplo de dedicação, de ética, de trabalho e de sacrifício. Um agradecimento enorme pela partilha de conhecimento e pelo tempo dedicado a este projeto.

À Doutora Ana Raquel Santiago e Inês Aires, pela força com que abraçaram o projeto, pela disponibilidade, por todo o apoio prestado e pela boa disposição.

Ao Departamento de Engenharia Eletrotécnica e de Computadores da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, ao Centro de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra e ao Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem pelo apoio prestado na execução deste projeto.

À Margarida, pelo incentivo e apoio incondicional, pela paciência e compreensão nos últimos anos e por toda a ajuda prestada na realização desta dissertação.

Ao Marco por todo o incentivo, pela motivação, pela partilha das conquistas e pelos conselhos.

Por último, mas não menos importante, a todos os meus amigos, em particular aos que me acompanharam ao longo dos últimos 5 anos, que foram como uma segunda família. Pela partilha de bons momentos, pelo apoio nos menos bons.

A todos o meu muito obrigado.

*A special thank to Suren Manvelyan who gently gave in the cover photo from his collection "Your beautiful eyes".*



# Resumo

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica que afeta cerca de 9% da população adulta mundial. As alterações provocadas por esta doença incluem o aumento da concentração de glicose nos fluídos corporais, nomeadamente no sangue, e o aumento da concentração de glicose em células independentes de insulina como neurónios, provocando efeitos tóxicos e morte celular em neurónios periféricos. Estas alterações manifestam-se nos olhos num cenário de patologia através do aumento da espessura da córnea e da alteração do fluxo do humor aquoso.

A técnica por ultrassons pode ser utilizada na determinação da espessura da córnea e caracterização do humor aquoso, avaliando as suas propriedades acústicas, nomeadamente a atenuação.

Neste trabalho foram estudadas as alterações na córnea e humor aquoso provocadas pela DM, usando 12 ratos, divididos em dois grupos de 6 (controlo e estudo). A DM tipo 1 foi induzida no grupo de estudo com streptozotocina e a progressão da doença foi avaliada ao longo de 8 semanas. A análise dos efeitos da doença na córnea e humor aquoso foi realizada usando duas abordagens: ultrassons de alta frequência, através de duas sondas (20MHz e 50 MHz) e Tomografia de Coerência Ótica (OCT do inglês *Optical Coherence Tomography*).

Os resultados deste estudo confirmaram a tendência para o aumento da espessura da córnea em ratos diabéticos, verificando-se diferenças estatisticamente significativas nas medidas obtidas com 20 MHz e 50 MHz, entre a *baseline* e a semana 8, para o grupo de estudo ( $P < 0,001$ ). O coeficiente de atenuação acústica no humor aquoso mostrou tendência para o aumento em ratos diabéticos ( $P < 0,001$  obtido com 50MHz) e tendência para a manutenção nos ratos controlo. Os resultados obtidos através da segmentação das imagens obtidas por OCT permitiram a análise da dimensão relativa das camadas da córnea, demonstrando que o estroma foi a camada que mais contribuiu para o aumento da espessura da córnea no grupo de estudo.

O trabalho desenvolvido demonstrou que os ultrassons podem ser utilizados no estudo das alterações da córnea e humor aquoso provocadas pelos efeitos tóxicos da hiperglicemia em doentes com diabetes. A caracterização das alterações da ecogenicidade do polo anterior do olho em cenários de diabetes poderá conduzir à deteção precoce da doença e ao melhoramento o acompanhamento clínico do doente.



# Abstract

Diabetes Mellitus is a metabolic disease that affects about 9% of world adult population. The disease promotes an increase glucose concentration in blood and body fluids, changing their flow, as well as an increase in intracellular glucose concentration in insulin-independent cells, such as neurons, producing toxic effects and cellular death in peripheral neurons. Those alterations affect the eye in terms of the corneal thickness and the aqueous humor flow.

The ultrasound technique may be used to determine corneal thickness and characterize the aqueous humor, evaluating their acoustical properties as the propagation velocity and attenuation.

In the present study, the corneal and aqueous humor alteration in DM was measured in 12 rats, which were divided into two groups of 6 (control and study). Type 1 DM was induced in the study group and the alterations were followed over 8 weeks. The analysis of the disease effects in the cornea and aqueous humor was made using two approaches: ultrasounds of high frequencies by two probes of 20MHz and 50 MHz, and by OCT.

This study has confirmed the trend towards the increasing of corneal thickness in DM, showing statistically significant differences in the obtained measurements with both ultrasound probes between baseline and 8<sup>th</sup> week, in the study group ( $P < 0.001$ ). The aqueous humor acoustical attenuation coefficient also showed a tendency to increase in DM ( $P < 0.001$  obtained with 50MHz probe). The results obtained by OCT images segmentation have showed that stroma is the largest contributor to total corneal increasing in DM, based on the relative size of corneal layers.

The current study has showed the ultrasound technique can be used in study of the eye's anterior pole alterations promoted by hyperglycemia in DM. The determination of echogenicity changes in anterior pole of the eye in DM may allow diagnosing early stages of DM and a better monitoring of patients.





# Acrónimos

CCT	<i>Central Cornea Thickness</i>
csv	<i>Comma-Separated Values</i>
DM	Diabete Mellitus
DMT1	Diabete Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabete Mellitus Tipo 2
FFT	<i>Fast Fourier Transform</i>
PRF	<i>Pulse Repetition Frequency</i>
OCT	<i>Optical Coherence Tomography</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
px	Pixel / pixéis
ROI	<i>Region of Interest</i>
STZ	<i>Streptozotocina</i>
tiff	<i>Tagged Image File Format</i>
USB	<i>Universal Serial Bus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>



# Lista de Figuras

Figura 2.1 – Representação (esquerda) e corte histológico (direita) de um Ilhéu de Langerhans. Adaptado de [4].	8
Figura 2.2 - Mecanismo básico da estimulação de produção de insulina na célula- $\beta$ por aumento da concentração de glicose. Adaptado de [3]	9
Figura 2.3 - Distribuição global do número de casos de DM em 2015 e estimativa para 2040 [9].	10
Figura 2.4 - Patogénese da Diabetes Mellitus tipo 1. Adaptado de [10]	13
Figura 2.5 - Patogénese da Diabetes Mellitus. Adaptado de [10].	15
Figura 3.1 – Olho humano e cavidade orbitária [17].	19
Figura 3.2 – Anatomia do olho humano. Adaptado de [19].	20
Figura 3.3 – Microanatomia da córnea. Adaptado de [19]	21
Figura 3.4 – Camada celular do epitélio da córnea. Adaptado de [20].	22
Figura 3.5 – Microscopia da córnea posterior. Representação da parte posterior do estroma, da Membrana de Descemet e do Endotélio. Adaptado de [20].	23
Figura 3.6 – Mecanismo de manutenção da córnea saudável. Adaptado de [23].	24
Figura 3.7 – Representação esquemática da inervação da córnea. Adaptado de [25].	24
Figura 3.8 – Estruturas envolvidas na regulação do humor aquoso. Adaptado de [16].	26
Figura 4.1 - Esquematização do comportamento de uma onda que incide na interface entre dois meios. Adaptado de [27].	29
Figura 4.2 – Relação entre a resolução axial, a penetração e a frequência do transdutor. Adaptado de [31].	31
Figura 4.3 - Representação esquemática de uma linha de A-scan de um olho. Adaptado de [27].	33

Figura 4.4 - Representação esquemática de um B-scan de um olho. Adaptado de [27]. .....	33
Figura 6.1 - Equipamento para aquisição dos sinais de A-Scan.....	48
Figura 6.2 - Pulso característico da sonda de 20 MHz. ....	48
Figura 6.3 - Pulso característico da sonda de 50 MHz. ....	48
Figura 6.4 – Configuração experimental para aquisição de imagens OCT. ....	49
Figura 6.5 – Algoritmo usado para detecção automática das interfaces, cálculo da espessura da córnea e atenuação. ....	51
Figura 6.6 – Sinal A-Scan da sonda de 50MHz com representação da janela de pesquisa (verde) e do pulso de emissão (vermelho). ....	52
Figura 6.7 – Representação da janela em torno do máximo do sinal (vermelho) e limiar da detecção de máximos locais (magenta). ....	54
Figura 6.8 – Identificação dos máximos locais correspondentes às fronteiras da córnea. ....	54
Figura 6.9 – Representação da janela de pesquisa da fronteira do cristalino (vermelho) e limiar da detecção (verde). ....	55
Figura 6.10 – Tempo de voo entre fronteiras no domínio do tempo. ....	57
Figura 6.11 – Tempo de voo entre fronteiras no domínio da frequência. ....	57
Figura 6.12 – Seleção do sinal da fronteira anterior da córnea e do estroma no domínio do tempo para o cálculo do tempo de voo no domínio da frequência. ....	57
Figura 6.13 – Tempo de voo entre fronteiras no domínio da frequência. ....	57
Figura 6.14 – Sinal A-Scan da sonda de 20MHz com representação da janela de pesquisa (verde) e do pulso de emissão (vermelho). ....	59
Figura 6.15 – Sobreposição dos ecos correspondentes às fronteiras anterior e posterior da córnea. ....	60
Figura 6.16 – Representação da janela de pesquisa da fronteira do cristalino (vermelho). ....	61

Figura 6.17 – Algoritmo para segmentação das camadas da córnea .....	62
Figura 6.18 – Imagem original e identificação das áreas de informação. ....	63
Figura 6.19 – Resultado da binarização da região correspondente à escala.....	64
Figura 6.20 – Ilustração da identificação das barras com base nos pixéis brilhantes vizinhos. ....	64
Figura 6.21 – Coluna do ápex da córnea da imagem não filtrada. a) localização da coluna selecionada; b) perfil de intensidade da coluna. ....	65
Figura 6.22 – Coluna do ápex da córnea da imagem filtrada. a) localização da coluna selecionada; b) perfil de intensidade da coluna.....	65
Figura 6.23 – Representação da janela de pesquisa para localização do pixel da fronteira anterior da córnea. ....	67
Figura 6.24 – Pixéis selecionados para o ajuste polinomial da fronteira anterior da córnea.....	68
Figura 6.25 – Aproximação polinomial baseada nos pixéis da interface anterior da córnea. ....	68
Figura 6.26 – Representação da janela de pesquisa para localização do pixel da fronteira do estroma (vermelho) e zona de espalhamento dos brilhos da interface anterior da córnea (tracejado laranja).....	69
Figura 6.27 – Efeito de espalhamento nas fronteiras da córnea. ....	69
Figura 6.28 – Representação da janela de pesquisa para localização do pixel da fronteira posterior da córnea. ....	70
Figura 6.29 – Resultado final da segmentação.....	70
Figura 6.30 – Representação da medida da espessura das camadas.....	70
Figura 7.1 – Evolução da espessura total da córnea no grupo de controlo, obtida com sonda de 20MHz. .....	76
Figura 7.2 – Evolução da espessura total da córnea no grupo de estudo, obtida com sonda de 20MHz. .....	76

Figura 7.3 – Evolução da espessura total da córnea no grupo de controlo, obtida com sonda de 50MHz. .....	76
Figura 7.4 – Evolução da espessura total da córnea no grupo de estudo, obtida com sonda de 50MHz. .....	76
Figura 7.5 – Evolução da espessura do epitélio no grupo de controlo, obtida com a sonda de 50MHz. .....	79
Figura 7.6 – Evolução da espessura do epitélio no grupo de estudo, obtida com a sonda de 50MHz. .....	79
Figura 7.7 – Evolução da espessura do estroma no grupo de controlo, obtida com a sonda de 50MHz. .....	79
Figura 7.8 – Evolução da espessura do estroma no grupo de estudo, obtida com a sonda de 50MHz. .....	79
Figura 7.9 – Dimensão relativa do epitélio face à espessura total da córnea no grupo de controlo, obtido com OCT.....	80
Figura 7.10 – Dimensão relativa do epitélio face à espessura total da córnea no grupo de estudo, obtido com OCT.....	80
Figura 7.11 – Dimensão relativa do estroma face à espessura total da córnea no grupo de controlo, obtido com OCT.....	80
Figura 7.12 – Dimensão relativa do estroma face à espessura total da córnea no grupo de estudo, obtido com OCT.....	80
Figura 7.13 – Atenuação no percurso do humor aquoso no grupo de controlo, obtida com a sonda de 50MHz.....	82
Figura 7.14 – Atenuação no percurso do humor aquoso no grupo de estudo, obtida com a sonda de 50MHz.....	82

# Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Prevalência e número de casos de DM em 2015 e previsão para 2040 à escala mundial [9].	10
Tabela 2.2 - Características clínicas de doentes com DM tipo 1 e tipo 2. Adaptado de [3]	11
Tabela 4.1 - Reflexões produzidas por diferentes interfaces. Adaptado de [27].	32
Tabela 6.1 - Características dos transdutores usados.	47
Tabela 6.2 – Resumo das dimensões reais da imagem.	64
Tabela 7.1 – Coeficientes de correlação de Spearman entre a espessura da córnea (CCT), do epitélio e do estroma, e os níveis de glicemia.	84
Tabela 7.2 – Sumário dos resultados.	86

# Lista de Algoritmos

Algoritmo 6.1 - Detecção dos máximos locais correspondentes aos ecos da córnea anterior para sinais de 50MHz.	53
Algoritmo 6.2 - Detecção do máximo local correspondente ao eco do cristalino para sinais de 50MHz.	55
Algoritmo 6.3 – Detecção do eco da córnea para sinais de 20MHz.	60
Algoritmo 6.4 – Detecção da fronteira anterior da córnea nas imagens OCT.	66
Algoritmo 6.5 – Seleção dos pixéis para a aproximação polinomial.	67
Algoritmo 6.6 – Seleção dos pixéis da fronteira do estroma.	69





# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>3</b>
1.1. Motivação e Objetivos .....	3
1.2. Estrutura da dissertação.....	4
<b>2. A DIABETES MELLITUS</b> .....	<b>7</b>
2.1. Introdução .....	7
2.2. Definição .....	9
2.3. Tipo 1 da Diabetes Mellitus .....	12
2.4. Tipo 2 da Diabetes Mellitus .....	14
2.5. Complicações provocadas pela hiperglicemia .....	15
<b>3. O OLHO</b> .....	<b>19</b>
3.1. Anatomia do olho.....	19
3.2. A Córnea .....	20
3.3. O Humor Aquoso .....	25
<b>4. ULTRASSONS</b> .....	<b>29</b>
4.1. Considerações Gerais .....	29
4.2. Geração e Detecção de Sinais .....	31
<b>5. ESTADO DA ARTE</b> .....	<b>37</b>
<b>6. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
6.1. Introdução ao estudo in vivo .....	45
6.2. Modelo animal .....	46
6.3. Configuração experimental .....	47
6.3.1. Ultrassons .....	47
6.3.2. OCT.....	49
6.4. Aquisições <i>in vivo</i> .....	49

6.5.	Processamento dos dados adquiridos .....	51
6.5.1.	Sinais acústicos .....	51
6.5.1.1.	Processamento dos sinais adquiridos com a sonda de 50MHz .....	51
6.5.1.1.1.	Cálculo da espessura das camadas da córnea.....	56
6.5.1.1.2.	Cálculo da atenuação acústica no humor aquoso.....	58
6.5.1.2.	Processamento dos sinais adquiridos com a sonda de 20MHz .....	58
6.5.1.2.1.	Cálculo da espessura da córnea .....	61
6.5.1.2.2.	Cálculo da atenuação acústica no humor aquoso.....	61
6.5.2.	OCT.....	62
6.5.3.	Análise estatística dos resultados .....	71
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
7.1.	Variação da espessura da córnea.....	75
7.2.	Variação da espessura das camadas da córnea.....	78
7.3.	Atenuação no humor aquoso .....	82
7.4.	Correlação entre os níveis de glicémia e a espessura e atenuação .....	84
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>89</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>93</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>103</b>
A.	Dose de STZ administrado a cada animal .....	105
B.	Dose de anestesia administrada a cada animal.....	106
C.	Valores de glicémia para cada animal medidos em cada semana .....	107

# 1. Introdução



# 1. Introdução

## 1.1. Motivação e Objetivos

A Diabetes Mellitus é uma das doenças mais comuns em todo o mundo, afetando cerca de 9% da população adulta mundial. A Organização Mundial de Saúde estima que em 2040 esta seja a 7ª maior causa de morte no mundo.

Devido à patogénese associada à doença, urge a necessidade de estudar os mecanismos fisiológicos associados ao seu desenvolvimento, bem como o desenvolvimento de técnicas capazes de facilitar o rastreio da doença e melhorar o acompanhamento dos doentes e da sua qualidade de vida. Algumas das alterações provocadas pela diabetes acontecem no olho, nomeadamente na córnea e humor aquoso.

O presente estudo tem como objetivo a aplicação da técnica de ultrassons e OCT em ratos diabéticos de modo a avaliar as alterações provocadas pela doença na córnea e no humor aquoso. Por ser um estudo inovador, não existindo informação referente a estudos idênticos, pretende-se avaliar as potencialidades dos ultrassons no cálculo da espessura da córnea e das suas camadas constituintes e caracterizar das propriedades acústicas do humor aquoso, nomeadamente velocidade e atenuação. Pretende-se também estudar a influência da frequência na capacidade de mapeamento das camadas da córnea, através do desenvolvimento de um método automático para a análise e processamento de sinais de ultrassons.

De forma a comprovar os resultados da técnica por ultrassons, pretende-se fazer estudo complementar por OCT através do desenvolvimento de um método automático para o cálculo da espessura da córnea e das suas camadas constituintes.

A componente experimental deste trabalho de projeto foi realizada e testada no IBILI – *Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences* da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e no Laboratório de Tecnologia de Materiais Elétricos e Ultrassons do Departamento de Engenharia Eletrotécnica e de Computadores da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

## **1.2. Estrutura da dissertação**

A presente dissertação encontra-se dividida em 9 capítulos.

Nos capítulos 2, 3 e 4 são apresentados os conceitos básicos das temáticas abordadas ao longo do trabalho. No capítulo 2, são dados a conhecer ao leitor os mecanismos básicos de controlo do nível de glicose no corpo humano, bem como a origem da diabetes tipo 1 e do tipo 2. No capítulo 3, é dada a conhecer ao leitor a anatomia básica do olho, bem como a microanatomia e fisiologia da córnea e do humor aquoso. No capítulo 4 – Ultrassons são dados a conhecer ao leitor os conceitos gerais sobre os ultrassons e os conceitos de geração e deteção de sinal ultrassonoros.

No capítulo 5, é apresentada uma revisão da literatura sobre o uso de ultrassons no polo anterior do olho bem como as alterações no polo anterior do olho promovidas pela diabetes.

O estudo experimental realizado é apresentado nos capítulos 6, 7 e 8. No capítulo 6, é apresentado o trabalho experimental realizado, descrito o procedimento laboratorial bem como, de modo resumido, a análise e o processamento dos dados com vista à obtenção de resultados. No capítulo 7 são apresentados os resultados da implementação dos métodos descritos bem como a análise e interpretação crítica dos mesmos e dos métodos implementados. Por último, no capítulo 8 é feita a revisão do trabalho e resposta aos objetivos propostos, deixando-se algumas sugestões para o trabalho a ser desenvolvido no futuro.

## 2. A Diabetes Mellitus





## 2. A Diabetes Mellitus

### 2.1. Introdução

As células são a unidade básica da vida de um ser vivo. No corpo humano, os órgãos podem ser vistos como aglomerados de células, com funções definidas, relações intercelulares e capazes de desempenhar determinadas funções no seu conjunto, tais como suporte estrutural, crescimento, proteção e movimento [1].

Embora existam os mais variados tipos de células, com as mais variadas funções, todas elas comungam de certas características básicas, nomeadamente o recurso a glicose como substrato básico para a produção de energia e os mecanismos químicos de conversão de nutrientes em energia [2].

No ser humano e noutros mamíferos, a glicose, substrato principal para a produção energética nas células, é obtida através da dieta.

Durante a digestão, a glicose é libertada para a corrente sanguínea através da ação de determinadas enzimas sobre os hidratos de carbono, ficando disponível para ser utilizada pelas células para a produção de energia. Caso não seja utilizada, a glicose é armazenada sob a forma de glicogénio no fígado e nos músculos, constituindo reservas para utilização futura [3].

É o pâncreas, glândula anexa do sistema digestivo, que desempenha as funções mais importantes nos mecanismos de obtenção de glicose e de controlo dos seus níveis na corrente sanguínea. Este órgão é constituído por duas porções: a porção exócrina, que ocupa 95% da sua massa, segrega hormonas como proteases, lípases, amílases, e outras, que participam na digestão de hidratos de carbono; e a porção endócrina, que ocupa a restante massa do pâncreas, e segrega hormonas responsáveis pelo controlo dos níveis de glicose [3].

O pâncreas endócrino está organizado em estruturas, designadas Ilhéus de *Langerhans* (Figura 2.1), que são constituídas por cinco tipos de células: células- $\alpha$ , produtoras de glicagina; células- $\beta$ , produtoras de insulina, ocupam a maioria do espaço do ilhéu; células- $\delta$ , produtoras de somatostatina; células PP, produtoras de polipeptídeo pancreático; e células- $\epsilon$ , produtoras de grelina [4]. A interligação entre estas células possibilita a comunicação célula a célula, o que permite que a secreção

de uma hormona controle a secreção de outra, como por exemplo a inibição da glicagina pela secreção de insulina [3].

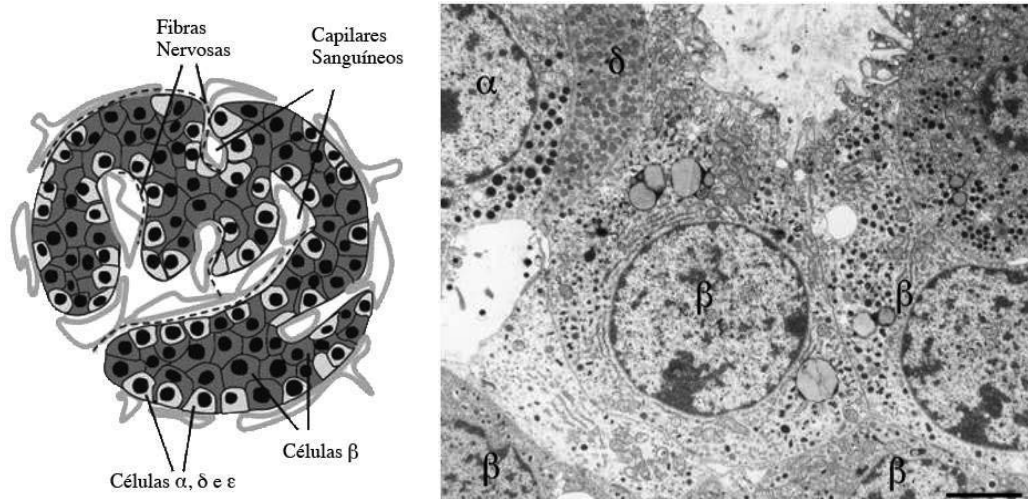


Figura 2.1 – Representação (esquerda) e corte histológico (direita) de um Ilhéu de Langerhans. Adaptado de [4].

O controlo da concentração da glicose no sangue é um mecanismo de extrema importância uma vez que a glicose é o nutriente normalmente usado pelo cérebro, olhos (retina), entre outras estruturas fundamentais, por ser o único capaz de lhes fornecer a quantidade de energia necessária ao seu ótimo funcionamento. É, por isso, importante que a sua concentração seja mantida a níveis que permitam a nutrição necessária destes órgãos [3], de modo a não comprometer o desempenho dos mesmos. A elevada concentração de glicose pode ter efeitos tóxicos nas células [3].

Este controlo é feito à custa da insulina e da glicagina, segregadas pelo pâncreas endócrino, através de mecanismos de *feedback* positivo: se a concentração de glicose no sangue está aumentada (normalmente após as refeições), o pâncreas é estimulado no sentido da produção e segregação de insulina (Figura 2.2), estimulando a absorção de glicose pelas células e o armazenamento da mesma pelo fígado, diminuindo a sua concentração no sangue.

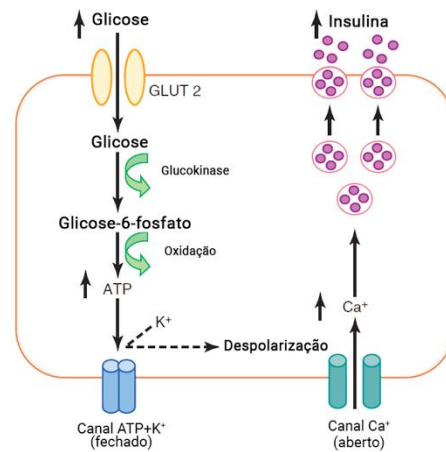


Figura 2.2 - Mecanismo básico da estimulação de produção de insulina na célula- $\beta$  por aumento da concentração de glicose. Adaptado de [3].

A glicagina, por sua vez, atua de forma a contrariar os efeitos da insulina. Isto é, quando a concentração de glicose é baixa e a secreção de insulina é suprimida, há estimulação das células- $\alpha$  no sentido da libertação de glicagina na corrente sanguínea. Esta hormona atua diretamente no fígado promovendo a glicogenólise e consequente libertação de glicose no sangue, proveniente das reservas de glicogénio [3]–[5].

Uma falha no mecanismo de regulação, isto é, na atuação das hormonas, conduz ao descontrolo dos níveis plasmáticos de glicose. No caso particular da insulina, uma falha na sua produção ou atuação provoca um aumento indesejado de glicose na corrente sanguínea, conduzindo a um estado clínico de hiperglicemia, como o caso da *Diabetes Mellitus* (DM) [3], [4].

## 2.2. Definição

O termo *Diabetes Mellitus* corresponde a um conjunto de distúrbios metabólicos caracterizados por um estado de hiperglicemia crónica, provocado por falhas ao nível da produção e utilização de insulina ou, em alguns casos, por ambos os fenómenos [6].

Ao longo dos últimos anos a DM tem sido vista como um problema de saúde pública, sendo uma das doenças mais comuns em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO do inglês *World Health Organization*), até final de 2015, 9% da população mundial adulta ( $\geq 18$  anos) estava afetada pela doença (Figura 2.3) [6], [7]. Na Europa, a prevalência média até ao final do mesmo ano era de cerca de 8% da população total, sendo de 10,3% nos homens e 9,6% nas mulheres entre os 20 e os 79 anos. Em Portugal, a prevalência da DM em 2015 foi de 13,1%, afetando 15,8% dos homens

e 10,7% das mulheres entre os 20 e os 79 anos [8]. A Tabela 2.1 resume os dados da prevalência da DM em 2015 e a previsão para o ano de 2040.

Tabela 2.1 – Prevalência e número de casos de DM em 2015 e previsão para 2040 à escala mundial [9].

	Ano 2015	Ano 2040
<b>Pessoas com DM</b>	414 M	642 M
<b>Homens com DM</b>	215,2 M	328,4 M
<b>Mulheres com DM</b>	199,5 M	313,3 M
<b>DM nos meios urbanos</b>	269,7 M	477,9 M
<b>DM nos meios rurais</b>	145,1 M	163,9 M

A WHO estima que em 2040 a DM seja a 7ª maior causa de morte no mundo e que o número de pessoas com a doença aumente cerca de 55%.

