

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE DOUTORADO EM
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
&
BIOFARMACÊUTICA

EMERSON ALBERTO DA FONSECA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNA β -AMILOIDE EM
CAMUNDONGOS BITRANSGÊNICOS PARA ALZHEIMER ATRAVÉS DE
ESPECTROSCOPIA RAMAN:**

**Primeiro passo para o estabelecimento de uma plataforma de
espectroscopia intraocular para fins de diagnóstico precoce**

Belo Horizonte

Setembro, 2020

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNA β -AMILOIDE EM
CAMUNDONGOS BITRANSGÊNICOS PARA ALZHEIMER ATRAVÉS DE
ESPECTROSCOPIA RAMAN:**

**Primeiro passo para o estabelecimento de uma plataforma de
espectroscopia intraocular para fins de diagnóstico precoce**

Emerson Alberto da Fonseca

Belo Horizonte

Setembro, 2020

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
para a obtenção do Título de Doutor em Inovação
Tecnológica e Biofarmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Ado Jorio

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, aos meus pais, por todo apoio e suporte. Por ter me ensinado desde cedo os mais caros valores.

Agadereço ao meu Professor e Orientador Ado, pela orientação, pela generosidade, e pela confiança que sempre depositou em mim. Pelo suporte e liberdade que me deu para fazer ciência. Pela paciência, pelo entusiasmo e pela amizade. Por ter me dado a oportunidade de fazer parte desse trabalho tão visionário e inovador. Foi uma honra e um prazer trabalhar sob sua orientação.

Agradeço ao Professor Luiz Orlando Ladeira, meu Mestre, meu padrinho na ciência, que desde o mestrado me acolhe com muita generosidade e amizade, e que foi o responsável pela minha paixão pela Física.

Agradeço à Camila Megale pelo apoio, pelos conselhos e pela companhia.

Agradeço à Telma Terra, que desde o início dessa jornada me apoiou, foi solidária, compreensiva e companheira.

Agradeço ao Professor Leandro (Xubaca), pela paciência e pela disposição de sempre.

Agradeço ao Lucas, pelo companheirismo, pelas incansáveis noites de experimentos, muitas vezes frustrados que nos levavam ao buteco mais próximo para discutir como conseguir o resultado esperado. Pela disposição, pela parceria e pela amizade.

Agradeço à Márcia pela disposição, competência e paciência. E por estar sempre disponível à ajudar.

Agradeço ao João Luiz Campos, nosso expert em análise de dados pelo esforço e competência.

Agradeço ao Cassiano, por colocar sua inteligência sempre a disposição de ajudar.

Agradeço ao Renan, pela perspicácia e competência, que tornou possível alcançarmos os resultados desejados.

Agradeço ao Alexandre pela tranquilidade em contribuir e enriquecer esse time.

Agradeço ao Professor Rafael Vieira, pela parceria, pela paciência, por ser sempre tão solícito.

Agradeço à Professora Raigna, por ter colocado seu laboratório à disposição, pela humildade, pelo carinho e pela amizade.

Agradeço a toda equipe do LabNS, que faz desse laboratório, além de um local de excelência, um ambiente familiar no qual trabalhar se torna um passeio no parque.

Agradeço à professora Silvia Guatimosin por ter disponibilizado seu laboratório sempre com muita generosidade.

Agradeço ao professor Marco Romano por disponibilizar seu laboratório e infraestrutura.

Agradeço ao professor Antônio Carlos pela ajuda, humildade e disponibilidade.

Agradeço à Eni, pela paciência, eficiência e bom humor de sempre.

Agradeço ao Instituto Tecgraf da PUC-Rio

Agradeço ao Departamento de Física, onde tive a oportunidade de trabalhar e crescer como cientista.

Agradeço ao Programa de pós-graduação em Inovação Tecnológica, que confiou a mim uma vaga da sua primeira turma de Doutorado.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais, pela excelência e pela oportunidade.

“Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez”

(Jean Cocteau)

RESUMO

Nas últimas décadas, houve um aumento significativo da expectativa de vida da população mundial. Esse incremento em anos de vida trouxe uma maior incidência de doenças relacionadas ao envelhecimento, dentre elas, as doenças neurodegenerativas idade-dependente, com um aumento significativo dos pacientes com demência. A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência. Estima-se que represente de 60 a 80% dos casos de demência. No ano de 2019, pelo menos 50 milhões de pessoas viviam com algum tipo de demência em todo o mundo. Este número deverá aumentar para mais de 152 milhões até 2050. Com uma sobrevida de 6 a 8 anos após o diagnóstico clínico, a DA já ocupa o quinto lugar em maior número de mortes no mundo, entre pessoas acima dos 65 anos. A principal alteração histopatológica da doença é a deposição do peptídeo β -amilóide (β A), seguida dos emaranhados neurofibrilares, que se relacionam com a morte neuronal, levando ao déficit cognitivo que caracteriza a doença. O β A se acumula em extensas placas (placas amiloides) extracelulares e a identificação dessas placas amiloides é usada para confirmação do diagnóstico, que se dá *post mortem*. Como é uma doença com origem no Sistema Nervoso Central (SNC), a DA apresenta alterações bioquímicas e histopatológicas na retina, um tecido composto principalmente por neurônios que, além de fazerem parte do SNC, conectam-se diretamente ao cérebro através do nervo óptico. Estudos mostram que a deposição de β A na retina antecede à deposição no cérebro, e em humanos, acredita-se que esse evento pode acontecer 15 a 20 anos antes das placas se acumularem no cérebro do paciente. Nesse sentido, um diagnóstico intraocular que detecte placas amiloides na retina, usando apenas uma fonte de luz, seria capaz de prover um diagnóstico precoce da DA de forma rápida e segura. Por isso, nós propomos o uso da espectroscopia Raman (ER) como uma alternativa para o diagnóstico precoce da DA. Essa técnica usa um laser como sonda para identificar uma determinada molécula de interesse, com alta especificidade, sem necessidade de corante ou contraste. Para tanto, desenvolvemos um trabalho de caracterização de placas amiloides, via espectroscopia Intraocular, para fins de diagnóstico precoce. Essa caracterização usando ER incluiu estudo de placas amiloides produzidas sinteticamente e previamente caracterizada com microscopia (eletrônica e de varredura), e naturalmente em cérebros de camundongos transgênicos específicos para a DA. Nossos resultados mostram que a placa amiloide tem, não um, mas um complexo de multi-frequências no espectro Raman que servem como marcadores molecular para fins de diagnóstico (fenilalanina, amida III, amida I, estiramento de CH_2 e estiramento de CH_3 de proteína e lipídio). Também demonstramos que a ER é capaz de diferenciar a doença conforme seu estágio. Neste sentido, fomos capazes de identificar uma clara tendência que diferencia animais de 6 e 12 meses segundo as alterações bioquímicas do tecido cerebral nos camundongos bitransgênicos. Além disso, demonstramos que a ER é capaz de identificar, não só placas amiloides, mas também a neurodegeneração e neuroinflamação associadas à placa. Desenvolvemos caracterização baseadas em espectroscopia Raman

espontânea e também estimulada, esta segunda intensa o suficiente para propiciar um imageamento completo da retina em segundos ou frações de segundos, um aspecto técnico importante para a implementação da técnica como método diagnóstico. Concluímos, portanto, a caracterização e indentificação de placa amiloide em tecido cerebral. A próximo fase desse projeto será aplicar esse conhecimento adquirido na identificação de placas amiloides em retinas de animais transgênicos e humanos.

ABSTRACT

In the last decades, there has been a significant increase in the life expectancy of the world population. This increase in years of life brought a greater incidence of diseases related to aging, among them, as age-dependent neurodegenerative diseases, with a significant increase in patients with dementia. Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. It is estimated that it represents 60 to 80% of dementia cases. In 2019, at least 50 million people were living with some form of dementia worldwide. This number is expected to increase to more than 152 million by 2050. With a survival rate of 6 to 8 years after clinical diagnosis, AD is already the fifth leading cause of death in the world among people over 65 years of age. The main histopathological alteration of the disease is the deposition of the amyloid β ($A\beta$) peptide followed by the tangled neurofibrillary, which is related to neuronal death, leading to the cognitive deficit characteristic of the disease. The $A\beta$ peptide accumulates in extensive extracellular plaques (amyloid plaques) and the identification of these amyloid plaques is used to confirm the diagnosis, which occurs post mortem. As a disease originating in the Central Nervous System (CNS), the AD exhibits the biochemical and histopathological changes also in the retina, a tissue composed mainly of neurons, which are part of the CNS and connect directly to the brain through the optic nerve. Studies show that the deposition of βA in the retina leads to deposition in the brain, and in humans, it is believed that this event can happen 15 to 20 years before plaques accumulate in the patient's brain. In this sense, an intraocular diagnosis that detects amyloid plaques in the retina, using only a light source, would be able to prove an early diagnosis in a fast and safe way. For this reason, we propose the use of Raman spectroscopy (RS) as an alternative for the early diagnosis of AD. This technique uses a laser as probe to identify a particular molecule of interest, with high specificity, without the need for dye or contrast. For this purpose, we developed a work to characterize amyloid plaques aiming at an early diagnosis protocol via Intraocular Spectroscopy. This characterization using RS included the study of synthetic amyloid plaques previously characterized with microscopy (electronic and scanning probe), and of naturally appearing plaques in the brains of transgenic mice specific for AD. Our results show that the amyloid plaque has, not one, but a complex multifeatured spectrum that serves as a molecular marker for diagnostic purposes (phenylalanine, amide III, amide I, CH_2 stretch, and CH_3 stretch of protein and lipid). We also demonstrated that an RS is able to differentiate its disease evolution stage. We were able to identify a clear trend that differentiates animals between 6 and 12 months according to biochemical changes in brain tissue in bitransgenic mice. In addition, we demonstrate that RS is able to identify, not only amyloid plaques, but also the neurodegeneration associated with plaque. We developed such characterization based on spontaneous and also stimulated Raman spectroscopy, this second intense enough to provide a complete imaging of the retina in seconds or fractions of seconds, an important technical aspect for the implementation of the technique

as a diagnostic method. We conclude, therefore, the characterization and identification of the amyloid plaque in a brain tissue. The next phase of this project will be to apply this knowledge acquired in the identification of amyloid plaques in retinas of animal models and humans.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
SUMÁRIO	viii
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiv
LISTA DE TABELAS	xiv
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Alzheimer no mundo	1
1.2 Morte por Alzheimer	3
1.3 DA no Brasil	5
1.4 Os custos do Alzheimer	5
1.5 Identificando o Alzheimer	6
1.6 O Domínio Tecnológico da Instrumentação Biomédica	9
1.7 A proposta deste trabalho - Uso de Espectroscopia Raman Intraocular como Diagnóstico Precoce para Alzheimer	12
2 - REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 A doença de Alzheimer	17
2.2 Bases Moleculares da Doença de Alzheimer	18
2.2.1 Proteína Precursora de Amiloide	18
2.2.2 A Hipótese Amiloide	19
2.3 Marcadores histopatológicos	23
2.4 O Fator Genético	25
2.5 Diagnóstico	26
2.6 Terapias da DA	28
2.7 Retina e doenças neurodegenerativas	29
2.7.1 Esclerose Múltipla & Retina	31
2.7.2 Doença de Parkinson & Retina	32
2.7.3 Doença de Alzheimer & Retina	33
2.7.4 Propostas de Diagnóstico de Alzheimer via Retina	35

2.8 Espectroscopia Raman (ER)	37
2.8.1 Espalhamento Raman Espontâneo.....	37
2.8.2 Espalhamento Raman Estimulado.....	38
2.8.3 Espectro Raman & Biologia.....	39
2.8.4 Raman & Alzheimer.....	42
2.8.5 Raman & Alzheimer & Retina.....	44
3 - METODOLOGIA	47
3.1 - 1ª PARTE – Caracterização de fibrilas βA in vitro	47
3.1.1 Montagem Experimental.....	47
3.1.2 Caracterização de aminoácidos por ER - in vitro.....	49
3.1.2.1 Micro-Raman.....	49
3.1.2.2 Macro-Raman.....	49
3.1.3 Caracterização e Identificação do Espectro Raman do peptídeo β A - in vitro....	51
3.1.3.1 Formação de fibrilas amiloides.....	51
3.1.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET.....	51
3.1.3.3 Microscopia de Força Atômica - AFM.....	52
3.1.3.4 Espectroscopia Raman de fibrilas amiloides.....	52
3.2 - 2ª PARTE - Caracterização de Placa Amiloide ex vivo	52
3.2.1 Estabelecimento do Modelo Animal.....	52
3.2.2 Preparo de Amostra.....	53
3.2.3 Microscopia de excitação por dois fótons para identificação de placas amiloides ex vivo.	54
3.2.4 Caracterização e Identificação de placa amiloide ex vivo por Raman Espontâneo.....	54
3.2.5 Marcação de placa amiloide.....	55
3.2.6 Microscopia CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) e SRS (Stimulated Raman Scattering).....	55
3.2.7 Análise de dados.....	56
3.2.7.1 Spectral Unmixer.....	56
3.2.7.2 WITec Project 5.0.....	56
3.2.7.3 OriginPro 9.....	56
3.2.7.4 ImageJ.....	56

3.2.7.5 <i>Análise de Componentes Principais (PCA)</i>	56
3.2.8 <i>Comitê de ética</i>	59
4 - RESULTADOS & DISCUSSÃO	61
1ª PARTE: Caracterizações in vitro de placa amiloide via espectroscopia Raman espontânea	61
4.1 Caracterização de aminoácidos	61
4.2 Caracterização de fibrilas βA in vitro	63
4.3 Espectro Raman de fibrilas βA in vitro	66
2ª PARTE: Caracterização de ex vivo de placa amiloide: Uso de espectroscopia Raman espontânea e estimulada	69
4.4 Caracterização ex vivo de placas amiloides por hiperespectro Raman – cortes de cérebros	69
4.4.1 <i>Caracterização de placa por análise não supervisionada – unmixing</i>	72
4.4.2 <i>Caracterização de placa amiloide por hiperespectro</i>	75
4.4.3 <i>Modo de vibração Amida III</i>	79
4.4.4 <i>Glia e Placa amiloide</i>	83
4.5 Identificação de placas amiloides, ex vivo, por espectroscopia Raman estimulada	88
4.6 Estudo de Transversal entre Camundongos 6 e 12 meses	103
4.7 Relação de placa amiloide versus distrofia neuronal	110
5 – SUMÁRIO E PERSPECTIVAS	118
SUMÁRIO	118
PERSPECTIVAS	121
5.1 Uso da espectroscopia Raman estimulada para identificação de placa amiloide em retina	121
5.2 Imagem SRS de retinas <i>ex-vivo</i>	124
5.3 SRS em hipocampo fresco	129
REFERÊNCIAS	131
APÊNDICE A	148
APÊNDICE B	157
ANEXO	166

LISTA DE FIGURAS

<i>FIGURA 1. EXPECTATIVA DE VIDA NO MUNDO.</i>	2
<i>FIGURA 2. ALTERAÇÕES PERCENTUAIS NAS CAUSAS SELECIONADAS DE MORTE.</i>	4
<i>FIGURA 3. PARTICIPAÇÃO DOS GRANDES SETORES NO MERCADO GLOBAL DE PRODUTOS OFTALMOLÓGICOS</i>	12
<i>FIGURA 4. ARQUIVO HISTÓRIO SOBRE ALOIS ALZHEIMER.</i>	17
<i>FIGURA 5. PROTEÍNA PRECURSORA DE AMILOIDE (APP) ALOCADA À ZONA ATIVA PRÉ-SINÁPTICA (PAZ).</i>	18
<i>FIGURA 6. TRANSPORTE DE APP EM NEURÔNIOS.</i>	20
<i>FIGURA 7. PROCESSAMENTO DE APP - ESCOLHA CELULAR CRÍTICA.</i>	21
<i>FIGURA 8. MODELOS MOLECULARES DOS OLIGÔMEROS Aβ42.</i>	23
<i>FIGURA 9. CÉLULAS NA GLIA EM TORNO DA PLACA.</i>	24
<i>FIGURA 10. PLACAS AMILOIDES E EMARANHADOS NEUROFIBRILARES.</i>	24
<i>FIGURA 11. IMAGEM DE PET E MRI.</i>	27
<i>FIGURA 12. ORGANIZAÇÃO LAMINAR DA RETINA.</i>	31
<i>FIGURA 13. ESQUEMA ILUSTRATIVO SOBRE ESPALHAMENTO DA LUZ.</i>	38
<i>FIGURA 14. ILUSTRAÇÃO DO FENÔMENO RAMAN.</i>	39
<i>FIGURA 15. ESPECTRO RAMAN DE TECIDO TUMORAL DE PULMÃO.</i>	41
<i>FIGURA 16. MODOS DE VIBRAÇÃO DE LIGAÇÃO PEPTÍDICAS.</i>	43
<i>FIGURA 17. IMAGEM DE PLACA AMILOIDE POR ER</i>	44
<i>FIGURA 18. MONTAGEM ESPERIMENTAL</i>	48
<i>FIGURA 19. ORGANIZAÇÃO DOS DADOS DE HIPERESPECTROS.</i>	58
<i>FIGURA 20. ESPECTRO RAMAN DO AMINOÁCIDO GLICINA E DO SEU DIPEPTÍDEO.</i>	63
<i>FIGURA 21. CARACTERIZAÇÃO DE FIBRILAS BA1-42 POR MICROCOPIA ELETRÔNICA.</i>	65
<i>FIGURA 22. ESPECTROS RAMAN DE FIBRILAS BA SINTÉTICAS.</i>	68
<i>FIGURA 23. AUTOFLUORESCÊNCIA DE PLACA AMILOIDE POR EDF.</i>	69
<i>FIGURA 24. FLUXO DE TRABALHO PARA CARACTERIZAÇÃO DE PLACA AMILOIDE NO TECIDO.</i>	70
<i>FIGURA 25. ESPECTRO RAMAN REPRESENTATIVO DE CÉREBRO DE CAMUNDONGO TG 6 MESES.</i> 71	
<i>FIGURA 26. IMAGEM DE HIPERESPECTRO RAMAN DE PLACA AMILOIDE.</i>	72
<i>FIGURA 27. GRÁFICOS END MEMBERS (EM).</i>	74
<i>FIGURA 28. IMAGEM END MEMBERS E IMAGEM WITEC.</i>	75
<i>FIGURA 29. CARACTERIZAÇÃO DE PLACA AMILOIDE POR VARREDURA RAMAN DE HIPERESPECTRO EM ANIMAIS DE 6 MESES.</i>	77
<i>FIGURA 30. CARACTERIZAÇÃO DE PLACA AMILOIDE POR VARREDURA RAMAN DE HIPERESPECTRO EM ANIMAIS DE 12 MESES</i>	78
<i>FIGURA 31. CARACTERIZAÇÃO DE PLACA AMILOIDE POR VARREDURA RAMAN DE HIPERESPECTRO – FREQUÊNCIA DE AMIDA III & I</i>	81
<i>FIGURA 32. VARREDURA RAMAN EM ANIMAIS CONTROLE DE 12 MESES.</i>	82

<i>FIGURA 33. CÉLULAS DA GLIA ASSOCIADAS À PLACA AMILOIDE EM DESENHO DE ALOIS ALZHEIMER</i>	83
<i>FIGURA 34. CARACTERIZAÇÃO DE PLACA AMILOIDE POR VARREDURA RAMAN DE HIPERESPECTRO – FREQUÊNCIAS DE DNA</i>	85
<i>FIGURA 35. IMAGEM HIPERESPECTRAL DE REGIÃO DE PLACA AMILOIDE</i>	87
<i>FIGURA 36. IMAGEM SRS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS</i>	88
<i>FIGURA 37. IMAGEM MULTIMODAL</i>	90
<i>FIGURA 38. ESPECTROSCOPIA RAMAN ESPONTÂNEA X ESPECTROSCOPIA RAMAN ESTIMULADA.</i>	91
<i>FIGURA 39. ESPECTROSCOPIA RAMAN ESPONTÂNEA X ESPECTROSCOPIA RAMAN ESTIMULADA.</i>	93
<i>FIGURA 40. IMAGEM SRS DE PLACAS AMILOIDE</i>	94
<i>FIGURA 41. IMAGEM DE PLACA AMILOIDE POR SRS</i>	97
<i>FIGURA 42. IMAGEM DE PLACA AMILOIDE POR SRS</i>	99
<i>FIGURA 43. IMAGEM DE PLACA AMILOIDE POR SRS</i>	100
<i>FIGURA 44A. SRS DE PLACAS AMILOIDES EM CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS DE 12 MESES</i>	101
<i>FIGURA 44B. SRS DE PLACAS AMILOIDES EM CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS DE 12 MESES</i>	102
<i>FIGURA 45. ANÁLISE PCA E ANIMAIS TG 6 E 12 MESES</i>	105
<i>FIGURA 46. ANÁLISE RAMAN DO HALO LIPÍDICO EM ANIMAIS TG DE 6 E 12 MESES</i>	109
<i>FIGURA 47. IMAGEM DE PLACA AMILOIDE E NEURITOS DISTRÓFICOS</i>	110
<i>FIGURA 48. IMAGEM DE PLACA AMILOIDE E NEURITOS DISTRÓFICOS</i>	112
<i>FIGURA 49. IMAGEM DE BORDA LIPÍDICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS DA GLIA</i>	113
<i>FIGURA 50. IMAGEM DE BORDA LIPÍDICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS DA GLIA</i>	113
<i>FIGURA 51. IMAGEM DE BORDA LIPÍDICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS DA GLIA</i>	114
<i>FIGURA 52. IMAGEM DE BORDA LIPÍDICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS DA GLIA</i>	115
<i>FIGURA 53. IMUNOMARCAÇÃO DE PLACA AMILOIDE EM RETINA DE CAMUNDONGOS TG</i>	121
<i>FIGURA 54. IMUNOMARCAÇÃO DE PLACA AMILOIDE EM RETINA DE CAMUNDONGOS TG</i>	122
<i>FIGURA 55. IMAGEM CARS DE RETINA DE CAMUNDONGO CTRL</i>	124
<i>FIGURA 56. IMAGENS SRS DE RETINA DE CAMUNDONGO TG</i>	125
<i>FIGURA 57. PROCESSAMENTO DE IMAGEM SRS DE RETINA DE CAMUNDONGO TG</i>	126
<i>FIGURA 58. IMAGEM SRS DE RETINA DE CAMUNDONGO TG</i>	127
<i>FIGURA 59. IMAGEM SRS DE RETINA DE CAMUNDONGO TG</i>	128
<i>FIGURA 60. IMAGEM SRS HIPOCAMPO FRESCO DE CAMUNDONGO TG 12 MESES.</i>	129
<i>FIGURA 61. ESPECTRO RAMAN DE AMINOÁCIDOS.</i>	150
<i>FIGURA 62. ESPECTRO RAMAN DOS A.A. EM PÓ</i>	152
<i>FIGURA 63. COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS RAMAN DE A.A. EM SOLUÇÃO E EM PÓ</i>	155

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NA RETINA RELACIONADAS À DA.....	34
QUADRO 2. PREPARO DA SOLUÇÃO DOS AMINOÁCIDOS.....	50
QUADRO 3. REGIÕES DE INTERESSE UTILIZADAS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. MÉDIAS DE PC1 DAS FREQUÊNCIAS ANALISADAS.....	106
---	-----

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer no mundo

Nas últimas décadas houve um aumento significativo da expectativa de vida da população mundial. Em 1960, a média de vida mundial estava em torno de 50 anos ^[1] e, em 2016, já superara os 70 anos, sendo que, os países com maiores índice de gini e IDH alcançam vida média de 85 anos, enquanto no outro extremo, no continente Africano, observa-se 52 anos na média (**FIGURA 1**) ^[2,3]. Esse incremento em anos de vida trouxe uma maior incidência de doenças relacionadas ao envelhecimento, dentre elas, as doenças neurodegenerativas idade-dependente, com um aumento significativo dos pacientes com demência.

