

Biópsia Óptica OCT

Carla Carmelo Rosa

INESC-Porto, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto
Rua do Campo Alegre 687, 4169-007 Porto
ccrosa@fc.up.pt

A introdução da Tomografia de Coerência Óptica (OCT) em meados da década de 90 revolucionou o diagnóstico médico em oftalmologia. Após duas décadas de evolução galopante, existe actualmente uma variedade apreciável de sistemas OCT, um conjunto alargado de empresas a trabalhar no sector, e muitas aplicações candidatas à utilização desta técnica. Neste artigo introduz-se o princípio de funcionamento da técnica OCT e as suas características principais, ilustrando-se algumas aplicações em áreas distintas.

O mercado de aparelhos de diagnóstico oftalmológico foi abalado em 1995 pela introdução do primeiro sistema OCT, reflexo do conceito experimental publicado pela equipa liderada por James Fujimoto [1]. Este aparelho revolucionou a prática de diagnóstico de retinopatias, permitindo a detecção prematura de problemas estruturais nas camadas retiniais, *in vivo*, em tempo real, não evasivamente, por seccionamento óptico de finas fatias da retina. O seccionamento é semelhante à biópsia “mecânica” de tecidos biológicos, comum em citologia, pelo que é comum referir OCT como *biópsia óptica*. Nos últimos 15 anos a técnica sofreu desenvolvimentos galopantes, associados a novas fontes de luz e novas abordagens de medida, assim como ao crescimento das velocidades de relógio de CPU actuais. Actualmente, é utilizada em vários campos da Medicina, encontrando também aplicações muito apelativas na caracterização micrométrica de estruturas, onde tanto as técnicas de microscopia tradicional como a confocal são de difícil implementação, ou apresentam resposta limitada [2,3].

Vejamos melhor em que consiste a Tomografia de Coerência Óptica – OCT. Nesta técnica, um sistema óptico tem a função dupla de iluminar a amostra e de recolher a luz retro-reflectida ao longo da direcção de propagação do feixe incidente na amostra. Até aqui, o funcionamento parece semelhante ao de um microscópio (tradicional, ou confocal), excepto no facto de que a amostra analisada com OCT não necessita ser fisicamente preparada em finas fatias, como requerido em microscopia.

Na Figura 1 mostra-se o esquema simplificado de um microscópio confocal [4]. A luz radiada por uma fonte de uma certa extensão espacial é projectada sobre a amostra. Pequenas estruturas na amostra, centros difusores, induzem o espalhamento da luz incidente, o que é visto pela lente L como fontes quasi-pontuais distribuídas em volume, na amostra. A lente colecta a luz retro-reflectida por espalhamento nos difusores. Dependendo da espessura da amostra, a informação em cada ponto no plano imagem do detector pode derivar de vários eventos de retro-reflexão da luz em estruturas dispersas no volume da amostra, pelo que se verifica sobreposição de informação e conseqüentemente a degradação da qualidade da imagem formada, o que se representa na figura pelo traçado dos raios cinza e negro, na ausência da abertura \mathbf{a}_2 . Em microscopia tradicional esta limitação é resolvida à custa do seccionamento em finas camadas da amostra. Em microscopia confocal utilizam-se aberturas micrométricas¹, \mathbf{a}_1 e \mathbf{a}_2 , devidamente colocadas, e combinam-se o varrimento transversal do ponto de incidência/observação na amostra, através de \mathbf{a}_1 , com a direcção de colecção de luz no detector, através

¹ pin-holes, literalmente pequenos orifícios de alfinete

do movimento sincronizado de \mathbf{a}_2 . Desta forma, a luz proveniente de ponto da amostra fora do plano focal é bloqueada pela abertura \mathbf{a}_2 e a qualidade da imagem significativamente melhorada. Este efeito de filtragem é caracterizado por uma elevada abertura numérica do sistema óptico, $NA = n \sin \alpha$, em que α corresponde ao ângulo máximo de colecção de luz e n ao índice de refração do meio de propagação da luz. A teoria da difracção determina a profundidade de foco $\delta z_{\text{confocal}}$ nestas condições como sendo inversamente proporcional ao quadrado da abertura numérica,