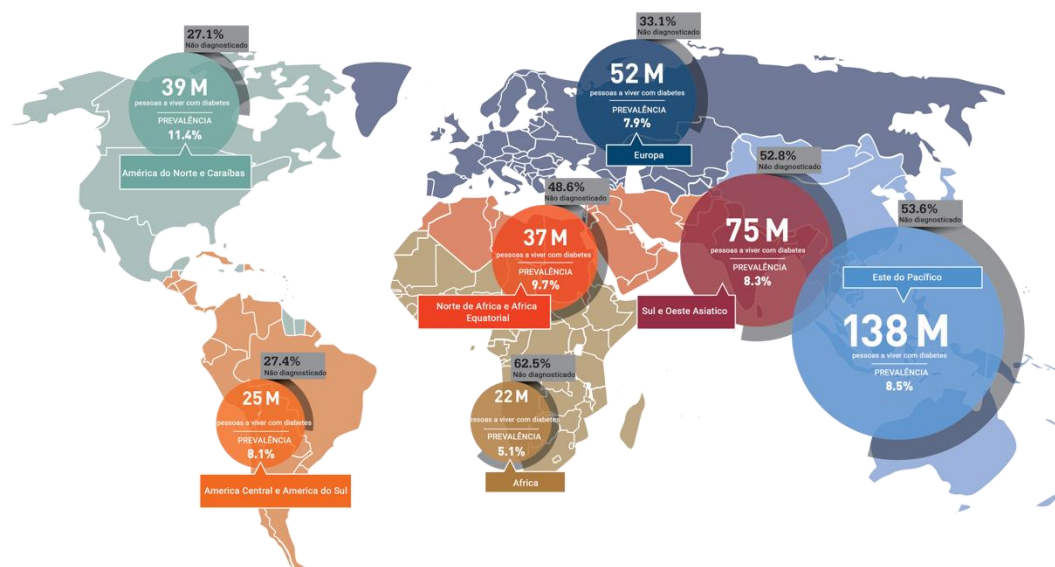


Figura 2.3 - Distribuição global do número de casos de DM em 2015 e estimativa para 2040 [9].

A DM pode tomar diversas formas, sendo as mais frequentes o tipo 1 e o tipo 2.

A DM tipo 1 (DMT1), ou *Diabetes Mellitus* dependente de insulina (IDDM do inglês *Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*), *Diabetes Mellitus* autoimune ou ainda *Diabetes* com Início no Jovem

(*juvenile Diabetes Mellitus*), devido à sua predominância em crianças e jovens [5], é o tipo menos frequente, ocorrendo apenas em 5% a 10% dos casos de DM. Esta forma de DM caracteriza-se pela destruição autoimune das células- $\beta$  dos Ilhéus de *Langerhans* do pâncreas e consequente não produção de insulina, levando ao aumento da concentração de glicose na corrente sanguínea, ou hiperglicemia [3].

A DM tipo 2 (DMT2), ou *Diabetes Mellitus* não-dependente de insulina (NIDDM do inglês *Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*), também denominada de Diabetes com Início no Adulto (*adult-onset Diabetes Mellitus*) devido à sua predominância em idades acima dos 30 anos, é o tipo mais comum da doença, ocorrendo em 90% a 95% dos casos [3]. Tal como no DMT1, também no DMT2 se verifica a ocorrência de hiperglicemia e, em contraste com o DMT1, pode até apresentar níveis elevados de insulina no sangue (hiperinsulinemia) [3].

Este tipo da DM é caracterizado pela resistência à insulina por parte das células dos tecidos, isto é, a diminuição da sensibilidade dos tecidos aos efeitos metabólicos da insulina, e por falhas na secreção de insulina, podendo qualquer uma das alterações ser predominante [4]. Ao contrário do DMT1, as causas da doença não são de caráter autoimune. Embora o mecanismo não seja ainda completamente conhecido, as principais causas para a resistência à insulina são a obesidade e o excesso de gordura visceral, normalmente associadas a predisposição genética para a falha na produção de insulina e resistência à insulina [4], [5], [10].

Ambos os cenários da DM têm associadas outras consequências, causadas diretamente pelos efeitos tóxicos da hiperglicemia. Doentes DMT1 e DMT2 tendem a desenvolver várias patologias crônicas, como aterosclerose, suscetibilidade a infeções, disfunção renal, doenças associadas ao sistema nervoso como a neuropatia diabética e glaucoma [4]. A Tabela 2.2 resume as características clínicas dos doentes com DM tipo 1 e 2.

Tabela 2.2 - Características clínicas de doentes com DM tipo 1 e tipo 2. Adaptado de [3].

	<b>Tipo 1</b>	<b>Tipo 2</b>
<b>Idade de início</b>	Normalmente < 20 anos	Normalmente > 30 anos
<b>Massa corporal</b>	Baixa - Normal	Obesidade visceral
<b>Insulina no plasma</b>	Baixa a inexistente	Elevada e resistente à supressão
<b>Glicagina no plasma</b>	Alta, passível de ser diminuída	Aumentada
<b>Glicose no plasma</b>	Aumentada	Aumentada
<b>Sensibilidade à insulina</b>	Normal	Reduzida

### 2.3. Tipo 1 da Diabetes Mellitus

Nas últimas décadas o DMT1 tem sido estudado não só como uma doença metabólica mas sobretudo, como uma doença autoimune, associada à destruição das células- $\beta$  dos Ilhéus de *Langerhans*, conforme mencionado na secção anterior. A manifestação sintomática da doença corresponde, portanto, à fase final do processo de destruição das células produtoras de insulina, levando ao diagnóstico do DMT1 [5].

Apesar da patogénese associada à destruição seletiva de células- $\beta$  ser difícil de estudar, devido à heterogeneidade de lesões pancreáticas, alguns fatores sustentam o carácter autoimune desta doença, nomeadamente: a presença de células imunocompetentes e células apresentadoras de antigénio (*Antigen-Presenting Cell*) em ilhéus pancreáticos, característica das doenças autoimunes; a presença de auto-anticorpos específicos para os ilhéus de Langerhans; a resposta à imunoterapia, entre outros [10]. A acrescentar a estas evidências celulares destaca-se a ocorrência de doenças autoimunes noutros órgãos ou em familiares próximos [10].

Atualmente pensa-se que a resposta autoimune na DMT1 está associada à suscetibilidade genética para o desenvolvimento de uma resposta imunitária contra as células do próprio indivíduo [5]. Contudo, a suscetibilidade genética *per si* não sustenta por completo o desenvolvimento da doença, conforme comprovam estudos baseados em familiares de doentes com DMT1 [4], sugerindo que outros fatores, externos (como o contacto com vírus e retrovírus), desempenham um papel crucial na “ativação” desta resposta imunitária [4], [5], [10].

A resposta autoimune inicia-se antes do diagnóstico da doença ser possível, isto é, antes da deteção de níveis de glicose no sangue clinicamente significativos [4]. A literatura indica que é certa a existência de anticorpos de células dos ilhéus em indivíduos de alto-risco<sup>1</sup> de desenvolvimento do DMT1, permitindo estabelecer limiares bioquímicos para a concentração destes marcadores e consequente estabelecimento de modelos preditivos para o desenvolvimento da patologia [4], [11]. Na Figura 2.4 encontra-se esquematizada a cascata de acontecimentos que conduz ao desenvolvimento da DMT1.

---

<sup>1</sup> Indivíduos em que um ou mais familiares diretos foram diagnosticados com DMT1.

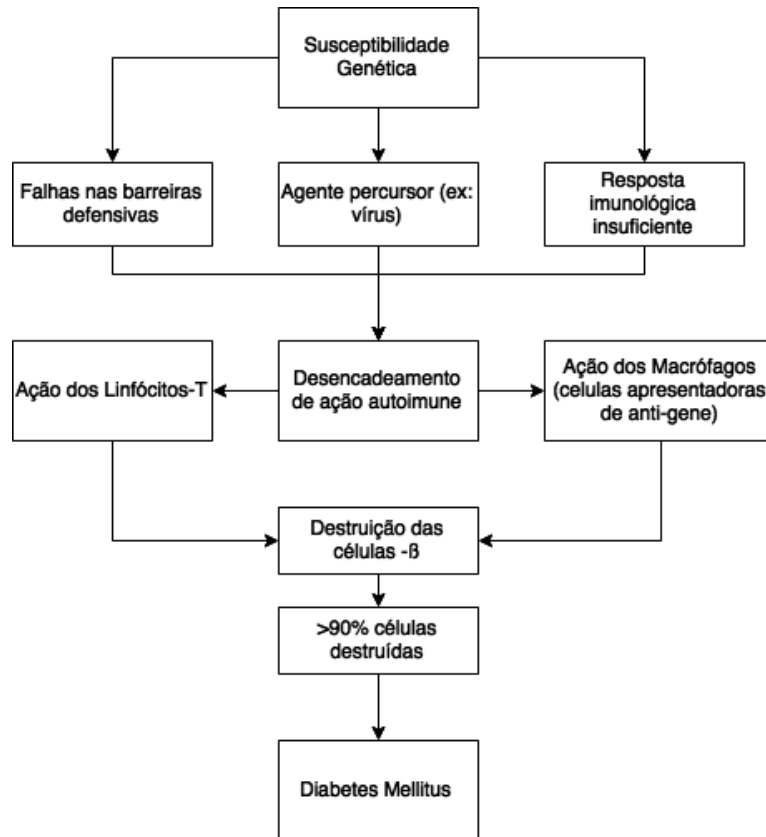


Figura 2.4 - Patogênese da Diabetes Mellitus tipo 1. Adaptado de [10].

A destruição autoimune das células- $\beta$  leva a uma alteração na produção de insulina, fazendo com que os seus níveis na corrente sanguínea diminuam, afetando os processos fisiológicos que envolvem absorção de glicose. Trata-se, portanto, de uma perturbação metabólica que leva à hiperglicemia, conforme referido anteriormente.

Embora esta complicação por si só contribua largamente para a hiperglicemia, outras complicações surgem no pâncreas na presença da DMT1, como o funcionamento anormal das células- $\alpha$ , responsáveis pela secreção de glicagina, levando ao descontrole dos seus níveis no sangue, promovendo a glicogenólise, contribuindo desta forma para o aumento da concentração de glicose no sangue [4].

## 2.4. Tipo 2 da Diabetes Mellitus

Numa situação fisiológica normal, os níveis de glicémia são mantidos num determinado intervalo à custa dos mecanismos de segregação de insulina, segregação de glicagina e da ação da insulina nos tecidos sensíveis à insulina. No DMT2 estes mecanismos de regulação falham levando a um cenário de hiperglicemia. As falhas verificam-se ao nível da produção de insulina, devido à falência das células pancreáticas quer por exaustão quer por incapacidade congénita e da ação da insulina, devido ao desenvolvimento de resistência à insulina por parte das células dependentes desta [10].

O DMT2 caracteriza-se por uma predisposição genética que conduz às falhas supramencionadas. Contudo, a predisposição *per si* não é suficiente para desencadear as falhas, atribuindo-se, neste tipo da DM, especial importância aos fatores externos.

Dos fatores externos destaca-se a obesidade, cujo papel no desenvolvimento da doença é de elevada importância devido ao aumento do tecido adiposo e gordura visceral, que levam ao desenvolvimento de resistência à insulina, verificada mesmo em casos de ausência de diabetes [4]. Embora a obesidade seja o fator que mais contribui para o desenvolvimento da doença, outros fatores contribuem largamente para espoletar a falha dos mecanismos, nomeadamente idade, consumo de bebidas alcoólicas, sedentarismo e tabagismo [4], [10]. Na Figura 2.5 encontra-se representada a cascata de acontecimentos que conduz ao desenvolvimento da DMT2.



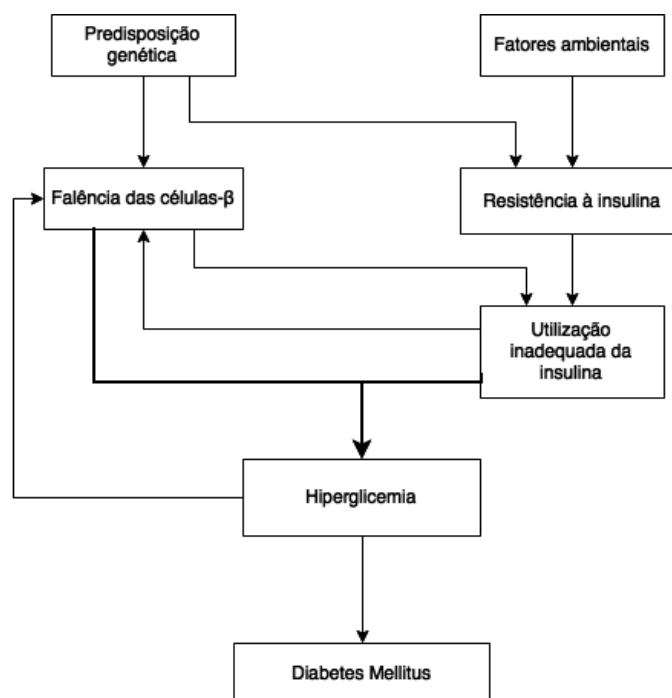


Figura 2.5 - Patogênese da Diabetes Mellitus. Adaptado de [10].

## 2.5. Complicações provocadas pela hiperglicemia

A elevada concentração da glicose no sangue promove complicações ao nível dos diversos órgãos e sistemas, podendo reduzir até cerca de 18 anos a esperança média de vida do doente [3], [4].

A exposição de células insulino-independentes<sup>2</sup> a altos níveis de glicose por um longo período de tempo, como num cenário de diabetes, provoca o aumento da concentração intracelular de glicose nestas células [12], conduzindo a complicações crónicas a médio e longo prazo. De entre essas complicações destacam-se a Retinopatia Diabética – patologia da retina caracterizada por danos nos seus vasos sanguíneos; tratando-se da maior causa de cegueira a nível mundial [13]; Neuropatias – distúrbio nervoso caracterizado por lesões e perda de terminações e fibras nervosas devido à exposição prolongada à hiperglicemia [12]; Nefropatia – patologia do aparelho renal caracterizada pela insuficiência renal, provocada pela hiperglicemia [14]; e Doenças Cardiovasculares.

<sup>2</sup> Células que não necessitam da ação da insulina para o transporte da glicose para o seu interior, tais como, células do sistema nervoso, retina, cristalino, medula do rim e músculo liso.



## 3. O Olho

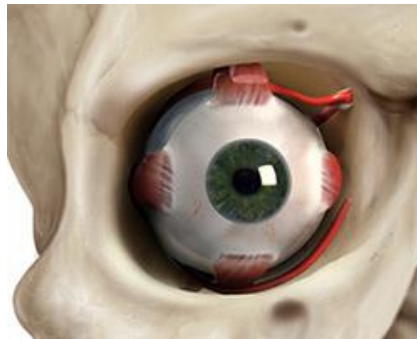


## 3. O Olho

### 3.1. Anatomia do olho

A visão é um dos cinco sentidos que permitem ao ser humano apreender e interagir com o meio que o envolve, possibilitando a distinção da cor, das formas e da distância. A luz que chega dos objetos, viaja através de todo o globo ocular, atravessando diferentes estruturas, até ao fundo do olho onde converge num só ponto. Aí, na retina, um conjunto de células específicas e especializadas convertem a luz num impulso elétrico, que é conduzido por neurónios até ao córtex visual do cérebro, onde é processado e a imagem interpretada. Este mecanismo de conversão da luz numa imagem no cérebro é extremamente rápido, demorando apenas frações de segundos, tornando o processo quase instantâneo [15].

O olho humano é um órgão aproximadamente esférico, com diâmetro axial médio de 2,4 cm e peso 7,5 g, inserido na cavidade orbitária, que se move pela ação conjunta de seis músculos (Figura 3.1) [16].



*Figura 3.1 – Olho humano e cavidade orbitária [17].*

O olho humano (Figura 3.2) é constituído por três camadas principais que envolvem o humor aquoso, o cristalino e o humor vítreo [18]. A camada mais exterior, a esclerótica, é constituída pela esclera e córnea. A camada intermédia contém a rede principal de fornecimento de nutrientes e oxigénio, e é constituída pela coróide, corpo ciliado e a íris. A camada mais interna das três é a retina, que recebe grande parte dos nutrientes fornecidos pela coróide e onde se dá o início do processamento

neurosensorial da visão [15], [16], [18]. Nas cavidades formadas pelas três camadas encontram-se as restantes estruturas do olho, que concentram as suas propriedades óticas. O cristalino é uma lente que tem por função convergir a luz na fóvea (zona de máxima acuidade visual da retina). É uma estrutura transparente e avascular suspensa pelas fibras zonulares, fibras transparentes que ancoram o cristalino ao corpo ciliado [15]. A íris, estrutura pigmentada do olho, situa-se em frente do cristalino, e separa a câmara anterior da câmara posterior. No centro desta estrutura existe uma abertura circular, designada por pupila, através da qual a luz entra no olho, funcionando como um diafragma, controlando desse modo a entrada de luz no olho [16]. O espaço entre a córnea e o cristalino, que contém a íris, é preenchido pelo humor aquoso, um fluído transparente produzido pelo corpo ciliado, e tem como função a manutenção da pressão intraocular, nutrição e hidratação das estruturas avasculares.

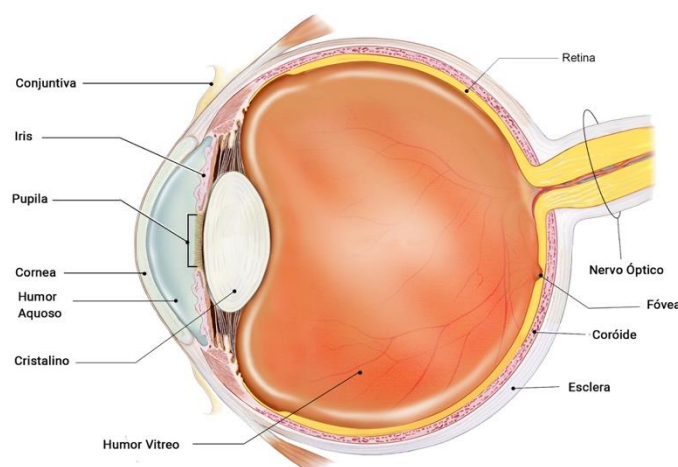


Figura 3.2 – Anatomia do olho humano. Adaptado de [19].

### 3.2. A Córnea

A córnea (Figura 3.3) é uma estrutura transparente e avascular que funciona como uma janela para o olho. Insere-se na esclera, numa depressão denominada de limbo, constituindo a camada mais externa do olho, a esclerótica. Esta estrutura que se estende por um diâmetro equatorial 10,6µm e transversal

de  $11,7\mu\text{m}$ , apresenta espessura central média em adultos de  $550\mu\text{m}$ , aumentando gradualmente na periferia, onde se apresenta com espessura média de  $670\mu\text{m}$  [16].

Ao passar através da córnea, a luz é parcialmente refratada e direcionada para o cristalino, devido à sua curvatura e à sua potência dióptrica de 44 dioptrias. Esta característica é mantida à custa da estrutura biomecânica intrínseca da córnea e pelo ambiente extrínseco. A rigidez da parte anterior do estroma, conferida pela organização estrutural das fibras de colagénio nesta zona, permite que na parte anterior da córnea haja maior tensão de coesão, garantindo que a sua curvatura se mantém constante e inalterada pela hidratação do estroma, ao contrário da zona posterior da córnea, que pode apresentar alterações na sua curvatura em função da hidratação do estroma [20].

A córnea humana é constituída por cinco camadas: três camadas celulares (epitélio, estroma e endotélio) e duas interfaces (membrana de *Bowman* e membrana de *Descmet*) [15], [16], [18], [20].

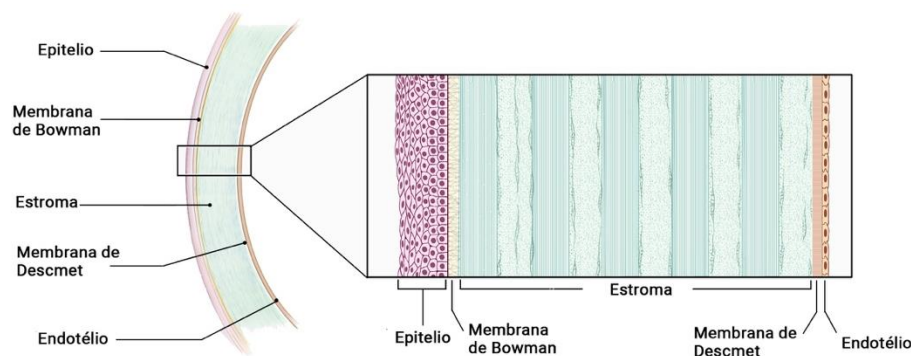


Figura 3.3 – Microanatomia da córnea. Adaptado de [19].

O epitélio (Figura 3.4) é a primeira camada da córnea, tratando-se de epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, com 4 a 6 camadas de células, coberto anteriormente por um filme de lágrima que suaviza as micro irregularidades da sua superfície anterior. Este filme lacrimal, conjuntamente com as restantes camadas da córnea, comporta  $2/3$  do poder refrativo total do olho. As células das camadas mais superficiais do epitélio apresentam microvilosidades que aumentam a área de contacto entre a camada e o filme de lágrima. Já as células mais profundas do epitélio, camada basal, apresentam hemidesmossomas que permitem a ancoragem desta camada às restantes camadas da córnea. Estas células são as únicas no epitélio da córnea capazes de se reproduzir, sendo as responsáveis pela regeneração das restantes camadas celulares do epitélio [20].

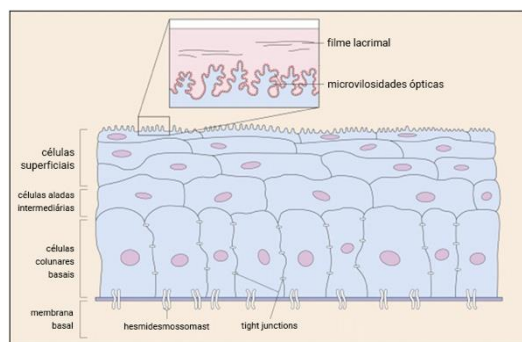


Figura 3.4 – Camada celular do epitélio da córnea. Adaptado de [20].

Abaixo do epitélio situa-se uma fina membrana acelular constituída essencialmente por fibras de colagénio, a membrana de *Bowman*, que separa o epitélio do estroma [15], [16], [20].

O estroma comporta grande parte da estrutura da córnea, ocupando entre 80 a 85% da espessura total da mesma. É composto por fibras de colagénio, dispostas paralelamente em feixes, denominados de fibrilas, que por sua vez também se organizam em camadas paralelas – *lamellae* [15]. O estroma difere de outras estruturas de colagénio pela sua transparência, resultado da organização precisa das fibras de colagénio e da matriz extracelular [20]. O curto espaço entre as fibrilas (55 a 60 nm) permite a passagem da luz através da córnea sem que sofra interação com a mesma, já que este espaço entre as fibrilas é cerca de 10 vezes inferior ao comprimento de onda da luz visível (400nm a 700nm) [21].

As fibras de colagénio do estroma são rodeadas por proteoglicanos<sup>3</sup>, que dadas as suas características desempenham um papel importante na regulação da hidratação e na regulação da estrutura do estroma, retendo e absorvendo a água [20]. Devido à sua importância para o sistema ótico, a manutenção da transparência do estroma é crucial, sendo feita à custa da organização das fibrilas, onde a hidratação constante é uma operação importante uma vez que garante que o espaço entre as fibrilas não se altera e não compromete a transparência da córnea.

Os queratinócitos, também fazem parte da constituição do estroma, sendo o maior tipo de células presentes nesta estrutura. Os queratinócitos estão diretamente envolvidos na manutenção da matriz extracelular através da síntese de colagénio e de glicosaminoglicanos [20].

<sup>3</sup> Os proteoglicanos são proteínas intracelulares ligadas à glicosaminoglicanos que por possuírem grande quantidade de carga negativa atraem vários catiões entre os quais o sódio, que atrai moléculas de H<sub>2</sub>O.



Abaixo do estroma, encontra-se a membrana de *Descemet* (Figura 3.5), a qual separa o estroma do endotélio. Trata-se de uma membrana acelular, constituída por fibras de colagénio e cuja origem é o endotélio [20].

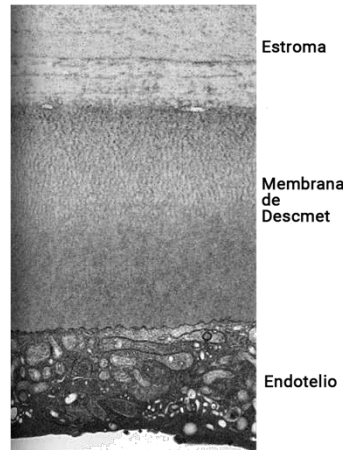


Figura 3.5 – Microscopia da córnea posterior. Representação da parte posterior do estroma, da Membrana de Descmet e do Endotélio. Adaptado de [20].

O endotélio é uma monocamada celular que delimita a fronteira posterior da córnea e desempenha a mais importante função na manutenção da transparência e nutrição do estroma. A manutenção é feita através do controlo da hidratação do estroma (deturgescência<sup>4</sup>) e do transporte de nutrientes e outras substâncias moleculares provenientes do humor aquoso para o interior da córnea [22].

Na manutenção da deturgescência o endotélio (Figura 3.6) funciona como uma barreira que impede a entrada de água na córnea e como membrana que transfere, por transporte ativo, iões do interior para o exterior do estroma e vice-versa. Este mecanismo de transporte ativo de iões é feito por via de dois importantes sistemas de transporte: a bomba de sódio-potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ ), uma proteína transmembranar que opera contra o gradiente de concentração na remoção de  $\text{Na}^+$  do interior da célula enquanto bombeia para o seu interior  $\text{K}^+$ , com consumo de energia (ATP); e o mecanismo intracelular da anidrase carbónica, uma enzima responsável pela conversão de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  em ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) e prótons, e vice-versa [22]. Devido à sua função, estas células são metabolicamente muito ativas, contendo um grande número de mitocôndrias de modo a garantir a sua eficiência no transporte contra o gradiente de concentração [22].

<sup>4</sup> Estado de relativa desidratação necessária para a manutenção da transparência do estroma.

A entrada de nutrientes e de outras moléculas no estroma é feita através de falhas existentes nas junções celulares adjacentes do endotélio (junções de oclusão), que devido ao controlo da hidratação no estroma, permite a entrada destas substâncias por difusão [22].

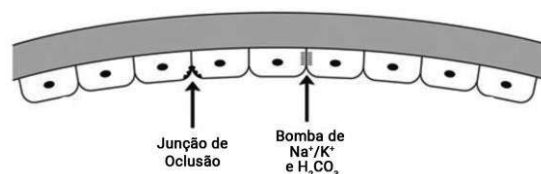


Figura 3.6 – Mecanismo de manutenção da córnea saudável. Adaptado de [23].

Apesar de avascular, a córnea é densamente innervada, sendo um dos tecidos mais sensitivos do corpo humano [20].