Demência é uma síndrome - grupo de sintomas - que tem várias causas. Os sintomas característicos de demência são dificuldade de memória, de linguagem, de resolução de problemas simples (diários) e em outras habilidades cognitivas que afetam a capacidade individual da pessoa para resolver e executar atividades diárias. A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência. Estima-se que represente de 60 à 80% dos casos de demência [1], [2].

Na DA acontece morte neuronal e, conseqüentemente, perda de massa encefálica. O cérebro danificado gera comprometimento de atividades básicas, com perda de memória e dificuldades de executar as tarefas corriqueiras do dia-a-dia. Com o avançar da doença, atividades como caminhar e engolir começam a ficar comprometidas. Pessoas nos estágios finais da doença ficam acamadas e necessitam de cuidados 24h por dia [2]. Nesse estágio avançado, a morbidade deixa o paciente de Alzheimer vulnerável a infecções, podendo levá-los a morte. A porcentagem da DA aumenta drasticamente com a idade: acomete 3% das pessoas com idade entre 65-74, 17% com idade de 75-84, chegando a 32% das pessoas com 85 anos ou mais [3].

¹ Disponível em: [HTTPS://DATA.WORLDBANK.ORG/INDICATOR/SP.DYN.LE00.IN](https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.LE00.IN). Data de acesso: 10 de março de 2020

² Disponível em: https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/life_tables/situation_trends_text/en/. Data de acesso: 10 de março de 2020.

³ Disponível em: <https://ourworldindata.org/life-expectancy>. Data de acesso: 10 de março de 2020.

Segundo o *The World Alzheimer Report 2019* da *Alzheimer's Disease International* ^[4], 50 milhões de pessoas viviam com algum tipo de demência em todo o mundo em 2019, valor maior que a população da Espanha (~45.6 milhões). Este número deverá aumentar para mais de 152 milhões até 2050, o que causará um enorme impacto econômico devido aos custos diretos e indiretos relacionados à saúde. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a DA é a quinta causa de morte no mundo, a terceira causa de morte em países ricos e a sexta em países em desenvolvimento^[5].

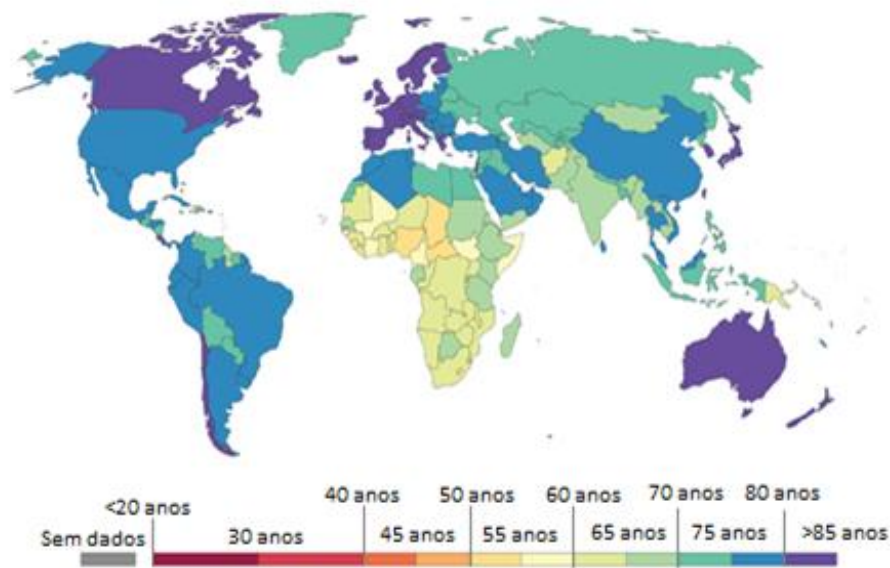


FIGURA 1. Expectativa de vida no mundo

Organização Mundial da Saúde (World Health Organization - WHO)

⁴ Disponível em: <<https://www.alz.co.uk/research/world-report-2019>>. Data de acesso: 10 de março de 2020.

⁵ Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Data de acesso: 10 de março de 2020

1.2 Morte por Alzheimer

Embora enorme, o número de morte por DA ainda é subestimado, porque a morte por Alzheimer só é atestada seguindo definição da OMS “*the disease or injury which initiated the train of events leading directly to death*” (doença ou injúria que iniciou a sequência de eventos que levam diretamente à morte) [6]. Imobilidade, dificuldade de deglutição e má-nutrição são algumas das complicações compartilhadas por vários tipos de demência, e esses quadros não contabilizados como DA aumentam os riscos de condições agudas que causam morte nesses pacientes. Nesses quadros, a pneumonia é uma das mais frequentes causas de morte em pacientes com Alzheimer ou outras demências. Doenças do sistema respiratório são a causa imediata de morte em mais da metade das pessoas com Alzheimer, seguida de doença do sistema circulatório que corresponde a um quarto do total [4]. O certificado de óbito desses indivíduos com DA consta, normalmente, como causa primária de morte a pneumonia em vez de Alzheimer [4], [5]. Desse modo, muitas pessoas que morrem em função dos efeitos do mal de Alzheimer não são computadas juntamente com aquelas que constam morte por DA de acordo com a definição da OMS, mesmo que a DA tenha causado a condição aguda declarada no óbito. Isso dificulta o devido certificado de óbito constando Alzheimer como *causa mortis* e, conseqüentemente, uma subnotificação das mortes pela doença.

A doença de Alzheimer já figura como a sexta causa de morte nos EUA e a quinta entre aqueles com 65 anos ou mais [2]. Estudos epidemiológicos deste país, que detém uma boa base de dados para a doença, mostram que a DA está se tornando a causa de morte mais comum. Enquanto a morte referente às outras graves enfermidades vem diminuindo significativamente, as mortes por DA vêm aumentando significativamente [2]. Entre 2000 e 2017, o número de mortes com óbito confirmatório para doença de Alzheimer mais que dobrou (145%), enquanto

⁶ Disponível em: <[HTTPS://APPS.WHO.INT/IRIS/HANDLE/10665/42980](https://apps.who.int/iris/handle/10665/42980)> Data de acesso: 10 de março de 2020

para as demais doenças diminuiu 9% (**FIGURA 2**)^[7]. E esse valor considera apenas as mortes que constam DA como “causa da morte”, ou seja, o número real é maior.

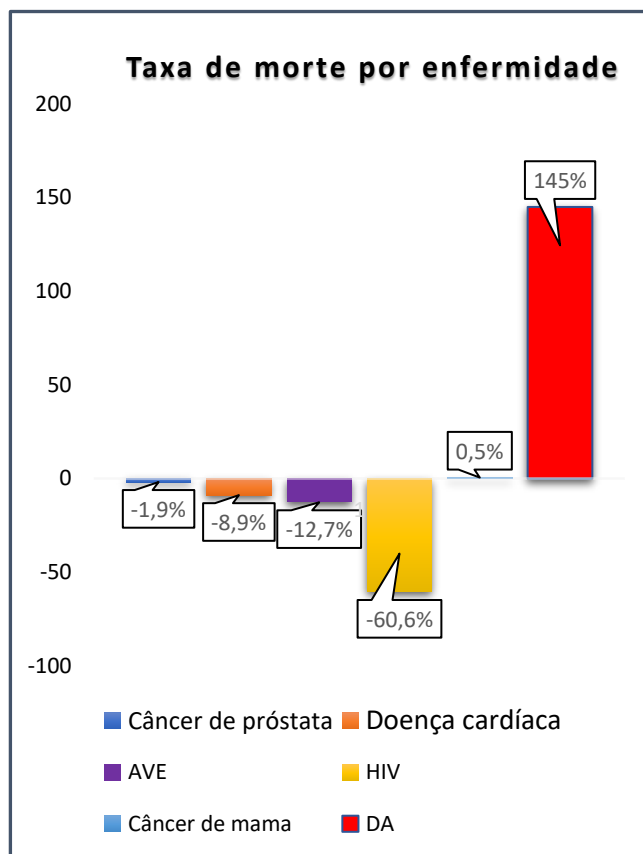


FIGURA 2. Alterações percentuais nas causas selecionadas de morte

Alterações percentuais nas causas selecionadas de morte (todas as idades) entre 2000 e 2017. Adaptado de 2019 Alzheimer's disease facts and figures. AVE, acidente vascular encefálico. HIV, vírus da imunodeficiência adquirida. DA, doença de Alzheimer.

⁷ Disponível em: <<https://www.alz.org/media/documents/alzheimers-facts-and-figures-2019-r.pdf>> Data de acesso: 10 de março de 2020

1.3 DA no Brasil

O Brasil sofreu uma intensa urbanização nos últimos 80 anos. Na década de 1940, a população nos centros urbanos era de 20%. Em menos de 50 anos ela passou para 80% [6]. Essa transformação se deu juntamente com melhoria de vida da população e maior acesso ao sistema de saúde. Esse fenômeno resultou no aumento da expectativa de vida e da diminuição da taxa de fecundidade [7]. Nos últimos 50 anos a expectativa de vida média do brasileiro aumentou em quase 25 anos [6]. O incremento em anos de vida reflete também no aumento de doenças crônicas idade-dependente, como a DA.

Um estudo desenvolvido a partir dos dados do Sistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde no período de 2000 a 2009, considerando apenas dados das capitais brasileiras, demonstrou que houve crescimento anual nas taxas de mortalidade por DA entre pessoas de 60 à 79 anos, ao passo que todas as demais causas de morte apresentou declínio nesse grupo etário [8]. Em um estudo recente desenvolvido no Departamento de Estatística da Faculdade Federal de Minas Gerais, também analisando apenas dados das capitais, concluiu-se que as taxas de mortalidade por todas as demências e por DA no Brasil foram maiores do que nos países desenvolvidos [9].

1.4 Os custos do Alzheimer

Para além do transtorno familiar, dos custos emocionais, do comprometimento da família com os cuidados necessários para lidar com uma pessoa com Alzheimer, a doença demanda um enorme gasto financeiro tanto com assistência médica quanto com cuidadores. Ainda há de se considerar o custo social em função da inatividade das pessoas do entorno familiar que necessitam deixar de trabalhar várias horas por dia para cuidar do familiar com Alzheimer. Nos EUA, 83% dos cuidadores de pacientes Alzheimer são membros da família ou amigos próximos, e por tanto, não exercem essa função de forma remunerada. O custo global

estimado dessa demência é de 1 trilhão de dólares com previsão de dobrar até 2030 [8]. Em 2018, estima-se que esses cuidadores despenderam algo próximo de 18.5 bilhões de horas de assistência (não remuneradas), o que corresponderia ao valor de 233.9 bilhões de dólares [2].

1.5 Identificando o Alzheimer

A DA é insidiosa e de lenta progressão. Estudos indicam que pessoas com 65 anos ou mais sobrevivem, em média, 6 à 8 anos após o diagnóstico clínico do Alzheimer [10]. A DA é historicamente definida a partir do aparecimento de sintomas de demência e só é confirmada com autópsia pela presença de elevadas concentrações de peptídeos beta amiloide (βA) e de proteína tau hiperfosforilada (hTau) no cérebro. Entretanto, existe um consenso de que a DA compreende um *continuum* que começa com mudanças no cérebro que teriam início muitos anos antes dos sintomas aparecerem; evoluindo para sintomas de comprometimento das funções cognitivas e físicas, que levam anos, culminando no estágio severo da doença, quando os danos cerebrais são tão extensos que a pessoa tem problemas motores e dificuldade de se comunicar. A partir desse entendimento, o que era nomeado como “Doença de Alzheimer” em 1984, agora é chamado de “demência devido ao Alzheimer” ou “Demência de Alzheimer”. Essa atualização ocorreu em 2011. De fato, o desenvolvimento de biomarcadores e mais conhecimento sobre a doença ensejaram atualizações sobre o Alzheimer [2], [11].

Novas diretrizes de diagnóstico foram propostas pelo Instituto Nacional do Envelhecimento (*National Institute on Aging - NIA*) e pela Associação de Alzheimer [12] com a incorporação de biomarcadores em adição aos sintomas clínicos da doença na identificação do Alzheimer mais precocemente, no *continuum* da doença. Segundo as novas diretrizes publicadas em 2011 [12], o Alzheimer se dá em 3 estágios:

- i. Pré-clínico, estágio após mudanças cerebrais, mas antes do surgimento dos sintomas;

⁸ Disponível em: <[HTTPS://WWW.ALZ.CO.UK/RESEARCH/WORLD-REPORT-2018](https://www.alz.co.uk/research/world-report-2018)>. Data de acesso: 10 de março de 2020

- ii. Comprometimento Cognitivo Leve devido ao Alzheimer – (CCL), do inglês *Mild Cognitive Impairment – MCI*. Esse estágio é caracterizado por mudanças no cérebro e sintomas cognitivos leves que não afetam de forma grave o dia-a-dia do paciente.
- iii. Demência devido ao Alzheimer. Estágio com mudanças no cérebro e significativos problemas de memória, raciocínio e comportamento.

O diagnóstico de Alzheimer não é simples. Os clínicos usam uma variedade de abordagens e ferramentas para chegar a um diagnóstico, que só será confirmado *post mortem* por autópsia. Para se chegar a um diagnóstico, o clínico necessita obter uma série de informações e resultados de vários testes [2], a saber:

- ✓ Histórico médico e familiar do indivíduo, incluindo histórico psiquiátrico, histórico cognitivo e mudanças de comportamento;
- ✓ A partir de um membro da família, saber sobre as mudanças na capacidade de pensar, nas habilidades e no comportamento do paciente;
- ✓ Conduzir testes cognitivos além de exames físicos e neurológicos;
- ✓ Exames sanguíneos e de imagem de cérebro para excluir sintomas de outras demências e doenças como tumor e deficiência de vitaminas;
- ✓ Em algumas circunstâncias, imagens de cérebro para identificação de marcadores específicos de Alzheimer, como placas amiloides e proteína Tau.

O processo de diagnósticos clínico de uma demência pode levar várias semanas, tempo para se completar todos os testes e o médico interpretar e concluir o diagnóstico. Os testes sorológicos usados para auxiliar o diagnóstico buscam dosar algumas proteínas envolvidas na DA, como presença de β A e Tau no líquido cefalorraquidiano (LCR). Os exames de imagem compreendem o *PET (Positron Emission Tomography)* e *MRI (Magnetic Resonance Image)*. O primeiro - *PET*, expõe o paciente a agente radioativo, e ambos têm elevado custo, e identificam alterações em estágios já avançados da doença, quando as mudanças (danos) no cérebro já se deram de forma irreversível. Além disso, essas técnicas de imagem têm baixa especificidade, pois revelam algumas alterações compartilhadas com

outras demências, como degeneração, anormalidades vasculares, metabolismo de glicose [13]. O grau de complexidade de todos esses métodos de diagnóstico – *PET*, *MRI* e *LCR*, e a desvantagem de não revelarem a doença na sua fase inicial, ou mesmo, assintomática, tornam impraticáveis o uso desses para triagem de grandes populações, monitoramento de terapias e gerenciamento de riscos de desenvolvimento da doença.

Algumas das tentativas recentes de terapias que têm como ação a redução da deposição de β A não lograram êxito [14], possivelmente porque são aplicadas a pacientes que já apresentam grave comprometimento neurológico. Sendo assim, os mesmos procedimentos podem ter efeito se iniciados antes de os danos estarem estabelecidos. Todavia, para isso é necessário um método de diagnóstico precoce adequado ao monitoramento de terapias. Nos anos em que a DA está se estabelecendo, o paciente não apresenta sintomas, embora as alterações neuropatológicas no cérebro já tenham começado, uma vez que a deposição lenta e gradual de β A, a hiperfosforilação da proteína Tau e a neurodegeneração acontecem num *continuum* prolongado de anos.

Essas mudanças no cérebro à nível histopatológico são conceitualmente divididas em 3 fases: Deposição de β A > hiperfosforilação de Tau > Neurodegeneração (A/T/N). Essa fase assintomática e insidiosa é denominada prodromal, começa 15 a 20 anos antes da manifestação clínica, ou seja, antes do déficit cognitivo acontecer [15]. Sob a perspectiva de identificar a evolução da doença em seus anos iniciais, surge a proposta do monitoramento da retina.

A retina é formada por camadas de neurônios que se conectam ao cérebro, e por isso apresenta manifestações clínicas e fisiopatológicas de algumas doenças neurodegenerativas [16]–[18]. Acredita-se que a retina, por ser uma extensão do SNC, tendo origem embriológica e vasculaturas comuns, apresenta as alterações histopatológicas da DA na fase prodromal, antecedendo em anos as alterações no cérebro. O acesso à retina facilitaria o diagnóstico precoce da doença de forma rápida, barata e segura. Algumas estratégias de diagnóstico precoce intraocular da DA estão sendo propostas atualmente. Um estudo em animais bitransgênicos

APP_{swe}PS1_{ΔE9} para DA mostrou a identificação, *in vivo*, de β A na retina utilizando um corante fluorescente [19]. Esse modelo animal superexpressa o gene humano da proteína precursora de amiloide (*APP – Amyloid Precursor Protein*) contendo a mutação Swedish K594N/M595L, e a mutação delta E9 do gene da prenilina 1, sob controle do promotor de prion [20]–[22]. De fato, esses animais apresentam a deposição de β A na retina aos 2.5 meses de idade, enquanto que no cérebro, a deposição é detectável a partir de 5 meses. Estudos recentes identificaram placas amiloides em retina de humanos, *ex vivo* e *in vivo* [19], [23], [24] e outras estratégias de diagnóstico intraocular a DA estão sendo propostas e desenvolvidas [25]–[27].

1.6 O Domínio Tecnológico da Instrumentação Biomédica

Segundo um relatório de 2012 da Sociedade Brasileira de Física ^[9], a instrumentação científica é essencial para aumentar as interações entre a ciência aplicada e o setor produtivo. A instrumentação científica está na base do desenvolvimento de equipamentos dos mais diferentes setores, tais como agricultura, indústria química, hospitalares e laboratoriais. Ainda, esses setores trazem no seu lastro uma enorme cadeia produtiva, o que sugere uma rede interligada para produção e comercialização de insumos, equipamentos, bens e serviços. Apesar da pujança desses setores, existe uma grave carência de equipamentos nacionais de alto valor tecnológico [28].