$$\delta z_{\text{confocal}} = 0.89 \frac{\lambda n}{NA^2} \quad (1)$$

A resolução da imagem é tanto melhor quanto menor for a profundidade de foco, pelo que se justifica a utilização de objectivas de elevada abertura numérica e, em situações especiais, objectivas de imersão que utilizam óleos de elevado índice de refração. A configuração confocal também otimiza ligeiramente a resolução transversal do sistema de imagem, por comparação com o limite de difracção de um microscópio convencional. As resoluções transversal e longitudinal chegam a dimensões subcelulares, de 200-500 nm. No entanto, a microscopia confocal exige distâncias de trabalho muito curtas, requerendo frequentemente contacto com a amostra em estudo, o que nem sempre é satisfatório para aplicações de diagnóstico e imagiologia *in vivo*. Em contraposição, a tomografia de coerência óptica utiliza técnicas interferométricas para obter elevada resolução espacial: a resolução transversal é definida pelo limite de difracção do sistema colector na cabeça sensora, e a resolução longitudinal, em profundidade, é fixada por implementação de *interferometria de luz branca*, também dita de *baixa coerência*.

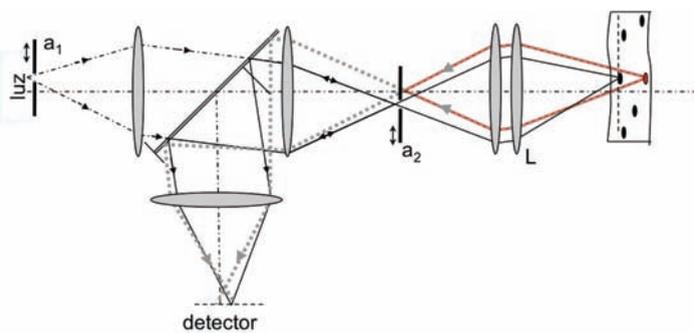


Fig. 1 - Esquema óptico de microscópio confocal: \mathbf{a}_1 e \mathbf{a}_2 são aberturas micrométricas móveis, L a lente colectora de luz da amostra. Na inexistência de \mathbf{a}_2 , o percurso óptico da luz colectada a partir de dois centros difusores da amostra é indicado pelos traços negro e cinza.

Fenómenos de interferência ondulatória podem ocorrer quando se verifica sobreposição espacial de duas ou mais ondas. A interferência pode ter carácter destrutivo ou construtivo, i.e. a sua soma pode resultar numa amplitude de valor superior (interferência construtiva) ou inferior (interferência destrutiva)

ao valor da soma das amplitudes de cada onda.

A interferência de ondas electromagnéticas só ocorre quando se verifica um conjunto de condições: as ondas incidentes partilham a mesma direcção de vibração (polarização), coexistem espacialmente (localização), e apresentam alguma correlação entre si (coerência). Como já se indicou, em OCT, coerência é a palavra de ordem! Nos interferómetros de dois feixes (configurações de Michelson e de Mach-Zehnder), a luz emitida pela fonte é dividida em dois feixes independentes por incidência num divisor de feixe. Porque obtidos do mesmo feixe inicial, os feixes são, à partida, correlacionados. Os dois feixes propagam-se em percursos ópticos distintos: o caminho-referência, em que as condições de propagação são bem controladas, e o caminho-amostra, que envolve uma parte de percurso na amostra em estudo. Os dois caminhos terminam num divisor de feixe onde os feixes são recombinados.

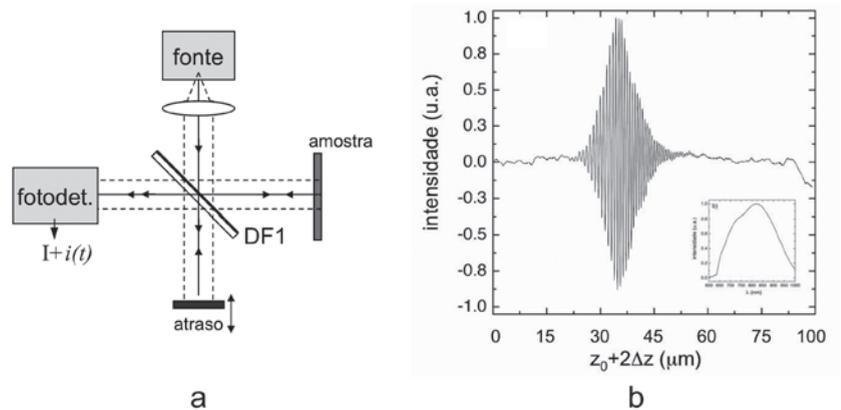


Fig. 2 - (a) esquema simplificado de um interferómetro de Michelson; (b) interferograma obtido quando se ilumina o interferómetro em (a) com uma fonte de halogéneo.