A inervação da córnea tem origem na ramificação oftalmológica do nervo trigeminal [24]. As fibras nervosas entram na córnea perifericamente e de forma radial, paralelas à sua superfície, diminuindo a sua espessura à medida que se aproximam do centro da córnea [24]. Antes de atingir o *limbo*, as fibras nervosas apresentam-se sem perineuro nem mielina, seguindo para o interior da córnea apenas envolvidas nas células de *Schwann* [24]. À medida que as fibras se aproximam do centro da córnea, a sua espessura vai diminuindo e a sua estrutura torna-se mais ramificada. A ausência de mielina e a fina espessura das fibras permite a manutenção da transparência da córnea [24]. A Figura 3.7 apresenta a inervação da córnea, em representação esquemática, sendo visíveis as fibras de maior calibre na zona anterior do estroma, que se ramificam dando origem aos nervos sub-basais do epitélio, que por sua vez se ramificam e dão origem aos terminais intraepiteliais.

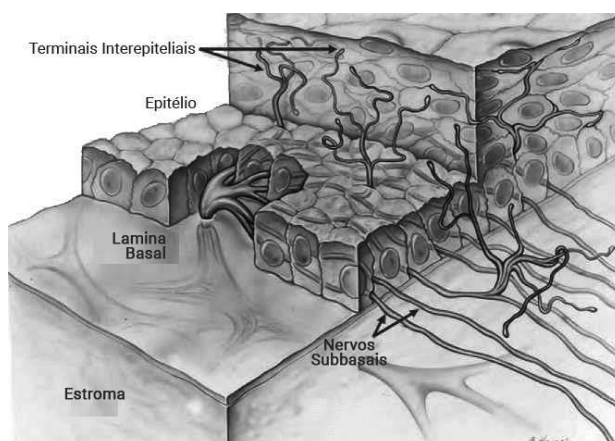


Figura 3.7 – Representação esquemática da inervação da córnea. Adaptado de [25].

### 3.3. O Humor Aquoso

O humor aquoso é um fluído transparente que preenche o polo anterior do olho [16]. Este fluído é o meio de nutrição, excreção de produtos do metabolismo, e transporte de neurotransmissores para a córnea e cristalino, uma vez que estas estruturas são avasculares. É pelo humor aquoso que circulam células e mediadores de resposta inflamatória e fármacos em cenários de patologia da córnea e do cristalino [26].

Além da função de hidratação e fornecimento de nutrientes, o humor aquoso é responsável pela função de suporte da câmara anterior, conferindo a forma ao polo anterior do globo ocular, que é importante na preservação das suas propriedades óticas [15]. A preservação da forma é feita através do equilíbrio entre a produção e drenagem do fluído bem como da manutenção da pressão intraocular [16].

O humor aquoso (Figura 3.8) é produzido pelo corpo ciliar por processos de secreção, difusão e ultrafiltração do plasma sanguíneo [26]. A sua composição é semelhante à composição plasmática, embora se apresente mais hipertónica e com algumas diferenças na concentração de determinadas substâncias [15]. Os seus componentes maioritários são iões, hidratos de carbono, glutatona, ureia, aminoácidos, proteínas, colagénio, oxigénio, dióxido de carbono e água. Relativamente às diferenças entre o humor aquoso e o plasma, destacam-se a concentração de proteínas, que é cerca de 200 vezes inferior no humor aquoso e a concentração de glicose e ureia, que no humor aquoso corresponde a cerca de 80% da concentração plasmática destas mesmas substâncias [26].

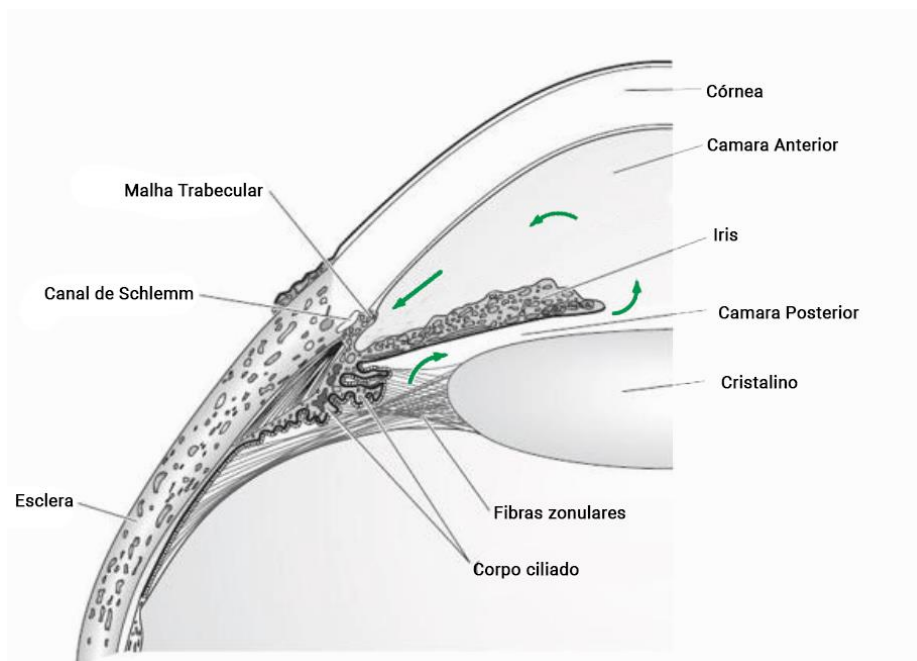


Figura 3.8 – Estruturas envolvidas na regulação do humor aquoso. Adaptado de [16].

A drenagem do humor aquoso é feita através dos poros da malha trabecular, que desempenham importante papel na regulação da pressão intraocular e do canal de Schlemm, que canaliza o fluído até ao sistema sanguíneo [26]. Este canal, que circunda a córnea, está diretamente ligado aos vasos sanguíneos contidos na esclera através de pequenos canais conectores que formam o plexo intraescleral [15]. A partir desta rede sanguínea, o humor aquoso é conduzido para a circulação venosa pelas veias ciliares anteriores, abandonando o olho [15].

## 4. Ultrasons



## 4. Ultrassons

### 4.1. Considerações Gerais

Os ultrassons são ondas mecânicas que se propagam em meios fluídos e sólidos, cuja designação está relacionada com a capacidade auditiva do ser humano a qual para um individuo saudável não vai além dos 20 kHz, como limite superior [27]. No entanto, as áreas de aplicação por excelência dos ultrassons fazem uso de frequências variando de algumas centenas de kHz a dezenas de MHz. Na atualidade, os ultrassons assumem particular importância na medicina, não só como meio de diagnóstico [28] como também de terapia [29].

Dado o seu caráter ondulatório, têm associada energia, um comprimento de onda e uma frequência e podem ser direcionados, focados e refletidos de acordo com os mesmos princípios aplicados aos fenómenos ondulatórios, como a luz [27].

Ao contrário das ondas eletromagnéticas, os ultrassons necessitam de um meio para se propagarem. Quando uma onda incide numa fronteira separando dois meios com propriedades acústicas distintas, nomeadamente velocidade de propagação ( $c$ ) e impedância acústica ( $Z = \rho c$ , sendo  $\rho$  a densidade), como ilustrado na Figura 4.1, uma fração da energia da onda incidente é refletida na fronteira entre os meios e a restante fração transmitida para o meio seguinte [30].

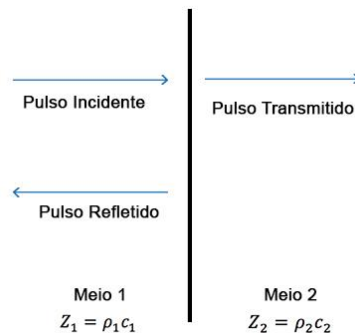


Figura 4.1 - Esquemática do comportamento de uma onda que incide na interface entre dois meios. Adaptado de [27].

Os coeficientes de transmissão e de reflexão da onda, quando a incidência é normal à interface são caracterizados por uma relação entre as impedâncias acústicas dos dois meios. Seja  $Z_x, \rho_x$  e  $v_x$  a impedância acústica, densidade e velocidade de propagação para os meios 1 e 2. O coeficiente de reflexão ( $R$ ) e transmissão ( $T$ ), de acordo com [30], são dados por:

$$R = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \quad (1)$$

$$T = \frac{2Z_2}{Z_2 + Z_1} \quad (2)$$

À medida que a onda se propaga num dado meio, alguma da sua energia é perdida na interação com a estrutura atômica desse meio. Essa interação provoca diminuição da intensidade da onda, fruto quer da conversão da energia em calor (absorção), quer do espalhamento provocado pela microestrutura do meio que redireciona a energia em várias direções (dispersão). Este fenómeno de perda de energia por interação dos ultrassons com o meio denomina-se atenuação acústica, cujo coeficiente pode ser extraído a partir da equação (3), onde  $I_0$  é a intensidade da onda incidente,  $\alpha$  o coeficiente de atenuação do meio ( $dB \cdot m^{-1}$ ),  $d$  a distância propagada no meio e  $I_d$  a respetiva intensidade, [30]. Na área de aplicação médica dos ultrassons é comum definir o coeficiente de atenuação do meio em função da frequência ( $dB \cdot m^{-1} \cdot MHz^{-1}$ ).

$$I_d = I_0 e^{-\alpha d} \quad (3)$$

Esta propriedade ganha especial importância nos sistemas de imagiologia médica, limitando a profundidade de penetração nos tecidos e, como consequência, o uso de frequências elevadas, que conduzem a superiores resoluções [27], uma vez que quanto maior a frequência, maior a atenuação do meio, e menor será o espaço percorrido pela onda. Contudo, quando se pretende melhorar a resolução espacial, para caracterizar pequenas estruturas, devem ser usadas frequências mais elevadas, sempre que possível (Figura 4.2).



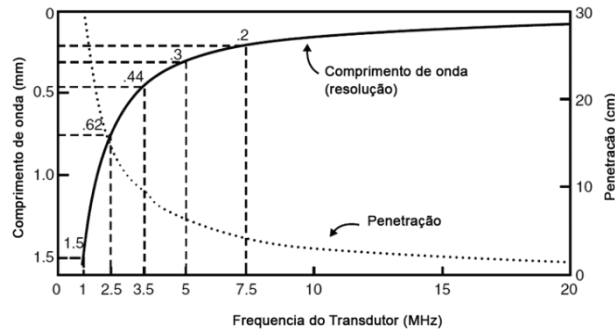


Figura 4.2 – Relação entre a resolução axial, a penetração e a frequência do transdutor. Adaptado de [31].

## 4.2. Geração e Detecção de Sinais

Nos sistemas de ultrassons, o elemento principal é o transdutor de efeito piezoelétrico, responsável tanto por gerar como detetar ondas ultrassônicas. O transdutor, muitas vezes denominado de sonda, consiste num elemento único que comporta um material piezoelétrico (elemento ativo) e uma possível lente acústica [27]. A geração e deteção dos sinais acústicos é realizada pelo elemento ativo, o qual tem a capacidade de gerar uma tensão elétrica em resposta a uma pressão mecânica e, também, gerar uma perturbação mecânica em resposta a uma tensão elétrica [32]. Já a lente acústica, à semelhança das lentes óticas, permite a convergência do feixe de ultrassons, originando o designado foco a uma determinada distância da lente, que constitui a distância focal da sonda [27].

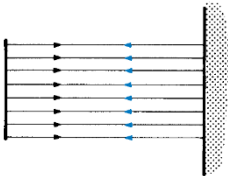
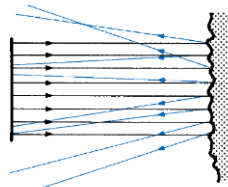
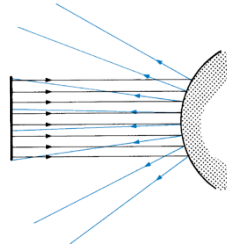
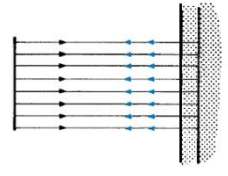
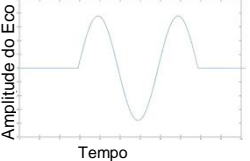
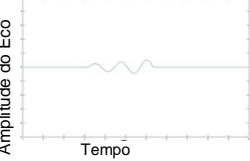
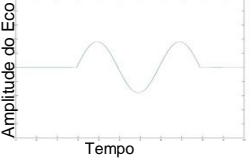
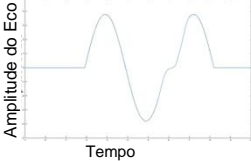
Um transdutor piezoelétrico responde mais ativamente a sinais elétricos e pulsos acústicos de frequência próxima da frequência de ressonância do seu elemento ativo, que constitui uma importante característica do transdutor. Isto é, a amplitude dos sinais gerados/recebidos, será tanto maior quanto mais próxima da frequência de ressonância da sonda forem os seus espectros de frequência [27]. Nos sistemas de ultrassons é usado um gerador de pulsos de banda larga capaz de gerar sinais elétricos adaptados à frequência do transdutor.

As técnicas de imagiologia médica por ultrassons fazem, essencialmente, uso do método pulso-eco, em que uma mesma sonda emite e recebe os pulsos acústicos, com uma periodicidade definida pela designada Frequência de Repetição de Pulso (PRF do inglês *Pulse Repetition Frequency*).

Os sinais refletidos podem apresentar diferentes formas e amplitudes dependendo quer do meio onde se propagam, devido à atenuação, quer da interface que o reflete, que nem sempre é um refletor plano,

quer da dimensão das estruturas através das quais se propaga. Por exemplo, se o meio apresenta um coeficiente de atenuação elevado, o sinal recebido terá fraca amplitude. Por outro lado, se a interface onde o sinal incide não é plana, o feixe é redirecionado e apenas parte da onda regressa ao transdutor [27]. Alguns exemplos são ilustrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Reflexões produzidas por diferentes interfaces. Adaptado de [27].

Reflexão produzida por um refletor plano	Reflexão produzida por um refletor irregular	Reflexão produzida por um refletor convexo	Reflexão produzida por uma camada fina de espessura inferior ao comprimento de onda
			
			

Em oftalmologia, a aquisição dos sinais nos sistemas de imagiologia médica é feita principalmente em dois modos: o modo-A ou *A-scan* (modo de Amplitude), o modo-B ou *B-scan* (modo de Brilho). O *A-scan* (Figura 4.3) consiste na aquisição dos ecos de um pulso unidirecional, relacionando a sua amplitude com o tempo de voo em profundidade, isto é, o tempo que o eco demora a voltar ao transdutor [27]. Este modo assume particular interesse na oftalmologia uma vez que permite estudar com rigor as estruturas em termos da sua espessura e propriedades acústicas, enquanto que o *B-scan* (Figura 4.4) consiste num conjunto de linhas *A-scan* processadas de modo a criar uma imagem bidirecional em escala de brilhos, comumente usada em imagens de ecografia convencional.

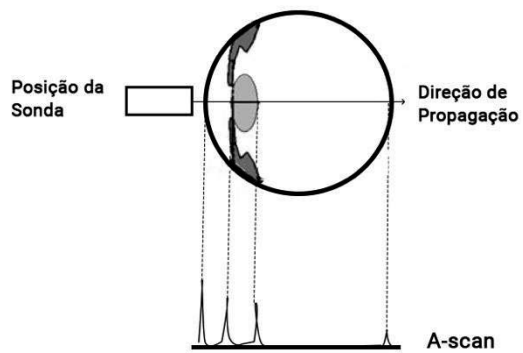


Figura 4.3 - Representação esquemática de uma linha de A-scan de um olho. Adaptado de [27].

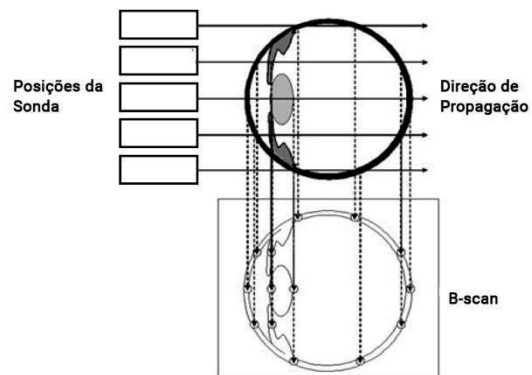


Figura 4.4 - Representação esquemática de um B-scan de um olho. Adaptado de [27].



## 5. Estado da Arte



## 5. Estado da Arte

A *Diabetes Mellitus* (DM) é uma doença do metabolismo, caracterizada por um estado crónico de hiperglicemia, provocado por falhas ao nível da produção de insulina, da sua absorção e utilização ou, em alguns casos, por ambos os fenómenos [6].

A diabetes pode ser classificada em Tipo 1 (DMT1) e Tipo 2 (DMT2). O DMT1 caracteriza-se pela sua componente autoimune, estando o seu aparecimento associado à destruição autoimune das células- $\beta$  dos Ilhéus de Langerhans do pâncreas, inibindo a produção de insulina, promovendo a hiperglicemia. Já o DMT2 caracteriza-se pela sua componente metabólica, estando o seu aparecimento associado à falha na utilização da insulina por parte dos tecidos, impedindo a absorção de glicose por parte destes, e consequente hiperglicemia [5]. Em ambos os casos, a hiperglicemia tem efeitos tóxicos nas células do organismo, nomeadamente nas células nervosas, conduzindo, em determinados casos, à sua destruição [33], fenómeno que caracteriza a DM como, além de metabólica, uma doença neurodegenerativa [34].

Atualmente o diagnóstico da diabetes é feito através da análise da concentração de glicose na urina, da concentração de glicose e de insulina no sangue e do teste de tolerância à glicose [3]. Em casos severos da doença, o diagnóstico pode ser feito com base na análise dos gases expelidos na respiração, em particular doentes com DMT1 apresentam aumento na concentração de ácido acetoacético no sangue, que é volatilizado sob a forma de acetona e expelido pelos pulmões, tornando possível este diagnóstico [3].

Sendo a DM uma doença cada vez mais comum nas sociedades modernas [9], o desenvolvimento de novos meios de diagnóstico que conduzam a um diagnóstico da doença nas suas fases iniciais ou subclínicas, e que contribuam para uma maior prevenção e acompanhamento eficaz do doente, constitui um importante desafio no panorama geral da doença.

De entre as complicações associadas à DM, destacam-se as que ocorrem no sistema visual. Além das alterações na visão provocadas pela retinopatia diabética, uma das maiores causas de cegueira no mundo [13], a DM provoca alterações nos meios transparentes do globo ocular numa fase mais precoce da doença [35], [36], nomeadamente no polo anterior, mais especificamente na córnea.

As alterações na córnea provocada pela DM verificam-se numa fase precoce da doença [37], compreendem alterações tanto no seu metabolismo [38], [39] como na sua estrutura [37], [40].

Ao nível neurodegenerativo, verifica-se degenerescência dos nervos subepiteliais da córnea [37], [40], [41], e a nível metabólico verifica-se alterações no aumento da espessura do estroma [39], camada da córnea implicada na sua transparência. A degenerescência dos nervos subepiteliais da córnea origina a diminuição de densidade celular nas várias camadas e em particular no epitélio uma vez que o metabolismo das células do epitélio depende de uma inervação adequada, que em doentes diabéticos é comprometida [40], [42].

O estudo das alterações na espessura da córnea, induzidas pela diabetes, é reportado na literatura através de vários trabalhos científicos onde se conclui que doentes diabéticos, face a indivíduos saudáveis, tendem a ter a espessura central da córnea (CCT do inglês *Central Cornea Thickness*) aumentada [42]–[47], sendo sugerido em alguns desses trabalhos que esta pode ser uma das primeiras alterações detetadas no olho [47], [48].

Em 2000, *Maria E. Rosenberg et. al.*, demonstrou haver um aumento da espessura central da córnea em doentes com DM relativamente a indivíduos saudáveis. Para o efeito, foram avaliadas a sensibilidade da córnea, a sua espessura central com microscopia especular sem contacto e a densidade dos nervos sub-basais com microscopia confocal, em 23 doentes com DM. Nove indivíduos saudáveis foram usados como controlo. Este estudo mostrou que a CCT nos diabéticos era superior à verificada nos indivíduos normais e a densidade dos nervos sub-basais bem como a sensibilidade da córnea era inferior em indivíduos diabéticos. Os autores admitem que o aumento da espessura da córnea se pode ter dado, entre outras hipóteses, por insuficiência das células endoteliais, promovendo edema no estroma. Assumem ainda que a hipótese de este aumento estar relacionado com a diminuição da densidade celular não se verificou [45].

Em 2006, *JS Lee et. al.*, realizou um estudo semelhante com o objetivo de avaliar as diferenças na espessura central da córnea e na morfologia do endotélio, em doentes diabéticos e saudáveis da mesma faixa etária e estabelecer correlações entre estas alterações e a duração da doença [42]. O estudo envolveu 300 indivíduos (100 saudáveis e 200 com DM) os quais foram submetidos a exames de paquimetria ultrassónica e microscopia especular. Os resultados permitiram estabelecer uma correlação entre o aumento da espessura da córnea e a DM, tendo-se verificado um aumento significativo da espessura nos indivíduos com patologia (cerca de 21 $\mu$ m). Os pacientes foram, também, divididos em dois grupos em função do tempo de prevalência da diabetes. Os autores



concluíram que no grupo cuja prevalência era superior a 10 anos, a CCT era maior quando comparada com o grupo com menos de 10 anos de prevalência.

Mais recentemente, em 2010, o estudo publicado por *Ozdamar, Y.*, confirmou o aumento da CCT em doentes com DM, [44]. No estudo foram avaliados 73 indivíduos saudáveis e 50 diabéticos. A espessura da córnea foi medida com recurso a paquimetria ultrassónica. Da análise dos resultados, o autor concluiu que a CCT de doentes diabéticos era maior de que em indivíduos saudáveis (cerca de 26 $\mu$ m).

Alguns autores têm desenvolvido trabalhos no sentido de justificar as alterações ocorridas na córnea em doentes com DM [42], [46], [47]. De entre as alterações ocorridas, a alteração no funcionamento das bombas de sódio-potássio<sup>5</sup> (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) do endotélio da córnea, responsáveis pela manutenção da hidratação do estroma, pode ser a causa do aumento da espessura da córnea [46], [49], [50].

*B. C. Weston et al.*, não verificaram aumento da permeabilidade do endotélio em doentes diabéticos capaz de promover edema do estroma [49]. *P. R. Herse, et al.*, demonstraram em modelos animais de coelhos diabéticos haver alterações metabólicas provocadas pela DM que conduzem à inibição das bombas de sódio-potássio (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase), que promovem a hidratação do estroma e consequente aumento da espessura da córnea [51], facto documentado por *S. A. Hasan* [52] e *A M. Calvo-Maroto* [43], nos seus trabalhos de revisão.

Além das alterações na espessura da córnea, também as alterações no humor aquoso induzidas pela diabetes têm vindo a ser estudadas. Este meio transparente do globo ocular, é um fluido composto por uma matriz de fibras de colagénio que contém glicose e ureia, e cujos níveis se correlacionam com a sua concentração plasmática, particularmente a glicose [26]. Estudos de espectroscopia de *Raman*<sup>6</sup> mostram que esta técnica permite calcular com precisão a concentração da glicose no humor aquoso com base em modelos preditivos, [53]–[55]. Vários autores concluíram que existe uma correlação entre a concentração de glicose no humor aquoso e a concentração de glicose no sangue

---

<sup>5</sup> A bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> é um mecanismo membranar de transporte ativo caracterizada pelo movimento de substâncias e iões contra o gradiente de concentração. Ocorre sempre de um meio hipotónico para um meio hipertónico. Este mecanismo é o responsável pela manutenção da concentração de potássio no meio intracelular é importante para a síntese de proteínas e respiração; o bombeamento de sódio para fora da célula permite a manutenção do equilíbrio osmótico. Além disso, através deste transporte, ocorre a estabilidade do volume celular e a concentração de água no meio intracelular

<sup>6</sup> A espectroscopia de Raman é uma técnica de luz baseada no espalhamento que a luz coerente sofre ao interagir com a matéria, mais concretamente no espalhamento inelástico. Nesta técnica, essas alterações são quantificadas de forma a caracterizar o meio que as provocou, gerando uma assinatura química do material irradiado, que permite a sua identificação.

[53], [55], [56], sustentando que a espectroscopia de *Raman* é um método passível de ser usado na determinação indireta da concentração de glicose no sangue.

Em 1995 *Lill-Inger, L. et al.*, realizaram um estudo sobre a fluxo do humor aquoso em doentes com DM, tendo demonstrado que na DM as propriedades físicas do humor aquoso se encontravam modificadas, fruto da alteração da concentração de glicose [57]. Em 2011, *James T Lane et al.*, analisaram a alteração do fluxo do humor aquoso em doentes com DM, tendo concluído que o fluxo se apresenta diminuído em doentes com diabetes tipo 1, mesmo antes do desenvolvimento de complicações microvasculares clinicamente significativas [58].

As alterações na córnea, nomeadamente o seu aumento, pode ser medido com recurso a várias técnicas, sendo a mais usada a paquimetria ultrassónica. Este método, permite determinar com rigor a espessura da córnea [59], usando ultrassons com frequências elevadas (20MHz ou superior) [60]. Os métodos baseados em ultrassons nomeadamente a paquimetria ultrassónica e a biomicroscopia ultrassónica, têm sido amplamente usados em estudos do polo anterior do olho, devido ao seu carácter não invasivo e à sua capacidade de interação com os meios transparentes, ao contrário das técnicas de luz [61]–[65].

*Ronald H. Silverman et al.*, em 2006, demonstraram que o polo anterior do olho pode ser estudado em detalhe, usando ultrassons de muito alta frequência (superior a 35MHz) [63]. O estudo consistiu na obtenção de imagens B-scan do olho de um doente, submetido a cirurgia LASER (LASIK), com recurso a um sistema de posicionamento ajustado à curvatura da córnea e a técnicas de processamento de sinal. Foram obtidas imagens com duas sondas de frequência central diferente: 35MHz e 75MHz. Este estudo mostrou que o uso da sonda de 75MHz, permitia a obtenção de imagens do polo anterior do olho, particularmente da córnea e das suas camadas, provando ser possível a sua aplicação na prática clínica, com principal interesse no diagnóstico de patologias da córnea e outras que implicam alterações na morfologia da mesma.

Além da paquimetria, o uso de ultrassons na medicina permite a caracterização dos tecidos em termos dos seus parâmetros acústicos, nomeadamente o coeficiente de atenuação e velocidade de propagação [66]. Estes parâmetros caracterizam o modo como os ultrassons interagem com os tecidos, permitindo discriminar os tecidos saudáveis e os patológicos [67]. A determinação destes parâmetros acústicos tem vindo a ser feita para alguns tecidos biológicos, conforme refere *J A Noble* na sua revisão da literatura sobre o uso de ultrassons [66]. Em particular, estudos têm sido realizados com o objetivo de caracterizar as propriedades acústicas dos tecidos do globo ocular [68]–[72].

Embora inconsistente, a velocidade de propagação na córnea saudável, atualmente considerada na paquimetria comercial e em investigações relacionadas para o cálculo da espessura da córnea é de 1640 m/s [70]–[73]. No caso do coeficiente de atenuação da córnea, são poucos os estudos que o referem e são inconsistentes entre si [70], [71].