O desenvolvimento de equipamentos de alta complexidade é algo ambicioso dentro da realidade brasileira. Vários problemas tornam a empreitada difícil: dificuldades com logística, carência de recursos humanos, falta de fomento financeiro, falta de continuidade de política pública, pouco incentivo às atividades científicas. Isso gera um desestímulo a projetos ambiciosos e inovadores e dificulta o progresso do desenvolvimento tecnológico. Projetos ambiciosos tendem a sucumbir a projetos imediatistas.

⁹ Disponível em: <[HTTP://WWW.SBFISICA.ORG.BR/V1/ARQUIVOS_DIVERSOS/PUBLICACOES/RELATORIO_SBF.PDF](http://www.sbfisica.org.br/v1/arquivos_diversos/publicacoes/relatorio_sbf.pdf)>. Data de acesso: 27 novembro 2019.

Um setor intensivo em tecnologia e que nasce a partir da instrumentação científica é o de equipamentos médico-hospitalar, principalmente o de diagnóstico, parte importante do complexo industrial da saúde [28], [29].

O Complexo Econômico-Industrial da Saúde (CEIS) – designação adotada para o Sistema Produtivo da Saúde – compreende os segmentos industriais de base química e biotecnológica (indústria farmacêutica, vacinas, hemoderivados e reagentes para diagnóstico), de base mecânica, eletrônica e de materiais (equipamentos e materiais médicos) e o segmento de serviços ^[10]. Esse setor foi muito ativo nos últimos anos. Em um intervalo de 10 anos - 1999 a 2009 - teve um crescimento de 37% no número de empresas industriais. No mesmo período apresentou um crescimento de 307% nas vendas nominais. Uma evolução real de 114,3% (descontado a inflação) [28].

Esse setor no Brasil é bastante segmentado, embora a maioria das empresas seja de médio porte, 62%, o setor se caracteriza por segmentos de baixa e média complexidade ^[11]. Grandes empresas localizadas no país são subsidiárias de multinacionais e correspondem a quase metade das exportações da indústria do setor de equipamentos médicos hospitalares ^[12]. No que se refere à equipamentos para diagnóstico por imagem, a indústria nacional supre uma parcela cada vez menor do mercado. Em 2009 essa parcela era menos da metade da demanda nacional [28]. Não por acaso, a indústria de equipamentos médicos, hospitalares e odontológicos (EMHO) vem apresentando déficits sistemáticos há anos (**FIGURA 3**). Em 2014 o déficit foi de U\$ 2 bilhões ^[13].

No contexto em que a incidência de demência se torna um mal que acomete dezenas de milhões de pessoas em todo o mundo, se traduzindo em um grande problema de saúde pública e econômico para as nações, surge também uma oportunidade de mercado e de domínio tecnológico dos instrumentos utilizados

¹⁰ Disponível em: <[HTTP://WWW6.ENSF.FIOCRUZ.BR/REPOSITORIO/SITES/DEFAULT/FILES/ARQUIVOS/COMPLEXOSAUE.PDF](http://www6.ensp.fiocruz.br/repositorio/sites/default/files/arquivos/complexosaude.pdf)>

¹¹ Disponível em: <www.abimo.org.br/default_interno.asp>. Data de acesso: 27 novembro 2019

¹² Disponível em: <[HTTP://CITRUS.USPNET.USP.BR/INGTEC/HTDOCS/UPLOADS/8F6BC036-8CE7-2E50.PDF](http://citrus.uspnet.usp.br/ingtec/htdocs/uploads/8f6bc036-8ce7-2e50.pdf)> Data de acesso: 27 novembro 2019

¹³ Disponível em: <<https://saudebusiness.com/mercado/equipamentos-para-saude-tem-deficit-acima-de-us-2-bi/>> Data de acesso: 27 novembro 2019

para diagnósticos e tratamentos médicos. De acordo com a *Evaluate Ltd.*, a indústria de tecnologia médica deve crescer 5.6% ao ano (*Compound Annual Growth Rate - CAGR*) no período entre 2017 e 2024, atingindo um volume de vendas global de US\$ 595 bilhões em 2024 ^[14]. O maior segmento é o de diagnóstico *in vitro*, seguido por cardiologia e diagnóstico por imagem. Estima-se, ainda, que o gasto total com pesquisa e desenvolvimento (P&D) apresentará um crescimento de 4.5% atingindo US\$ 39 bilhões em 2024. Segundo as projeções da *Evaluate Ltd.*, a área de maior crescimento em dispositivos médicos será a neurologia, com *CAGR* de 9,1% entre 2017 e 2024, e vendas atingindo US\$ 15,8 bilhões em 2024. Segundo a *Stratagem Intellectual Property Management Limited* ^[15], em novembro de 2015, o Mercado mundial total de produtos oftalmológicos era de aproximadamente US\$50 bilhões, com os Estados Unidos representando aproximadamente 40% deste Mercado. O segmento de Instrumentação diagnóstica representava 7% deste total, ou seja, US\$3,5 bilhões (**FIGURA 3**). A maioria dos países, o Brasil dentre eles, depende da importação de equipamentos biomédicos, o que além de aumentar os custos, tanto de aquisição quanto de manutenção, ainda sofre com a precariedade de assistência técnica.

Esse cenário de pouco protagonismo do Brasil contrasta com a crescente demanda por P&D no setor de equipamentos médico-hospitalar, com a crescente demanda por serviços de saúde, em função do envelhecimento da população, melhorias na qualidade de vida e no acesso à saúde. Equipamento de diagnóstico precoce e preventivo de doenças crônicas são uma meta no horizonte, uma vez que o gasto dos países com saúde tende a crescer quanto mais longeva fica a sociedade, pois permitem um melhor gerenciamento das doenças, mais eficácia no tratamento, melhor possibilidade de desenvolvimento de terapias e redução no tempo e custo de internação.

¹⁴ Disponível em: <www.evaluate.com/MedtechWorldPreview2018>. Data de acesso: 27 novembro 2019.

¹⁵ Disponível em: <<https://studyres.com/doc/1247488/the-ophthalmology-market>>. Data de acesso: 7 junho 2019

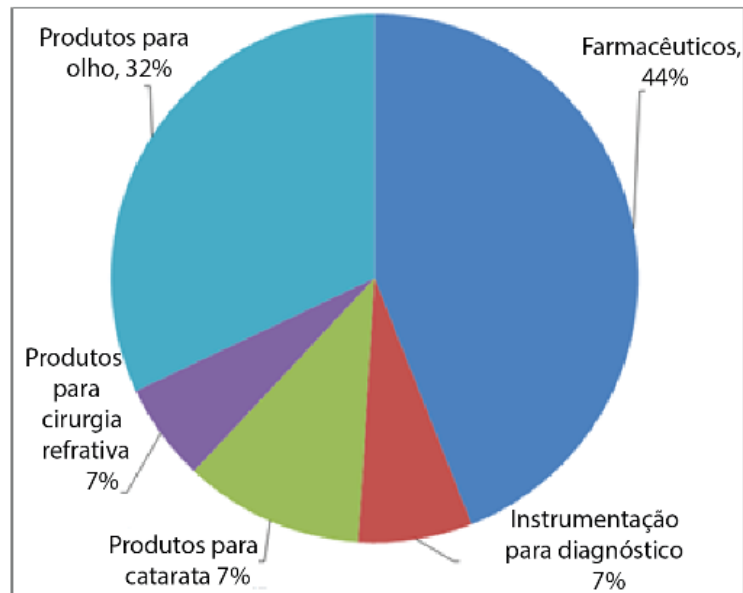


FIGURA 3. Participação dos grandes setores no Mercado global de produtos oftalmológicos (Fonte: Stratagem, 2015).

1.7 A proposta deste trabalho - Uso de Espectroscopia Raman Intraocular como Diagnóstico Precoce para Alzheimer

É nesse contexto que trazemos aqui a espectroscopia Raman (ER) como uma alternativa para o diagnóstico precoce do Alzheimer. Essa técnica, na fronteira do conhecimento, usa o laser como sonda para identificar uma determinada molécula de interesse, com alta especificidade, sem necessidade de corante ou contraste [30], [31]. A técnica já se provou eficiente em várias aplicações, em estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, para diversas doenças [32]. É vasta a literatura de uso de ER para diagnóstico e estudo de doenças como câncer [33], diabetes [34], osteoporose [35], sepse [36] e outras [37]. O principal biomarcador para Alzheimer, as placas amiloides, apresenta uma assinatura Raman característica, como demonstrado em [38] e também em [39], [40]. Alguns trabalhos sugerem o uso da ER para diagnóstico de retinopatias, com aplicação intraocular (ERMAKOV et al., 2004; HOGG et al., 2007; STIEBING et al., 2019).

Considerando que: (I) a principal marca histopatológica da DA está presente na retina [23]; (II) ela se manifesta na fase prodromal (ao menos no cérebro comprovadamente) [15]; (III) existem várias abordagens de exame intraocular para diagnóstico precoce de Alzheimer; (IV) trabalhos de vanguarda de detecção de placas amiloide por exames intraoculares estão sendo estabelecidos [19], [26], [41]; (V) nossos resultados recentes, discutidos nesta tese, sobre caracterização de tecido Alzheimer por espectroscopia Raman e aquisição de imagens de placas amiloide por Raman estimulado e Raman coerente (duas técnicas avançadas de aquisição de imagem, sem necessidade de marcação); este trabalho propõe o uso de espectroscopia Raman intraocular para diagnóstico precoce de Alzheimer, através da aquisição de imagem de placas amiloides, sem necessidade de corantes ou qualquer procedimento preparatório. Nossos estudos transversais em modelo animal indicam a viabilidade da proposta para, de forma rápida, segura e com custo operacional compatível, atender a uma demanda de diagnóstico de um número grande de pacientes.

Nosso grupo pretende ser pioneiro na proposta de diagnóstico precoce para Alzheimer por espectroscopia Raman intraocular. Para tanto, estamos criando massa crítica e conhecimento técnico para liderarmos esse nicho promissor da instrumentação científica e da aplicação da ER na biomedicina. O trabalho apresentado nessa tese apresenta um processo multidisciplinar para a solidificação do conhecimento técnico e científico para o desenvolvimento de um Oftalmoscópio de Varredura a Laser (OVL), que funcionará com base na espectroscopia Raman.

O objetivo desse trabalho foi o de pavimentar um caminho para o uso da espectroscopia Raman no diagnóstico histopatológico da DA e subsidiar o uso futuro dessa técnica na neuro-oftalmologia para fins de diagnóstico precoce de DA via espectroscopia intraocular. É necessário dizer, ainda, que o OVL pretende ser uma equipamento de imageamento de retina, com potencial de uso para as mais diversas doenças retinianas, além de outras aplicações, nas áreas farmacêuticas e

pesquisa em geral. Importante ressaltar também que um projeto dessa envergadura conta com uma equipe interdisciplinar distribuída nos departamentos de Física do Instituto de Ciências Exatas, na Escola de Farmácia, na Faculdade de Medicina e na Escola de Engenharia da UFMG. Fazem parte do grupo três engenheiros, dois programadores de software, dois clínicos, cinco físicos, dois farmacêuticos, um biólogo e uma química.

Essa tese está inserida em um projeto de instrumentação científica para o desenvolvimento de um equipamento de espectroscopia Raman intraocular para uso em humanos, que pode ser dividido em 4 etapas: 1ª Experimento *in vitro* e *ex vivo*; 2ª Experimento *in vivo*, 3ª Desenvolvimento de um protótipo; 4ª Estudo de mercado/plano de negócio. Essa divisão não é linear e as várias etapas foram/estão sendo executadas simultaneamente. Essa tese propõe apresentar a conclusão da primeira 1ª etapa, e os avanços alcançados nas demais etapas.

O trabalho exposto nessa tese tem 2 objetivos principais:

- I. Determinar a assinatura espectroscópica da placas amiloides por espectroscopia Raman;
- II. Validar um método de identificação de placas amiloides usando espectroscopia Raman estimulado, para uso intraocular na detecção precoce da doença de Alzheimer;

Essa tese está estruturada da seguinte forma:

CAPÍTULO 2, Apresenta uma revisão da literatura sobre os vários temas envolvidos no trabalho, a começar pela doença de Alzheimer. O histórico da doença, suas manifestações bioquímicas e histopatológicas, as alternativas disponíveis para diagnóstico auxiliar e a relação dessa e de outras doenças neurodegenerativas com a retina. É apresentada uma revisão sobre o potencial da retina como meio de diagnóstico para doenças neurodegenerativas, principalmente para a DA, e os métodos de imageamento intraocular recentemente propostos para esse fim. Finalmente, para completo entendimento do trabalho e dos resultados

apresentados, é exposto, de maneira didática, uma introdução teórica sobre espectroscopia Raman e suas potencialidades de uso na biologia e nas ciências da vida.

A partir do embasamento teórico, no **CAPÍTULO 3** são descritas as técnicas usadas e protocolos desenvolvidos para aquisição dos resultados nesse trabalho. A parte voltada para a engenharia das técnicas ópticas foi desenvolvida com grande apoio de professores e doutorandos do laboratório LabNS, enquanto toda a parte biológica e de interface entre biologia, física e engenharia foi desenvolvida pelo autor desta tese.

No **CAPÍTULO 4** são apresentados os resultados deste trabalho e sua discussão, onde solidificamos os dois objetivos listados acima.

E, finalmente, no **CAPÍTULO 5** está sumarizado o trabalho realizado e apresentamos um tópico “Perspectivas” com alguns resultados recentes relacionados à próximas etapas.

No **APÊNDICE** são apresentados alguns resultados suplementares. Também estão listados artigos publicados e em elaboração.

O **ANEXO** contém um relatório técnico com um protótipo de um OVL, e um plano de negócio que visa angariar recursos para as próximas fases do projeto e o certificado de aprovação do projeto do Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A doença de Alzheimer

Em 1906, Alois Alzheimer reportou resultados da autópsia de uma mulher de 55 anos de idade chamada Auguste Deter, que havia morrido de um distúrbio comportamental e cognitivo, progressivos. Alzheimer notou a presença de dois quadros histopatológicos no cérebro de Deter, emaranhados neurofibrilares e placas neuríticas (**FIGURA 4**) [42], descrita por ele à época como “*which were dystrophic neuronal processes surrounding a “special substance in the cortex”*” [43], [44]. Só em 1984, essas placas neuríticas foram isoladas e identificadas por Glenner & Wong, mostrando serem compostas por um peptídeo de ~4 kDa, de 40 ou 42 resíduos de aminoácidos. A suspeita era de que fossem produto de clivagem de uma proteína precursora maior. Em 1987, Kang e grupo clonaram a proteína que dá origem ao peptídeo, proteína precursora de amiloide (*amyloid precursor protein - APP*). Embora Alois Alzheimer estivesse convencido que a sua paciente, Auguste Deter, sofria de um caso atípico de demência, somente em 1968, em um trabalho seminal de Blessed, Tomlinson e Roth, a relação entre as placas neuríticas e o quadro de um tipo de demência específico foi estabelecida [45].

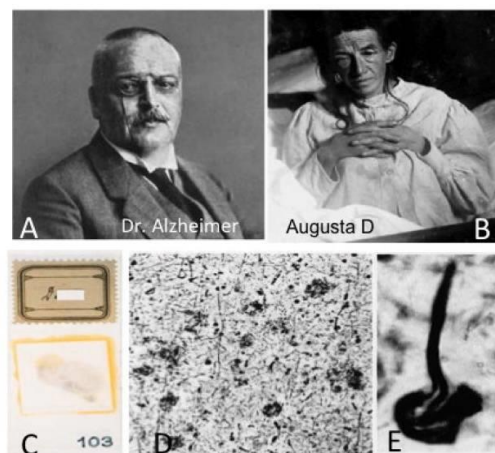


FIGURA 4. Arquivo histórico sobre Alois Alzheimer

(A) Fotografia do Dr. Alzheimer e (B) sua primeira paciente, Auguste Deter. (C). Imagem das lâminas histológicas post-mortem originais mostrando placas neuríticas impregnadas de prata (D) e um emaranhado neurofibrilar (E) no cérebro de Auguste Deter. Mufson et al.; Neuroscience 2015.

Esse perfil histopatológico - presença de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares - é o critério de diagnóstico confirmatório para DA, embora haja casos de pacientes sem quadro clínico com algum nível de placas neuríticas [46], [47]. Toda via, em outras doenças neurodegenerativas como Parkinson, não se observa aumento idade-dependente da histopatologia causada pela deposição de β A [48]. Parece haver um consenso da maioria dos estudos que atestam o critério patofisiológico clássico para DA – placas neuríticas e emaranhados fibrilares [44].

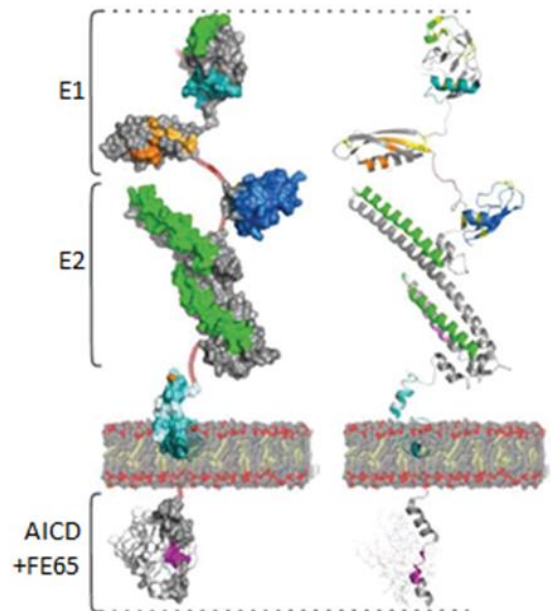
2.2 Bases Moleculares da Doença de Alzheimer

2.2.1 *Proteína Precursora de Amiloide*

Na década de 1980, foi demonstrado que as placas neuríticas (também chamadas de placas amiloides ou placas senis) consistem em fibrilas amiloide compostas pelo peptídeo β A, de 40 e 42 aminoácidos (a.a.) [49], [50]. Esse peptídeo é derivado da APP, um membro da família de proteínas presente em mamíferos (mas não só). Todas APP são proteínas transmembrana com um extenso domínio extracelular (**FIGURA 5**), e são processadas de maneira similar [44], [50].

FIGURA 5. Proteína precursora de amiloide (APP) alocada à zona ativa pré-sináptica (PAZ)

*Ilustração esquemática da proteína transmembrana APP, representando a organização do domínio de ligação à heparina/domínio semelhante ao fator de crescimento (HBD/GFLD, verde), pontes de dissulfeto (amarelo), domínio de ligação ao cobre (CuBD, laranja), domínio de ligação ao zinco (ZnBD, laranja claro), domínio ácido (DE), domínio inibidor de protease Kunitz (azul), domínio de ligação ao colágeno (violeta), sequência β A (ciano), local de clivagem da secretase (ciano pálido), sequência YENPTY (magenta), Sequência NPXY (roxa), proteína adaptadora FE65 (branca), sequências de renderização não modeladas (rubi). Adaptado de Weingarten et al.; *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2017.*



O *splicing* alternativo do transcrito da APP gera 8 isoformas, 3 das quais são mais comuns: a isoforma de 695 a.a. de expressão predominantemente no sistema nervoso central (SNC); as isoformas de 751 e 770 a.a. são expressas de forma ubíqua [51]. Como toda proteína transmembrana, a APP possui regiões hidrofílicas que se voltam para a parte intracelular e para o meio extracelular, e com regiões lipofílicas que ficam inseridas na bicamada lipídica. A expressão de mRNA de APP em camundongos foi observada a partir do sétimo dia de desenvolvimento embrionário [52]. Também foi observada no neuroectoderma, em estágios mais avançados, com alta expressão no tubo neural em neurônios motores em desenvolvimento, células da crista neural, retina e outros, com sustentada expressão ubíqua na fase adulta [53]. A função fisiológica da APP continua desconhecida. Trabalhos sugerem que a proteína tenha algum papel no crescimento e sobrevivência celular, crescimento neuronal, motilidade e liberação de vesículas sinápticas [54], [55]. Esses seriam alguns dos eventos em que a APP e seus peptídeos derivados poderiam atuar. A APP é encontrada nos compartimentos somato-dendríticos e axonais dos neurônios e é abundante em membranas de compartimentos intracelulares. Uma vez na superfície das células, a APP é clivada pela α -secretase, liberando APPs α , ou reinternalizando para os endossomos [56].

2.2.2 A Hipótese Amiloide

A APP é produzida em grande quantidade em neurônios e rapidamente metabolizada, e isso envolve múltiplas rotas de processamento, algumas das quais levam à produção do peptídeo β A (**FIGURA 6**) [57]. Após deixar o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, a APP segue pelo axônio onde é rapidamente transportada para o terminal sináptico. A etapa crucial do processamento da APP ocorre na superfície da membrana celular e na rede trans-Golgi (*Trans-Golgi network* - TGN). A partir do TGN, a APP pode ser transportada para a superfície da célula ou diretamente para o compartimento endossomal [50] (**FIGURA 6**).