Na configuração de Michelson, representada na Figura 2.a), a amostra em estudo é um espelho semelhante ao espelho presente no caminho-referência. Dependendo do comprimento (óptico) dos dois caminhos, haverá um atraso temporal entre os feixes. Se se utiliza uma fonte de luz monocromática (com comprimento de onda único, ex. laser vermelho de HeNe), sempre que a diferença de percurso óptico Δz entre os dois feixes for múltipla do comprimento de onda da luz, o fotodetector regista o sinal máximo; quando Δz equivale a múltiplos ímpares de meio comprimento de onda, a soma das duas ondas é destrutiva, a intensidade óptica é nula. Ao mover o espelho no caminho-referência a velocidade constante v , o fotodetector regista um sinal sinusoidal de frequência $f_D = 4v/\lambda$, resultante do movimento do espelho. Substituindo o fotodetector por um alvo pode observar-se esta frequência pela intermitência da luz projectada, entre o escuro da interferência destrutiva total e o brilho da interferência construtiva máxima. Quando o interferómetro é iluminado por um laser de HeNe este comportamento pode ser observado até diferenças Δz da ordem de centímetros, ou mesmo metros. Substituindo o laser por uma fonte de halogéneo, fonte que tem um espectro rico e contínuo no visível e infravermelho próximo (inserção da Figura 2.b), já

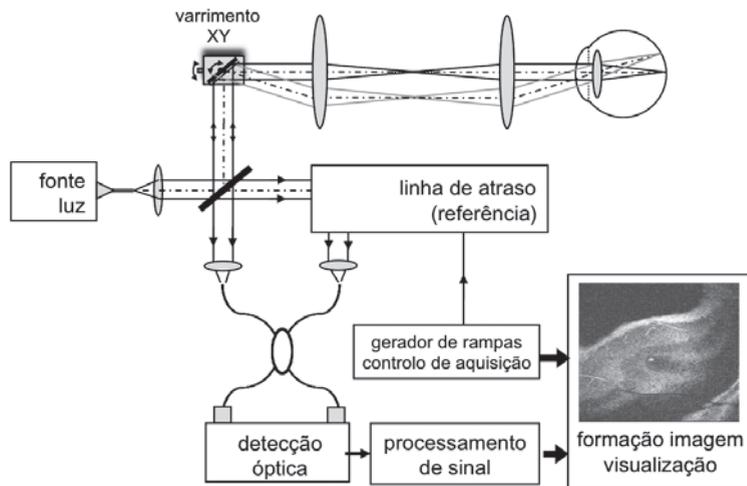


Fig. 3 - Esquema de blocos de um sistema OCT, indicando-se o varrimento do objecto através do sistema de espelhos xy, e o varrimento rápido do caminho referência pela linha de atraso.

não se observa o mesmo comportamento: só é possível ver o sinal de interferência quando a diferença Δz é praticamente nula, a menos de uma quantidade designada de comprimento de coerência² da fonte. Para distâncias maiores, o valor da intensidade detectada resulta simplesmente da soma das intensidades luminosas dos dois feixes. Da figura, em que se mostra a intensidade luminosa detectada em função da diferença Δz , pode extrapolar-se que o comprimento em que se verificam franjas de interferência e em que existe correlação entre os dois feixes, ou coerência, é de cerca de $10 \mu\text{m}$. Tal significa que só se poderá detectar o sinal interferométrico quando os dois percursos, referência e amostra, são equivalentes a menos de $\pm 5 \mu\text{m}$. Em concreto, o comprimento de coerência da fonte depende das características do seu espectro de emissão, e normalmente é definido por

$$\Delta z_c = c\tau_c = \frac{41n^2}{\pi} \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda},$$

em que se considera o comprimento de onda central λ e a largura total $\Delta\lambda$ medida a meia altura.

Resumindo, o truque da *Tomografia de Coerência Óptica para gerar resolução longitudinal* é a utilização de interferómetros iluminados por fontes de espectro muito largo! Associando a este o varrimento rápido da amostra na direcção transversal ao feixe sobre a amostra, assim como a variação rápida do comprimento óptico da referência, sintonizando a profundidade em estudo (linha de atraso), podem construir-se mapas tridimensionais obtidos de forma não invasiva, com resoluções longitudinais e transversais (sub)micrométricas e desacopladas, e com a elevada sensibilidade característica de medidas interferométricas.