Finalmente, saliente-se a existência de poucos trabalhos relacionados com as propriedades acústicas do humor aquoso [74], [75]. A velocidade de propagação acústica sugerida para o meio em questão é de 1540 m/s. A literatura não fornece estudos sobre as alterações das propriedades acústicas deste meio na DM. Contudo, os estudos anteriormente mencionados sobre a alteração da concentração de glicose neste meio, na DM [53], [54], [56], bem como as alterações no fluxo e nas propriedades físicas do humor aquoso em pacientes diabéticos [57], [58] e os referidos sobre as propriedades acústicas do meio, sugerem que a atenuação e velocidade de propagação no humor aquoso apresentem valores diferentes para indivíduos saudáveis e diabéticos [76].



## 6. Materiais e Métodos



## 6. Materiais e Métodos

### 6.1. Introdução ao estudo in vivo

No estudo aqui apresentado foram avaliadas as alterações do polo anterior do olho provocadas pela diabetes tipo 1. Para esse efeito, foi desenvolvida uma metodologia usando a técnica de ultrassons para análise *in-vivo* de modelos animais de ratos diabéticos e foi desenvolvido um algoritmo para segmentação automática das imagens da córnea obtidas com OCT (do inglês *Optical Coherence Tomography*).

Foram usados 12 ratos *Wistar* adultos de 4 meses de idade, do género feminino de modo a obter dois grupos distintos com 12 olhos em cada grupo, o que permitiu ter amostra significativa em cada grupo de acordo com a hipótese do estudo. Para esse efeito os ratos saudáveis foram divididos em 2 grupos ( $R_0$  e  $R_1$ ), aleatoriamente. O grupo  $R_0$  foi designado como o grupo de controlo, e o grupo  $R_1$  foi designado como o grupo de estudo.

Os 12 animais foram mantidos em condições ambientais controladas (temperatura de  $21.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , humidade relativa de  $67.6 \pm 1.6\%$  e 12h ciclo luz/escuridão), com acesso livre a comida e água. A experimentação animal seguiu a regulamentação europeia de proteção dos animais usados para fins científicos (Diretiva 2010/63/EU). Toda a experiência foi realizada de forma a minimizar o sofrimento do animal.

As aquisições *in-vivo* foram feitas ao longo de 8 semanas: na semana zero, correspondente à semana de início do estudo (*baseline*), semana 1, 2, 5 e semana 8. Na semana zero foram adquiridos os dados de OCT e ultrassons relativos a todos os animais saudáveis, antes da indução da diabetes no grupo de estudo. Após as aquisições da semana zero foi induzida a diabetes tipo 1 no grupo  $R_1$ .

## 6.2. Modelo animal

O modelo animal usado foi o de diabetes tipo 1 induzido com *Streptozotocina*<sup>7</sup> (STZ) em ratos *Wistar* saudáveis [77].

Os ratos *Wistar* são uma estirpe da espécie *Rattus Norvegicus* especialmente manipulada para uso científico, e largamente usada em investigação biomédica, devido às semelhanças encontradas entre os seus mecanismos fisiológicos e os mecanismos fisiológicos dos humanos, permitindo assim o estudo de fenómenos biológicos em humanos [78].

No caso particular da Diabete Mellitus (DM), a indução da diabetes tipo 1 em ratos *Wistar* com STZ é um bom modelo animal sendo o mais usado em investigação, uma vez que as células- $\beta$  do pâncreas destes animais são sensíveis aos efeitos tóxicos da STZ, induzindo alterações semelhantes às provocadas pela destruição autoimune dos ilhéus de Langerhans e défice de insulina em humanos com diabetes tipo 1 [79], nomeadamente, alterações no polo anterior do olho [80].

O olho deste animal difere do olho humano essencialmente na sua dimensão e na dimensão das suas estruturas constituintes. Apresenta um diâmetro axial de 6,29 mm [81], a córnea, tem um raio de curvatura anterior de 2,97 mm e posterior de 2,87 mm, e a sua espessura total é de 0,26 mm [81]. A distância entre a face posterior da córnea e a capsula anterior do cristalino (espaço ocupado pelo humor aquoso) é de aproximadamente 0,62 mm [81].

### Indução da DM com STZ

A diabetes tipo 1 foi induzida no grupo  $R_1$  através de injeção intraperitoneal de STZ. A Streptozotocina provoca a destruição quase imediata das células produtoras de insulina do pâncreas, tornando os animais diabéticos ao fim de aproximadamente 48 horas [79], [82]. Os ratos do grupo  $R_0$ , saudáveis, foram injetados com uma solução salina (PBS do inglês *phosphate buffered saline*) que atuou como placebo.

Para a indução de diabetes, usou-se uma solução de (S0130 – *Streptozocin*, Sigma-Aldrich), numa dosagem de 65mg/Kg de acordo com o peso do animal [79], [82]. Todos os animais foram rastreados para a diabetes através da medição da glicemia em jejum com recurso a um glicosímetro comercial.

---

<sup>7</sup> *Streptozotocina (STZ) é um fármaco de origem natural que exerce ação tóxica sobre as células- $\beta$  do pâncreas, usado para a indução do DMT1 através da destruição das células produtoras de insulina [79].*



A dose administrada para cada animal deste estudo e a glicémia no momento da indução pode ser consultada no apêndice A. Após a injeção, os animais foram mantidos em condições controladas com acesso livre a comida e a uma solução contendo 15% de sacarose, que ao fim de 2 dias foi substituída por água.

### 6.3. Configuração experimental

#### 6.3.1. Ultrassons

Neste trabalho, foram adquiridos sinais *A-Scan* da córnea, em modo pulso-eco, usando dois transdutores ultrassônicos com frequências de 20 (Figura 6.1 (a)) e 50 MHz (Figura 6.1 (b)), cujas características são mostradas na Tabela 6.1. Para a excitação das sondas foram usados dois geradores de pulso: *Panametrics Model 5800 (Olympus, Inc., MA, USA)* para a sonda de 20MHz (Figura 6.1 (d)) e *DPR500 Dual Pulse/Receiver (Imaginant Inc., NY, USA)* para a sonda de 50MHz (Figura 6.1 (e)). Em ambos os casos foi usado uma Frequência de Repetição do Pulso (PRF do inglês *Pulse Emission Frequency*) de 1kHz.

Tabela 6.1 - Características dos transdutores usados.

Sonda	Frequência central (MHz)	Distância focal (mm)	Diâmetro do elemento ativo (mm)	Fabricante
Sonda 20 MHz	20	8,9	3,2±0,1	Imasonic, SAS, France
Sonda 50 MHz	50	7,8	3.17±0.01	General Electric, USA

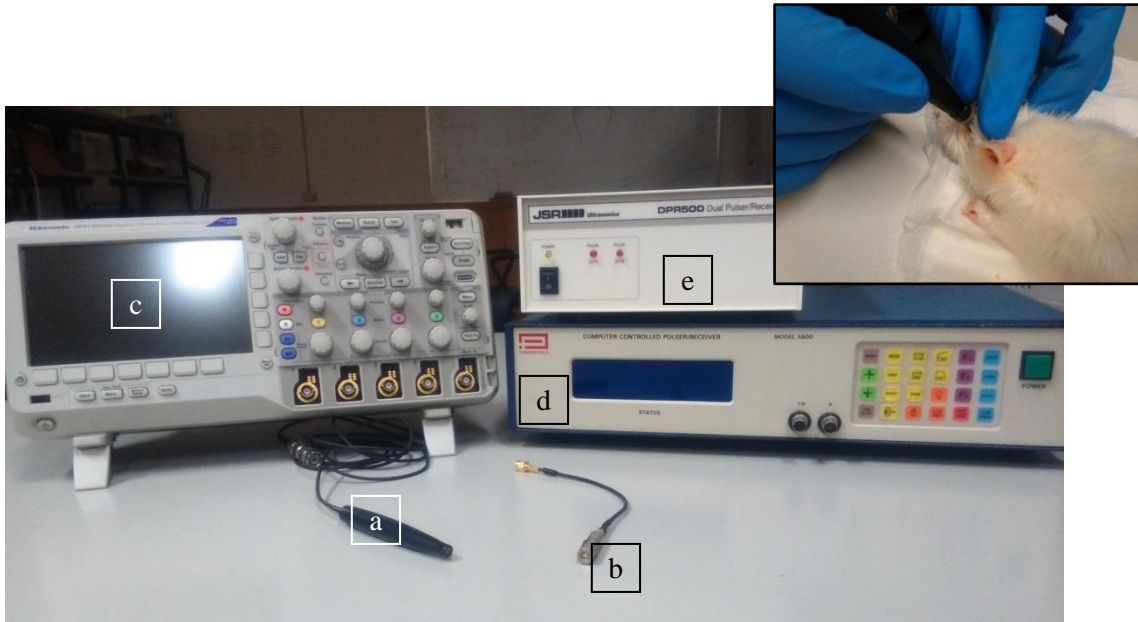


Figura 6.1 - Equipamento para aquisição dos sinais de A-Scan.

A forma de onda produzida é característica de cada sonda. Na Figura 6.2 e Figura 6.3 estão representados os sinais de eco característicos de cada sonda utilizada, obtidos com recurso a um refletor plano.

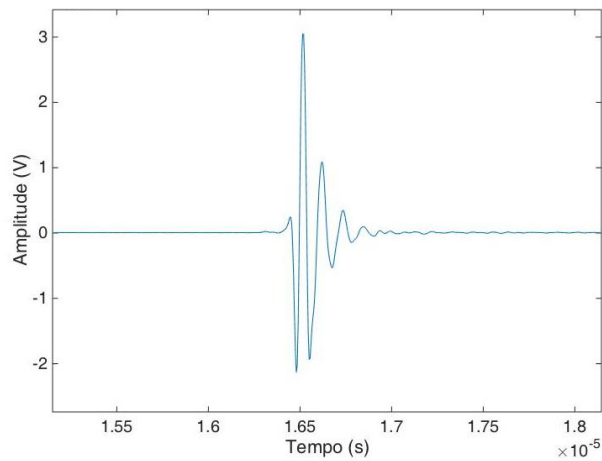


Figura 6.2 - Pulso característico da sonda de 20 MHz.

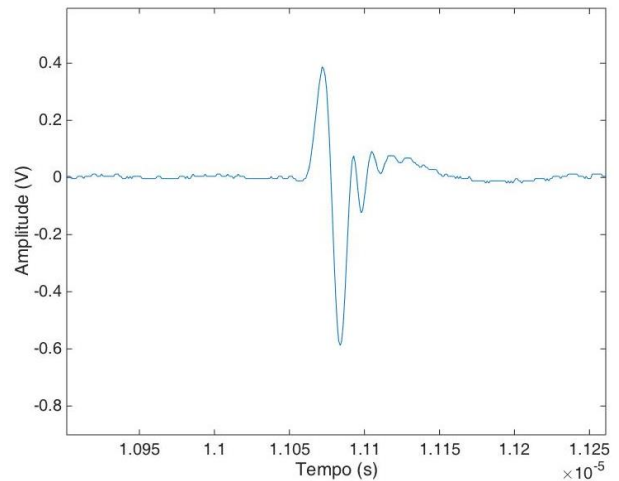


Figura 6.3 - Pulso característico da sonda de 50 MHz.

Para visualização e aquisição dos sinais acústicos foi usado um osciloscópio digital (*Tektronix DPO 2024B Digital Phosphor Oscilloscope, Tektronix Inc., TX, USA*), de 1GS/s de frequência de amostragem (Figura 6.1 (c)) e capacidade para armazenamento externo via *USB (Universal Serial Bus)* em formato *.CSV* (do inglês *Comma-Separated Values*).

Os dados foram processados offline em ambiente Matlab® (*MathWorkds Inc., MA, USA, versão R2014b*).

### 6.3.2. OCT

Nesta abordagem, foram adquiridas imagens da córnea com um OCT para animais de pequenas dimensões (*830 nm OCT Imaging System, Phoenix Research Laboratories, Inc, CA, USA*), mostrado na Figura 6.4. No processo de aquisição, foi usada uma plataforma de posicionamento com dois parafusos micrométricos (Figura 6.4 (a)), permitindo o ajuste da distância entre o animal e o foco da câmara CCD, (Figura 6.4 (b)). Após os ajustes do foco, as imagens foram adquiridas em formato *.tiff* (do inglês *Tagged Image File Format*) através do *software* do OCT (*Phoenix OCT Software*) e devidamente catalogadas com a identificação do animal, da semana e do índice da aquisição.

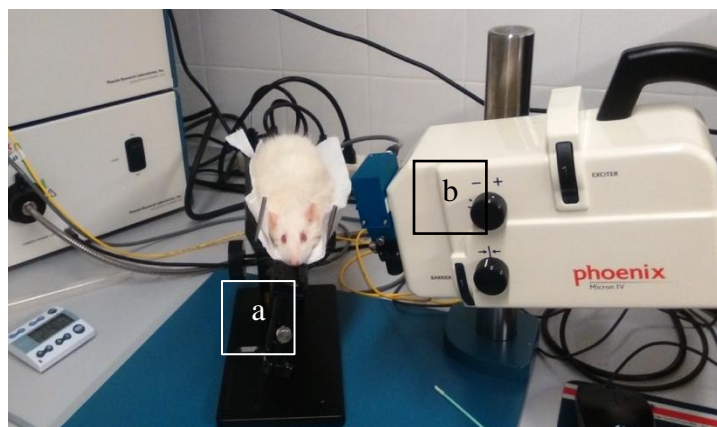


Figura 6.4 – Configuração experimental para aquisição de imagens OCT.

## 6.4. Aquisições *in vivo*

A aquisição da informação referente a ambos os grupos de ratos, com OCT e ultrassons, ao longo de 8 semanas do estudo, foi realizada de acordo com os seguintes passos:

## **1. Preparação**

O processo de aquisição pelas metodologias acima descritas implicou uma anestesia prévia dos animais com uma injeção intraperitoneal de uma solução cloridrato de ketamina (IMALGENE®1000, *Merial*) e xilazina (Rompun®, *Bayer*) numa proporção de (75mg/kg) de acordo com o peso de cada animal. As pupilas foram dilatadas com uma solução contendo 10% de cloridrato de fenilefrina (*Davinefrina*®) e a córnea anestesiada com uma solução de cloridrato de oxibuprocaina (*Anestocil*®). Para todos os animais, foi feita a medição da glicémia antes das aquisições. Os resultados são apresentados no apêndice B.

## **2. Aquisição de imagens por OCT**

Após o processo de anestesia, o animal foi colocado em decúbito ventral na plataforma de posicionamento (Figura 6.4 (a)), de modo a obter uma incidência normal da fonte de LASER do OCT no ápex da córnea. A aquisição das imagens por OCT, imediatamente após a anestesia, permitiu diminuir a influência dos movimentos respiratórios.

## **3. Aquisição de sinais acústicos**

A aquisição de sinais usando ultrassons requer um adequado acoplamento da sonda ao meio a inspecionar, no caso concreto ao olho do animal. Para o efeito, foi manualmente construído um tubo em silicone ajustado ao diâmetro de cada sonda e ao diâmetro dos olhos dos animais [83], no qual era vertida uma solução salina, mantida à temperatura de  $31 \pm 0.5$  °C, o que permitia uma adequada transmissão do sinal ultrassonor e proporcionava um atraso temporal nos sinais adquiridos, necessário para uma clara diferenciação entre o sinal da emissão e o sinal da córnea.

## **4. Recuperação da anestesia**

Após a aquisição dos dados de OCT e ultrassons, o animal era mantido numa placa aquecida a  $31 \pm 0.5$  °C para recuperação dos efeitos da anestesia. Uma vez recuperados, os animais regressaram ao biotério onde permaneceram ao longo das semanas seguintes em condições de luminosidade, temperatura e humidade controladas e livre acesso a água e comida.

## 6.5. Processamento dos dados adquiridos

### 6.5.1. Sinais acústicos

A informação contida nos sinais de *A-Scan* foi usada para medir a espessura total da córnea, bem como das suas camadas constituintes, usando a sonda de 50MHz, e a atenuação acústica no humor aquoso. Para o efeito, foi desenvolvido um algoritmo de identificação automática dos ecos provenientes das fronteiras de interesse e aplicado aos sinais adquiridos com a sonda de 20 e 50MHz. A implementação do algoritmo foi feita em ambiente Matlab® e encontra-se esquematizado no diagrama da Figura 6.5.

De modo a conduzir a uma identificação mais eficaz das fronteiras, antes da aplicação do algoritmo foi feita uma inspeção visual de todos os sinais adquiridos, tendo sido removidos os sinais cuja relação sinal-ruído era baixa bem como os que apresentavam artefactos, motivados pela presença de bolhas de ar ou reflexões resultantes de uma incidência deficiente.

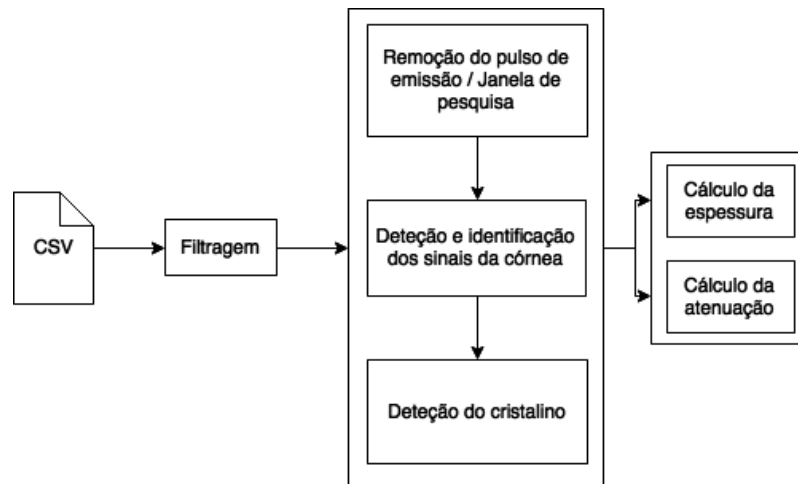


Figura 6.5 – Algoritmo usado para deteção automática das interfaces, cálculo da espessura da córnea e atenuação.

#### 6.5.1.1. Processamento dos sinais adquiridos com a sonda de 50MHz

No processo de deteção automática das fronteiras das estruturas oculares (córnea anterior, posterior e cristalino), o sinal gravado em adquirido foi previamente sujeito a remoção de ruído. Para tal,

aplicou-se um filtro passa-banda com frequências de corte de 10MHz e 60MHz, de modo a remover frequências indesejadas e selecionar as frequências de interesse.

Posteriormente, procedeu-se à deteção dos ecos de interesse através da localização dos máximos locais, e à caracterização das estruturas com base no tempo de propagação e a velocidade de propagação dos ultrassons (1640 m/s na córnea [70] e 1540m/s no humor aquoso).

O primeiro passo para a deteção dos ecos das fronteiras consistiu na seleção de uma janela de pesquisa, cujo início tinha como referência a localização temporal do pulso de emissão. Para os sinais *A-Scan* adquiridos, considerou-se que a janela de pesquisa tinha início  $2\mu\text{s}$  após o início do pulso de emissão e como fim o final do *A-Scan* (retângulo verde na Figura 6.6).

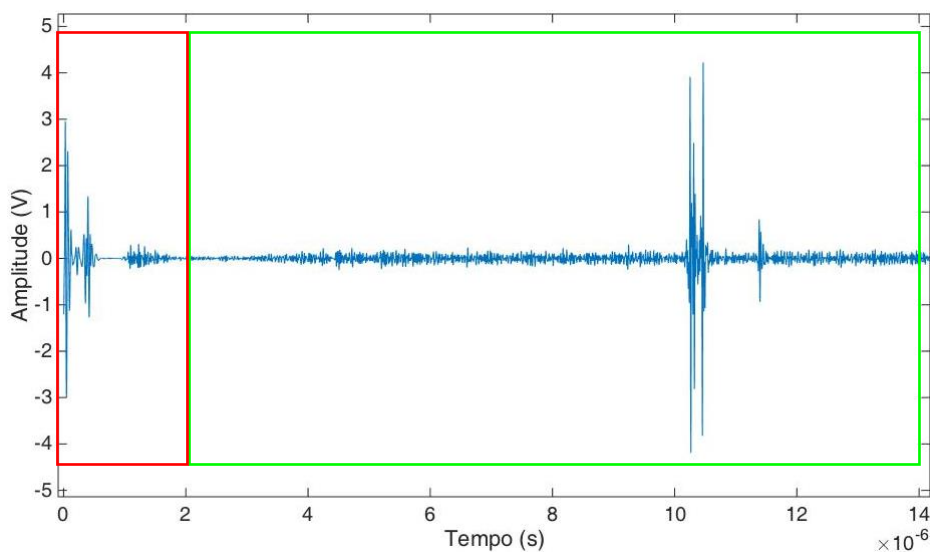


Figura 6.6 – Sinal *A-Scan* da sonda de 50MHz com representação da janela de pesquisa (verde) e do pulso de emissão (vermelho).

A deteção das fronteiras teve como referência a reflexão de máxima intensidade na janela considerada. Nos sinais adquiridos, o pulso de maior amplitude correspondia à reflexão na fronteira posterior da córnea. Note-se que, dependendo da incidência, era possível observar pulsos de maior amplitude na fronteira anterior da córnea. O facto dos pulsos de maior amplitude se verificarem na fronteira posterior pode ser justificado pela curvatura da córnea que, por ser muito acentuada, faz com

que os ecos sejam desviados desviadas segundo outras direções, que não a normal, no percurso de regresso ao transdutor.

Localizado o máximo absoluto, foi feita uma pesquisa no sentido de localizar os restantes máximos locais correspondentes às fronteiras da córnea. A pesquisa consistia na localização de máximos relativos de amplitude igual ou superior a 40% da amplitude do máximo local numa janela centrada no máximo absoluto e largura de 800ns (Figura 6.7). Por forma a garantir que os máximos detetados não correspondiam à mesma fronteira, foi estabelecida uma distância temporal mínima de 50ns entre máximos (limiar obtido experimentalmente, com base no comprimento de onda do pulso). Nos casos em que o limiar 40% não permitia a deteção de máximos relativos, o mesmo foi diminuído, de 5 em 5% até um limite máximo de 20% da amplitude do máximo absoluto. Nos casos em que este procedimento não permitiu detetar nenhum máximo relativo, o sinal foi rejeitado. A seleção do valor para a duração da janela foi baseada no tamanho médio da córnea e do humor aquoso [81], bem como na respetiva velocidade de propagação dos ultrassons. A duração da janela é suficiente para garantir que apenas as fronteiras anterior e posterior da córnea estejam incluídas. Este mecanismo encontra-se esquematizado no Algoritmo 6.1.

```
[valMax,posMax] = max(janelaPesquisa)
limiar = 0,4 x valMax

janelaPesquisaCornea = janelaPesquisa(posicaoMaximo-
400:posicaoMaximo+400)

[valMaxLocais,posMaximLocais]=
procurarMaximos(janelaPesquisaCornea)≥limiar

n = contar(posicaoMaximosLocais)

while n ≤ 1

    limiar = limiar-0.05*valMax

    [valMaxLocais, posMaximLocais]=
procurarMaximos(janelaPesquisaCornea)≥limiar

end

tca = posMaximLocais (1)
tcp = posMaximLocais (end)
```

*Algoritmo 6.1 - Deteção dos máximos locais correspondentes aos ecos da córnea anterior para sinais de 50MHz.*

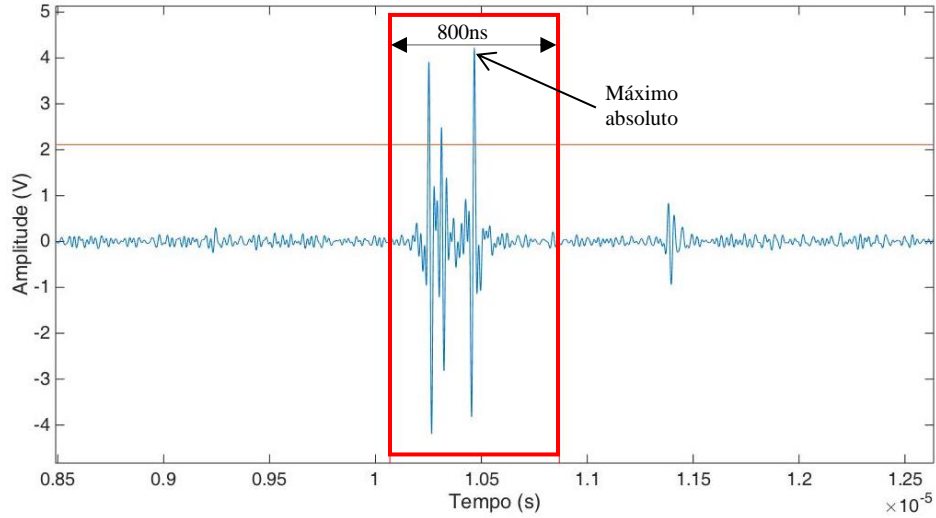


Figura 6.7 – Representação da janela em torno do máximo do sinal (vermelho) e limiar da detecção de máximos locais (magenta).

Detetados os máximos relativos da janela considerada (Figura 6.8), ou seja, na zona da córnea, procedeu-se à sua identificação avaliando, para o efeito, a distância temporal entre eles. Deste modo, os máximos foram identificados em função da sua localização temporal como fronteira anterior da córnea ( $t_{ca}$ ) e fronteira posterior da córnea ( $t_{cp}$ ).

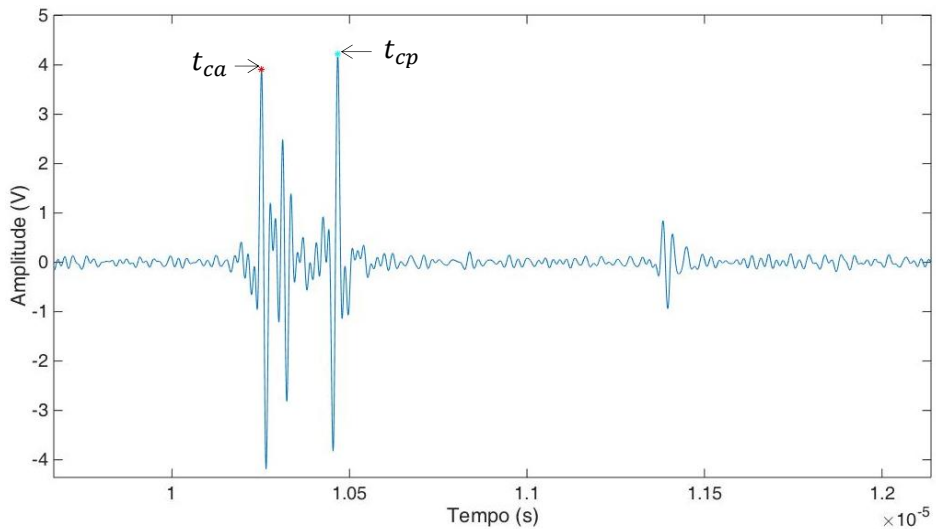


Figura 6.8 – Identificação dos máximos locais correspondentes às fronteiras da córnea.