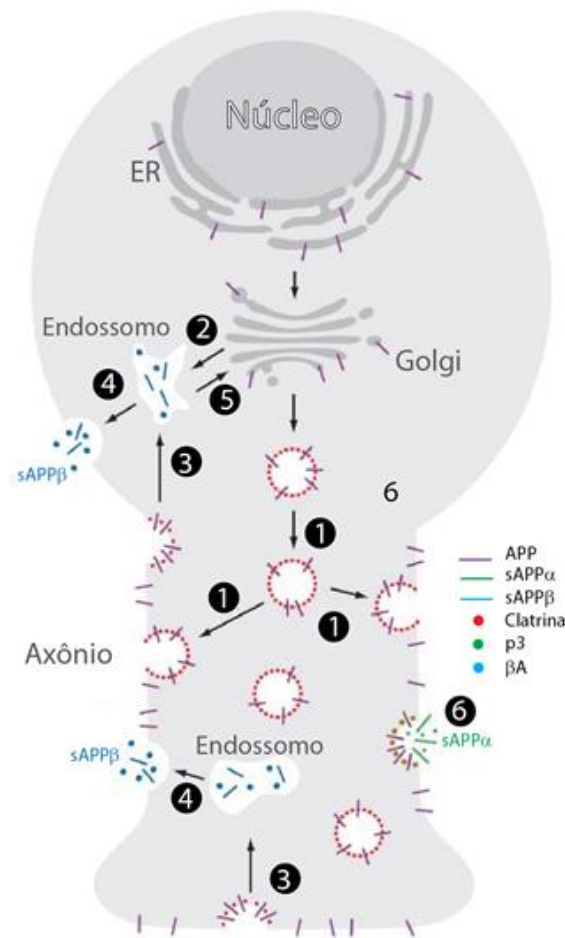


FIGURA 6. Transporte de APP em neurônios

A APP recém-sintetizada (roxa) é transportada do Golgi para baixo do axônio (1) ou para um compartimento endossômico do corpo celular (2). Após a inserção na superfície celular, algumas APP são clivadas pela α -secretase (6) gerando o fragmento sAPP α , que se difunde (verde), e algumas são reinternalizadas em endossomos (3), onde β A é gerado (azul). Após a proteólise, o endossomo recicla na superfície celular (4), liberando β A (azul) e sAPP β . O transporte dos endossomos para o Golgi antes da clivagem da APP também pode ocorrer, mediado por retromeros. ER; retículo endoplasmático. P3; peptídeo 3kDa. Adaptado de Wong et al.; Annu Rev Neurosci2011.

Na superfície da célula, a APP pode sofrer dois eventos, ser processada pela α -secretase, seguida pela γ -secretase (nessa sequência de processamento, não é gerado o peptídeo amiloide – via não amiloidogênica), ou ser reinternalizada em outro compartimento endossomal contendo β -secretase (BACE1) e γ -secretase. Nessa configuração, a sequência de processamento gera o peptídeo amiloide, que é secretado na porção extracelular ou degradado nos lisossomos (**FIGURA 6**). Os peptídeos β A₄₀ e β A₄₂ são produzidos pela clivagem da β -secretase e γ -secretase, em uma região hidrofóbica da proteína APP inserida na membrana (**FIGURA 7**), esses peptídeos (β A₄₂ é mais hidrofóbico) se aglomeram e se depositam no espaço

extracelular formando placas amiloides [44], [58]. A βA é secretada por ambos, dendritos e axônios [59]. O porquê de algumas APP serem internalizadas em endossomos e outras serem processadas diretamente na superfície pela α -secretase não está claro.

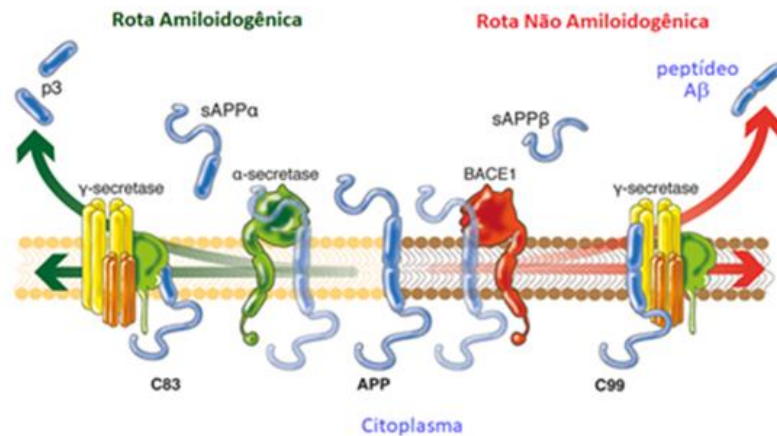


FIGURA 7. Processamento de APP - escolha celular crítica

A principal fonte de produção de $A\beta$ no cérebro são os neurônios. Duas vias de processamento proteolítico da APP foram descritas com duas saídas claras. A via não amiloidogênica levará à liberação final do p3 e sAPP α (s=solúvel), um pequeno peptídeo com função celular ainda pouco compreendida. As enzimas de clivagem que atuam para produzir a sAPP α são a α - e γ -secretase. Por outro lado, a atividade da BACE (β - e γ -secretase) leva à formação de sAPP β e βA , o principal agente neurotóxico descrito na DA. Adaptado de Zolezzi et al.; Front. Aging Neurosci, 2014.

Uma vez produzidos os peptídeos amiloide, estes monômeros de peso molecular ~ 4.5 kDa e de dimensão aproximada de ~ 4 nm se agrupam em estruturas globulares metaestáveis chamados oligômeros, de dimensões variáveis, de ~ 15 nm (quando formados por βA_{42} - **FIGURA 8**) a 200 nm (quando formado por βA_{40}) [60]. A estrutura do monômero que compõe os oligômeros apresenta baixa estabilidade. Forçados pela termodinâmica, esses monômeros - que compõem os oligômeros - adquirem uma estrutura de folha-beta pregueada se tornando mais estável no meio aquoso. Esse processo leva à formação de

protofibrilas que crescem longitudinalmente formando longas fibrilas. Essas estruturas são extremamente estáveis e insolúveis. As fibrilas se entrelaçam entre si e formam as placas amiloides [61]–[64]. Acredita-se que todo esse processo leva à distrofia neuronal, bloqueio de sinapses, hiperfosforilação da proteína Tau e morte dos neurônios [65], [66].

Diferentemente do que era consenso alguns anos atrás, parecem ser os oligômeros, e não as placas amiloides, responsáveis pela neurotoxicidade. Cultura de neurônios de ratos expostos à oligômeros sofreram distrofia neurítica e hiperfosforilação da proteína Tau [67]. Oligômeros, mas não as fibrilas amiloides, extraídos do córtex de paciente Alzheimer provocaram, em ratos, diminuição das sinapses em número e função, além de prejudicarem a memória de um comportamento aprendido [68]. Por sua vez, a relação da hiperfosforilação das proteínas Tau e β A ainda não é um consenso. A Tau é responsável pela estabilização de microtúbulos em neurônios, e, no Alzheimer, essa sofre hiperfosforilação, levando à perda de função, dissociando-se dos microtúbulos, causando os agregados intracelulares (observado por Alois), distrofia neuronal e, conseqüentemente, morte neuronal [69], [70]. As implicações desse evento são várias e todas muito drásticas para a célula. Compromete a estrutura e polarização dos neurônios, inibe o transporte de mitocôndrias, causando disrupção na produção de energia e acúmulo de espécie reativa de oxigênio. O transporte vesicular nos axônios também é comprometido e, conseqüentemente, as funções sinápticas [71], [72].

Embora a hipótese amiloide seja a mais aceita, alguns achados tornam a questão controversa. Algumas pessoas sem sintomas de Alzheimer apresentaram placas amiloides [46], [47], [73], [74] e alguns modelos animais que desenvolvem placas amiloides apresentam emaranhados fibrilares, outros não [53], [73], [75]
[1].

¹ DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.ALZFORUM.ORG/RESEARCH-MODELS/ALZHEIMERS-DISEASE](https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease)> Data de acesso: 27 novembro 2019.

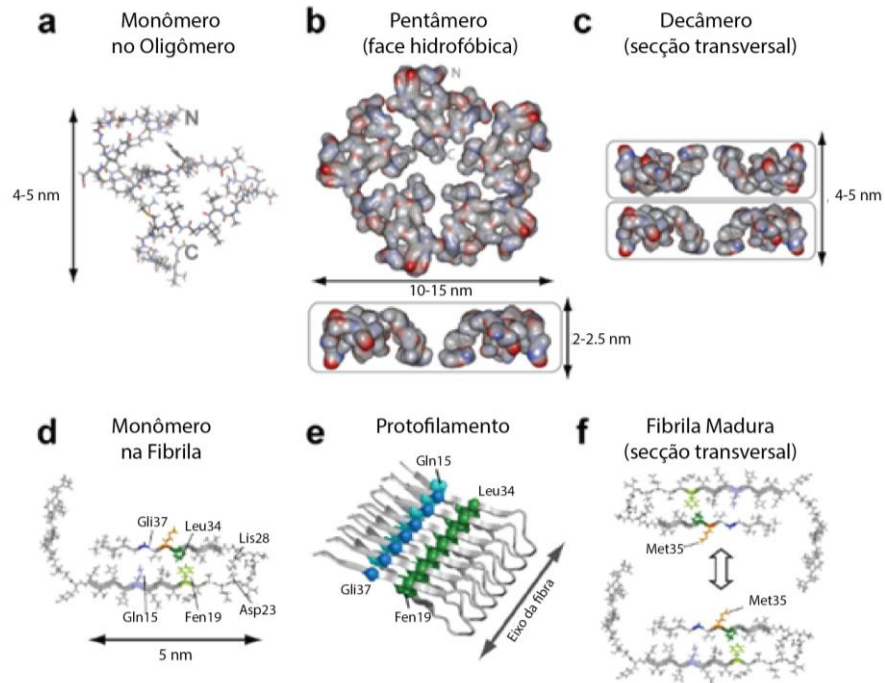


FIGURA 8. Modelos moleculares dos oligômeros $A\beta_{42}$

Em (a-c) e fibrilas (d-f). O modelo do monômero $A\beta_{42}$ na conformação do oligômero (a). A associação de pentâmeros em forma de disco pode formar decâmeros com alturas de ~ 4 nm. (d) Monômero na fibrila $A\beta_{42}$. A unidade monomérica tem uma geometria em forma de “U” com Fen19 em contato com Leu34. (e) Protofilamento $A\beta_{42}$. Pelo menos dois protofilamentos se associam para formar fibrilas maduras. Medidas de RMN indicam que Gln15 e Gln37 (esferas azuis) de peptídeos adjacentes estão próximos no espaço na estrutura do protofilamento, enquanto experimentos mutacionais em pares mostraram que Asp23 e Lis28 podem interagir em peptídeos adjacentes. Acredita-se que a ponte salina Asp23-Lis28 seja um elemento chave da estrutura de dobramento em $A\beta_{40}$. A observação de que o contato Fen19-Leu34 em $A\beta_{42}$ é o mesmo que em $A\beta_{40}$ argumenta que a estrutura β -turn- β é o mesmo nas fibrilas formadas a partir desses dois peptídeos. $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$ podem co-misturar homoganeamente em fibrilas amiloides, sugerindo que possuem a mesma arquitetura estrutural. (f) Seção transversal de fibrilas $A\beta_{42}$. Duas unidades de protofilamento podem se associar para formar fibrilas maduras (mostradas aqui em uma visão expandida, uma vez que os contatos moleculares que mediam a associação de protofilamento podem ser uma fonte de polimorfismo em fibrilas $A\beta_{42}$). Adaptado de Mahiuddin Ahmed et al. Nature Structural & Molecular Biology 2010. Fen, fenilalanina; Leu, leucina; Gli, glicina; Lis, lisina; Asp, ácido aspártico; Met, metionina.

2.3 Marcadores histopatológicos

As duas lesões histopatológicas observadas ao microscópio tecido cerebral de paciente na DA parecem correlacionar-se com o resultado de uma exacerbada deposição de βA extracelular, lesão axonal e dendrítica associada. Essa distrofia neuronal ocorre tanto junto à placa quanto na vizinhança imediata dela. Os axônios e dendritos (neuritos) desses neurônios apresentam-se dilatados e

tortuosos, com anormalidades ultraestruturais, lisossomos dilatados, mitocôndrias numerosas e filamentos helicoidais emparelhados, estes geralmente indistinguíveis dos que compõem os emaranhados neurofibrilares [76]. Os axônios se mostram altamente distróficos, o que compromete o transporte de vesículas [72], [77], [78]. Tudo isso associado às micróglias ativadas, circundadas por astrócitos reativos [79], [80].

As micróglias geralmente estão dentro e adjacentes ao núcleo da placa, enquanto os astrócitos frequentemente tocam a parte externa da placa amiloide, com alguns de seus processos estendendo-se em direção ao núcleo da placa (**FIGURA 9**) [81]–[83]. O método clássico de marcação histoquímica usa impregnação por prata que marca tanto as placas amiloides quanto os emaranhados neurofibrilares (**FIGURA 10**) [48], [76], [84]. Vermelho congo e Thioflavina são outros métodos de marcação histoquímicas bastante usados [85]. Somente após essa marcação histopatológica que o diagnóstico definitivo da DA é dado.

FIGURA 9. Células na glia em torno da placa

Astrócitos marcados em verde, micrógliamarcada em vermelho e placa amiloide marcada comThioS, (branco). Imagem do grupo LabNS, 2020.

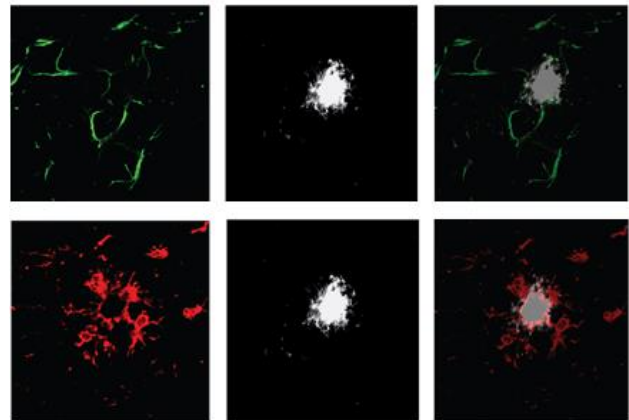
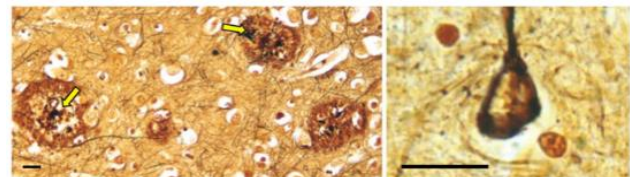


FIGURA 10. Placas amiloides e Emaranhados neurofibrilares

Placas amiloides (setas) e emaranhados neurofibrilares (direita) marcados por impregnação por prata. Adaptado de Richard J. O'Brien & Philip C. Wong, Annu Rev Neurosci, 2011 (Bhadbhade & Cheng, 2012).



2.4 O Fator Genético

A DA tem duas variáveis básicas, uma que é multifatorial (Alzheimer esporádico) e outra que tem determinantes genéticos (Alzheimer familiar). Na primeira, os indivíduos desenvolvem a doença a partir de ~65 anos, e estima-se que 95% dos casos de Alzheimer sejam esporádicos. Já a DA familiar começa a manifestar-se em idades variadas, aproximadamente a partir dos 30 ou 40 anos, e tem evolução muito rápida comparativamente ao Alzheimer esporádico [86]. O Alzheimer familiar está relacionado às mutações dos genes da APP, presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2). Existem dezenas de mutações para esses 3 genes (atualmente superam 270) ^[2], autossômica dominante e totalmente penetrante, que podem resultar na DA de início precoce [86]. A mutação de APP, (a mais famosa APPswe) provoca mudanças de aminoácidos no sítio de clivagem onde a BACE1 atua. A mutação relacionada às PSEN1 e 2 altera aminoácidos dessas enzimas. Em todas essas mutações, a resultante é o aumento da produção de peptídeo β_{42} (mais tóxico) em relação ao β_{40} [44].

O gene da APP encontra-se no cromossomo 21. Pessoas com síndrome de Down apresentam uma cópia a mais desse cromossomo, em função disso, esses pacientes apresentam superexpressão de APP e consequente deposição de β_{42} em torno dos 20 anos. Essas pessoas apresentam quadro de Alzheimer precoce [66], [87]. Apesar do Alzheimer esporádico não ter uma determinante genética como ocorre com o Alzheimer familiar, existe uma componente genética significativa que aumenta o risco à doença em 50% à 70%, e pelo menos metade desse risco se deve ao alelo do gene apoproteína E (ApoE) e suas 3 variáveis (ApoE2, ApoE3, ApoE4) [88]. O papel do metabolismo de colesterol na DA ainda não está claro, mas parece haver uma implicação baseada na relação de polimorfismos do gene da ApoE e a doença. A proteína APOE, juntamente com a ABCA7 estão envolvidas no efluxo de lipídio das células e na regulação de fagocitose. Assim, essa proteína pode estar implicada na remoção (clearance) de βA . Essa remoção de βA diminui de ApoE4 > E3 > E2 [89]. Neste

² Disponível em: <[HTTP://WWW.MOLGEN.UA.AC.BE/ADMUTATIONS/](http://www.molgen.ua.ac.be/admutations/); [HTTP://WWW.ALZFORUM.ORG/MUTATIONS](http://www.alzforum.org/mutations)> Data de acesso: 10 de maio.

caso, não há “aumento” de produção de βA e sim “diminuição da remoção” do peptídeo. O alelo ApoE4, que está presente em 10% a 20% da população, aumenta o risco de Alzheimer em 3 vezes em indivíduos que carregam uma cópia, e em 15 vezes em indivíduos homocigotos [44]. Diferente do Alzheimer familiar, cuja mutação condena a pessoa à doença, o portador do alelo ApoE não está condenado a desenvolver a doença, apenas tem maior pré-disposição a desenvolvê-la.

2.5 Diagnóstico

Como mencionado na Introdução, o diagnóstico da doença de Alzheimer é usualmente feito pelo neurologista, a partir de um histórico familiar e médico do indivíduo, incluindo a história psiquiátrica e as mudanças cognitivas e no comportamento. Adicionalmente, este profissional conduz testes cognitivos, exame clínico direcionado, e exames complementares, como a Ressonância Magnética por Imagem (*MRI - Magnetic Resonance Image*) e Tomografia por Emissão de Póstron (*PET - Positron Emission Tomography*) [90], [91], além de exames do líquido cefalorraquidiano (LCR) [86].

Em pacientes de Alzheimer, a distrofia e morte neuronal levam, fatalmente, à diminuição do metabolismo cerebral. Para o exame de *PET*, o paciente é administrado com glicose radiomarcada para imageamento do metabolismo de glicose no cérebro. Já existem no mercado sondas radiomarcadas específicas para placas amiloides para imagem por *PET* [92], [93], assim como sonda para Tau (**FIGURA 11**) [94]. Entretanto, essas sondas são muito caras, tem tempo de vida útil muito baixo (em função do tempo de decaimento do radioisótopo), além do inconveniente de expor o paciente à radiação.

A RMI mostra alteração estrutural (*structural Magnetic Resonance Imaging sMRI*) notadamente, em função da diminuição considerável da densidade da massa encefálica quanto mais avançada está a DA (**FIGURA 11**). Além disso, as alterações na função, conectividade e metabolismo podem ser detectadas através da ressonância magnética funcional (*functional Magnetic Resonance Imaging - fMRI*). A ressonância magnética funcional ganhou recentemente atenção no estudo de doenças neurodegenerativas [95]. Essa técnica consiste na aquisição do

sinal dependente do nível de oxigênio no sangue durante “nenhuma tarefa cognitiva” [96]. Isso permite o estudo de redes cerebrais independentemente de qualquer viés introduzido pela variabilidade de tarefas e procedimentos. A ressonância magnética funcional tem sido descrita como uma técnica de imagem promissora para identificar biomarcadores neurais muito precoces da DA *in vivo* [97], entretanto, muitas alterações observadas por MR são comuns de outras patologias. Ambas as técnicas de diagnóstico por imagem são muito caras, com custos de manutenção e execução altos, além de requererem uma infraestrutura complexa, de alto custo e com corpo técnico altamente especializado.