Na presença de múltiplas camadas reflectoras ao longo do caminho-amostra, o varrimento do caminho-referência com uma precisão mais fina que o comprimento de coerência revelará conjuntos de franjas localizadas sempre que o atraso da referência sintoniza o interferómetro para cada uma das superfícies reflectoras. Em meios biológicos o princípio de funcionamento é idêntico, mas o sinal do fotodetector resulta da sobreposição da reflectividade da amostra, constituída por meios estruturados e com distribuições contínuas de centros difusores. A propagação da luz ao longo do meio é regida pela lei de Beer-Lambert,

$$I(\Delta z) = I_0 \exp\{-(\mu_a + \mu_s) \Delta z\},$$

em que os coeficientes μ_a e μ_s introduzem perdas de energia por absorção e por espalhamento de luz, respectivamente. O coeficiente de atenuação por espalhamento é o mais relevante na imagiologia OCT, porque o sinal OCT em tecidos biológicos deriva dos fótons que são retrodifundidos por espalhamento, e por o seu valor depender das características particulares de cada tecido [5].

Na prática, os sistemas OCT são um pouco mais complexos que a simples montagem de Michelson, sendo necessário atender a questões específicas ligadas à utilização de sistemas ópticos com resposta espectral uniforme numa zona larga do espectro, e à necessidade de adquirir imagens em tempo real. A Figura 3 apresenta um diagrama de blocos simplificado do protótipo OCT instalado na Unidade de Optoelectrónica do INESC-Porto e descrito com mais detalhe em [6].

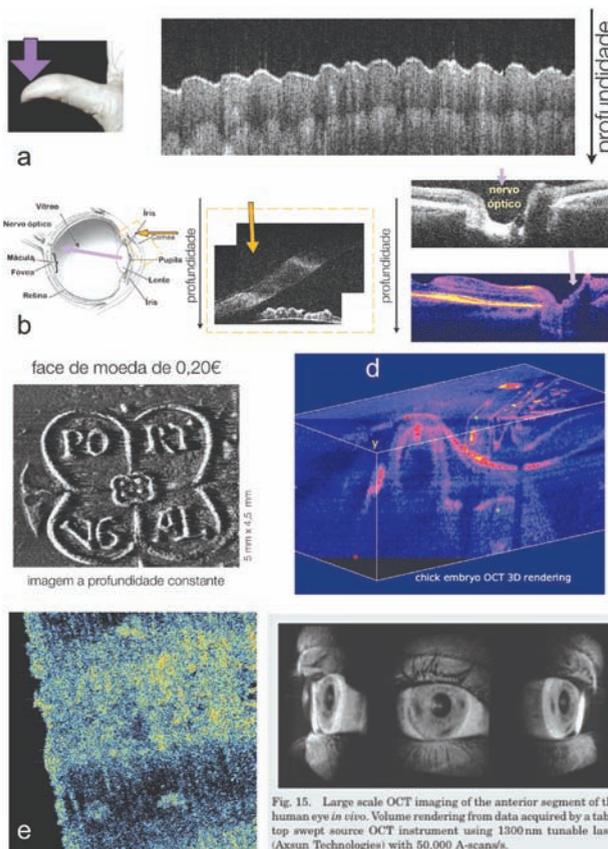


Fig. 15. Large scale OCT imaging of the anterior segment of the human eye *in vivo*. Volume rendering from data acquired by a table top swept source OCT instrument using 1300nm tunable laser (Axun Technologies) with 50,000 A-scans/s.

Fig. 4 - imagens OCT de um conjunto variado de amostras - descrição detalhada no texto. Copyright (a)-(e): autor; (f): Optical Society of America.

2 É mais correcto referir-se tempo de coerência da fonte τ_c , ao qual corresponde um comprimento $v\tau_c$ que não deve ser confundido com a coerência espacial da fonte, esta associada à extensão emissora e correlação entre diferentes pontos emissores.