Por último, foi feita a identificação do máximo local correspondente ao sinal do cristalino ( $t_{cr}$ ). Para o efeito, foi considerada uma nova janela de pesquisa com limite temporal inferior de 500ns, medido



a partir de  $t_{cp}$ , correspondendo a uma localização no humor aquoso, e duração de  $2\mu\text{s}$ . Definida a zona de pesquisa foi identificado o  $t_{cr}$  como o primeiro máximo local de intensidade igual ou superior a 80% do máximo absoluto nesta janela (Figura 6.9). No Algoritmo 6.2 está representado o mecanismo descrito.

```

janelaPesquisaCristalino = janelaPesquisa(tcp+500: tcp+2500)

[valMax,posMax] = max(janelaPesquisaCristalino)

limiar = 0,8 * valMax

[valorMaximosLocais,posicaoMaximosLocais=
procurarMaximos(janelaPesquisaCristalino)≥limiar

tcr = posicaoMaximosLocais(1)

```

Algoritmo 6.2 - Detecção do máximo local correspondente ao eco do cristalino para sinais de 50MHz.

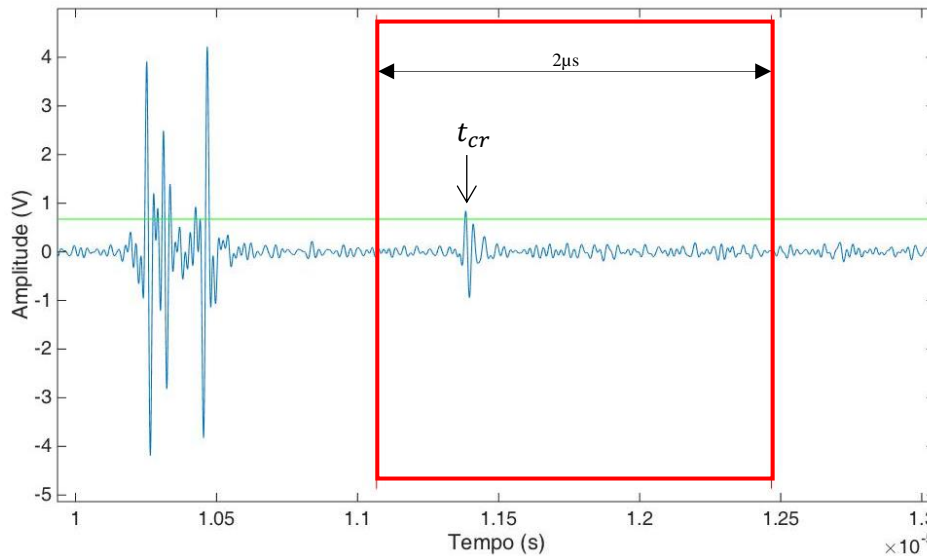


Figura 6.9 – Representação da janela de pesquisa da fronteira do cristalino (vermelho) e limiar da detecção (verde).

Identificadas todas as estruturas do polo anterior do globo ocular procedeu-se à sua caracterização. Concretamente, calculou-se a espessura total da córnea, do epitélio, do estroma e do percurso entre a fronteira posterior da córnea e a fronteira anterior do cristalino, usando abordagens no domínio do tempo e no domínio da frequência [62], [84] bem como a atenuação no percurso do humor aquoso.

### 6.5.1.1.1. Cálculo da espessura das camadas da córnea

A abordagem no domínio do tempo para o cálculo das espessuras levou em consideração os máximos locais de cada uma das fronteiras identificadas. Assim, medindo o intervalo ( $\Delta t$ ) de tempo verificado entre elas (Figura 6.10) e considerando a velocidade de propagação ( $v$ ) respectiva, obteve-se a espessura ( $d$ ), usando a Equação (4),

$$d = \frac{v\Delta t}{2} \quad (4)$$

A abordagem no domínio da frequência para o cálculo da espessura, faz uso da interferência entre pulsos. Medindo a variação de frequência ( $\Delta f$ ) entre máximos (ou mínimos) consecutivos (Figura 6.11), pode ser estimado o tempo de voo ( $\Delta t$ ), permitindo o cálculo da espessura através da equação (4) ou, em alternativa, usando a equação (5), onde a frequência é considerada [85],

$$d = v \cdot 2\Delta f \quad (5)$$

Considerando os sinais adquiridos, a interferência na frequência consistiu em selecionar os pulsos das fronteiras delimitando a região em estudo, eliminando os restantes pulsos através da técnica de *zero-padding*. Posteriormente, calculou-se o seu espectro em frequência usando a Transformada Rápida de Fourier (FFT, do inglês *Fast Fourier Transform*). A média da variação da frequência entre os máximos do espectro em amplitude com intensidade superior ou igual a 25% do valor de maior amplitude (frequência central), foi calculada e, com base nisso, determinado o tempo de voo entre as fronteiras ( $\Delta t = \frac{1}{\Delta f}$ ) (Figura 6.11).

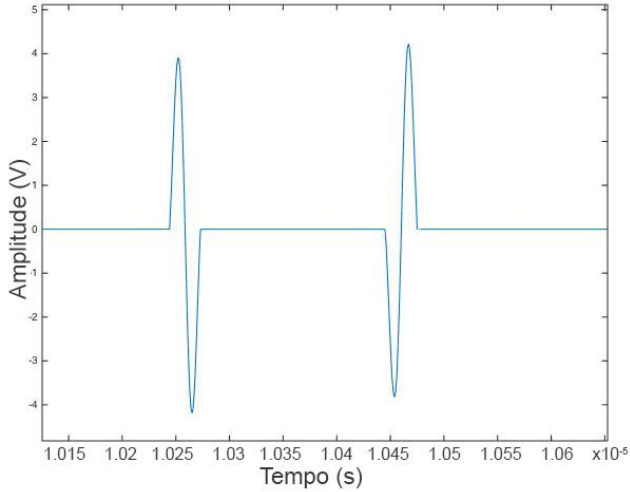


Figura 6.10 – Tempo de voo entre fronteiras no domínio do tempo.

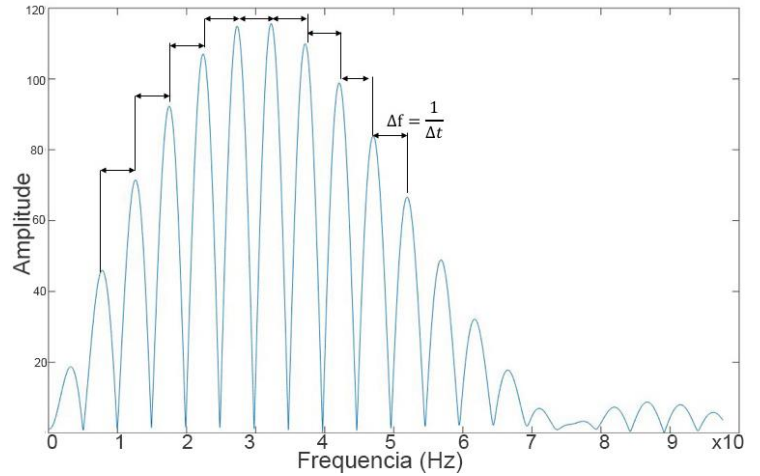


Figura 6.11 – Tempo de voo entre fronteiras no domínio da frequência.

A determinação do tempo de propagação no epitélio ( $t_{es}$ ), usando a abordagem no domínio do tempo, não foi possível na maioria dos casos como se observa na Figura 6.12, sendo a análise no domínio da frequência a única forma de estimar a sua espessura [86]. Para o efeito, foi calculada a interferência na frequência conforme anteriormente descrito (Figura 6.13).

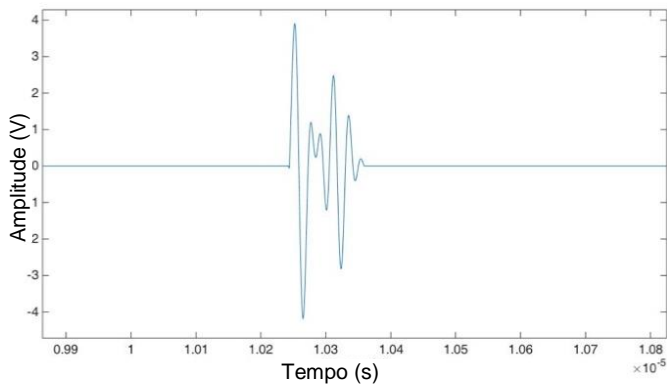


Figura 6.12 – Seleção do sinal da fronteira anterior da córnea e do estroma no domínio do tempo para o cálculo do tempo de voo no domínio da frequência.

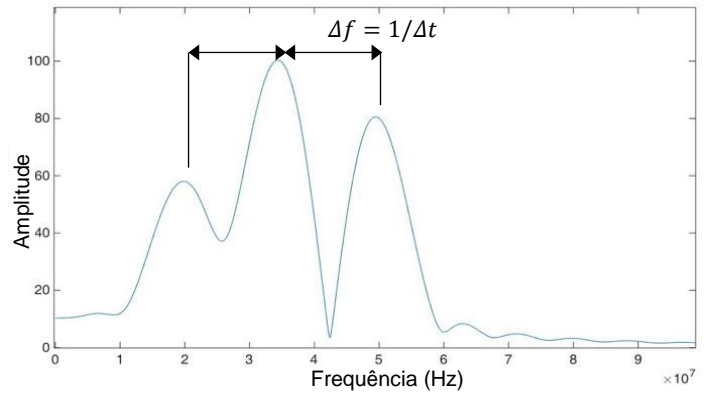


Figura 6.13 – Tempo de voo entre fronteiras no domínio da frequência.

### 6.5.1.1.2. Cálculo da atenuação acústica no humor aquoso

O coeficiente atenuação foi calculado no percurso dos ultrassons no humor aquoso. Este cálculo foi feito com base a relação entre amplitudes das reflexões (no domínio do tempo) nas fronteiras que o limitam (fronteira posterior da córnea e fronteira anterior do cristalino)

Como mencionado, o coeficiente de atenuação ( $\alpha_c$ ) foi calculado como uma relação de amplitudes máximas das reflexões ( $A_a$  e  $A_p$  correspondentes às amplitudes das fronteiras anterior e posterior respetivamente) limitando cada percurso e a espessura ( $d$ ) da camada a caracterizar, através da equação (6)

$$\alpha_c = \frac{20}{2d} \log_{10} \left( \frac{A_p}{A_a} \right), \quad (6)$$

### 6.5.1.2. Processamento dos sinais adquiridos com a sonda de 20MHz

No processo de deteção automática das fronteiras das estruturas oculares (córnea anterior, posterior e cristalino), o sinal adquirido foi previamente sujeito a remoção de ruído, à semelhança do efetuado para os sinais adquiridos com a sonda de 50 MHz. Para tal, aplicou-se um filtro passa-banda com frequências de corte de 1MHz e 30MHz, de modo a remover frequências indesejadas e selecionar as frequências de interesse.

O primeiro passo para a deteção dos ecos das fronteiras, consistiu na seleção de uma janela de pesquisa, cujo início tinha como referência a localização temporal do pulso de emissão (Figura 6.14). Para os sinais *A-Scan* adquiridos, considerou-se que a janela de pesquisa tinha início 2 $\mu$ s após o início do pulso de emissão e como fim o final do *A-Scan*.

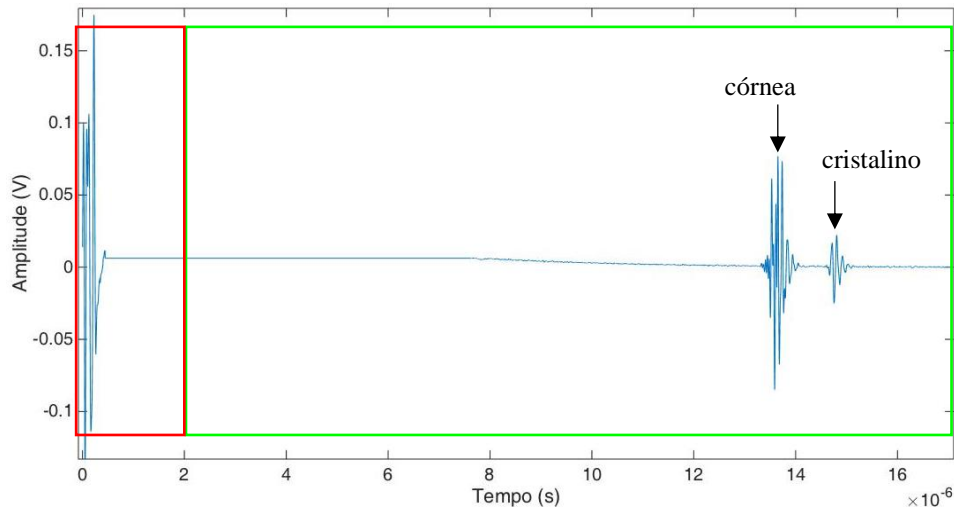


Figura 6.14 – Sinal A-Scan da sonda de 20MHz com representação da janela de pesquisa (verde) e do pulso de emissão (vermelho).

Atendendo à forma do sinal gerado, a detecção das fronteiras através do máximo local, como no caso da análise dos sinais obtidos com a sonda de 50MHz, não foi uma abordagem eficaz uma vez que o eco característico apresentava vários máximos locais. Por isso, os ecos foram detetados no seu percurso ascendente.

Na deteção da córnea anterior ( $t_{ca}$ ), foi usada uma janela deslizante de 50ns de duração, varrendo progressivamente o sinal sem sobreposição. Em cada janela era calculado o desvio padrão e comparado com o desvio padrão do sinal. No caso de o desvio padrão da janela ser superior ao desvio padrão do sinal a duração da janela era ajustada para 100ns e localizadas as amostras com amplitude superior a 50% da amplitude máxima do sinal, de modo a identificar se a janela estava posicionada sobre um eco ou não (ver Algoritmo 6.3). Atendendo à forma dos sinais adquiridos, se a amplitude de metade do número total de amostras da janela inspecionada fosse igual ou superior a 50% da amplitude máxima do sinal, então o eco detetado correspondia à fronteira da córnea e a primeira amostra acima desse limiar foi assumida como o início do eco.

```

intervalo = 50 nanosegundos
limiar = std(janelaPesquisa)
for cada intervalo janelaPesquisa
    if std(intervalo) > limiar
        duração do intervalo = 100 nanosegundos

```

```

if 50% amostras no intervalo > limiar
    posEcoDaCornea = primeira amostra do intervalo
end
end
end

```

Algoritmo 6.3 – Detecção do eco da córnea para sinais de 20MHz.

A determinação do eco correspondente à fronteira posterior da córnea ( $t_{cp}$ ) não foi possível no domínio do tempo. Observando o sinal da Figura 6.15, é visível a sobreposição dos ecos destas duas fronteiras, o que impossibilita a sua discriminação no domínio do tempo.

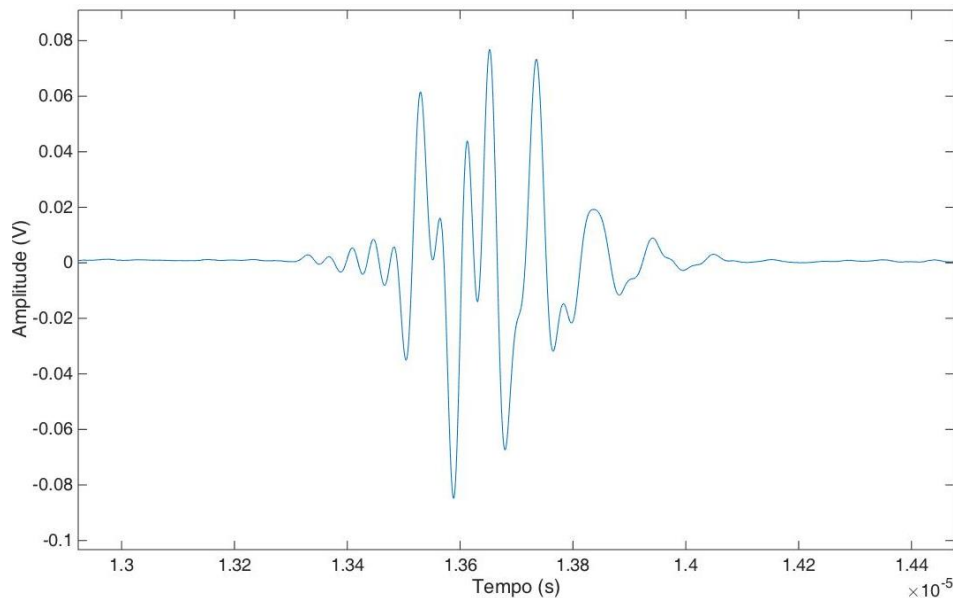


Figura 6.15 – Sobreposição dos ecos correspondentes às fronteiras anterior e posterior da córnea.

A deteção do cristalino ( $t_{cr}$ ) foi feita com base no mesmo princípio da deteção da córnea anterior. Neste caso, foi considerada uma janela de pesquisa limitada inferiormente pelo humor aquoso (600ns após  $t_{ca}$ ) e duração de 2  $\mu$ s (Figura 6.16), que corresponde à zona interior do cristalino, de acordo com as dimensões destas estruturas [83] e velocidade de propagação dos ultrassons. Definida a janela de pesquisa, foi feito um varrimento semelhante ao levado a efeito para a deteção da córnea anterior, permitindo a identificação do início do sinal do cristalino.

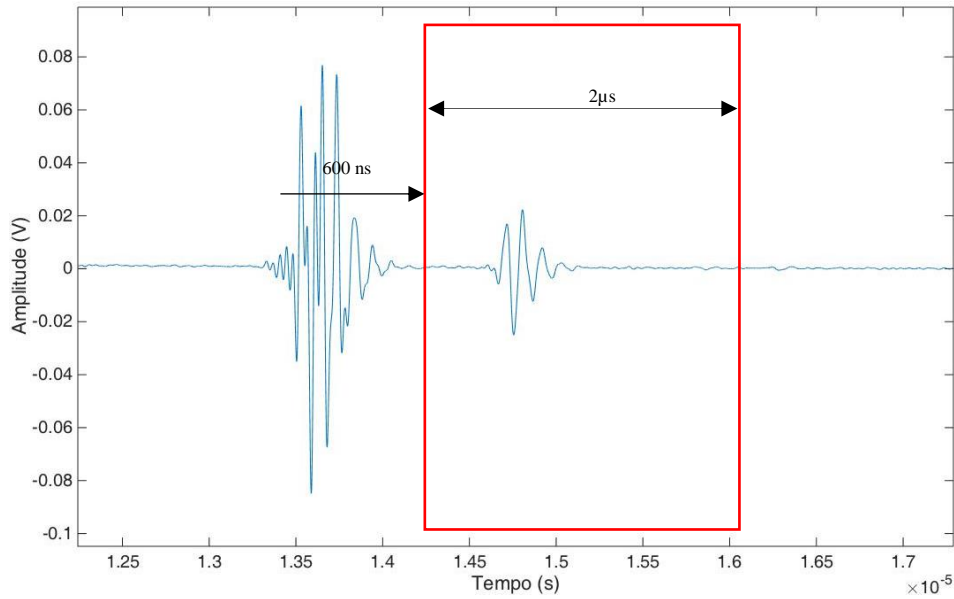


Figura 6.16 – Representação da janela de pesquisa da fronteira do cristalino (vermelho).

#### 6.5.1.2.1. Cálculo da espessura da córnea

A determinação do tempo de propagação no epitélio ( $t_{es}$ ), usando a abordagem no domínio do tempo, não foi possível na maioria dos casos como se observa na Figura 6.15, sendo a análise no domínio da frequência a única forma de estimar a sua espessura. Para o efeito, foi calculada a interferência na frequência conforme descrito em 6.5.1.1.1.

A determinação de  $t_{cp}$  no domínio da frequência permitiu calcular o tempo de voo entre  $t_{cp}$  e  $t_{cr}$ , determinando assim o tempo de propagação no percurso correspondente ao humor aquoso.

#### 6.5.1.2.2. Cálculo da atenuação acústica no humor aquoso

O coeficiente atenuação ( $\alpha_c$ ) foi calculado tendo por base a relação entre as amplitudes das reflexões (no domínio do tempo) nas fronteiras que o limitam (fronteira posterior da córnea e fronteira anterior do cristalino) e a distância percorrida, calculada com base no tempo de propagação dos ultrassons no humor aquoso e a velocidade de propagação nesse meio (6).

## 6.5.2. OCT

As imagens da córnea adquiridas com OCT foram objeto de processamento com vista a avaliar a sua espessura total bem como a espessura das suas principais camadas: epitélio e estroma. Para o efeito, foi desenvolvido um algoritmo (Figura 6.17) capaz de realizar a segmentação da imagem, tendo em vista a extração dos contornos de cada camada e medida das suas espessuras, de modo totalmente automática.

O processamento das imagens foi feito em Matlab® e teve por base o fluxograma representado na Figura 6.17, o qual é explicado nos parágrafos seguintes.

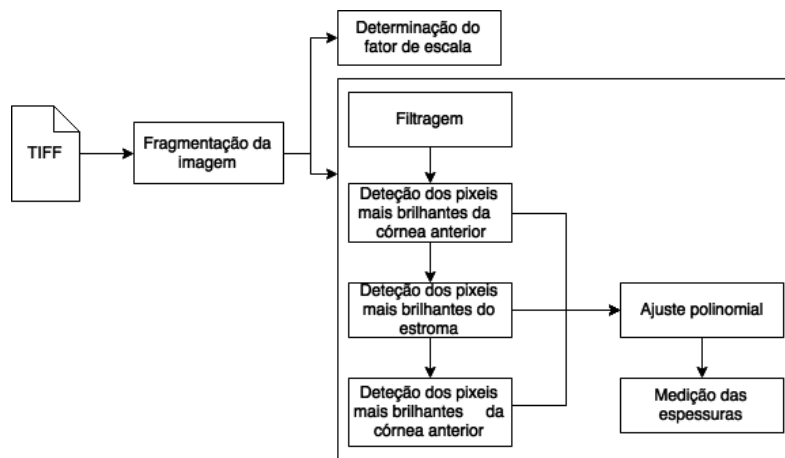


Figura 6.17 – Algoritmo para segmentação das camadas da córnea.

Nas imagens OCT adquiridas, é possível identificar três zonas distintas, assinaladas no exemplo representado na Figura 6.18. Apenas a parte central da imagem (dentro do retângulo azul) é de interesse do ponto de vista do processamento, constituindo a designada ROI (do inglês *Region of Interest*). Na parte inferior da imagem (quadrado verde) fornece a informação sobre a escala para a conversão de píxeis em  $\mu\text{m}$ .



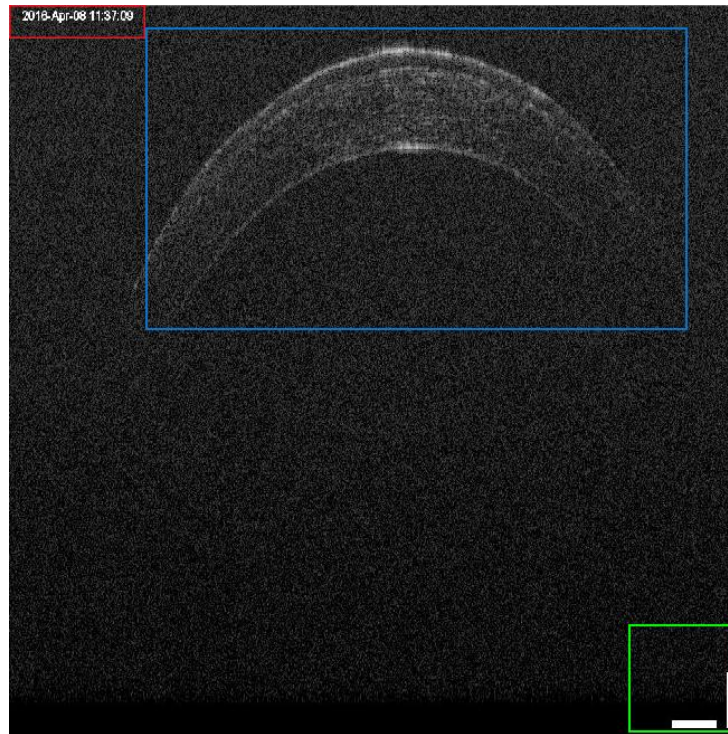


Figura 6.18 – Imagem original e identificação das áreas de informação.

A determinação do rácio de conversão dos pixéis (px) em  $\mu\text{m}$  foi feita atendendo à escala fornecida pelo *software* do OCT e as indicações do fornecedor, que referem que o número de pixéis correspondentes ao comprimento da barra horizontal e o número de pixéis correspondente à altura da barra vertical equivalem a  $100\mu\text{m}$ .

Por forma a calcular o número de pixéis de cada barra isolou-se a parte da imagem com os fatores de escala (quadrado verde da Figura 6.18) e procedeu-se à sua conversão de escala de cinzentos para imagem binária. Uma vez que as barras da escala apresentam intensidade do brilho correspondente à intensidade máxima da escala de cinzentos, a conversão foi feita tendo como limiar o valor de 99% da intensidade máxima, originando a imagem representada na Figura 6.19.

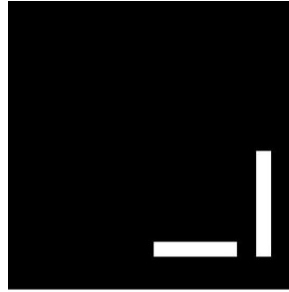


Figura 6.19 – Resultado da binarização da região correspondente à escala

Com a imagem binarizada, procedeu-se à determinação das dimensões de cada uma das barras de escala. Como esta imagem binária continha as duas barras, e o valor dos pixéis de cada barra era 1, definiu-se, então, cada uma das barras como o conjunto de pixéis brilhantes vizinhos, conforme ilustra a Figura 6.20.



Figura 6.20 – Ilustração da identificação das barras com base nos pixéis brilhantes vizinhos.

Para cada uma das barras foi contado o número de pixéis brilhantes consecutivos segundo cada direção e feita a respetiva conversão em  $\mu\text{m}$ .

Tabela 6.2 – Resumo das dimensões reais da imagem.

Direção	Número de pixeis	Valor de cada pixel ( $\mu\text{m}$ )
Horizontal	62	1.6129
Vertical	78	1.2821

Neste passo foi utilizada a função *regionprops* da *Toolbox Image Processing* do Matlab®.

A ROI da imagem usada no estudo tinha por dimensão 655 x 498 pixels na coordenada (185,2) – valores obtidos experimentalmente. Esta região onde estava contida a córnea, para a qual se pretendia identificar e caracterizar as fronteiras, foi pré-processada e posteriormente objeto de segmentação. Mais concretamente, a imagem foi inicialmente filtrada de modo a reduzir o ruído *speckle* e evidenciar os contornos das camadas. Esta filtragem consistiu na aplicação de um filtro de Gauss com um *kernel* de 7x7 e  $\sigma = 2$ . A convulsão da função Gaussiana equação (7) com a imagem, permitiu evidenciar os contornos ao realçar os máximos locais em cada coluna da imagem, facilitando o processo de segmentação.

$$g(x, y, \sigma) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\left(\frac{x^2}{2\sigma^2} + \frac{y^2}{2\sigma^2}\right)}, \quad (7)$$

A coordenada  $(x, y)$  corresponde à abcissa e ordenada do pixel e  $\sigma$  é o desvio padrão.