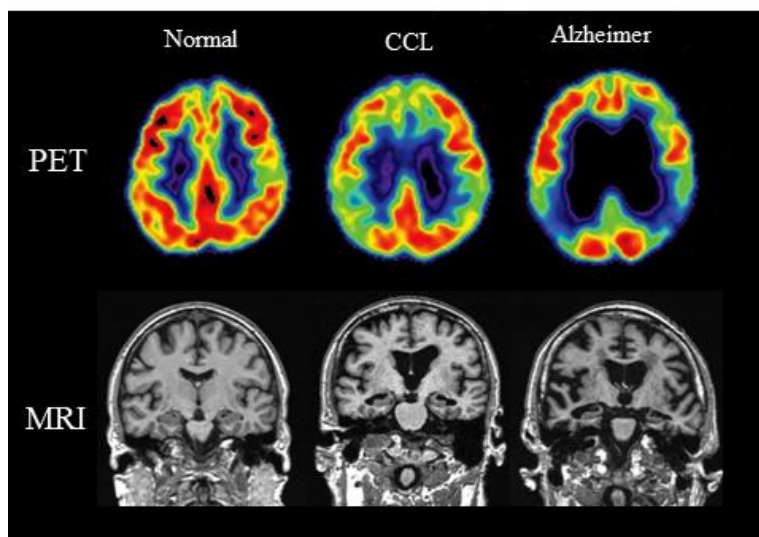


FIGURA 11. Imagem de PET e MRI.

Na imagem de PET, observa-se a diferença entre o metabolismo da glicose no encéfalo. O MRI mostrando a perda de massa encefálica em paciente Alzheimer. CCL (Comprometimento Cognitivo Leve). Adaptado de Prashanthi Vemuri & Clifford R Jack Jr, Alzheimer's Research & Therapy, 2010.

O líquido cefalorraquidiano está em contato direto com o espaço extracelular do cérebro e, conseqüentemente, mudanças bioquímicas no cérebro o afetam. Como a patologia da DA é restrita ao SNC, o LCR é uma fonte óbvia de biomarcadores para a DA. Espera-se que os marcadores bioquímicos para DA reflitam os processos patogenéticos centrais (isto é, a degeneração neuronal, a deposição do peptídeo β A em placas e a hiperfosforilação da tau com subsequente

formação de emaranhados) [98]. Os possíveis biomarcadores para esses processos patogênicos são as concentrações da proteína tau total, de $A\beta_{42}$ e a proteína tau hiperfosforilada (hTau) no LCR. Em indivíduos com DA, são observados uma diminuição nos níveis de $A\beta_{42}$ e um aumento de hTau [99], [100]. Todavia, é necessária uma punção lombar para retirada do LCR, um procedimento considerado de invasividade moderada [101].

Esses exames auxiliares descritos acima são os mais efetivos atualmente no auxílio do diagnóstico clínico, muitas vezes combinados. Entretanto, o grau de complexidade de todos esses métodos diagnóstico, a exposição à radiação ionizante (PET) e as desvantagens de não revelar a doença em sua fase inicial, ou mesmo assintomática, inviabilizam seu uso para triagem de grandes populações, monitoramento de terapias e gerenciamento de risco de desenvolver a doença.

2.6 Terapias da DA

Algumas estratégias de terapia buscam atacar o acúmulo ou a produção de βA quer seja com imunoterapia através de anticorpo anti- βA [102] ou bloqueando a clivagem via inibidor de β -secretase [103] e γ -secretase [104], enquanto algumas usam inibidores seletivos de recaptação de serotonina, outras estão voltadas para taupatias [105]. Alguns terapias miram na neuroinflamação associada à DA [106]. Há ainda inibidores de colinesterase e antagonista de receptor de N-metil-D-aspartato [106]. Conforme o último levantamento publicado em 11 de julho de 2020 pela *Translational Research & Clinical Interventions* na sua 5ª edição, o anual “*Alzheimer’s disease drug development pipeline: 2020*”, havia pelo menos 121 agentes em 136 ensaios clínicos de terapias para DA nos Estados Unidos e o mesmo relatório salienta que segundo a Organização Mundial da Saúde, há pelo menos 170 drogas em desenvolvimento para DA em todo o mundo. Número muito inferior quando comparado às 6833 para câncer e 433 para diabetes. Essa disparidade certamente está relacionada com a dificuldade de, i. encontrar alvos biológicos mais eficazes, ii. poucos biomarcadores disponíveis, iii. duração de ensaios muito longos e de alto custo e maior risco de insucesso no desenvolvimento de medicamentos para DA [105]. Fato é que, os esforços para

desenvolver um tratamento para a DA vem sofrendo sucessivos fracassos e várias promessas caíram no vazio por apresentarem resultados falhos [105], [106]. Isso deixa claro a necessidade de compreendermos melhor a doença e como ela se desenvolve. Para tanto, é necessário e desejável que se diagnostique a doença de forma precoce, para aprendermos como ela evoluiu, quais alterações bioquímicas e fisiopatológicas antecedem a histopatologia já conhecida (placas amiloides e emaranhados neurofibrilares). Como o diagnóstico da DA se dá a partir do sintoma clínico, quando os danos já estão bem estabelecidos, aumenta a dificuldade de êxito. A morte neuronal é irreversível. Em linhas gerais, tanto antes uma terapia for aplicada, maior a chance de ela ser eficaz.

2.7 Retina e doenças neurodegenerativas

A vida provavelmente se desenvolveu na Terra há aproximadamente ~3,7 bilhões de anos, e o olho provavelmente evoluiu há mais de 500 milhões de anos [107], [108]. A tentativa de entender esse órgão intrigante e imprescindível para a vida animal remonta aos filósofos pré-hipocráticos (Hipócrates, pai da medicina, 460 a.C) que acreditavam que a visão era o resultado de informações coletadas por raios emitidos pelo olho; esses raios, ao atingir um objeto, seriam desviados de volta aos olhos, transmitindo informações do mundo exterior. Foi na literatura árabe que surgiram as figuras que ilustravam a anatomia do olho. O primeiro desenho ainda disponível aparece no livro “Livro dos dez tratados sobre o olho” (*Book of the Ten Treatises on the Eye*), de Hunain ibn Is-hâq (809 d.C.) [3]. Filósofos e poetas através dos tempos sempre disseram que “os olhos são a janela da alma”.

Em um paralelo, a retina parece ser a janela do cérebro, podendo atuar como delatora das doenças neurodegenerativas. Durante o desenvolvimento embrionário, a retina e o nervo óptico se estendem do diencéfalo, e são assim considerados parte do SNC. A retina é uma fina camada de tecido que reveste o fundo interior do olho e é composta de várias camadas de neurônios densamente interconectados por sinapses. A luz que entra pelo olho atravessa a retina e é

³ Disponível em: <[HTTP://WWW.MRCOPHTH.COM/HISTORYOFOPHTHALMOLOGY/ANATOMY.HTM](http://www.mrcophth.com/historyofophthalmology/anatomy.htm)> DATA DE ACESSO 05 DE MAIO.

capturada pela última camada de células desse tecido, os fotorreceptores. Esses traduzem os sinais luminosos via uma intrincada cascata de sinalização que alcança as células ganglionares (CG), primeira camada de células da retina (parte superficial do tecido), cujos axônios formam o nervo óptico (**FIGURA 12**). O nervo óptico, por sua vez, estende-se até o núcleo geniculado lateral no tálamo e até o colículo superior no mesencéfalo, de onde as informações são transmitidas para o centro de processamento visual que nos permite perceber uma imagem visual do mundo [17].

As camadas da retina são formadas de 5 tipos celulares altamente especializados, além das células ganglionares (superfície externa) e dos fotorreceptores (superfície interna), há ainda as células amácrinas, as células bipolares e as células horizontais que compõe a parte intermediária do tecido retiniano (**FIGURA 12**). Assim como os demais neurônios, as camadas de células ganglionares (CGC) apresentam a morfologia típica, contendo o soma, axônios e dendritos. Ao contrário da maioria dos outros axônios do SNC, estes não são mielinizados até deixarem o olho [109]. Tal qual ocorre no SNC, danos e traumas no nervo óptico resultam em degeneração do fluxo retrógrado e anterógrado, formação de cicatrizes e destruição de mielina, criando um ambiente neurotóxico com estresse oxidativo, privação de fatores neurotróficos, níveis excitotóxicos ^[4] de neurotransmissores e agregação anormal de proteínas e detritos. Todo esse cenário culmina em morte neuronal e comprometimento do ideal funcionamento da retina [17].

Do mesmo modo que o cérebro e a medula espinal, a retina possui um privilegiado sistema imune, com uma barreira sanguínea ocular - barreira hemato-retiniana - composta de células endoteliais fortemente conectadas por junções *tigh* e circundada por astrócitos e células Müller terminais. Essa estrutura se assemelha a barreira hematoencefálica no cérebro [110]. É por compartilhar essas (e outras) características com o SNC que a retina pode ser uma porta para observamos o que

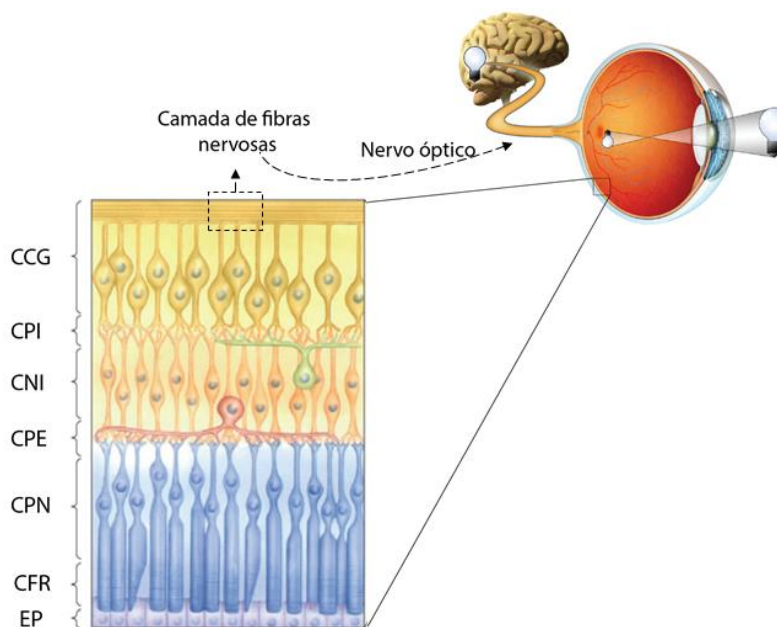
⁴ Excitotoxicidade é o termo usado para o processo de morte neuronal induzido pela liberação maciça do aminoácido excitatório L-glutamato no espaço extracelular após a lise de neurônios.

se passa no cérebro, de modo a aprender sobre doenças neurológicas e, de forma preventiva, conseguir identificá-las e monitorar sua evolução.

Algumas doenças neurodegenerativas apresentam manifestações fisiopatológicas na retina, como discutido nas próximas subseções.

FIGURA 12. Organização laminar da retina.

Ilustração esquemática das camadas que compõem a retina. Camada de células ganglionares (CCG), camada plexiforme interna (CPI) sinapse entre CCG e células amácrinas, bipolares e horizontais – células intermediárias. Camada Nuclear interna (CNI - núcleos das células intermediárias). Camada da plexiforme externa (CPE), Camada plexiforme nuclear (núcleos dos fotoreceptores), Camada de Fotoreceptores (CFR), Epitélio pigmentado (EP). Em destaque no retângulo pontilhado, a camada de fibras nervosas formada pelos axônios das células ganglionares. Esse feixe nervoso forma o nervo óptico. Adaptado de Bea et al.; 2006.



2.7.1 Esclerose Múltipla & Retina

A esclerose múltipla (EM) é uma grave e devastadora doença neurodegenerativa, de fundo autoimune, crônica, caracterizada pela destruição da camada de mielina no SNC, com componentes inflamatórios e degenerativos [111]. A EM normalmente afeta o caminho visual, via nervo óptico, sendo a inflamação desse - neurite óptica - o primeiro sintoma clínico em aproximadamente 20% dos pacientes [112]. Essa inflamação se traduz em visão turva e dor retro orbital. Acredita-se que 30-70% dos pacientes com EM apresentem alguma deficiência visual no curso da doença e em função da neurite óptica [17], [112], [113]. Dentre várias anormalidades oculares que acontecem no

paciente com EM, temos a inflamação e disfunção da barreira hemato-retiniana, atrofia da retina a partir das CCG e perda axonal [114]. O OCT (*optical coherence tomograph*) é normalmente usado para imageamento da retina e quantificação das suas estruturas no diagnóstico por imagem de EM. Usando luz no infravermelho, o OCT é capaz de visualizar as camadas da retina, as CCG e seus axônios [113].

2.7.2 Doença de Parkinson & Retina

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada por uma degeneração crônica dos neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra mesencefálica, com consequente perda de função da via dopaminérgica nigroestriatal, determinando diminuição progressiva da neurotransmissão dopaminérgica para o corpo estriado, especialmente para o putâmen [115]. Desordem visual é um dos sintomas não motores na DP e pode ser identificada facilmente em estágio precoce da doença. Muitos estudos mostram que pacientes de Parkinson apresentam várias formas de deficiência visual, tais como dificuldade na discriminação de cores, baixa acuidade visual, imagem borrada, perda de visão, entre outras [116]. Possivelmente, esses sintomas são causados pela depleção de dopamina nas células da camada sináptica interna - células ganglionares e amácrinas (plexiforme interna) [117].

A dopamina é um neurotransmissor importante com papel relevante na regulação do cérebro, no desenvolvimento da retina, bem como na sinalização visual e no desenvolvimento refrativo [118]. Já foi demonstrado que a depleção de dopamina em células amácrinas compromete a sinalização via CG, o que pode resultar em disfunção visual no paciente com Parkinson [116]. A proteína α -sinucleína nativa (α -sin) é ubíqua no SNC e está presente em todas as camadas e células da retina, embora predominantemente nos segmentos externos dos fotorreceptores, nas células amácrinas e na camada plexiforme interna [119]. É uma proteína intracelular neuronal pré-sináptica, cujo agregados estão relacionados geneticamente e neuropatologicamente à DP. Agregados de α -sin exercem efeito tóxico, levando ao desbalanço da homeostase e morte neuronal. Esse evento tem efeitos nocivos também em células vizinhas [120].

O estreitamento da CCG que ocorre no paciente de Parkinson também é visualizado por OCT, bem como da camada interna de plexiforme e da camada nuclear interna. Angiografia e injeção intravital de sondas fluorescentes são outras técnicas também disponíveis para avaliação do tecido retiniano e identificação de α -sin em pacientes de Parkinson [119].

2.7.3 Doença de Alzheimer & Retina

Pacientes da doença de Alzheimer (DA) também apresentam manifestações oculares e isso vem sendo matéria de estudos há anos. A primeira evidência histopatológica de degeneração da retina em pacientes de DA foi reportada por Hinton *et al.* em 1986 [121]. Análise *post mortem* mostrou degeneração axonal generalizada do nervo óptico, bem como redução no número de CG, e comprometimento do diâmetro dessas células [121], [122]. Também foi observado CG com aparência vacuolada e "espumosa" do citoplasma, além de mitocôndrias e retículo endoplasmático inchados [123] e elevado número de astrócitos [124]. Na **QUADRO 1** está uma lista com algumas alterações histopatológicas descritas na retina relacionadas à DA. Sintomas visuais têm sido reportados desde 1987 [125] e aparecem em estágios iniciais da doença [126]. A lista de sintomas não é pequena e incluem dificuldades para ler e encontrar objetos, na percepção de profundidade, na percepção da estrutura do movimento, no reconhecimento de cores e o comprometimento da sensibilidade ao contraste espacial [16]. Todavia, inicialmente se imaginou que os sintomas visuais relacionados à DA devia-se aos danos no córtex [127]–[130]. Entretanto, para além do comprometimento do cérebro (principalmente hipocampo e córtex), a DA tem suas manifestações bioquímicas de forma muito intensa nas células da retina [130].

Conforme já apresentado acima, as placas amiloide e emaranhados neurofibrilares de Tau cumprem um papel (ainda não totalmente claro) na DA, e essas alterações histopatológicas estão vastamente documentadas na retina. A deposição de β A na retina antecede a degeneração neuronal do tecido, causa infiltrado inflamatório com elevada presença de micróglia ativas, apoptose em

camundongos e comprometimento da fisiologia do tecido [131]–[133]. Emaranhados neurofibrilares já foram observados em retinas de camundongos transgênicos para Alzheimer [132] e em pacientes da DA [133]. Estudos em modelos animais mostraram apoptose de CG acompanhada e colocalizada com depósitos de A β em retinas de modelos de roedores de DA, enquanto a redução dos níveis de A β por imunização levou à preservação estrutural do epitélio pigmentado e a proteção visual em um modelo murino de DA e degeneração macular relacionada à idade (DMRI), sugerindo que A β causa neurodegeneração nesses modelos [134]–[136]. Haan *et al.* demonstraram, por imunomarcção em retina humana (*post mortem*), a predominância de placas amiloides, com dimensões de 5 – 20 μ m, nas camadas de células ganglionares e na camada plexiforme interna, confirmando o trabalho de Koronyo *et al.* 2017 [23], [24]. Mesmo trabalho mostrou imunomarcção de hTau com prevalência na camada da plexiforme interna e externa [24].

QUADRO 1. Alterações histopatológicas na retina relacionadas à DA

Alterações na Retina em DA	Descrição	Refs.
Alterações na CCG	Degeneração e perda significativa dessas células	[121], [123], [124]
βA depósitos na camada de CCG	Associação com apoptose e perda de CCG.	[135], [137]
Alterações axonal na CCG	Redução significativa na camada de fibras nervosas da retina.	[138], [139]
Alterações no disco óptico	Aumento da escavação óptica , redução do volume e da área neuroretinal rim.	[138]
Alteração da vasculatura	Estreitamento de vasos sanguíneos e redução de fluxo sanguíneo na retina.	[139], [140]
Alterações no epitélio pigmentado da retina	Aumento de APP.	[141]

2.7.4 Propostas de Diagnóstico de Alzheimer via Retina

A área da imagem ocular tem considerável dinamismo no desenvolvimento de métodos para acessar a retina devido à natureza transparente do olho, o que permite uma avaliação óptica fácil. Os avanços recentes na imagem ocular oferecem uma grande oportunidade para tecnologias de ponta para explorar biomarcadores de demência na retina.

Pioneiramente, em 1991 Tsai *et al.* usaram fotografias de alta resolução com luz azul e revelaram alterações no nervo óptico em pacientes com DA [140]. Nos anos seguintes, o OCT foi usado para explorar, também *in vivo*, mudanças e anormalidades estruturais na retina de pacientes da DA [142], [143]. O OCT foi certamente um dos mais importantes equipamentos de imageamento de retina desenvolvido nas últimas décadas, e tem uma excelente capacidade de revelar anormalidades estruturais na retina, na patologia macular, como o afinamento da camada de fibras nervosas da retina, quadro relacionado com DA, dentre outras patologias. Entretanto, a técnica não é capaz de identificar as estruturas histopatológicas específicas do Alzheimer, placas amiloides e tau hiperfosforilada, sem as quais, não há diagnóstico da doença. Em 2010, Koronyo-Hamaoui e colegas demonstraram, pela primeira vez, *in vivo*, a presença de placas amiloides coradas com curcumina em retina de camundongos transgênicos para Alzheimer [19]. No mesmo trabalho, foram demonstradas placas amiloide em retinas humanas (*ex vivo*), também coradas com curcumina. A curcumina é um corante fitopolifenol, natural e seguro para uso em humanos. Tal qual a thioflavina, ela também se liga às fibrilas amiloide e pode ser detectada por fluorescência [19]. Foi a primeira demonstração *in vivo* de uma proposta de diagnóstico intraocular para a DA. Os camundongos usados no trabalho carregam as duas mutações, APP e PS1. Esse modelo apresenta deposição de placas amiloides na retina aos 2.5 meses de idade, e no cérebro aos 5 meses.

Em 2015 foi feito o primeiro piloto de identificação (*in vivo*) de placas amiloides em humanos. Pacientes com síndrome de Down receberam curcumina oral e foram submetidos a exame de fundo de olho através de um oftalmoscópio

modificado [144]. Em 2017 o mesmo procedimento foi realizado, dessa vez com pacientes idosos com DA esporádico [23]. Iniciando assim a corrida em busca de um diagnóstico intraocular efetivo para a DA e comprovando, de forma inequívoca, que de fato em pacientes de DA a retina apresenta deposição de β A, e esta é detectável através de exame de imagem intraocular. Em 2020, Sidiqi et al. repetiu a identificação *in vivo* no mesmo modelo de camundongo, também com administração intravenosa de curcumina e com um oftalmoscópio à laser [145].

Todo tecido biológico apresenta autofluorescência natural e, quando exposto a uma fonte de luz, pode sofrer diferença no seu “tempo de vida”. O oftalmoscópio de tempo de vida de fluorescência (*fluorescence life-time imaging ophthalmoscope - FLIO*) é um método relativamente novo dentro do campo de imageamento de retina. É uma técnica não invasiva capaz de quantificar o tempo de vida da autofluorescência endógena do tecido retiniano [146]. Segundo demonstrou um trabalho de Jentsch *et al.*, o *FLIO* foi capaz de identificar alterações globais da autofluorescência retiniana em pacientes da DA [26]. Com todas as alterações estruturais que a retina de um paciente da DA apresenta, é crível que a constituição do tecido retiniano apresente diferenças no espectro de reflectância. Em um trabalho de 2015, retinas de camundongos com DA expostas a diferentes comprimentos de onda (400 nm – 1000 nm) foram diferenciadas do grupo controle através do aumento da dispersão de espalhamento *Rayleigh* [147]. Um ano depois, a mesma proposta foi realizada *in vivo* [148]. Em 2019, Hadoux et al. em experimento *in vivo*, tanto para camundongos transgênicos 5xFAD quanto em humanos, foi capaz de fazer a diferenciação dos grupos (AD e normal) a partir de uma análise do espectro de reflectância da retina [25].