A Figura 4 apresenta amostras de diferentes características analisadas por OCT, iluminadas com luz infravermelha (SLD Superlum a 830 nm, $\Delta\lambda=20$ nm, $\Delta z_c \sim 15 \mu\text{m}$). As setas coloridas nas imagens indicam a direcção de incidência do feixe sobre a amostra. Em (a) observa-se um corte longitudinal do polegar, sendo visíveis a estrutura corrugada da superfície/impressões digitais, uma interface interior que separa a epiderme da derme, e pontos brilhantes correspondentes aos condutos de transpiração; em (b) apresentam-se imagens de uma retina normal (fóvea e nervo óptico), e do vértice da córnea com a íris, obtidas *in vivo*. Conseguem identificar-se facilmente vasos sanguíneos como zonas escuras, onde a luz é muito absorvida. As camadas mais reflectoras correspondem ao Epitélio Pigmentado da Retina, uma das estruturas importantes na detecção precoce de risco de descolamento de retina. Em (c) ilustra-se a utilização da técnica OCT como perfilometria de elevada resolução espacial, com uma imagem obtida a profundidade constante, correspondendo assim a uma fatia de material de cerca de $15 \mu\text{m}$ de espessura. Em (d) observa-se uma reconstrução 3D do volume de um embrião de galinha, a partir de uma sequência de imagens obtidas a profundidade incrementalmente constante, estudado *in ovo*, durante o seu desenvolvimento nos primeiros dias de incubação. Este estudo foi feito para avaliar a aplicabilidade da técnica OCT como complemento à técnica confocal utilizada rotineiramente em Biologia do Desenvolvimento [7]. Neste caso particular a técnica OCT apresenta a vantagem de interferir minimalisticamente com o crescimento do embrião, possibilitando o estudo do crescimento embrionário no mesmo ovo durante intervalos de tempo à escala de dias, por oposição aos tempos em estudos assistidos por técnicas confocais, que requerem manipulação do embrião. Na Figura 4.e) mostra-se uma imagem obtida a profundidade constante de uma amostra de madeira, correspondendo a uma fatia de $15 \mu\text{m}$ de espessura, onde se podem identificar estruturas características associadas aos anéis de crescimento claro-escuro, alternados.

Na verdade, a história não fica por aqui. Na última década tem-se assistido a desenvolvimentos significativos em detecção espectral e em fontes laser sintonizáveis, aliados ao processamento muito rápido de sinal em computador que permitiram atingir taxas de produção de imagens similares aos padrões vídeo, proporcionando a recolha de informação em processos dinâmicos ou tão simplesmente para determinar fluxos sanguíneos ou de agentes contrastantes. Maciej Wojtkowski publicou recentemente uma excelente revisão sobre as diferentes variantes da técnica OCT ultra-rápida [2] acompanhada de um bom conjunto de casos clínicos (oftalmologia)

que demonstram o valor clínico da tomografia de coerência óptica – veja-se o exemplo de imagens OCT de Larga Escala do segmento anterior do olho na Figura 5.f) [2]. O futuro certamente levará a OCT a novas áreas das ciências biomédicas, e da caracterização microscópica nas ciências e na indústria.

1. D. Huang, E. A. Swanson, et al., "Optical coherence tomography", *Science* 254 (5035), 1178-81 (1991).
2. Maciej Wojtkowski, "High-speed optical coherence tomography: basics and applications", *Appl. Opt.* 49, D30-D61 (2010).
3. David Stifter, "Beyond biomedicine: a review of alternative applications and developments for optical coherence tomography", *Applied Physics B* 88, 337-357 (2007).
4. Kjell Carlsson e Nils Åslund, "Confocal imaging for 3-D digital microscopy", *Appl. Opt.* 26, 3232-3238 (1987).
5. Valery Tuchin, "Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instrumentation for Medical Diagnosis", *SPIE Tutorial Texts in Optical Engineering*, Vol. TT38 (2000).
6. Carla Carmelo Rosa, John Rogers, Justin Pedro, Richard Rosen, e Adrian Podoleanu, "Multiscan time-domain optical coherence tomography for retina imaging", *Appl. Opt.* 46, 1795-1808 (2007).
7. Michael Leitner, "White Light Interferometry, applications in high resolution sensing and biomedical imaging", PhD Thesis, Universidade do Porto, Porto (2010).



Carla Carmelo Rosa é Professora Auxiliar no Departamento de Física e Astronomia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, e Investigadora da Unidade de Optoelectrónica e Sistemas Electrónicos do INESC-Porto, onde tem desenvolvido trabalho de investigação em técnicas de medida e imagiologia óptica de elevada resolução espacial. No âmbito do seu doutoramento, e em colaboração com o Applied Optics Group da University of Kent, Inglaterra, desenvolveu um sistema OCT-Multiscan, direccionado para diagnóstico de patologias da retina. Actualmente, explora a aplicação da técnica OCT na caracterização microscópica tridimensional das propriedades ópticas e estruturais de (bio)materiais.

[<http://www.fc.up.pt/pessoas/ccrosa>]