Na Figura 6.21 (b) está representado o perfil de intensidade de uma coluna da ROI, correspondente ao ápex da córnea (representada pela linha azul (a)), da imagem não filtrada, sendo possível observar a intensidade ruído *speckle* e as fronteiras da córnea ( $F_{ac}$ ,  $F_{es}$  e  $F_{pc}$  fronteira anterior da córnea, fronteira do estroma, fronteira posterior da córnea, respetivamente). Na Figura 6.22 (b) está representado o perfil de intensidade da mesma coluna da ROI (representada pela linha azul (a)), da imagem filtrada, sendo possível observar o efeito do filtro aplicado sobre a imagem, nomeadamente a diminuição da intensidade dos brilhos dos pixels correspondentes ao ruído *speckle* e a preservação dos contornos.

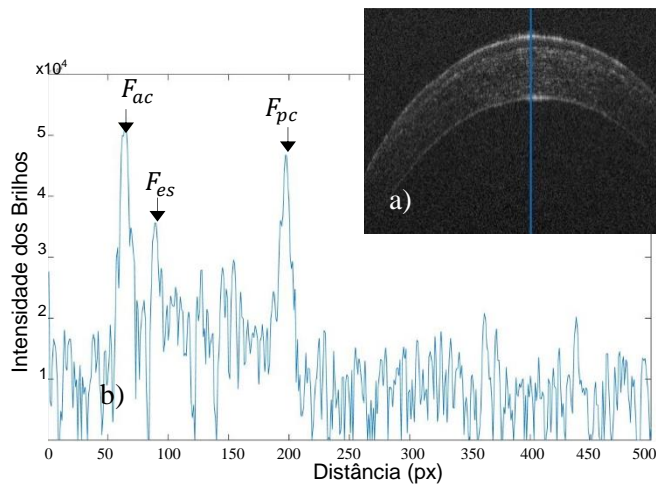


Figura 6.21 – Coluna do ápex da córnea da imagem não filtrada. a) localização da coluna selecionada; b) perfil de intensidade da coluna.

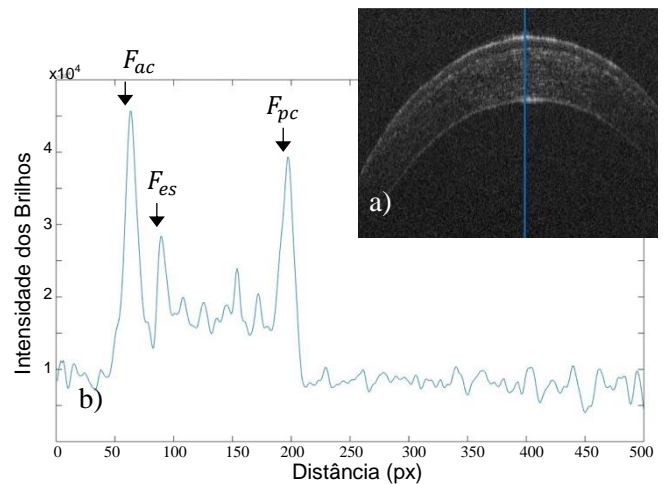


Figura 6.22 – Coluna do ápex da córnea da imagem filtrada. a) localização da coluna selecionada; b) perfil de intensidade da coluna.

Posteriormente, foi feito um varrimento por coluna de modo a identificar os contornos das camadas. O primeiro contorno a ser detetado foi o da córnea anterior, seguida do estroma e, por último, o da córnea posterior.

A deteção da córnea anterior foi feita definindo uma zona de pesquisa entre o início da ROI e a ordenada do pixel de máxima intensidade nessa coluna (Figura 6.23). Normalmente o máximo acontecia nos primeiros pixéis da ROI pois correspondiam a reflexões da fronteira anterior da córnea. No entanto, caso a imagem não tivesse sido adquirida com o contraste devido, o pixel de máxima intensidade do podia não corresponder à fronteira anterior, mas sim à fronteira do estroma ou à fronteira posterior da córnea. Por esse motivo identificou-se o primeiro pixel da janela de pesquisa cuja intensidade fosse igual ou superior a 75% da intensidade máxima registada na coluna, e registou-se a sua posição e intensidade do brilho. O mecanismo descrito encontra-se esquematizado no Algoritmo 6.4.

```
pixeisFronteiraAnterior = []  
  
for coluna in ROI  
    [valMax, posMax] = max(coluna)  
    limiar = valMax*0,75;  
    aux = procurarMaximos(coluna(1:posMax)) >= limiar  
    Fac = aux(1)  
    pixeisFronteiraAnterior.adicionar(Fac)  
  
end
```

*Algoritmo 6.4 – Deteção da fronteira anterior da córnea nas imagens OCT.*

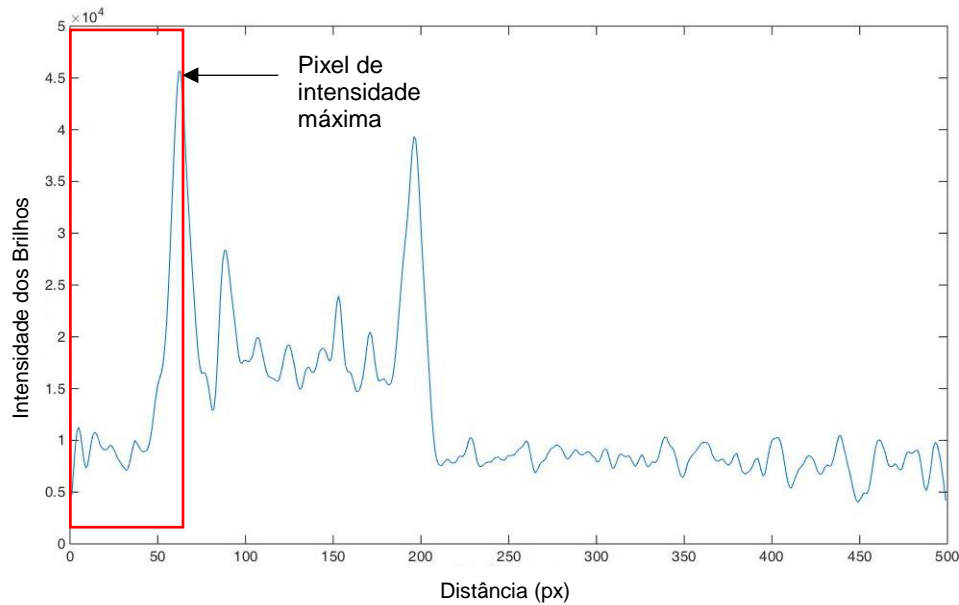


Figura 6.23 – Representação da janela de pesquisa para localização do pixel da fronteira anterior da córnea.

Por último, comparou-se a intensidade de todos os pixels registados e rejeitou-se aqueles cuja intensidade era inferior à média menos um desvio padrão ( $\bar{x} - \sigma$ ) dos valores de intensidade registados (ver Algoritmo 6.5 e Figura 6.24). A partir dos pixels resultantes, foi feita uma aproximação polinomial para esta camada através de um polinómio de grau 2 (Figura 6.25). Este controlo permitiu ainda determinar sobre que colunas seria feito o varrimento para deteção das fronteiras do estroma e posterior da córnea, tendo-se rejeitado as colunas onde pertenciam os pixels rejeitados.

```

pixeisNaoValidos = []

limiar = media(pixeisFronteiraAnterior) - std(pixeisFronteiraAnterior)

for pixel in pixeisFronteiraAnterior
    if valor do pixel < limiar
        pixeisNaoValidos.adicionar(pixel)
    end
end

pixeisValidos = pixeisFronteiraAnterior - pixeisNaoValidos

```

Algoritmo 6.5 – Seleção dos pixels para a aproximação polinomial.

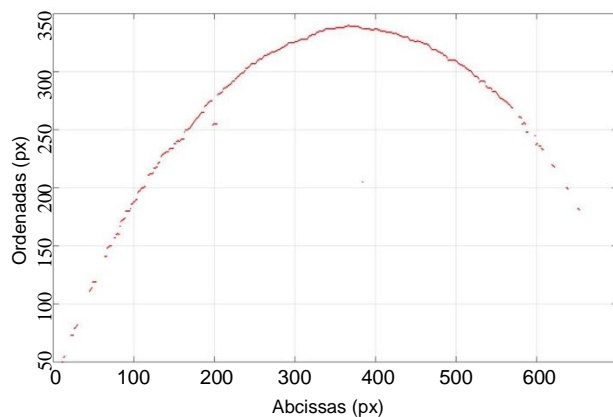


Figura 6.24 – Pixels selecionados para o ajuste polinomial da fronteira anterior da córnea.

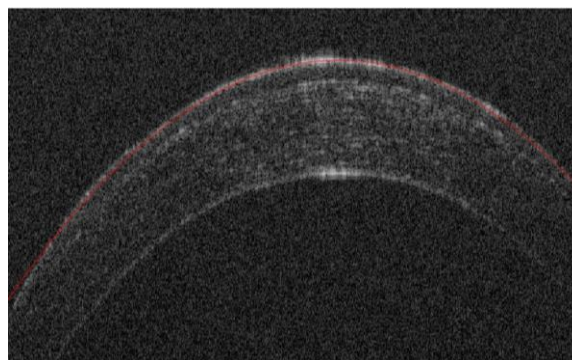


Figura 6.25 – Aproximação polinomial baseada nos pixels da interface anterior da córnea.

A segmentação da fronteira do estroma foi feita de forma semelhante à da córnea anterior (ver Algoritmo 6.6). Neste caso, o varrimento fez-se apenas nas colunas consideradas no controlo anteriormente descrito, em vez de ser feito em todas as colunas. Foi usada uma janela de pesquisa afastada 10 pixels após o pixel identificado como pertencente à córnea anterior e comprimento 80 pixels (Figura 6.26). Estes limites garantiam que a janela considerada tinha início após a fronteira anterior da córnea, que corresponde a uma zona de espalhamento de brilhos (Figura 6.27), e fim correspondente a uma zona interior do estroma (valor obtido experimentalmente, com base na espessura média da córnea). Esta janela permitiu excluir da pesquisa os pixels da fronteira posterior da córnea, cuja sua intensidade era, normalmente, superior à intensidade dos pixels da fronteira do estroma.

Usando a referida janela, foi realizada a pesquisa de máximos locais cuja intensidade era igual ou superior a 90% da intensidade máxima registada (este limiar permitiu identificar apenas pixels de mais alta intensidade da janela, que correspondiam à interface do estroma, e evitar os brilhos do ruído *speckle* proveniente do interior do estroma). Com as posições dos pixels resultantes, foi usado um polinómio de grau 2 de modo a gerar uma aproximação polinomial para esta camada.

```

pixeisFronteiraEstroma = []

colunasPixeisValidos = colunasDosPixeisValidosDaFronteiraAnterior

linhasPixeisValidos = linhasDosPixeisValidosDaFronteiraAnterior

for coluna in colunasPixeisValidos

    janelaEstroma = coluna(Fac+10:Fac+90)

    limiar = 0,9 * max(janelaEstroma)

    aux = procurarMaximos(janelaEstroma) ≥ limiar

    Fes = aux(1)

    pixeisFronteiraEstroma.adicionar(Fes)

end

```

Algoritmo 6.6 – Seleção dos pixels da fronteira do estroma.

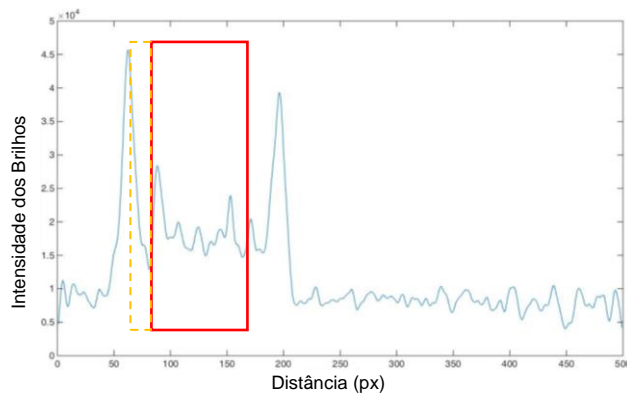


Figura 6.26 – Representação da janela de pesquisa para localização do pixel da fronteira do estroma (vermelho) e zona de espalhamento dos brilhos da interface anterior da córnea (tracejado laranja).

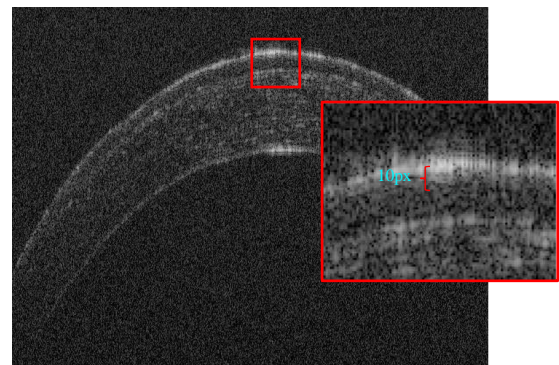


Figura 6.27 – Efeito de espalhamento nas fronteiras da córnea.

Posteriormente, foi feita a detecção do contorno da fronteira posterior da córnea. Para o efeito, fez-se um varrimento pelas colunas consideradas e em cada uma foi criada uma janela de pesquisa entre o limite posterior da janela considerada para o estroma e o final da imagem (Figura 6.28). Nessa janela foi detetado o pixel de intensidade máxima, que normalmente correspondia à fronteira posterior da córnea, e registada a sua posição e valor da intensidade.

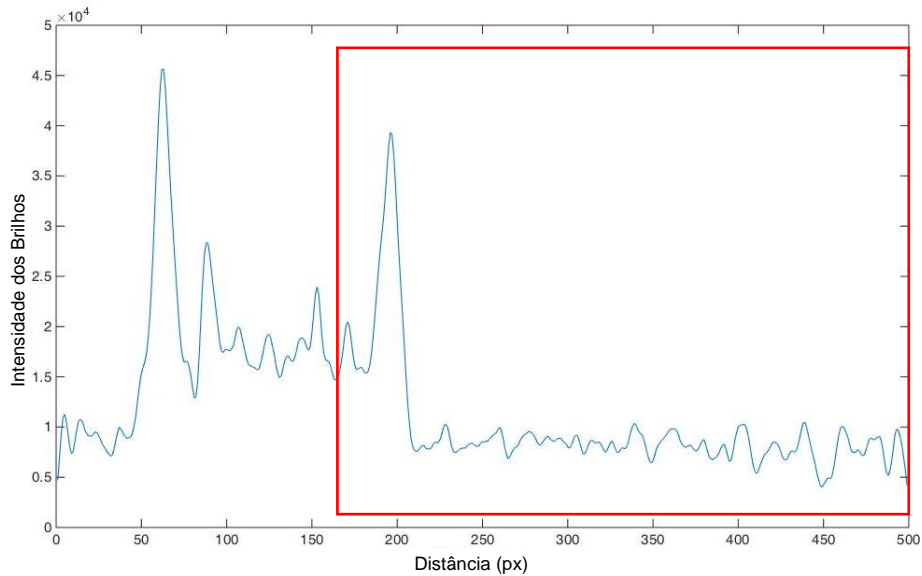


Figura 6.28 – Representação da janela de pesquisa para localização do pixel da fronteira posterior da córnea.

Por último, foi feito um controlo semelhante ao realizado para a córnea anterior, desprezando os pixels cuja intensidade era inferior à média menos um desvio padrão ( $\bar{x} - \sigma$ ) dos valores de intensidade registados. Usando as coordenadas dos pixels resultantes, foi gerado um polinómio de grau 2, cuja aproximação resultante se ajusta ao contorno da fronteira posterior da córnea.

O resultado final da deteção das fronteiras e da aproximação polinomial está representado na Figura 6.29. O cálculo da espessura das camadas foi feito com base nos vértices das três parábolas, que correspondem à zona central da córnea (Figura 6.30). Para tal, foi calculada a distância entre estes, multiplicando o resultado pelo valor do rácio da conversão de pixels em  $\mu\text{m}$ .

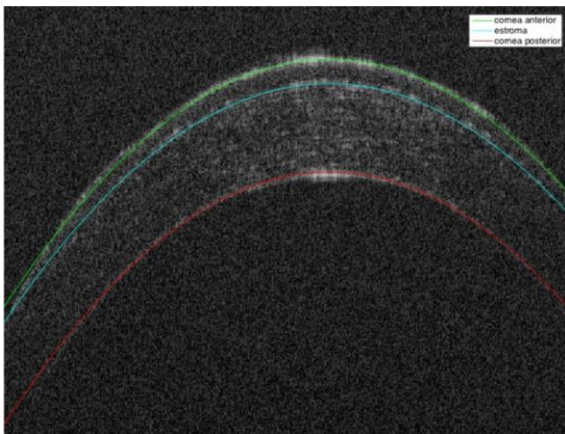


Figura 6.29 – Resultado final da segmentação.

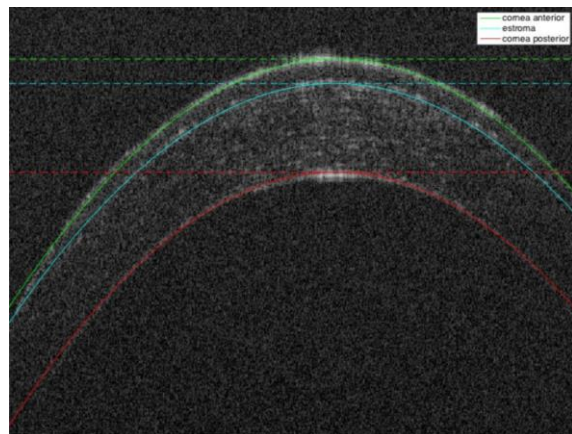


Figura 6.30 – Representação da medida da espessura das camadas.



### 6.5.3. Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos com os métodos descritos foram estatisticamente analisados de modo a encontrar correlações ou diferenças significativas entre os dados dos dois grupos (controle e estudo), ao longo do tempo. Os testes estatísticos foram realizados em ambiente Stata/SE™ (*StataCorp LP, TX, USA*) versão 12.1. Considerou-se, como estatisticamente significativo, um valor de  $P$  menor ou igual a 0.05.

A normalidade dos dados foi testada com o método de *Kolmogorov-Smirnov* [87].

A diferença entre os grupos para as várias medidas foi testada com o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* [88], considerando-se quer os dados de todas as semanas, quer os dados semana a semana. O valor de  $P$  obtido com este teste determina a diferença entre os dados, isto é, se o valor de  $P$  for inferior a 0.05, então os dados testados pertencem a grupos diferentes.

Para cada grupo, a diferença entre semanas para as várias medidas foi testada com o teste não paramétrico de *Wilcoxon* [89]. O valor de  $P$  obtido com este teste determina a diferença entre os dados de duas visitas, isto é, se o valor de  $P$  for inferior a 0.05, então os dados apresentam diferenças estatisticamente significantes entre si, sugerindo a ocorrência de alterações entre as mesmas.

A correlação entre a espessura da córnea e as suas camadas e os níveis de glicémia foi avaliada com o coeficiente de correlação de *Spearman* [90]. Este coeficiente ( $\rho$ ), que varia entre -1 e 1, determina a correlação entre duas variáveis independentes. Quanto mais próximo o valor do coeficiente estiver destes extremos, maior será a associação entre as variáveis. Correlações com coeficientes abaixo de 0.400 são consideradas fracas, entre 0.400 e 0.600 as correlações são consideradas moderadas e acima de 0.600 as correlações são fortes. Se o valor do coeficiente de correlação for negativo, então as variáveis correlacionam-se de forma inversa, isto é, se uma aumenta a outra diminui.



## 7. Resultados e Discussão



## 7. Resultados e Discussão

### 7.1. Variação da espessura da córnea

A espessura total da córnea, do epitélio e do estroma foram calculadas para as 8 semanas através dos sinais de ultrassons e da segmentação automática das imagens de OCT (do inglês, *Optical Coherence Tomography*). Os valores obtidos foram comparados entre grupos (controlo e diabéticos), considerando todos os valores de espessura obtidos em cada grupo, e entre semanas, dentro de cada grupo.

Na comparação entre grupos, considerando os dados das 8 semanas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para a espessura total da córnea.

Nos valores calculados para a espessura total da córnea, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na comparação da diferença entre a *baseline* e a semana 8 entre os grupos de controlo e de estudo ( $P = 0,017$  para a sonda de 20 MHz,  $P = 0,002$  e  $P = 0,003$  para os valores obtidos através do tempo de voo calculado no domínio do tempo e para os valores obtidos através do tempo de voo calculado no domínio da frequência com a sonda de 50MHz, respetivamente). Os valores para a espessura total da córnea calculados através da segmentação das imagens de OCT não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de controlo e o grupo de estudo na *baseline* e na semana 8 ( $P = 0,849$ ). Na Figura 7.1, Figura 7.2, Figura 7.3 e Figura 7.4 encontram-se esquematizados os resultados obtidos para a espessura central da córnea, obtida com as sondas de 20MHz e 50MHz nos grupos de controlo e de estudo.

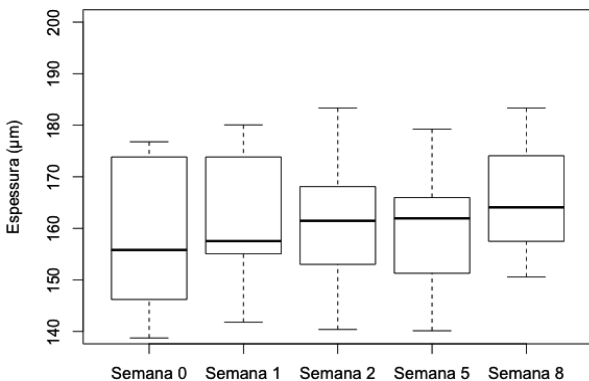


Figura 7.1 – Evolução da espessura total da córnea no grupo de controlo, obtida com sonda de 20MHz.

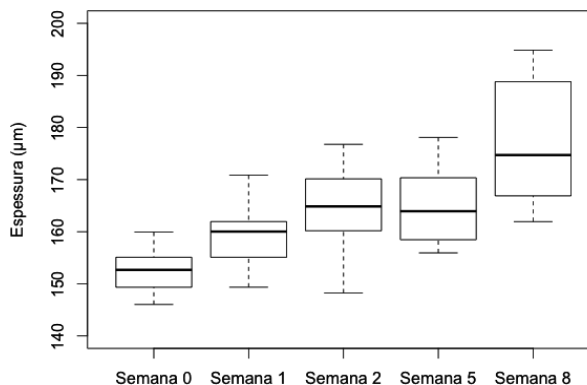


Figura 7.2 – Evolução da espessura total da córnea no grupo de estudo, obtida com sonda de 20MHz.

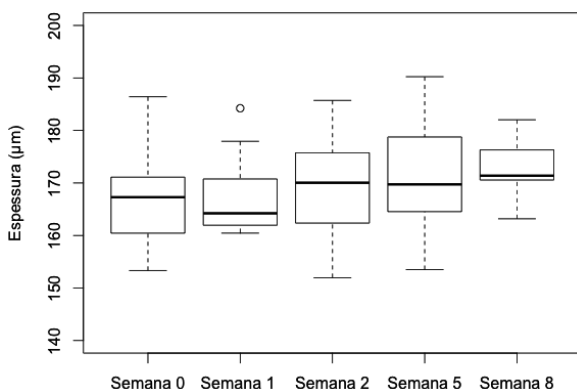


Figura 7.3 – Evolução da espessura total da córnea no grupo de controlo, obtida com sonda de 50MHz.

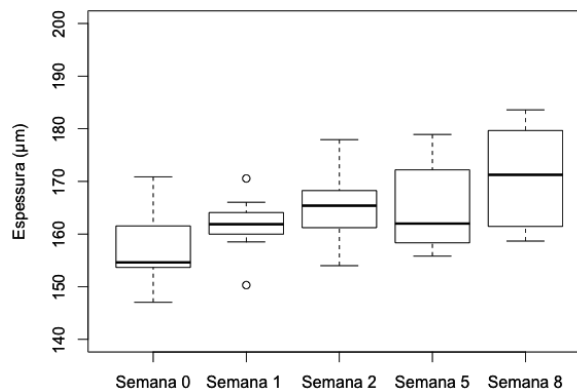


Figura 7.4 – Evolução da espessura total da córnea no grupo de estudo, obtida com sonda de 50MHz.

Na comparação da espessura total córnea entre semanas, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre a *baseline* e a semana 8 no grupo de estudo para 20MHz ( $P < 0,001$ ) (Figura 7.2), para 50MHz ( $P < 0,001$ ) (Figura 7.4) e para a espessura medida com OCT ( $P < 0,001$ ). No grupo controlo, para a espessura total da córnea, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nas medidas obtidas com ultrassons ( $P = 0,445$  para 20MHz (Figura 7.1),  $P = 0,1589$  para 50MHz (Figura 7.3)), tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significantes nas medidas obtidas com OCT ( $P < 0,001$ ).

Foram ainda encontradas diferenças estatisticamente significantes entre a *baseline* e a semana 1 para o grupo de estudo ( $P = 0,001$  para 20MHz e OCT, e  $P = 0,002$  e  $P = 0,007$  para 50MHz para as

medidas obtidas no domínio do tempo e no domínio da frequência, respetivamente). Na comparação entre a *baseline* e a semana 1, para o grupo de controlo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas medidas obtidas com ultrassons ( $P = 0,636$ ,  $P = 0,880$ ,  $P = 0,4082$  para 20MHz e 50MHz), tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas nos valores da espessura calculados através das imagens OCT ( $P < 0,001$ ).

O aumento da espessura total da córnea verificado nos ratos diabéticos ao longo do tempo de seguimento, sugere que a avaliação da espessura da córnea seja um indicador da presença da doença. Alguns autores encontraram também um aumento da espessura da córnea em doentes diabéticos [42], [44], [45]. No grupo de controlo, verificou-se um aumento pouco expressivo da espessura da córnea ao longo do tempo de seguimento, comparativamente com o verificado no grupo de estudo, o que pode ser justificado pelo crescimento do animal durante o período do estudo. Hipótese esta que deverá ser experimentalmente confirmada em trabalhos futuros.

O aumento significativo da espessura da córnea na primeira semana, de diabetes, sugere que as alterações na córnea possam acontecer em estadios precoces da doença, uma vez que a aquisição foi feita 1 semana após a indução da diabetes, ou seja, 5 dias após os animais se tornarem diabéticos (considerando as 48 horas necessárias à destruição das células- $\beta$  do pâncreas no modelo produzido).

Na semana 5 observa-se um desvio do valor médio da espessura total da córnea no grupo de estudo, em relação à tendência evidenciada. Este desvio deve-se à dificuldade verificada em anestésiar os animais diabéticos, o que implicou a aquisição de sinais com alguns movimentos do animal, em particular movimentos do globo ocular. Esta dificuldade foi reportada por outros autores [91], [92], tendo-se verificado que ao fim de algum tempo de diabetes os animais desenvolvem resistência ao tipo de anestesia usada. De forma a esta limitação não influenciar o estudo, na semana 8 as doses de anestesia foram reajustadas.