Em resumo, sendo a retina um tecido neuronal, conectado ao sistema nervoso central, de fácil acesso visual e não invasivo, e que apresenta alterações histológicas e bioquímicas relacionadas à DA ainda na fase prodromal, mensuráveis por métodos ópticos, parece óbvio que ela se torne uma via de acesso para um diagnóstico precoce da doença. Todos esses estudos e resultados relatados

são esforços recentes, da última década, em busca de uma estratégia segura, simples e rápida para viabilizar este diagnóstico precoce.

2.8 Espectroscopia Raman (ER)

Quando uma amostra é excitada por um feixe de luz, diferentes fenômenos podem ocorrer com os fótons da luz de excitação, como a transmissão da luz através da amostra, a absorção da luz pela amostra, a fluorescência, o espalhamento elástico ou inelástico. O espalhamento elástico é denominado espalhamento Rayleigh, e o inelástico, espalhamento Raman (**FIGURA 13**) [149]. O espalhamento inelástico da luz foi identificado pela primeira vez pelo físico Chandrasekhara Venkata Raman em 1928, e lhe rendeu o Nobel em 1930, além de o fenômeno ter sido batizado com seu nome [150]. Por “espalhamento inelástico” entende-se que a frequência da luz incidente é modificada, gerando feixes de luz de diferentes valores de energia do feixe incidente. Os deslocamentos em frequências produzidos são específicos para cada estrutura físico-química [151]. Em função da natureza do fenômeno, a espectroscopia Raman (ER) permite a identificação química e estrutural de uma determinada molécula por meio da análise de seu espectro de energias. Entretanto, o espalhamento Raman é cerca de um milhão de vezes menos intenso que o espalhamento Rayleigh [152], portanto, para obter espectros Raman, é necessário evitar que o espalhamento elástico e outros fenômenos ópticos mais intensos dominem o sinal óptico.

2.8.1 Espalhamento Raman Espontâneo

O fenômeno de espalhamento inelástico é um processo espontâneo causado por um modo de vibração molecular que resulta em duas frequências, uma com ganho de energia, denominada espalhamento Stokes, e outra com perda de energia, denominada espalhamento anti-Stokes. O espalhamento Raman Stokes é mais intenso que o anti-Stokes, diferença esta que depende da energia da vibração molecular e da temperatura da amostra. Como já comentado acima, comparado ao espalhamento Rayleigh (**FIGURA 14**), a dispersão espontânea Raman é um processo fraco, sendo aproximadamente 1 fóton espalhado para 10^7 - 10^8 fótons incidentes, valor este que pode variar de material para material [149].

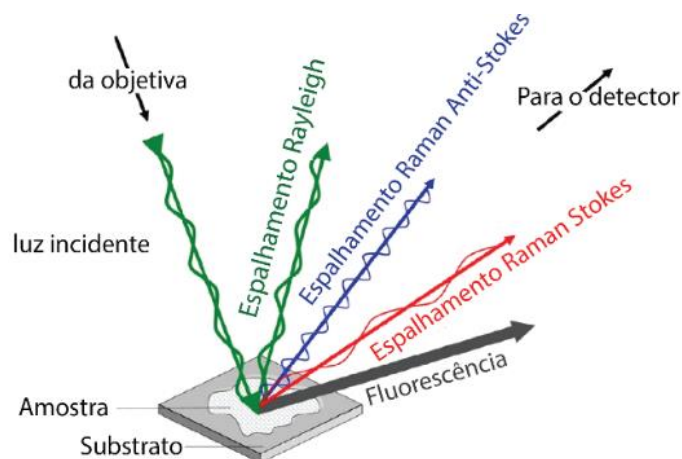


FIGURA 13. Esquema ilustrativo sobre espalhamento da luz

Esquema de identificação do espalhamento da luz após a interação do laser com a superfície da amostra. Fótons (pacotes de energia luminosa) são focalizados na amostra através da objetiva do microscópio. Quando os fótons interagem com a amostra biológica, os elétrons do material são excitados para outros níveis de energia. Se essas moléculas biológicas retornam ao nível de energia original emitindo fótons de mesma energia, temos o espalhamento elástico ou Rayleigh. Se os elétrons excitados sofrem uma mudança de energia e retornam em níveis vibracionais moleculares diferentes, de energias mais baixas (Stokes) ou mais altas (anti-Stokes), temos o espalhamento inelástico ou Raman. O espalhamento Raman é um processo de baixa probabilidade, com cerca de 1 em 10^7 - 10^8 fótons dispersos inelasticamente (as larguras das setas não são representativas); O espalhamento Raman Stokes é mais intenso que o anti-Stokes, devido à maior probabilidade de uma molécula estar originalmente no estado vibracional fundamental. A fluorescência pode ocorrer quando os elétrons excitados para os níveis de energia eletrônica mais altas decaem para o nível chamado LUMO (lowest unoccupied molecular orbital), retornando então ao nível de energia fundamental e emitindo um fóton de luz com energia equivalente ao gap eletrônico. Adaptada de Butler et al. Nature Protocols, 2016.

2.8.2 Espalhamento Raman Estimulado

Diferentemente do espalhamento Raman espontâneo, o espalhamento Raman estimulado usa duas fontes de laser incidentes sobre a amostra, no nosso caso o CARS e o SRS. Um feixe de laser denominado laser de bombeio, ou *pump* (ω_p) provoca o fenômeno espontâneo, enquanto um segundo feixe de laser denominado Stokes (ω_s) estimula a resposta anti-Stokes da amostra. Quando o *pump* (ω_p) e o Stokes (ω_s) incidem na amostra, e a diferença entre suas energias corresponde a uma frequência vibracional molecular específica, a produção do efeito Raman

anti-Stokes torna-se estimulada (**FIGURA 14**). O espalhamento Raman estimulado pode ser ordens de magnitude mais intenso que o Raman espontâneo [153].

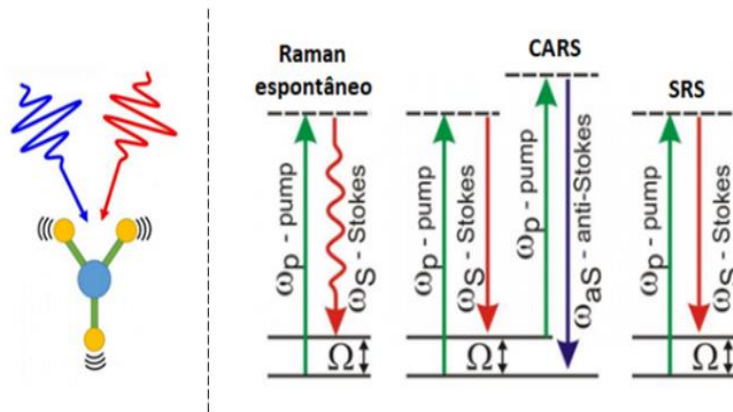


FIGURA 14. Ilustração do fenômeno Raman

Ilustração do processo em que dois feixes incidentes (à esquerda) ativam modos de vibração de uma molécula. Este processo pode se dar de diversas maneiras, entre elas o espalhamento Raman espontâneo (aqui um dos feixes não tem função) e suas variações estimuladas, como CARS (Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy) e SRS (Stimulated Raman Spectroscopy). O diagrama de transição da direita mostra a transição eletrônica do espalhamento Raman espontâneo Stokes, onde um feixe gera a excitação eletrônica e, espontaneamente, o material perde esta energia para os modos vibracionais do material e decai emitindo um fóton. O diagrama do meio mostra as transições eletrônicas do CARS, onde são incididos dois feixes e a diferença de energia entre o ω_p (pump) e o ω_S (Stokes) é igual à energia do modo de vibração do material, amplificando o sinal ω_{AS} (anti-Stokes); No diagrama de transição eletrônica mais à direita, do SRS, são incididos dois lasers que têm a diferença de energia igual à energia de um modo de vibração do material, sofrendo uma modulação de intensidade por esse modo de vibração. Adaptado de Politécnico Milano.

Disponível em [HTTPS://WWW.FISI.POLIMI.IT/EN/TEACHING/STUDENTS/THESIS_AVAILABLE/54196](https://www.fisi.polimi.it/en/teaching/students/thesis_available/54196).

2.8.3 Espectro Raman & Biologia

O tecido biológico é composto por uma infinidade de substâncias e moléculas. Essas, ao interagirem com uma fonte de luz, dão origem a um espectro que pode ser decomposto em seus modos vibracionais, para que essas substâncias sejam identificadas [154], [155]. Na ER, o resultado é apresentado em um gráfico de intensidade sobre energia (usualmente medida em unidades de cm^{-1}), e cada pico representa um modo de vibração específico da molécula (**FIGURA 15**) [156]. A

técnica é promissora por sua seletividade, por ser não destrutiva e não invasiva, já que apenas um feixe de luz, com energia geralmente no visível, atinge o tecido [157]. Além disso, a ER dispensa processamento prévio do tecido (ou célula), como fixação em paraformaldeído, glutaraldeído, etc.

Existem diversos trabalhos demonstrando o uso de ER nas áreas biomédicas e biológicas. Como a caracterização *ex vivo* e *in vivo* de tumores de mama [158], de intestino [159], [160], de bexiga [161], do cérvix [162], do cérebro [163], [164] e de tantos outros [165].

A ER vem sendo amplamente usada na identificação de tecido tumoral. As células tumorais apresentam intensa atividade metabólica, promovem alteração na arquitetura extracelular circundante além de aumentarem a vascularização na região do tecido tumoral [158], [166]. Tudo isso forma um somatório espectral que torna capaz distinguir, com satisfatória precisão e resolução espacial, regiões com e sem células tumorais. Michael Jermyn et al., (2015) utilizaram uma sonda de fibra óptica acoplada à ER para identificar glioblastoma durante a operação de ressecção do tumor. Nesse trabalho os autores relatam uma precisão de 92%, sensibilidade de 93% e especificidade de 91% e afirmam que a sonda Raman foi capaz de detectar a presença de apenas 17 células cancerígenas humanas/0,0625 mm² [164].

A invenção da microscopia por Raman estimulado iniciou uma nova era nas aquisições de imagens biológicas. Com o desenvolvimento relativamente recente da microscopia por *CARS* (*Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*) [167], [168] e bem recentemente da microscopia por *SRS* (*stimulated Raman scattering*) [169], houve uma revolução na aquisição de imagem de células e tecidos sem necessidade de marcação, e com a mesma resolução de uma imagem de imunofluorescência [170], [171]. A partir disso, tornou-se possível adquirir imagens - livres de marcação - com velocidade de milissegundo em tecidos biológicos, fazendo uso de comprimento de onda no infravermelho. O infravermelho tem maior capacidade de penetração em tecidos biológicos e pode chegar até 3 cm, a depender do comprimento de onda e do tecido [172], [173], o

que torna a técnica extremamente promissora para estudos biológicos e aplicações biomédicas [174].

Os imageamentos espectroscópicos *CARS* e *SRS* possibilitam estudar a difusão de compostos químicos nos tecidos e células [31], [175]. observar o fluxo sanguíneo por microscopia intravital e não invasiva [176] e uma série de abordagens no estudo de biologia celular, biofísica, metabolismo, fisiologia e histologia, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* [176], [177]. O uso destas técnicas para diagnóstico histológico de câncer, sem necessidade de processamento de amostra, já está bastante avançado [33] e com propostas de equipamento para anatomia patológica já no mercado [5].

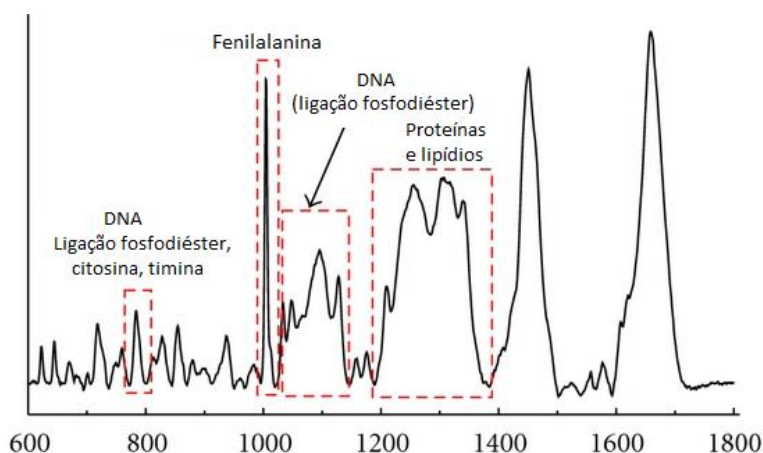


FIGURA 15. Espectro Raman de tecido tumoral de pulmão

O picos de frequências relacionados às vibrações moleculares de DNA, lipídios e proteínas estão indicados. Observe que o eixo x está no deslocamento Raman, que é definido em número de onda (cm^{-1}), o inverso do comprimento de onda em centímetros. Adaptado de Fenn et al.; *Advances in Optical Technologies*, 2011.

⁵ Disponível em: <[HTTPS://WWW.INVENIO-IMAGING.COM/TEAM](https://www.invenio-imaging.com/team)> DATA DE ACESSO: 15 DE MAIO.

2.8.4 Raman & Alzheimer

Existe um grande esforço por parte dos biofísicos e bioquímicos para entender a cinética de agregação e o polimorfismo estrutural da β A, principalmente suas fibrilas, que são a estrutura mais estável e abundante na marca histopatológica da doença – as placas amiloides.

Os peptídeos e proteínas tem vários modos vibracionais representativos de suas estruturas secundárias, os principais são Amida A (AmA) Amida I (AmI), Amida II (AmII) e Amida III (AmIII) [178] (**FIGURA 16**). Todos esses modos de vibração estão relacionados às ligações da cadeia principal dos aminoácidos, cuja sensibilidade ao padrão de ligação do hidrogênio, a interação dipolo-dipolo e a geometria do esqueleto peptídico fornecem indicadores úteis de alterações estruturais secundárias [179][180]. A vibração de AmA é devido ao estiramento de N – H, é intensa em espectroscopia por Infravermelho mas pouco intensa em ER, assim como AmII [40], [181]. AmI é devido, principalmente, ao estiramento do grupo carbonila (C=O), com a contribuição da vibração de N – H [179], [182]. Os modos vibracionais AmII e AmIII são relacionados ao dobramento de N–H acoplado com o estiramento de C–N [183], [184] (**FIGURA 16**).

As fibrilas de β A são compostas de peptídeos que têm uma conhecida conformação bioquímica folha-beta ($f\text{-}\beta$) (ver **FIGURA 8**), e essa conformação apresenta energia de vibração em torno de 1670 cm^{-1} . Diferentemente da estrutura alfa hélice ($\alpha\text{-h}$) que apresenta uma energia de vibração de 1660 cm^{-1} e pode ser identificada e diferenciada por ER (BANDEKAR, 1992; FONSECA et al., 2019; HAYASHI; MUKAMEL, 2007).

Em 2003, Dong et al. usaram a ER para identificar placas amiloides extraídas e purificadas de córtex humano [186]. Foi um trabalho seminal do uso da ER no estudo da DA, porém com algumas limitações e falhas metodológicas. Chen et al. (2009) tentaram identificar placas amiloides em ratos inoculados com peptídeo β A₄₂ [187]. Também com limitações metodológicas, o trabalho foi um passo adiante no uso da ER para estudo da DA. Em 2017 um trabalho apresentou uma análise mais robusta de placas amiloide em fatia de córtex e hipocampo de

paciente da DA através de imagem Raman por varredura de hiperespectro [188]. Curiosamente, os pesquisadores não foram capazes de identificar a placas amiloide segundo a vibração de AmI. Ainda em 2017, outro grupo usou varredura de hiperespectro para caracterização de fatias de cérebro de camundongos transgênicos para a DA [189]. Também nesse trabalho, o grupo não apresentou imagem de ER de placa amiloide.

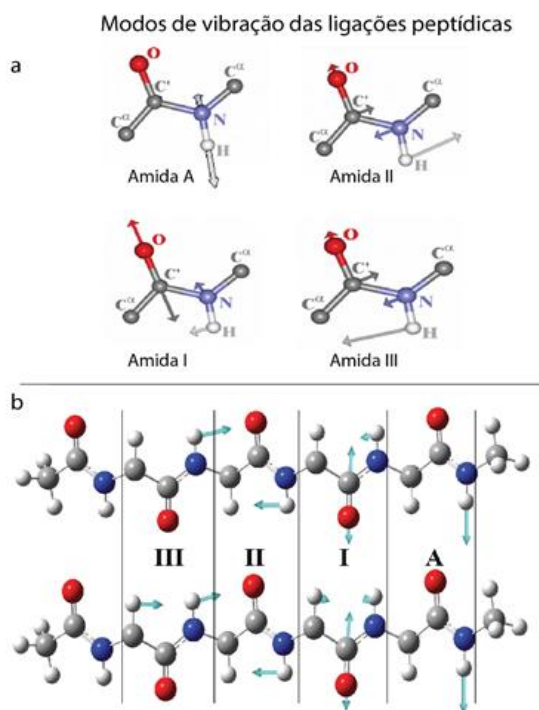


FIGURA 16. Modos de vibração de ligação peptídicas

Modos de amida A, amida I, amida II e amida III ilustrados nos esqueletos carbônicos de aminoácidos. (b) Mostrando esses mesmos modos em uma cadeia polipeptídica. Oxigênio, vermelho; Carbono, cinza; Nitrogênio, azul; Hidrogênio, branco; Adaptado de Seungsoo Hahn, *J. Chem. Phys.*, 2016 e <https://kb.osu.edu/handle/1811/30971>

Apenas em 2018, no trabalho de Palombo et al. (2018) que placas amiloide foram identificadas de forma inequívoca por ER, em corte de cérebro de camundongos transgênicos, também usando varredura de Raman [40] (**FIGURA**

17). No mesmo ano, Xie *et al.*, (2018) fizeram a primeira imagem de SRS de placa amiloide em tecido de camundongos transgênicos [39] (FIGURA 17). E, em 2019, nosso grupo fez uma caracterização Raman de placas amiloides em tecido de camundongo transgênico para a DA elucidando suas assinaturas espectrais de forma mais completa, demonstrando as vibrações ideais para identificação de placas de β A por ER (FONSECA *et al.*, 2019).

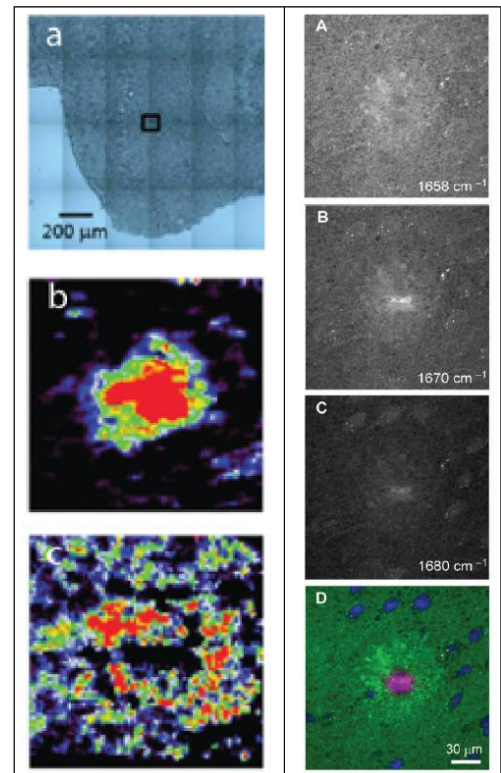


FIGURA 17. Imagens de placas amiloides por ER

Na coluna à esquerda temos as imagens de placa amiloide por Raman espontâneo. (a) imagem óptica do corte de cérebro de camundongo, (b) imagem hiperespectral da região com placa amiloide em função da vibração AmI. (c) entorno da placa mostrando vibração de lipídio. Adaptado de Palombo *et al. Analyst*, 2018. Nas imagens à direita, placa amiloide identificada por Raman estimulado – SRS. Adaptado de Xie *et al. Nat. Commun.*, 2018

2.8.5 Raman & Alzheimer & Retina

Toda essa evolução recente no uso de ER para estudo da DA coincide com a proposta de uso de exame intraocular para o diagnóstico precoce da doença.