A origem do desvio padrão expressivo verificado em alguns resultados poderá estar relacionado com o sistema de aquisição usado. Embora o acoplamento da sonda ao olho, tenha sido projetado de forma a que a incidência do feixe de ultrassons fosse o mais normal possível ao olho do animal, não foi possível garantir que todas as aquisições fossem efetuadas nas condições de incidência ideais. Uma incidência do feixe de ultrassons, ainda que ligeiramente diferente da normal ao olho (ângulo de  $90^\circ$  com a superfície), poderá resultar em ecos de menor amplitude, constituindo uma fonte de erros nos resultados. O impacto que uma eventual incidência oblíqua tem nos dados, poderá ser experimentalmente confirmado comparando os resultados obtidos neste estudo, *in vivo*, com os resultados obtidos *ex vivo* dos mesmos ratos em condições de incidência ideais.

Os resultados obtidos através da segmentação automática das imagens obtidas por OCT, não revelaram tendência definida tanto nos ratos diabéticos como no grupo de controlo. Contudo, estes resultados devem ser interpretados tendo em conta a configuração experimental utilizada e as possíveis fontes de erro. Nas aquisições com OCT foi usada uma plataforma móvel para posicionamento do animal. Consequentemente, o posicionamento rigoroso do animal ao longo das várias visitas, não foi conseguido, por se tratar de uma tarefa de extrema dificuldade. Este facto poderá ter influenciado as imagens adquiridas para o mesmo rato ao longo do tempo de seguimento. O erro associado à segmentação automática dos contornos da córnea e das suas subcamadas, pelo algoritmo desenvolvido, relaciona-se com o espalhamento dos brilhos nas fronteiras da córnea, induzido pela eletrónica do equipamento e pelo sistema ótico associado.

Algumas possíveis alterações ao sistema de aquisição poderiam minimizar estes erros, nomeadamente o desenvolvimento de um sistema de posicionamento que garantisse que as medidas ao longo das visitas fossem feitas sempre na mesma posição.

Em relação à técnica por ultrassons, o aumento do número de aquisições obtido por olho em cada semana poderia diminuir a incerteza associada à estimação da espessura da córnea, permitindo uma aproximação ao valor real da mesma. Neste estudo foram feitas 5 aquisições para cada olho, em cada semana, pelo que, o aumento deste número, poderia diminuir o erro nesta estimação.

## **7.2. Variação da espessura das camadas da córnea**

As espessuras do epitélio e estroma, foram calculadas ao longo das 8 semanas com ultrassons e OCT e comparadas entre semanas. No cálculo da espessura do epitélio e estroma por ultrassons apenas a sonda de 50MHz permitiu a discriminação destas duas camadas, devido à resolução associada a esta frequência.

No grupo de estudo verificou-se um aumento nas espessuras do epitélio e do estroma (Figura 7.6 e Figura 7.8 respetivamente) calculadas com ultrassons ao longo das 8 semanas. Também no grupo de controlo se verificou um aumento da espessura do epitélio. Na comparação dos valores da espessura entre grupos, considerando os valores obtidos em todas as semanas, tanto para o epitélio como para o estroma, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Na comparação entre grupos, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa na diferença entre a semana 0 e a semana 8 entre grupos ( $P = 0,019$ ) na espessura do estroma (Figura 7.7 e Figura 7.8).



As medidas obtidas através da segmentação automática das imagens da córnea obtidas com OCT não revelaram tendência definida tanto para o grupo de controlo como para o grupo de estudo.

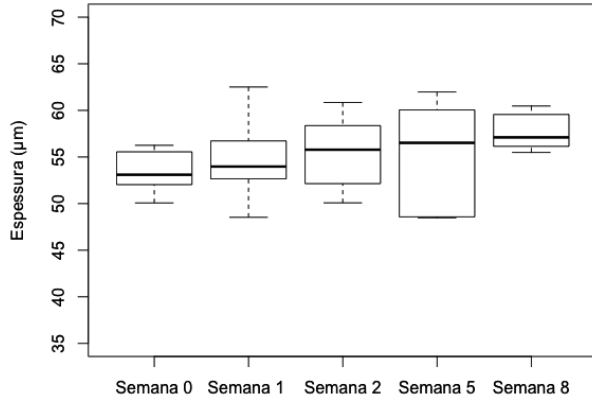


Figura 7.5 – Evolução da espessura do epitélio no grupo de controlo, obtida com a sonda de 50MHz.

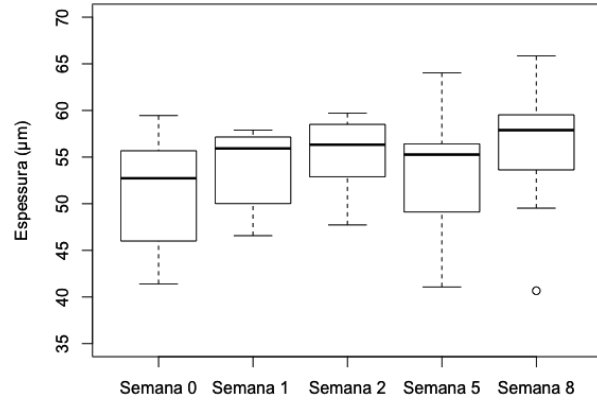


Figura 7.6 – Evolução da espessura do epitélio no grupo de estudo, obtida com a sonda de 50MHz.

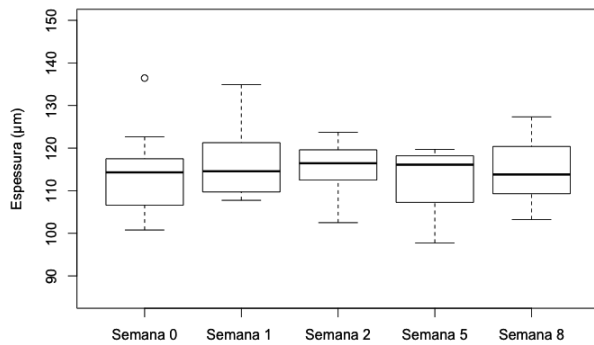


Figura 7.7 – Evolução da espessura do estroma no grupo de controlo, obtida com a sonda de 50MHz.

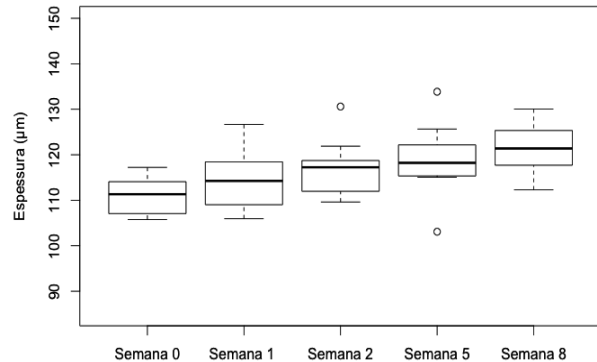


Figura 7.8 – Evolução da espessura do estroma no grupo de estudo, obtida com a sonda de 50MHz.

Com base na segmentação das imagens obtidas por OCT, foi feita a comparação das camadas constituintes da córnea em termos da sua dimensão relativa, isto é, considerando o espaço ocupado por cada camada na espessura total da córnea. Na Figura 7.9 e Figura 7.10 é apresentada a dimensão relativa do epitélio para o grupo de controlo e de estudo, respetivamente, ao longo das 8 semanas. Já a Figura 7.11 e Figura 7.12 apresentam a dimensão relativa do estroma para o grupo de controlo e de estudo, respetivamente, ao longo das 8 semanas.

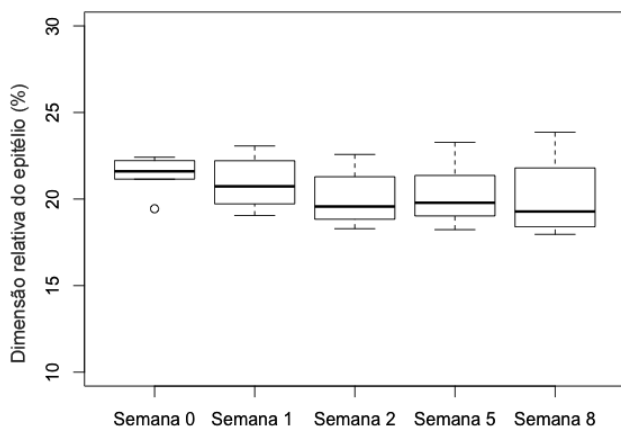


Figura 7.9 – Dimensão relativa do epitélio face à espessura total da córnea no grupo de controlo, obtido com OCT.

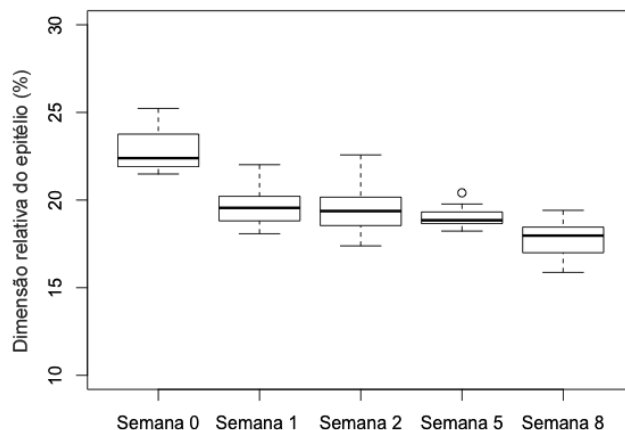


Figura 7.10 – Dimensão relativa do epitélio face à espessura total da córnea no grupo de estudo, obtido com OCT.

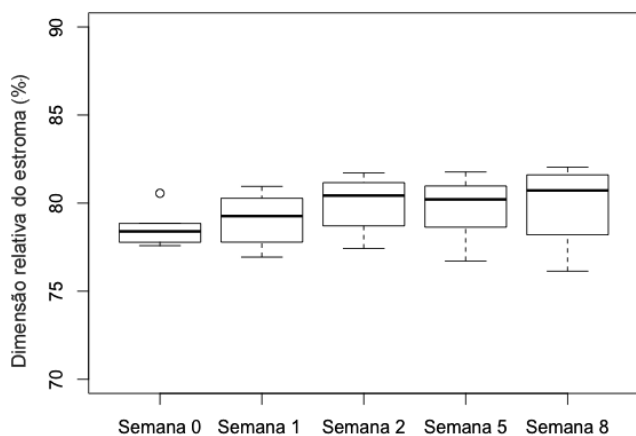


Figura 7.11 – Dimensão relativa do estroma face à espessura total da córnea no grupo de controlo, obtido com OCT

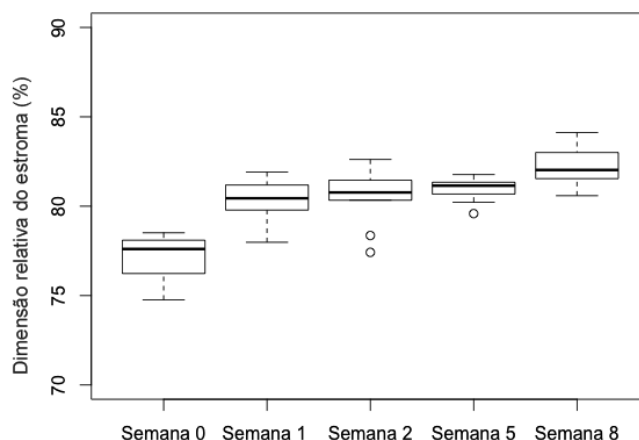


Figura 7.12 – Dimensão relativa do estroma face à espessura total da córnea no grupo de estudo, obtido com OCT

Na comparação das medidas da espessura do epitélio e do estroma entre grupos não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos métodos.

Na comparação da espessura do epitélio entre visitas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a *baseline* e a semana 8 no grupo de estudo ( $P = 0,002$  e  $P = 0,003$  com 50MHz e OCT, respetivamente) e no grupo controlo ( $P = 0,010$  e  $P = 0,003$  com 50MHz e OCT, respetivamente).

Na comparação da espessura do estroma, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre a *baseline* e a semana 8 no grupo de estudo ( $P < 0,001$  e  $P < 0,001$  com 50MHz e OCT, respectivamente), e no grupo de controlo ( $P < 0,001$  com OCT). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre visitas nas medidas do estroma do grupo de controlo obtidas com 50MHz ( $P = 0,824$ ). Foram ainda encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a *baseline* e a semana 1 para o grupo de estudo ( $P = 0,001$ ), com OCT.

O aumento verificado na espessura do epitélio obtido por ultrassons, no grupo de estudo, desde a *baseline* até à semana 8, impossibilita que seja retirada uma conclusão sólida para o aumento desta camada da córnea ao longo do tempo de seguimento da diabetes, devido ao desvio padrão associado às medidas e a ordem de grandeza da medida (ver Figura 7.5 e Figura 7.6).

O aumento verificado na espessura do estroma em ratos diabéticos e a manutenção do valor da espessura do estroma nos ratos saudáveis, são um indicador do aumento do edema da córnea em ratos diabéticos, o que vai de encontro às hipóteses de alguns autores sobre a falência dos mecanismos de regulação da hidratação da córnea, nomeadamente as bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  do endotélio [49]–[51], consequência dos efeitos tóxicos da hiperglicemia [93]. Os resultados da espessura do epitélio e do estroma nos ratos de controlo e nos ratos diabéticos evidenciaram que o estroma é a camada que mais contribui para o aumento da espessura da córnea em indivíduos diabéticos.

A segmentação das imagens obtidas por OCT, apesar de não terem permitido a estimação da espessura real da córnea e das suas camadas, permitiram analisar as alterações na sua estrutura, nomeadamente na dimensão das suas camadas. Da análise da dimensão relativa das camadas observou-se que é o estroma que mais contribui para esse aumento em ratos diabéticos, resultado que está em consonância com a tendência encontrada nos dados obtidos por ultrassons (Figura 7.8).

De entre as alterações promovidas pela diabetes na córnea, a falha nos mecanismos de transporte e manutenção dos fluídos através do endotélio, devido à falência das bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  desta membrana por consequência direta da hiperglicemia [93], são apontados como a maior causa para o aumento da hidratação do estroma e consequente aumento da espessura da córnea [49]–[51]. No entanto, outros fatores podem contribuir para o aumento do edema da córnea. A nível do estroma, a falha nos mecanismos de síntese de colagénio [51] e a diminuição da densidade celular nesta camada [40] poderão ser algumas das causas para o aumento verificado na sua espessura. Já ao nível do epitélio, o aumento da sua permeabilidade [94], o que facilita a entrada de água através do filme lacrimal, aumento de volume das células da membrana basal (consequência do aumento da taxa de

morte celular nesta camada) [40], e a perda de função de barreira devido à morte celular e ao aumento da concentração de glicose intra e intercelular [51], são apontadas como possíveis causas para o aumento da sua espessura.

### 7.3. Atenuação no humor aquoso

O coeficiente de atenuação no humor aquoso foi calculado ao longo das 8 semanas usando os sinais acústicos obtidos com a sonda de 20MHz e 50MHz. Verificou-se um aumento da atenuação no grupo de estudo e no grupo de controlo nas medidas obtidas com a sonda de 50MHz, embora no grupo de estudo este aumento tenha sido mais acentuado. Os valores da atenuação obtidos com a sonda de 20MHz não revelaram tendência definida.

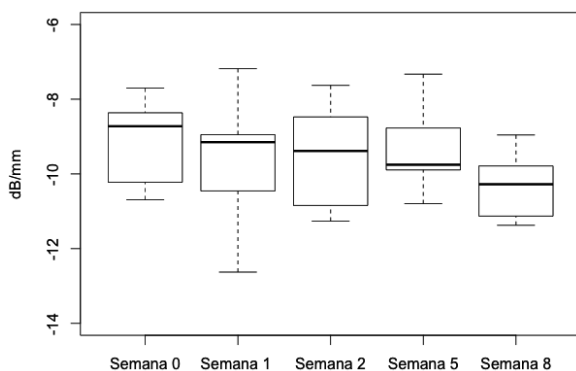


Figura 7.13 – Atenuação no percurso do humor aquoso no grupo de controlo, obtida com a sonda de 50MHz.

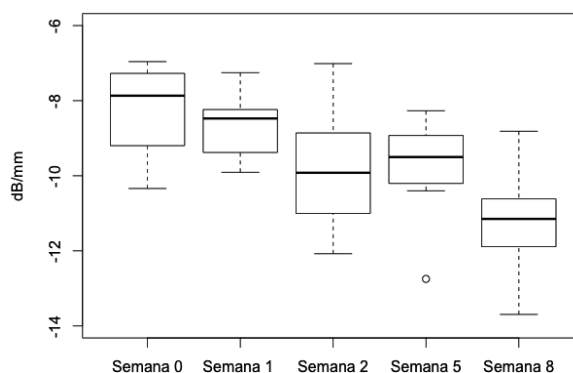


Figura 7.14 – Atenuação no percurso do humor aquoso no grupo de estudo, obtida com a sonda de 50MHz.

Na comparação do coeficiente de atenuação entre grupos, isto é, considerando todos os valores obtidos em cada grupo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para nenhuma das frequências usadas.

Já na comparação do coeficiente de atenuação obtido com a sonda de 20MHz entre semanas, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a *baseline* e a semana 8 para o grupo controlo ( $P < 0,001$ ), não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as mesmas visitas para o grupo de estudo ( $P = 0,3136$ ).

Na comparação do coeficiente de atenuação obtido com a sonda de 50MHz entre visitas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a *baseline* e a semana 8 para o grupo de estudo e para o grupo de controlo ( $P < 0,001$  e  $P = 0,031$ , respetivamente).

A atenuação obtida com a sonda de 20MHz, apesar de ter evidenciado diferenças estatisticamente significativas nos dois grupos, não apresenta tendência definida ao longo do tempo de seguimento. Este resultado deve ser interpretado tendo em conta o modo como o valor da atenuação foi obtido nos sinais adquiridos com a sonda de 20MHz. Ou seja, o valor do coeficiente de atenuação no humor aquoso calculado com base nos sinais obtidos com a sonda de 20MHz, tinha associadas algumas limitações. Como este cálculo é dependente da amplitude dos ecos considerados, a seleção dessa amplitude pode influenciar o resultado obtido.

No caso dos sinais obtidos com 20MHz, observou-se que o eco da fronteira posterior da córnea, aparece sobreposto com o eco da fronteira anterior da córnea. Por esse motivo, não foi possível garantir que a amplitude da reflexão na fronteira anterior do humor aquoso, considerada para este cálculo, correspondesse à fronteira posterior da córnea, podendo ter sido selecionada a amplitude correspondente à fronteira anterior da córnea ou a uma amplitude resultante da interferência dos dois ecos.

Devido a essa dependência, pode ter acontecido, em alguns sinais, que o coeficiente de atenuação calculado não corresponda ao valor do mesmo para o humor aquoso, mas sim para um outro percurso que inclui parte ou a totalidade da córnea. Por se tratarem de meios distintos, com estrutura diferente e diferentes parâmetros acústicos, nomeadamente o coeficiente de atenuação, os resultados obtidos poderão não refletir a tendência real tanto nos indivíduos saudáveis como nos doentes.

Ao contrário dos dados obtidos com a sonda de 20MHz, o coeficiente de atenuação no humor aquoso obtido com a sonda de 50MHz revelou uma tendência para a aumento (em módulo) no grupo de estudo, ou seja, o meio tornou-se mais atenuador com a progressão da doença. Uma vez que nos sinais obtidos com a sonda de 50MHz foi possível distinguir os ecos da fronteira posterior da córnea e da fronteira anterior do cristalino, não se põe em causa a identificação dos ecos considerados para o cálculo deste parâmetro acústico. Além disso, a inequívoca identificação dos ecos que limitam o humor aquoso, permitiu que a distância considerada para o cálculo correspondesse apenas à distância percorrida pelos ultrassons no humor aquoso, e não ao percurso total entre a fronteira anterior da córnea e a fronteira anterior do cristalino. Contudo, importa referir que os problemas de incidência podem ter influenciado a amplitude dos sinais e, por isso, os resultados devem ser confirmados com uma amostra maior e com ensaios em condições de incidência controladas e ideais.

Mais uma vez, salienta-se a incoerência da semana 5 em relação à tendência das restantes semanas. Conforme anteriormente explicado, este desvio do valor médio deve-se à dificuldade verificada em anestésiar os animais diabéticos, o que implicou a aquisição de sinais com alguns movimentos do animal, em particular movimentos do globo ocular

Apesar de se ter verificado diferença estatisticamente significativa entre os resultados da *baseline* e os resultados da semana 8 no grupo controlo, é necessário considerar que a tendência observada no coeficiente de atenuação em ratos diabéticos foi muito mais acentuada (ver Figura 7.14), ou seja, o meio foi mais atenuador. Este resultado poderá ser um indicador da presença da doença, DM, e da sua progressão, uma vez que é possível que esta alteração tenha sido provocada pelo aumento da concentração de glicose neste meio, estando em linha com os resultados obtidos em alguns estudos sobre o aumento da concentração de glicose no humor aquoso em diabéticos [53], [56], [95].

#### 7.4. Correlação entre os níveis de glicémia e a espessura e atenuação

Os valores dos coeficientes de correlação entre a espessura da córnea, do epitélio e do estroma, e os níveis de glicemia, encontram-se na tabela 1.

Tabela 7.1 – Coeficientes de correlação de Spearman entre a espessura da córnea (CCT), do epitélio e do estroma, e os níveis de glicemia.

			CCT 20MHz	CCT 50MHz	Epitélio 50MHz	Estroma 50MHz	CCT OCT	Estroma OCT (%)	Epitélio OCT (%)	Atenuação 20MHz	Atenuação 50MHz
Controlos	Glicémia	$\rho$	0,344	0,160	0,089	0,126	0,412	0,311	-0,311	-0,061	0,093
		$P$	0,009	0,238	0,516	0,356	0,028	0,026	0,026	0,0689	0,560
Diabéticos	Glicémia	$\rho$	0,513	0,522	0,337	0,365	0,674	0,684	-0,680	0,272	-0,492
		$P$	<0,001	<0,001	0,004	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,074	<0,001

Foi encontrada uma correlação moderada entre os níveis de glicémia e a espessura da córnea calculada com OCT ( $\rho = 0,412$  e  $P = 0,028$ ).

Nos ratos diabéticos foram encontradas correlações moderadas entre os níveis de glicémia e a espessura da córnea calculada com base nos sinais obtidos com as sondas de 20MHz ( $\rho = 0,513$  e  $P < 0,001$ ) e 50 MHz ( $\rho = 0,522$  e  $P < 0,001$ ). Foram ainda encontradas correlações fortes entre

os níveis de glicémia e a espessura da córnea ( $\rho = 0,674$  e  $P < 0,001$ ), a dimensão relativa do epitélio ( $\rho = -0,680$  e  $P < 0,001$ ) e do estroma ( $\rho = 0,684$  e  $P < 0,001$ ), calculadas com base na segmentação automática das imagens obtidas com OCT. Também na atenuação no humor aquoso foi encontrada correlação moderada entre os níveis de glicémia e a atenuação calculada com base nos sinais obtidos com a sonda de 50MHz ( $\rho = -0,492$  e  $P < 0,001$ ).

Os resultados demonstram que o aumento da glicemia esta associado ao aumento da espessura total da córnea e do estroma, o que poderá ser explicado pela alteração nos mecanismos de hidratação da córnea, promovendo o seu edema [49]–[51], [93]. O valor negativo para o coeficiente de correlação da dimensão relativa do epitélio deve-se ao facto do mesmo ter sido calculado com base na dimensão relativa, diminuindo ao longo das semanas como consequência do aumento do espaço ocupado pelo estroma. Quando considerado o valor do epitélio em micrómetros, a correlação com os níveis de glicemia passa a fraca ( $\rho = -0,371$  e  $P = 0,004$ ).

Já a correlação encontrada entre os níveis de glicémia e os valores da atenuação, o que sugere que o humor aquoso fica mais atenuante para os ultrassons. Este resultado pode ser explicado pelo aumento da concentração de glicose neste meio, o que vai de encontro com os resultados obtidos em alguns estudos sobre o aumento da concentração de glicose no humor aquoso em diabéticos [53], [56], [95].

Na Tabela 7.2 é apresentado um resumo com todos os resultados obtidos para cada método, nomeadamente a tendência observada e os valores de P obtidos em cada comparação.

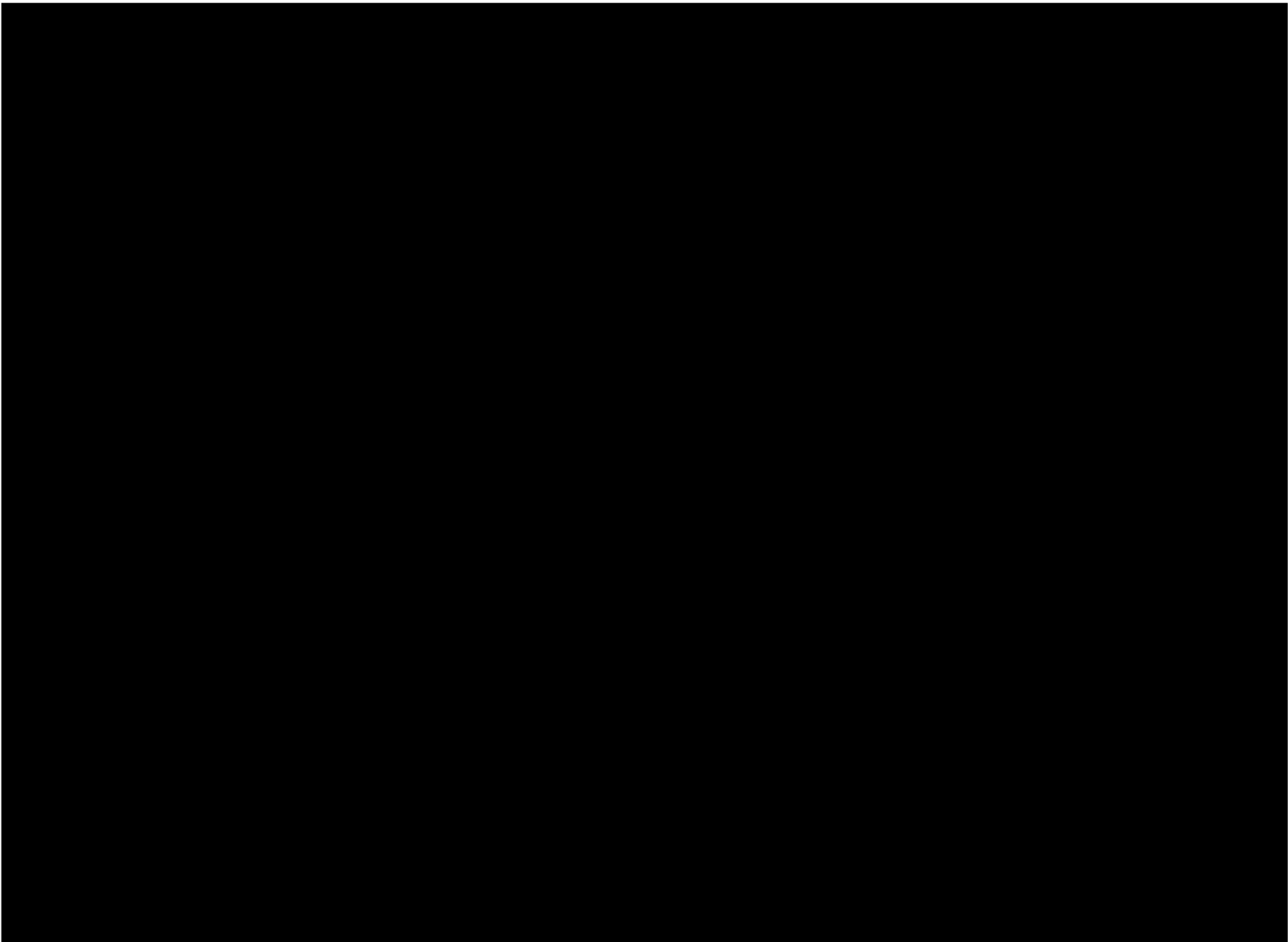
Tabela 7.2 – Sumário dos resultados.

	Tendência		Comparação entre grupos		Comparação entre semanas				Obs.
	Controle	Estudo	Considerando todos os dados de cada grupo	Considerando a diferença entre a semana 8 e a baseline	baseline e semana 1		baseline e semana 8		
					Controle	Estudo	Controle	Estudo	
CCT 20MHz	manutenção	aumento	sem diferenças	P = 0,017	P = 0,636	P = 0,001	P = 0,445	P < 0,001	
CCT 50MHz	manutenção	aumento	sem diferenças	P = 0,002	P = 0,880	P = 0,002	P = 0,1589	P < 0,001	
CCT OCT	sem tendência definida		-	sem diferenças	P < 0,001	P = 0,001	P < 0,001	P < 0,001	*
Epitélio 50MHz	Ligeiro aumento		sem diferenças		sem diferenças	sem diferenças	P = 0,010	P = 0,002	
Epitélio OCT	sem tendência definida		-	-	sem diferenças	sem diferenças	P = 0,003	P = 0,003	*
Estroma 50MHz	manutenção	aumento	sem diferenças	P = 0,019	sem diferenças	sem diferenças	P = 824	P < 0,001	
Estroma OCT	sem tendência definida		-	-	sem diferenças	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	*
Atenuação 20MHz	sem tendência definida		sem diferenças		sem diferenças	sem diferenças	P < 0,001	P = 0,3136	*
Atenuação 50MHz	aumento	aumento	sem diferenças		sem diferenças	sem diferenças	P = 0,031	P < 0,001	

\* Resultados para os quais os valores de p encontrados têm de ser interpretados tendo em conta a ausência de tendência definida.



## 8. Conclusões





## 8. Conclusões

O presente estudo mostrou ser possível com base nas metodologias desenvolvidas avaliar alterações provocadas pela diabetes no polo anterior do olho.

O modelo animal revelou-se um bom modelo para o estudo das alterações provocadas pela diabetes na córnea e humor aquoso ao permitir observar alterações semelhantes às documentadas por outros estudos, em humanos.

As correlações encontradas entre os níveis de glicemia e as alterações verificadas na córnea e humor aquoso indicam que a metodologia desenvolvida tem potencial para o estudo da diabetes.

A metodologia desenvolvida para o cálculo da espessura da córnea com ultrassons de alta frequência, em particular com a sonda de 50 MHz, revelou-se interessante por permitir avaliar as camadas da córnea em ratos. Tanto a metodologia desenvolvida para a sonda de 50MHz como para a sonda de 20MHz revelaram-se interessantes para o estudo das propriedades acústicas do humor aquoso, que se mostrou alterado em ratos diabéticos.

A sonda de 20MHz, apesar de não ter permitido o mapeamento das camadas da córnea em ratos, revelou-se uma metodologia interessante para o cálculo da espessura total da córnea, podendo ser uma metodologia interessante para a medição e mapeamento das camadas da córnea em humanos.

A segmentação automática das imagens da córnea obtidas com OCT é uma metodologia promissora para análise da espessura da córnea e para análise das alterações da sua subestrutura, nomeadamente através da medição das suas maiores camadas, o epitélio e o estroma.

O presente estudo é uma prova de conceito para o desenvolvimento de trabalhos sobre o polo anterior do olho, com ultrassons e OCT, documentando as alterações provocadas pela diabetes nestas estruturas, as metodologias de base a implementar e identificando falhas a colmatar em possíveis trabalhos futuros. Os resultados alcançados são promissores e os métodos desenvolvidos mostram potencial para uso em diagnóstico.

### **Trabalhos Futuros**

Seria interessante, num trabalho futuro, a utilização de um sistema de posicionamento mais eficaz no OCT que garanta que as aquisições são feitas sempre na mesma posição e que essa posição garante que a imagem resultante corresponde à dimensão real da córnea. Além disso, o melhoramento do acoplamento das sondas de ultrassons ao olho poderá minimizar a incerteza associada à medida.

Por se tratar de uma metodologia não-invasiva e de baixo custo, seria igualmente interessante a reprodução do estudo em humanos.

# Referências



# Referências

- [1] H. C. B. M. R. Sadava, David; Hills, David M; Heller, *LIFE: The Science of Biology, Tenth Edition*, 10th ed. W. H. Freeman, 2014.
- [2] M. M. Nelson, L David; Cox, *Principles of Biochemistry*, vol. 17, no. 8. 2011.
- [3] A. C. Hall, John E; Guyton, *Guyton And Hall Textbook Of Medical Physiology*, 13th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2016.
- [4] P. Z. G. A. R. A. DeFronzo E. Ferrannini, *International Textbook of Diabetes Mellitus, 2 Volume Set*, 4th ed. Wiley-Blackwell, 2015.
- [5] American Diabetes Association, “Diagnosis and classification of diabetes mellitus,” *Diabetes Care*, vol. 33, no. SUPPL. 1, 2010.
- [6] World Health Organisation, “WHO | Diabetes,” *WHO*, 2016.
- [7] International Diabetes Federation, “About Diabetes,” 2015. [Online]. Available: <http://www.idf.org/about-diabetes>. [Accessed: 01-Jul-2016].
- [8] S. P. de Diabetologia, *Diabetes: Factos e Números*, vol. 11. 2014.
- [9] International Diabetes Federation, “IDF Diabetes Atlas, 7th edn,” Brussels, 2015.
- [10] O. Ozougwu, “The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus,” *J. Physiol. Pathophysiol.*, vol. 4, no. 4, pp. 46–57, 2013.
- [11] A. Mari, E. Ferrannini, J. S. Skyler, and D. P. T. S. Grp, “Mechanisms of progression to diabetes in relatives of type 1 diabetic patients,” *Diabetes*, vol. 56, pp. A384–A384, 2007.
- [12] C. Campos, “Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: pathology and clinical sequelae,” *Postgrad. Med.*, vol. 124, no. 6, pp. 90–7, 2012.
- [13] R. Lee, T. Y. Wong, and C. Sabanayagam, “Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss.,” *Eye Vis. (London, England)*, vol. 2, p. 17, 2015.

- [14] L. WebMD, “Diabetic Nephropathy - Topic Overview,” 2016. [Online]. Available: <http://www.webmd.com/diabetes/tc/diabetic-nephropathy-topic-overview>. [Accessed: 21-Aug-2016].
- [15] K. Rogers, *The Eye: The Physiology of Human Perception (The Human Body)*, 1st ed. 2010.
- [16] J. W. Paul Riordan-Eva, *Vaughan and Asbury's General Ophthalmology*, 17th ed. McGraw-Hill Medical, 2007.
- [17] “Orbit and eye image,” 2016. [Online]. Available: <http://www.imperialhealth.org/wp-content/themes/ypo-theme/images/orbit-img.jpg>. [Accessed: 19-Aug-2016].
- [18] J. S. D. M. D. Myron Yanoff MD, *Ophthalmology 4th Edition*, 4th ed. Saunders, 2014.
- [19] National Eye Institute, “Diagram of the Eye,” 2016. .
- [20] D. W. DelMonte and T. Kim, “Anatomy and physiology of the cornea,” *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 37, no. 3, pp. 588–598, 2011.
- [21] I. C. Ramos, “Revisão da Literatura: Anatomia e Fisiologia da Córnea - EYE VISIO,” 2016. [Online]. Available: <http://www.eyevisio.com/revisao-da-literatura-anatomia-e-fisiologia-da-cornea/>. [Accessed: 15-Aug-2016].
- [22] W. M. Bourne, “Biology of the corneal endothelium in health and disease.,” *Eye (Lond.)*, vol. 17, no. 8, pp. 912–8, 2003.
- [23] H. F. Edelhauser, “The Balance between Corneal Transparency and Edema The Proctor Lecture,” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 47, no. 5, p. 1755, May 2006.
- [24] L. J. Müller, C. F. Marfurt, F. Kruse, and T. M. T. Tervo, “Corneal nerves: Structure, contents and function,” *Experimental Eye Research*, vol. 76, no. 5. pp. 521–542, 2003.
- [25] A. J. Rózsa and R. W. Beuerman, “Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit,” *Elsevier Biomed. Press*, vol. 14, no. 2, pp. 105–120, 1982.
- [26] M. Goel, R. G. Picciani, R. K. Lee, and S. K. Bhattacharya, “Aqueous humor dynamics: a review.,” *Open Ophthalmol. J.*, vol. 4, pp. 52–9, 2010.
- [27] D. Z. Jackson Coleman; Silverman, Ronald H.; Lizzi, Frederic L.; Rondeai, Mark J.; Lloyd,



- Harriet O.; Daly, Sizanne W.; Reinstein, *Ultrasonography of the eye and orbit*, Second edi. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [28] J. Santos, J. S. Silva, A. A. Santos, and P. Belo-Soares, “Detection of pathologic liver using ultrasound images,” *Biomed. Signal Process. Control*, vol. 14, pp. 248–255, 2014.
- [29] D. L. Miller, N. B. Smith, M. R. Bailey, G. J. Czarnota, K. Hynynen, and I. R. S. Makin, “Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations.,” *J. Ultrasound Med.*, vol. 31, no. 4, pp. 623–34, 2012.
- [30] P. Laugier and G. Haiat, “Introduction to the physics of ultrasound,” in *Bone Quantitative Ultrasound*, 2011, pp. 29–45.
- [31] S. N. N. (eds. . Marc A. Huntoon (auth.), *Atlas of Ultrasound-Guided Procedures in Interventional Pain Management*, 1st ed. Springer-Verlag New York, 2011.
- [32] J. E. Aldrich, “Basic physics of ultrasound imaging.,” *Crit. Care Med.*, vol. 35, no. 5 Suppl, pp. S131–S137, 2007.
- [33] H. Umegaki, “NEURODEGENERATION IN DIABETES MELLITUS,” *Adv Exp Med Biol*, pp. 258–265, 2012.
- [34] N. I. O. HEALTH, “Diabetic neuropathies : The nerve damage of diabetes,” *Natl. Diabetes Inf. Clear.*, pp. 1–11, 2009.
- [35] N. Papanas, A. I. Vinik, and D. Ziegler, “Neuropathy in prediabetes: does the clock start ticking early?,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 7, no. 11, pp. 682–690, 2011.
- [36] M. Tabák, Adam G.; Helder, Christian; Rathmann, Wolfgang; Brunner, Eric J.; Kivimaki, “Prediabetes\_ A high-risk state for developing diabetes,” *Lancet* , vol. 379, no. 9833, pp. 2279–2290, 2012.
- [37] D. Ziegler, N. Papanas, A. Zhivov, S. Allgeier, K. Winter, I. Ziegler, J. Br??ggemann, A. Strom, S. Peschel, B. Kohler, O. Stachs, R. F. Guthoff, and M. Roden, “Early detection of nerve fiber loss by corneal confocal microscopy and skin biopsy in recently diagnosed type 2 diabetes,” *Diabetes*, vol. 63, no. 7, pp. 2454–2463, 2014.
- [38] S. A. Hasan, “The Cornea in Diabetes Mellitus,” in *Diabetic Retinopathy: Evidence-Based*

- Management*, J. D. Browning, Ed. New York, NY: Springer New York, 2010, pp. 347–355.
- [39] Y. Kaji, T. Usui, T. Oshika, M. Matsubara, H. Yamashita, M. Araie, T. Murata, T. Ishibashi, R. Nagai, S. Horiuchi, and S. Amano, “Advanced glycation end products in diabetic corneas.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 41, no. 2, pp. 362–368, 2000.
- [40] M. J. Quadrado, M. Popper, A. M. Morgado, J. N. Murta, and J. a Van Best, “Diabetes and corneal cell densities in humans by in vivo confocal microscopy.,” *Cornea*, vol. 25, no. 7, pp. 761–8, 2006.
- [41] M. Popper, M. J. Quadrado, A. M. Morgado, J. N. Murta, J. A. Van Best, and L. J. Muller, “Subbasal Nerves and Highly Reflective Cells in Corneas of Diabetic Patients: In vivo Evaluation by Confocal Microscopy ,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 46, no. 13, p. 879, May 2005.
- [42] J. S. Lee, B. S. Oum, H. Y. Choi, J. E. Lee, and B. M. Cho, “Differences in corneal thickness and corneal endothelium related to duration in diabetes,” *Eye*, vol. 20, no. 3, pp. 315–318, 2006.
- [43] A. M. Calvo-Maroto, R. J. Perez-Cambrodí, C. Albarán-Diego, A. Pons, and A. Cerviño, “Optical quality of the diabetic eye: a review.,” *Eye (Lond)*, vol. 28, no. 11, pp. 1271–1280, 2014.
- [44] Y. Ozdamar, B. Cankaya, S. Ozalp, G. Acaroglu, J. Karakaya, and S. S. Ozkan, “Is there a correlation between diabetes mellitus and central corneal thickness?,” *J. Glaucoma*, vol. 19, no. 9, pp. 613–6, 2010.
- [45] L. J. M. Maria E. Rosenberg, Timo M. T. Tervo, Ilkka J. Immonen and M. H. V. Carola Gronhagen–Riska, “Corneal Structure and Sensitivity in Type 1 Diabetes Mellitus,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 41, no. 10, pp. 2915–2921, 2000.
- [46] G. Bikbova, T. Oshitari, A. Tawada, and S. Yamamoto, “Corneal changes in diabetes mellitus.,” *Curr. Diabetes Rev.*, vol. 8, no. 4, pp. 294–302, 2012.
- [47] N. Busted, T. Olsen, and O. Schmitz, “Clinical observations on the corneal thickness and the corneal endothelium in diabetes mellitus,” *Br.J Ophthalmol*, vol. 65, no. 0007–1161, pp. 687–690, 1981.

- [48] C. W. O. B. E. F. Frcp. Chris Steele BSc(Hons) FCOptom DCLP DipOC FBCLA David H. W. Steel MBBs FRCOphth, *Eye Essentials: Diabetes and the Eye*, 1st ed. Butterworth-Heinemann, 2007.
- [49] B. C. Weston, W. M. Bourne, K. A. Polse, and D. O. Hodge, “Corneal hydration control in diabetes mellitus,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 36, no. 3, pp. 586–595, 1995.
- [50] W. M. Bourne, “Clinical estimation of corneal endothelial pump function.,” *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, vol. 96, pp. 229-39-42, 1998.
- [51] P. R. Herse, “Corneal hydration control in normal and alloxan-induced diabetic rabbits,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 31, no. 11, pp. 2205–2213, 1990.
- [52] S. A. Hasan, “The Cornea in Diabetes Mellitus,” pp. 1–30, 2010.
- [53] M. S. Borchert, M. C. Storrie-Lombardi, and J. L. Lambert, “A noninvasive glucose monitor: preliminary results in rabbits,” *Diabetes Technol. Ther.*, vol. 1, no. 2, pp. 145–151, 1999.
- [54] R. L. et. al. Adams, “Noninvasive Glucose Monitoring of the Aqueous Humor of the Eye: Part II. Animal Studies and the Scleral Lens,” vol. 5, no. 3, pp. 254–258, 1982.
- [55] J. L. Lambert, C. C. Pelletier, and M. Borchert, “Glucose determination in human aqueous humor with Raman spectroscopy.,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 10, no. 3, p. 31110, 2005.
- [56] B. D. Cameron, J. S. Baba, and G. L. Coté, “Measurement of the glucose transport time delay between the blood and aqueous humor of the eye for the eventual development of a noninvasive glucose sensor.,” *Diabetes Technol. Ther.*, vol. 3, no. 2, pp. 201–7, 2001.
- [57] L.-I. LARSSON, J. M. PACH, and R. F. BRUBAKER, “Aqueous Humor Dynamics in Patients With Diabetes Mellitus,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 120, no. 3, pp. 362–367, 1995.
- [58] M. James T. Lane, Md, Carol B. Toris, Phd, Samer N. Nakhle, A. David M. Chacko, Md, Yun-Liang Wang, Md, and P. Michael E. Yablonski, Md, “Acute Effects of Insulin on Aqueous Humor Flow in Patients With Type 1 Diabetes,” *Am. J. Ophthalmol.*, pp. 321–327, 2011.
- [59] N. C. Wheeler, C. M. Morantes, R. M. Kristensen, T. H. Pettit, and D. a Lee, “Reliability coefficients of three corneal pachymeters.,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 113, no. 6, pp. 645–651,

- 1992.
- [60] R. H. Silverman, “High-resolution ultrasound imaging of the eye—a review,” *Clin. Experiment. Ophthalmol.*, vol. 37, no. 1, pp. 54–67, 2009.
- [61] M. Caixinha, D. A. Jesus, E. Velte, M. J. Santos, and J. B. Santos, “Using ultrasound backscattering signals and Nakagami statistical distribution to assess regional cataract hardness,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 61, no. 12, pp. 2921–2929, 2014.
- [62] M. Caixinha, J. Amaro, M. Santos, F. Perdigão, M. Gomes, and J. Santos, “In-vivo Automatic Nuclear Cataract Detection and Classification in an Animal Model by Ultrasounds,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. PP, no. c, 2016.
- [63] R. H. Silverman, J. Cannata, K. K. Shung, O. Gal, M. Patel, H. O. Lloyd, E. J. Feleppa, and D. J. Coleman, “75 MHz ultrasound biomicroscopy of anterior segment of eye.,” *Ultrason. Imaging*, vol. 28, no. 3, pp. 179–88, 2006.
- [64] M. Hiroshi Ishikawa, MD; Joel S. Schuman, “Anterior segment imaging: ultrasound biomicroscopy,” *Ophthalmol Clin North Am*, vol. 18, no. 17, pp. 7–20, 2004.
- [65] G. R. Lockwood, D. H. Turnbull, D. a. Christopher, and F. S. Foster, “Beyond 30 MHz - applications of high-frequency ultrasound imaging,” *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, vol. 15, pp. 60–71, 1996.
- [66] J. a Noble, “Ultrasound image segmentation and tissue characterization.,” *Proc. Inst. Mech. Eng. H.*, vol. 224, pp. 307–316, 2010.
- [67] M. L. O. (auth. . J. M. M. L. O. (eds. . Goutam Ghoshal Jonathan Mamou, *Quantitative Ultrasound in Soft Tissues*, 1st ed. Springer Netherlands, 2013.
- [68] R. Raitelaitiene, A. Paunksnis, L. Ivanov, S. Kurapkiene, and R. Raitelaitienė, “Ultrasonic and biochemical evaluation of human diabetic lens.,” *Medicina (Kaunas)*, vol. 41, pp. 641–648, 2005.
- [69] C. C. Huang, Q. Zhou, H. Ameri, D. W. Wu, L. Sun, S. H. Wang, M. S. Humayun, and K. K. Shung, “Determining the Acoustic Properties of the Lens Using A High-Frequency Ultrasonic Needle Transducer,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 33, no. 12, pp. 1971–1977, 2007.

- [70] R. H. Silverman, M. S. Patel, O. Gal, A. Sarup, A. Deobhakta, H. Dababneh, D. Z. Reinstein, E. J. Feleppa, and D. J. Coleman, "Effect of Corneal Hydration on Ultrasound Velocity and Backscatter," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 35, no. 5, pp. 839–846, 2009.
- [71] C. L. de Korte, A. F. van der Steen, and J. M. Thijssen, "Acoustic velocity and attenuation of eye tissues at 20 MHz," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 20, no. 5, pp. 471–480, 1994.
- [72] D. Z. Reinstein, R. H. Silverman, M. J. Rondeau, and D. J. Coleman, "Epithelial and corneal thickness measurements by high-frequency ultrasound digital signal processing," *Ophthalmology*, vol. 101, no. 1, pp. 140–6, 1994.
- [73] D. Y. L. Leung, D. K. T. Lam, B. Y. M. Yeung, and D. S. C. Lam, "Comparison between central corneal thickness measurements by ultrasound pachymetry and optical coherence tomography," *Clin. Experiment. Ophthalmol.*, vol. 34, no. 8, pp. 751–754, 2006.
- [74] A. Oksala and A. Lehtinen, "MEASUREMENT OF THE VELOCITY OF SOUND IN SOME PARTS OF THE EYE," *Acta Ophthalmol.*, vol. 36, no. 4, pp. 633–639, 1958.
- [75] U. Meister, B. Ohnesorge, D. Körner, and M. H. Boevé, "Evaluation of ultrasound velocity in enucleated equine aqueous humor, lens and vitreous body," *BMC Vet. Res.*, vol. 10, p. 250, 2014.
- [76] R. J. Eckersley and J. C. Bamber, "Methodology for Imaging Time-Dependent Phenomena," in *Physical Principles of Medical Ultrasonics*, John Wiley & Sons, Ltd, 2004, pp. 303–335.
- [77] a a Like and a a Rossini, "Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus," *Science*, vol. 193, no. 4251, pp. 415–417, 1976.
- [78] I. of Medicine and N. R. Council, *Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research*. Washington, DC: The National Academies Press, 1988.
- [79] K. K. Wu and Y. Huan, "Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats," *Curr. Protoc. Pharmacol.*, no. March, pp. 1–14, 2008.
- [80] J. Yin, J. Huang, C. Chen, N. Gao, F. Wang, and X. Y. Fu-Shin, "Corneal Complications in streptozocin-induced type I diabetic rats," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 52, no. 9, pp. 6589–6596, 2011.

- [81] A. Hughes, “A schematic eye for the rat,” *Vision Res.*, 1979.
- [82] A. Junod, A. E. Lambert, W. Stauffacher, and A. E. Renold, “Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 48, no. 11, pp. 2129–2139, 1969.
- [83] A. Hughes, “A schematic eye for the rat,” *Vision Res.*, vol. 19, pp. 569–588, 1979.
- [84] D. Jesus, M. Caixinha, M. Santos, and J. Santos, “Ultrasound techniques for lens hardness characterization: A comparison study,” in *2012 IEEE International Ultrasonics Symposium*, 2012, pp. 2376–2379.
- [85] H. Hachiya, S. Ohtsuki, M. Tanaka, and F. Dunn, “Determination of sound speed in biological tissues based on frequency analysis of pulse response.,” *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 92, no. 3, pp. 1564–1568, 1992.
- [86] R. S. Dwyer-Joyce, P. Harper, and B. W. Drinkwater, “A method for the measurement of hydrodynamic oil films using ultrasonic reflection,” *Tribol. Lett.*, vol. 17, no. 2, pp. 337–348, 2004.
- [87] R. Wilcox, “Kolmogorov–Smirnov Test,” *Encycl. Biostat.*, pp. 83–90, 1998.
- [88] H. B. Mann and D. R. Whitney, “On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other,” *Ann. Math. Stat.*, vol. 18, no. 1, pp. 50–60, 1947.
- [89] F. Wilcoxon, “Individual comparisons of grouped data by ranking methods.,” *J. Econ. Entomol.*, vol. 39, no. 6, p. 269, 1946.
- [90] C. Spearman, “Spearman ’ s rank correlation coefficient,” *Amer. J. Psychol.*, vol. 15, pp. 72–101, 1904.
- [91] A. Tuttnauer and P. D. Levin, “Diabetes Mellitus and Anesthesia,” *Anesthesiology Clinics of North America*, vol. 24, no. 3. pp. 579–597, 2006.
- [92] H. R. Amouzadeh and S. Sangiah, “Effects of streptozotocin-induced diabetes on xylazine-ketamine anesthesia.,” *Vet. Hum. Toxicol.*, vol. 32, no. 1, pp. 19–22, Feb. 1990.
- [93] D. R. Tomlinson and N. J. Gardiner, “Glucose neurotoxicity.,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 9, no. 1, pp. 36–45, 2008.

- [94] M. Göbbels, M. Spitznas, and J. Oldendoerp, “Impairment of corneal epithelial barrier function in diabetics.,” *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 227, pp. 142–144, 1989.
- [95] M. Hayashi, M. E. Yablonski, C. Boxrud, N. Fong, C. Berger, L. J. Jovanovic, and L. J. Jo, “Decreased formation of aqueous humour in insulin- dependent diabetic patients,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 73, pp. 621–623, 1989.





# Apêndices



**A. Dose de STZ administrado a cada animal**

Gaiola	Animal		Volume STZ ( $\mu$ l)	Glicémia mg/dl
1	1	R0	PBS	74
	2	R1	249	73
2	3	R0	PBS	76
	4	R1	240	86
3	5	R0	PBS	71
	6	R1	230	72
4	7	R0	PBS	58
	8	R1	245	66
5	9	R0	PBS	72
	10	R1	225	71
6	11	R0	PBS	68
	12	R1	218	68

**B. Dose de anestesia administrada a cada animal**

Gaiola	Animal		Peso inicial kg	Anestesia		Stock Ketamina 50 mg/ml	Stock Xilazina 20 mg/ml	Volume Injectar/animal ( $\mu$ l)
				Ketamina 65 mg/kg	Xilazina 5 mg/kg			
Referencia			1	65	5	650	250	
1	1	R0	0,234	15	1	152	59	211
	2	R1	0,249	16	1	162	62	224
2	3	R0	0,25	16	1	163	63	225
	4	R1	0,24	16	1	156	60	216
3	5	R0	0,24	16	1	156	60	216
	6	R1	0,23	15	1	150	58	207
4	7	R0	0,219	14	1	142	55	197
	8	R1	0,245	16	1	159	61	221
5	9	R0	0,242	16	1	157	61	218
	10	R1	0,225	15	1	146	56	203
6	11	R0	0,23	15	1	150	58	207
	12	R1	0,218	14	1	142	55	196

### C. Valores de glicémia para cada animal medidos em cada semana

Gaiola	Animal		Glicémia mg/dl				
			semana 0*	semana 1	semana 2	semana 5	semana 8
1	1	R0	74	163	210	113	148
	2	R1	73	580	590	Hi**	Hi**
2	3	R0	76	153	142	122	117
	4	R1	86	500	505	520	Hi**
3	5	R0	71	206	249	120	104
	6	R1	72	550	585	Hi**	Hi**
4	7	R0	58	113	94	--	--
	8	R1	66	517	554	Hi**	551
5	9	R0	72	124	106	131	151
	10	R1	71	551	600	Hi**	568
6	11	R0	68	219	115	241	118
	12	R1	68	576	600	Hi**	Hi**

\* Início das aquisições. Os animais foram mantidos em jejum com o objetivo de ser induzida a diabetes tipo 1.

\*\*Abreviação de *high*. Indica que o valor de glicémia medido é superior ao valor máximo admitido pelo glicosímetro.