O uso de Raman aplicado à oftalmologia não é recente [190]. Yu e East (1975) analisaram proteína de lente bovina por Raman [191]. Em 1978 a ER foi usada para analisar colágeno de córneas intactas de felinos [192]. O ER tem sido

muito útil na caracterização do tecido ocular [193]–[195]. Yu et al. (1982) realizaram a primeira espectroscopia Raman intraocular *in vivo* em coelhos [196], e Ermakov et al. (2001) em humanos [197], seguido por outro grupo [198]. Outros estudos realizaram Raman intraocular em humanos vivos [199]–[201]. Evans et al. (2009) usaram microscópio OCT para imagens de retina *ex-vivo* combinadas com espectroscopia Raman [202]. Em 2013, foi usada microscopia CARS para imagens *ex vivo* de retina [203] e córnea [204]. E em 2015, foi feita a primeira imagem de retina de ratos (*ex vivo*) por SRS [205].

Coincidentemente, o primeiro trabalho com ER intraocular foi feito por Bernstein et al. (1998), 3 anos depois de Loffler ter identificado, pela primeira vez, placas amiloide em retinas humanas (*post mortem*) [206]. Neste trabalho, Bernstein visava avaliar a distribuição de luteína e zeaxantina, dois carotenoides presentes na retina e cuja a diminuição é observada em pacientes com degeneração macular [206]. Não demorou muito e, em 2001, 2002 e 2004, foram publicados trabalhos de ER intraocular, também identificando carotenoide na retina em humano *in vivo* [197], [200], [207]. Hogg et al. (2007) publicaram o último trabalho da literatura sobre ER intraocular, também para detecção e carotenoides [201]. Todos estes fatos nos colocam em um momento ideal para introduzir o modelo de diagnóstico precoce de Alzheimer fundamentado na espectroscopia Raman, como será apresentado nesta tese.

3 - METODOLOGIA

A tese aqui apresentada contempla uma atividade de um projeto maior que conta com 4 atividades, sendo elas: (i) Experimento *in vitro* e *ex vivo*; (ii) Experimento *in vivo*; (iii) Desenvolvimento de protótipo do OVL; (iv) Estudo de mercado/plano de negócio. Dessa forma, neste capítulo serão detalhados os procedimentos técnicos relativos à atividade (i), que pode ser dividida em 2 partes:

1ª PARTE – Caracterizações *in vitro* de fibrilas amiloides sintéticas - Uso de Raman espontâneo.

2ª PARTE - Caracterização de *ex vivo* de placa amiloide – Uso de Raman espontâneo e Estimulado.

3.1 - 1ª PARTE – Caracterização de fibrilas β A *in vitro*

3.1.1 Montagem Experimental

Com a intenção de separar o que é comum a todos os efeitos e o que é particular ao SRS e ao CARS, é conveniente dividir a montagem em duas etapas: uma de preparação dos feixes, em que quase todos os elementos estão presentes na implementação de qualquer um dos efeitos, e uma de detecção, em que os elementos são específicos para o SRS (**Figura 18**).

As medidas de Raman espontâneo das fibrilas assim como de tecidos foram feitas em um microscópio comercial WITec Alpha 300 Series do Laboratório Institucional de Pesquisa (LIPq) de Caracterização e de Processamento de Nanomateriais – LCPNano, no departamento de Física – ICEX (Instituto de Ciências Exatas).

As medidas de Raman estimulado – SRS e CARS - e as imagens de fluorescência por dois fótons foram feitas no laboratório de NanoEspectroscopia – LabNS (Dep. de Física – ICEX) em uma montagem laboratorial com um microscópio invertido Nikon e laser pulsado de pico segundos (APE picoemerald).

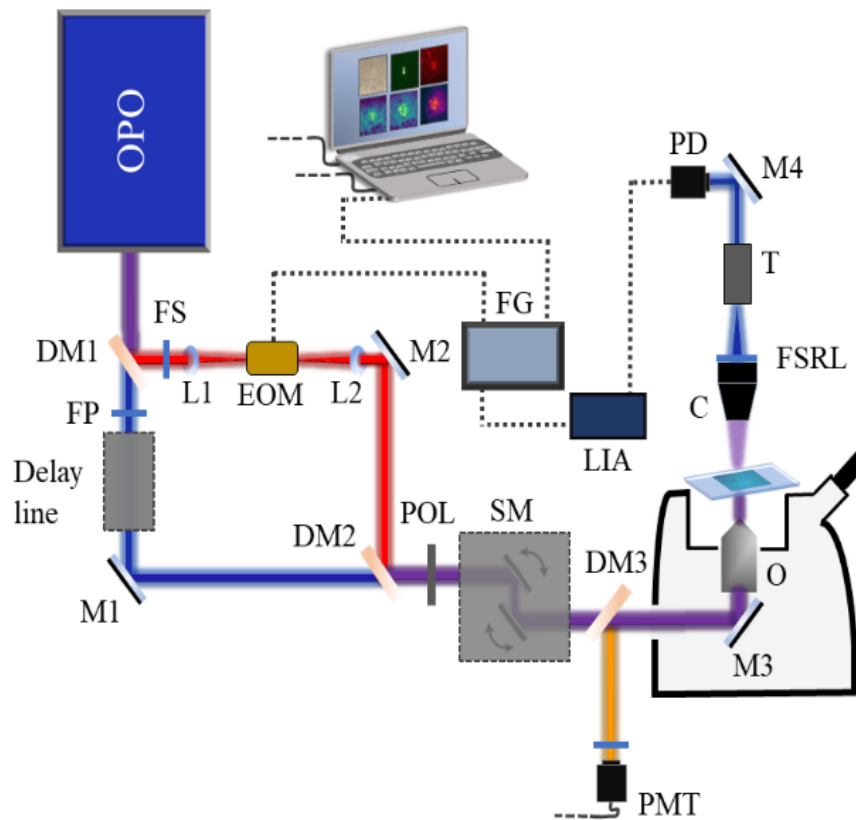


Figura 18. Montagem Experimental

1.Luz pulsada com cavidade OPO operando com um comprimento de onda fixo (1064 nm) e um sintonizável (pump, de menor comprimento de onda), ambos horizontalmente polarizados; 2.Espelho dicróico shortpass de 1000 nm; 3.Filtro longpass de 1020 nm; 4.Lente plano-convexa de distância focal 100 mm e com revestimento para infravermelho; 5.Modulador eletroóptico ressonante em 10 MHz; 6 - Lente plano-convexa de distância focal 100 mm e com revestimento para infravermelho; 7.Espelho plano de prata; 8.Filtro shortpass de 1010 nm; 9.Plataforma composta: linha de atraso com 4 espelhos planos de prata; 10.Espelho plano de prata; 11.Espelho dicróico shortpass de 1000 nm; 12.Polarizador radial; 13.Sistema de varredura; 14.Espelho dicróico longpass; 15.Microscópio invertido; 16.Espelho plano de prata; 17.Objetiva; 18.Amostra; 19.Condensador; 20.Filtro passa-banda de 830/310 nm; 21.Telescópio; 22.Espelho plano de prata; 23.Fotodiodo; 24.Amplificador lock-in sincronizado em 10 MHz 25 - Gerador de função com onda de 10MHz; 26.Item removível: conjunto de filtros para CARS; 27.Fotomultiplicadora

3.1.2 Caracterização de aminoácidos por ER - in vitro

A fim de conhecermos os espectros dos aminoácidos (a.a.) que compõem as β A, e adquirir conhecimento sobre ER de biomoléculas, nosso grupo caracterizou o espectro Raman de todos os 20 L-a.a (Sigma). Embora a literatura sobre espectroscopia de a.a. seja vasta, há pouca publicação com boa resolução espectral de todos os a.a. em solução [208]. Além disso, não foi encontrado nenhum trabalho que tenha categorizado para todos os a.a., as frequências abaixo de 200 cm^{-1} . Fizemos então uma caracterização para todos os a.a. em solução e em pó, e também para as amostras em pó, em frequência abaixo de 200 cm^{-1} . Foi também caracterizado um dipeptídeo glicina-glicina para compreendermos as alterações do espectro do a.a. após uma ligação peptídica.

3.1.2.1 Micro-Raman

A caracterização de ER dos a.a. em pó foi feita por micro-Raman, colocando uma pequena amostra sobre lamínula, e adquirindo espectro no intervalo de frequência de $40\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$. O equipamento usado foi um microscópio Raman Horiba, laser 532, 15 mW e objetiva de 40x, abertura numérica 0.80, aquisição de 60 segundos.

3.1.2.2 Macro-Raman

Para os a.a. em solução aquosa, as amostras foram solubilizadas em água ultrapura (Millipore-Q, $18\text{ M}\Omega$). Já para os a.a. insolúveis ou com pouca solubilidade em água, foi usada solução de HCl 0,5 a 1M (**QUADRO 2**). As amostras foram homogeneizadas com o uso de pipeta e sob sonicação. Após completa solubilização, foram colocados $500\text{ }\mu\text{l}$ de cada amostra em cubeta de quartzo e analisados em sistema de macro-Raman. O sistema de macro-Raman é composto por um laser de íons de Argônio Innova 70C da Coherent de 5 watts de potência no modo multilinha. No caminho óptico até o porta amostra (A), cubeta de quartzo de 1cm montada em um translador xyz, foi inserido um filtro de interferência em 514.5 nm para eliminar as linhas de plasma do laser. A luz espalhada foi guiada por duas lentes biconvexa de foco de 200 mm e diâmetro de 50 mm . Um filtro *notch* ($514,5\text{ nm}$) foi inserido antes da entrada do monocromador (IHR550 – Horiba) para cortar o espalhamento Rayleigh, o que nos permite fazer medidas do deslocamento Raman acima de 200 cm^{-1} . O sinal de espalhamento de luz foi

detectado por uma câmara CCD e analisado por um microcomputador que também controla o sistema. A potência nominal usada foi de 400 mW. O tempo de aquisição foi de 5 minutos.

QUADRO 1. Preparo da solução dos aminoácidos

<i>a.a. solúveis em água</i>	<i>g/500 µL</i>	<i>a.a. solúveis em água de HCl 0,5M</i>	<i>g/500 µL</i>
Alanina – Ala	0.08	Triptofano - Trp	0.025
Arginina – Arg	0.075	Ácido Aspártico - Asp	0.025
Glicina – Gli	0.125	Valina – Val	0.025
Lisina – Lis	0.05	Histidina – His	0.025
Serina - Ser	0.025	Glutamato – Glu	0.025
Cisteína - Cis	0.05	Isoleucina – Ile	0.025
Treonina - Tre	0.05	Glutamina – Gln	0.025
Prolina - Pro	0.05	Leucina – Leu	0.05
Fenilalanina - Fen	0.025	Asparagina- Asn	0.05
		Metionina – Met	0.025
		Tirosina – Tir	0.025

Tanto as medidas de macro-Raman quanto de micro-Raman foram feitas no laboratório do Grupo de Espectroscopia de Materiais (GEM) do departamento de Física da Universidade Federal de Uberlândia, em colaboração com a professora Raigna Armond e seu aluno de doutorado, Fernando Costa Basílio. A aquisição de espectro em frequências abaixo de 40 cm^{-1} usando micro-Raman com comprimento de onda 633 nm, 8 mW - tempo de aquisição de 2 minutos - no laboratório de Nanoespectroscopia (LabNS).

3.1.3 Caracterização e Identificação do Espectro Raman do peptídeo βA - in vitro

H₂N-Asp¹-Ala²-His⁶-Asp⁷-Ser⁸-Gli⁹-Tir¹⁰-Glu¹¹-Val¹²-His¹³-His¹⁴-Gln¹⁵-
Lis¹⁶-Leu¹⁷-Val¹⁸-Fen¹⁹-Fen²⁰-Ala²¹-Glu²²-Asp²³-Val²⁴-Gli²⁵-Ser²⁶-Asn²⁷-
Lis²⁸-Gli²⁹-Ala³⁰-Ile³¹-Ile³²-Gli³³-Leu³⁴-Met³⁵-Val³⁶-Ii³⁷-Gli³⁸-Val³⁹-Val⁴⁰-
Ile⁴¹-Ala⁴²-COOH.

Inicialmente, fizemos a caracterização de fibrilas βA_{42} sintéticas de sequência:

O peptídeo comercial βA_{1-42} (Geneone) foi utilizado para formação de fibrilas, e então submetido à espectroscopia Raman para identificação e caracterização dos modos de vibração. A comprovação de formação de fibrilas foi feita usando a microscopia eletrônica.

3.1.3.1 Formação de fibrilas amiloides

Foi usado um protocolo adaptado de Mahiuddin Ahmed (2010) [60]. Resumidamente, peptídeos βA foram monomerizados com HFIP (1,1,1,3,3,3 - hexafluoro-2-propanol), após secagem *overnight*, o filme de peptídeo foi dissolvido em pequeno volume de NaOH, ~10 μ L, 100 mM e diluído em água deionizada, para concentração de 100 mM. O pH foi ajustado para 7,4 e as amostras foram incubadas a 37°C por 48h. Após esse período, alíquotas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de força atômica (AFM), outras alíquotas das mesmas amostras foram submetidas à análise por espectroscopia Raman.

3.1.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

5 μ L de amostras foram depositadas em grade de malha de carbono revestida com cobre e deixadas por 2 minutos para adesão, e em seguida tratadas com acetato de uranila a 2% (p/v) por 30 segundos. O excesso de acetato foi lavado com 5 μ L de água ultrapura (Millipore-Q, 18 M Ω). As amostras foram deixadas para secar em capela de fluxo laminar. Usamos dois microscópios eletrônicos para caracterização das fibrilas, o microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai 120kV do Centro de Microscopia da UFMG e o microscópio eletrônico de transmissão Titan, FEI, disponível na Divisão de Metrologia de Materiais (Dimat) do Instituto Nacional

de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro). As caracterizações feitas no Inmetro foram realizadas pelo aluno de Iniciação Científica Helton Gonçalves de Medeiros, que passou um período do seu estágio no Laboratório de Nanoespectroscopia – UFMG.

3.1.3.3 Microscopia de Força Atômica - AFM

Sobre lamínula lavada com acetona e isopropanol 1,5 µL da mesma amostra de fibrilas foi depositada e secada com N₂. As imagens foram adquiridas no microscópio de força atômica NanoWizard BioScience da JPK Instruments, disponível na Dimat do Inmetro. A ponteira utilizada é da fabricante Bruker, possui aproximadamente 10 nm de raio e é constituída por Silício. Foram feitas varreduras de 1µm x 1µm e as imagens geradas com 512 x 512 pixels pelo modo de contato intermitente (*tapping mode*). As imagens obtidas foram tratadas pelo Software Gwyddion.

3.1.3.4 Espectroscopia Raman de fibrilas amiloides

Lamínulas foram lavadas com acetona, isopronol e água deionizada, nessa ordem, sob sonicação por 10 minutos. Sobre essas lamínulas foram depositados 5 µL de amostra de fibrilas. As análises foram feitas no microscópio comercial confocal WITec Alpha 300 Series utilizando lasers de comprimentos de onda 467, 532 e 633 nm, potência 5 mW, grade de difração de 800 nm (resolução ~1,86 cm⁻¹), objetiva 50x a ar, abertura numérica 0.55.

3.2 - 2ª PARTE - Caracterização de Placa Amiloide *ex vivo*

3.2.1 Estabelecimento do Modelo Animal

Esse trabalho usou camundongos bitransgênicos da linhagem APP_{swe}PS1_{ΔE9} adquiridos na Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME. USA). Esse modelo APP/PS1 é duplamente transgênico que expressa uma proteína precursora de amiloide quimérica - humana/camundongo - (Mo/HuAPP695swe) e a presenilina 1 humana mutante (PS1-deltaE9), ambas direcionadas aos neurônios do SNC. Essas duas mutações estão associadas à doença de Alzheimer de início precoce. Esse modelo foi desenvolvido pela inserção dos transgenes (HuAPP695swe e PS1-deltaE9) no cromossomo 9 de camundongos híbridos C3H/ x C57BL/6 sob o promotor de

prion. O transgene Mo/HuAPP695swe "humanizado" promove aumento de secreção do peptídeo β A humano. A mutação suecas (swe) apresenta substituição na sequência de resíduos de aminoácidos (K595N / M596L) encontradas em humanos. Essa substituição eleva a quantidade de β A produzida a partir do transgene, favorecendo o processamento através da via da β -secretase. O outro transgene carrega a deleção do exon 9 da presenilina 1 humana (PS1-deltaE9). Essa linhagem APP_{swe}PS1 Δ E9 apresenta deposição de placas de β A na retina a partir de dois meses e meio, e no cérebro a partir do 5º mês [19], [209]. A colônia foi estabelecida no biotério de experimentação da faculdade de Medicina da UFMG através de cruzamento *backcrossing* entre o híbrido bitransgênico de *background* CH3/C57 macho, com fêmeas C57 BL/6 do Biotério Central da UFMG. O cruzamento foi feito por 8 gerações (N), em seguida, os cruzamentos passaram a ser isogênicos entre irmãos, sempre com macho Transgênico (Tg) e fêmea *Wild type* (Wt – de agora em diante referido como controle – Ctrl).

3.2.2 Preparo de Amostra

Cortes histológicos de cérebro , além de retinas dissecadas inteiras, foram usadas para caracterização e identificação da assinatura Raman das placas amiloide do tecido. Animais com 6 e 12 meses de idade foram anestesiados com cetamina 80 mg e xilazina 15 mg /kg via IP, perfundidos com PBS (*phosphate buffered saline*), seguido de fixação em paraformaldeído (PFA) 4%. A seguir, os globos oculares (G.O.) e cérebros foram removidos e incubados overnight em PFA 4% a 8°C. As retinas foram então enucleadas e os cérebros fatiados em criostato (30 e 40 μ m) para varreduras de hiperespectro. Animais não perfundidos também foram usados. Para se manter o corte hidratado por todo o período do experimento, lançamos mão da seguinte estratégia:

- a. Todo tecido a ser analisado foi depositado em lamínula de 24 mm x 60 mm;
- b. O excesso de PFA foi retirado com micropipeta, deixando líquido suficiente apenas para manter o tecido hidratado;
- c. Foi feito um anel de ~10 mm com graxa de silicone ao redor do tecido, deixando-o circundado por esse anel.

d. Uma lamínula de 22 mm x 22 mm foi então depositada sobre o tecido e o anel de graxa de silicone, de modo a manter o tecido selado e impedindo vazamento do líquido (PFA) e sua evaporação.

3.2.3 Microscopia de excitação por dois fótons para identificação de placas amiloides ex vivo

Para realizar a varredura nos tecidos, foi preciso identificar as placas previamente. As placas foram visualizadas pela autofluorescência através da técnica de excitação por dois fótons (EDF). Foi usado microscópio confocal Nikon invertido, laser de picosegundo pulsado (APE picoemerald) com comprimento de onda sincronizado no infravermelho, 830 nm, e objetiva de 10x e 20x, abertura numérica 0.45 e 0.75, respectivamente. A potência variou entre 200 e 300 mW e o tempo de aquisição, entre 5 e 10 segundos. Após aquisição, as imagens foram tratadas no software *ImageJ* e levadas ao microscópio Raman WITec para, só então, realizarmos as varreduras hiperespectrais. Concluídas as varreduras, as amostras foram coradas com marcador específico de placas amiloides e submetidas a EDF para confirmação.

3.2.4 Caracterização e Identificação de placa amiloide ex vivo por Raman Espontâneo

As varreduras Raman de hiperespectros foram feitas no microscópio WITec Alpha 300 Series usando a linha de laser 532 nm, potência 20 mW, grade de difração de 600 nm (resolução $\sim 1,86 \text{ cm}^{-1}$), objetiva 50x, abertura numérica 0.55, e objetiva 60x de imersão em óleo, abertura numérica 1.40. A aquisição do espectro variou entre 0,1 e 1 segundo.

Após análise Raman, os cortes foram marcados com Thioflavina S (ThioS) para identificação das placas amiloide e validação dos resultados obtidos por espectroscopia.

Os tecidos foram mantidos sob solução de PBS durante toda a aquisição de hiperespectro.

3.2.5 Marcação de placa amiloide

Foi usado o protocolo de ThioS para marcação de placa amiloide no tecido. Foi diluído ThioS 1% (p/v) em álcool 70%. As amostras de tecido foram incubadas por 5 minutos, depois lavadas rapidamente em álcool 50%, duas vezes, seguido de lavagem em PBS. As amostras foram colocadas entre uma lâmina e uma lamínula e mantidas hidratadas para aquisição de imagem de fluorescência por EDF.

3.2.6 Microscopia CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) e SRS (Stimulated Raman Scattering)

Retinas inteiras e fatias de cérebro montadas sobre lâminas foram submetidas a microscopia CARS/SRS para aquisição de imagens. Imagens CARS/SRS foram feitas com laser (APE picoemerald) pulsado de 7 picosegundos, emitindo dois feixes sincronizados, um fixo em 1064 nm, que atua como o que chamamos de laser Stokes, e o laser de bombeamento foi sintonizado em várias frequências, 811 nm (estiramento CH₃ de proteína e lipídio), 814 nm (estiramento CH₂ de proteína e lipídio), 816 nm (estiramento CH₂ de lipídio), 903 (vibração Amida I – estiramento C = O), 961 nm (vibração do anel aromático da fenilalanina).

Como este não é um sistema comercial, mas montado em laboratório, cabe aqui uma pequena descrição de sua geometria: o feixe sai do laser, passa por espelhos galvanométricos de varredura, entra no microscópio óptico através de um espelho de prata, passa por um dicroico, que transmite acima de 780 nm, e é conduzido à objetiva (Nikon 20x, abertura numérica 0.75, 60x de imersão em óleo, abertura numérica 1.40 e 100x de imersão em óleo, abertura numérica 1.49), que deve ser apocromática para que os feixes de comprimento de onda diferentes sejam focados no mesmo lugar. O feixe emitido pela amostra é retro-espalhado, colimado pela mesma objetiva

Para remover sinal de autofluorescência da amostra é utilizado um filtro passa banda (*band pass*) de 661/11 nm da Semrock.

3.2.7 Análise de dados

3.2.7.1 *Spectral Unmixer*

Foi usado o algoritmo N_FINDR que decompõem a coleção de espectros constituintes em membros finais (*end members - EMs*), bem como suas frações correspondentes (abundâncias) que indicam a proporção de cada membro final no pixel [210], [211].

3.2.7.2 *WITec Project 5.0*

Foi usado o software *WITec Project 5.0* para imageamento hiperespectral, através de pós-processamento com filtragem de frequências, com subtração de *background*

3.2.7.3 *OriginPro 9*

Os gráficos de espectros Raman foram tratados usando o software OriginPro 9.

3.2.7.4 *ImageJ*

Todas as imagens de Raman estimulado e de fluorescência foram editadas no software *ImageJ*.

3.2.7.5 *Análise de Componentes Principais (PCA)*

O método mais usado para análise de espectro Raman é o *PCA* (*PCA*, do inglês “Principal Component Analysis”) [212]. Nesse trabalho, o *PCA* foi executado por integrantes do grupo, sob supervisão do autor desta tese.

Para análise de componentes principais dos hiperespectros Raman das amostras de animais Tg 6 meses e 12 meses, foi necessário o tratamento dos espectros para remoção de linha de base, de artefatos (*spikes*) causados por raios cósmicos que incidem no detector do espectrômetro utilizado para aquisição dos espectros Raman, e normalização de intensidades.

A remoção desses *spikes* é feita de forma automática utilizando algoritmo baseado na transformada discreta de *wavelets* (DWT). Esse algoritmo consegue identificar e remover aproximadamente noventa por cento dos *spikes*, sendo que os dez por cento restantes foram removidos manualmente através do programa de computador (HSPE). O HSPE foi desenvolvido no decorrer do projeto, sendo uma tecnologia registrada pela UFMG no INPI.

Também foi feito o cálculo da primeira derivada dos espectros, utilizando o método proposto por Savitzky e Golay, para reduzir os efeitos do *background* causados por diferença de foco entre as medidas feitas em cada amostra.

Uma vez feito o pré-processamento, foram definidas as regiões de interesse que serão analisadas (**QUADRO 3**). Essas regiões são definidas pelo deslocamento Raman central e pelos limites inferior e superior. É feita uma análise dos componentes principais para cada região de forma individual.

Após o pré-processamento dos espectros Raman para cada mapa, é feita a montagem da matriz de dados que será utilizada na análise *PCA*, essa montagem é feita com base no volume de dados de cada amostra.

A organização dos dados dentro de um hiperespectro é orientada por linha da varredura e cada elemento da linha (direção X) é composto por uma sequência de valores (direção Z) que descrevem o espectro de cada ponto da amostra (**FIGURA 19**).

Cada linha da matriz de dados representa um ponto do hiperespectro de uma amostra, logo cada amostra resulta em X vs. Y linhas com Z colunas. Os valores dos espectros (colunas) são interpolados para o mesmo valor de deslocamento Raman. Com base nessa organização é construída uma matriz contendo todas as amostras que se deseja incluir no *PCA*.

A de componente principal consiste em decompor a matriz de dados em autovalores e autovetores. Os autovalores representam a variância e os autovetores são as componentes principais. Essas componentes são ordenadas da maior variância para a menor, isso faz com que as primeiras componentes principais contribuam para descrever as maiores variações no conjunto de dados.

Foi observado que *PCI*, a primeira componente principal, explica 51-90% das variações observadas no conjunto de dados, com isso ela foi utilizada para representar a semelhança entre as regiões dos espectros. Com *PCI* foi feito um mapa de cores: pontos com valores próximos de *PCI* são semelhantes.

QUADRO 2. Regiões de interesse utilizadas na análise de Componentes Principais

Região	Raman shift (cm ⁻¹)		
	Mínimo	Central	Máximo
R1	400	424	448
R2	702	707	712
R3	720	725	730
R4	758	763	768
R5	1002	1007	1012
R6	1630	1660	1690
R7	1640	1655	1670
R6	1670	1685	1700
R9	2845	2850	2855
R10	2915	2930	2945

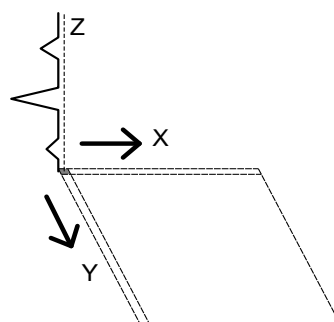


FIGURA 19. Organização dos dados de hiperespectros

3.2.8 Comitê de ética

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais da UFMG, sob Protocolo n° 225/2014. O comprovante consta no ANEXO.

4 - RESULTADOS & DISCUSSÃO

Como mostrado no capítulo 3, o trabalho aqui realizado foi dividido em duas partes: inicialmente, foram feitas as caracterizações *in vitro* de placa amiloide com o uso de espectroscopia Raman espontânea, para desvendar a assinatura espectroscópica do marcador natural da DA e, em seguida, foi feita a caracterização *ex vivo* de placas amiloides com o uso de Espectroscopia Raman espontânea e estimulada, confirmando a validade da assinatura espectroscópica e fazendo um estudo longitudinal que demonstra a possibilidade de se acessar diferentes estágios de evolução da doença utilizando a técnica. A seguir, são detalhadas cada uma dessas etapas.

1ª PARTE: Caracterizações *in vitro* de placa amiloide via espectroscopia Raman espontânea

4.1 Caracterização de aminoácidos

A β A é composta por 16 resíduos de aminoácidos (a.a.) que se ligam em uma cadeia linear através de ligação peptídica, com repetições específicas. Seria então possível prever a frequência Raman do peptídeo amiloide conhecendo o conjunto de vibrações de cada a.a. que a compõe? Para entendermos melhor as entidades biológicas com as quais estamos lidando, começamos por identificar o espectro Raman dos a.a. em questão e do peptídeo amiloide *in vitro*.

Amostras em pó dos 16 a.a. (alanina - ala, glutamina - gln, glicina - gli, ácido glutâmico - glu, ácido aspártico - asp, fenilalanina - Fen, metionina - Met, valina - Val, isoleucina - Ile, lisina - Lis, leucina - Leu, asparagina - Asn, arginina - Arg, serina - Ser, histidina - His, tirosina - Tir) presentes no peptídeo β A₁₋₄₂ foram colocadas em lamínulas e caracterizadas por ER com o uso do filtro chamado “super notch”. Pela primeira vez, as regiões de baixas frequências de todos os a.a. foram caracterizadas, evidenciando picos Raman intensos na região entre 15 e 200 cm^{-1} e incluindo a região anti-Stokes de todos os a.a. (APÊNDICE A, FIG 61). É importante conhecer as assinaturas espectrais dos aminoácidos que constituem a β A para melhor compreensão do todo e possíveis correlações entre os espectros.

Foram feitas, também, medidas dos 16 a.a. de 40 a 4000 cm^{-1} em pó e em solução (**APÊNDICE A, FIG 62, 63**) para cobrir todas as vibrações presentes e desvendar o efeito da cristalização dos a.a. em sua assinatura espectroscópica. Uma vez que o peptídeo βA é hidrofóbico e não solúvel, consideramos importante avaliar as frequências desses a.a. tanto em pó, quanto em solução. Existe correspondência de várias frequências entre as amostras de a.a. em pó e em solução, conforme observado por Pazderka e Kopecký (2017)[208].

Todo a.a. é composto de uma unidade básica contendo um carbono α ligado a um grupo carboxila em uma extremidade, uma amina na outra, um hidrogênio e um grupo funcional (cadeia lateral). A cadeia lateral é a única parte não conservada entre os a.a., e que difere um do outro. A cadeia lateral interfere no espectro Raman dos a.a., haja visto que o esqueleto de carbono e suas extremidades contém poucos átomos e é esperado que sofra intensa perturbação dos seus modos de vibração em função de qualquer molécula que se adicione a ele [213]. Quando consideramos os efeitos dessa perturbação, fica fácil entender que cada grupo funcional, com suas respectivas vibrações e impedimento estérico, irá perturbar de forma diferente o esqueleto de carbono e, conseqüentemente, sua assinatura espectral. Por sua vez, a resultante do espectro de cada a.a. *não* será então uma resultante dos valores das vibrações de cada grupo funcional. Cada a.a., separadamente, também sofrem perturbações vibracionais quando fazem ligações peptídicas, pois ligações foram alteradas, composições atômicas modificadas e outra conformação espacial foi adquirida, com novos graus de liberdade (ver Cap.2, Seção 2.7.4, **FIGURA 16**). Por isso, o espectro de um peptídeo (ou de uma proteína) *não* é igual ao somatório do conjunto de espectros dos a.a. que o constitui. Isso fica evidente no espectro do dipeptídeo glicina-glicina, que é composto pelo a.a. mais simples dentre os demais e que, quando forma uma nova estrutura, altera seu espectro (**FIGURA 20**). Este simples exemplo mostra como um arranjo molecular de um dipeptídeo, assim como no caso do peptídeo βA_{1-42} , apresenta uma assinatura única. Como mostraremos, a conformação folha- β do peptídeo amiloide, influencia nesta assinatura. Apesar disso, algumas cadeias laterais de alguns a.a. apresentam espectros específicos

(isso é, mesmo em uma cadeia polipeptídica, essas vibrações mantêm sua identidade) e muito intensos, como o caso do anel aromático da fenilalanina, que apresenta uma vibração característica por volta de $1000-1010\text{ cm}^{-1}$ e da tirosina que apresenta um pico em 1614 cm^{-1} . Uma vez que o peptídeo βA apresenta esses dois a.a., a contribuição de suas vibrações no espectro pode ser usada para identificar placas amiloide em função da concentração desses a.a. na placa, em contraposição à distribuição normal deles em região sem placa amiloide.

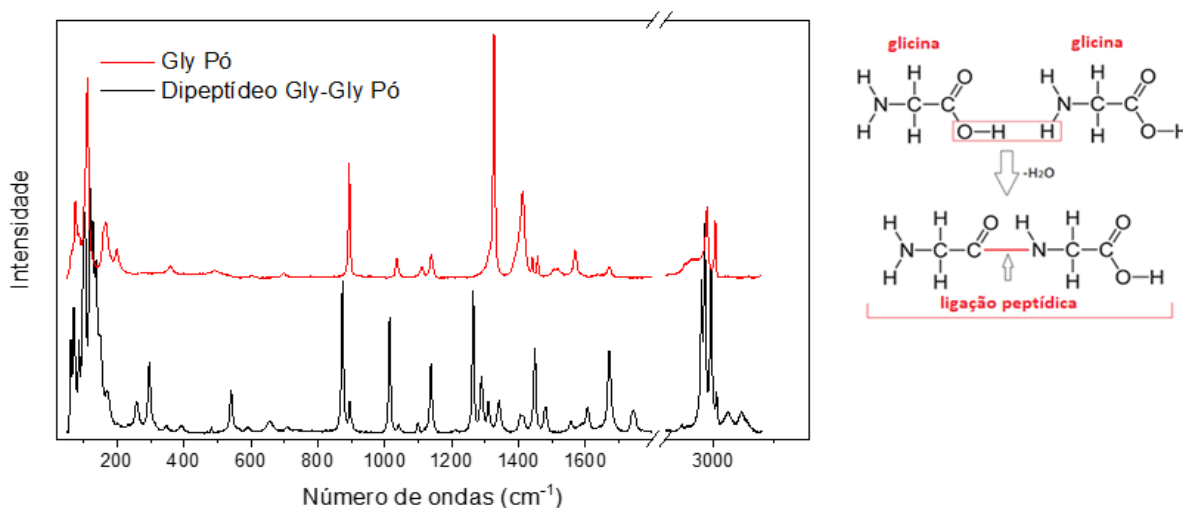


FIGURA 20. Espectro Raman do aminoácido glicina e do seu dipeptídeo

Note que o espectro de um peptídeo não é o somatório dos espectros de seus a.a., devido às mudanças estruturais decorrentes da ligação peptídica

4.2 Caracterização de fibrilas βA *in vitro*

O processo de fibrilização da βA , como descrito anteriormente (Cap. 2, Seção 2.2.2), é complexo e provavelmente se dá em etapas. Primeiro ocorre a formação de oligômeros que se transmutam em profibrilas e essas em fibrilas maduras que se entrelaçam entre si [60]. Embora mais aceita, essa hipótese ainda é alvo de discussão [214]. Como nosso foco são as placas amiloides (formadas por emaranhados de fibrilas), foi preciso estabelecer um protocolo de formação dessas, cujo tempo, concentração, pH e temperatura são fatores determinantes para o

processo de fibrilização. Após incubação por 48h nas condições já descritas, foi possível confirmar a formação de fibrilas conforme imagem de MET e AFM (**FIGURAS 21**). Em função do sal formado a partir da reação entre NaOH e HCl da amostra, não foi possível a aquisição de imagem de AFM após simples deposição e secagem. A formação de cristais de sal tornava as fibrilas inacessíveis à sonda do microscópio de varredura. Para resolver esse problema, utilizamos duas estratégias: 1) dialisamos a amostra contendo fibrilas e só depois depositamos sobre lamínula; 2) depositamos uma gota de 10 μ L da amostra sobre a lamínula, deixamos adsorver por 5 minutos e lavamos com 10 μ L água ultrapura, mantendo a lamínula inclinada a 45° sobre papel filtro, para lavar o excesso de sal. Ambas as estratégias deram resultado e então foi possível visualizar a morfologia das fibrilas por microscopia de força atômica.

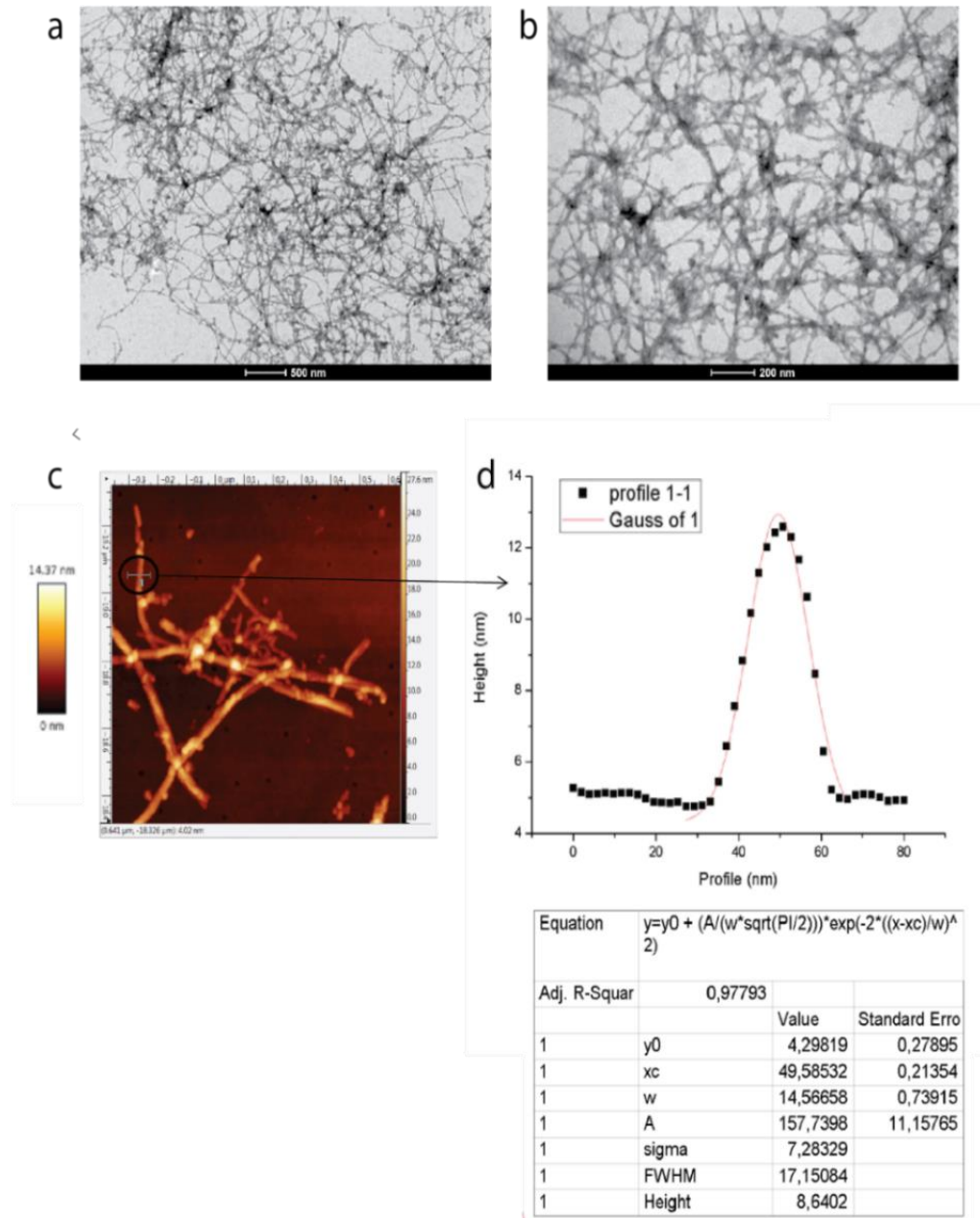


FIGURA 21. Caracterização de fibrilas β A1-42 por microscopia eletrônica

(a e b) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando emaranhado de fibrilas. (c) Imagem de fibrilas por microscopia de força atômica. Região circulada em preto foi analisada quanto a espessura da fibrila. (d) Gráfico de escala com valores do perfil de linha da região circulada em (c). As varreduras foram feitas pelo modo contato intermitente (tapping mode), de $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ e as imagens geradas com 512×512 pixels. Imagens adquiridas no Centro de Microscopia da UFMG.

4.3 Espectro Raman de fibrilas β A *in vitro*

As regiões espectrais onde se observam vibrações em material biológico compreendem, normalmente, a faixa de 400 - 3000 cm^{-1} números de onda, associadas majoritariamente às vibrações de ligações atômicas de proteínas, carboidratos, lipídios, ácidos ribonucleios e desoxirubonucleios. Essas vibrações incluem o estiramento das ligações C-N, C-C, C=O, ligação N-H, cadeia lateral, (1000 – 1700 cm^{-1}), carboidratos (470 – 1200 cm^{-1}), ligação fosfodiéster e grupo fosfato do DNA e RNA (790, 980, 1080 e 1240 cm^{-1}), frequências associadas aos estiramentos C-H, N-H e O-H em lipídios e proteínas (2700 e 3500 cm^{-1}) e outras moléculas biológicas [154], [155]. Por questões de limitações técnicas, as vibrações em regiões mais baixas, entre 0 – 400 cm^{-1} , são pouco definidas em tecido biológicos, dado o somatório de frequências de várias moléculas biológicas que apresentam grande intensidade de vibração nessa região e a dificuldade técnica em separá-las espectralmente. O que se tem é uma larga banda no espectro, sem possibilidade de definição de frequências específicas (**APÊNDICE A, FIG 61 e 62**).

Uma vez adquiridas as fibrilas, efetuamos suas medidas do espectro Raman. Após sucessivas tentativas, ficou estabelecido o uso do comprimento de onda de excitação de 532 nm, em função da melhor relação sinal/ruído, em comparação aos comprimentos de onda de 456 nm e 633 nm. Além disso, este comprimento de onda no verde se mostrou menos destrutivo à amostra que o comprimento de onda menor. A fim de compararmos o espectro de amida I de folha β (AmI de f- β) com α hélice (AmI de α -h), fizemos também medida em uma amostra de albumina. A albumina é uma proteína sérica, e apresenta estrutura secundária predominantemente de α -h. Na **FIGURA 22** podemos observar os espectros das amostras de albumina e de fibrilas de β A sintética, já indicando as especificidades de cada estrutura. Através da energia de vibração acessadas por ER, é possível identificar tanto grupos funcionais de a.a. [208], [215], quanto saturação de cadeia

carbônica de ácidos graxos [216], [217], ou diversas outras classes de moléculas biológicas presentes em um tecido ou célula [155], [218].

Quando se trata de proteínas e peptídeos, é muito comum o uso de ER para identificação da estrutura secundária, pois essas estruturas apresentam diferenças nas suas vibrações moleculares além de alta intensidade. As principais vibrações relacionadas aos peptídeos e proteínas são as AmI, AmII e AmIII. O dobramento α -h se caracteriza por um deslocamento de frequência com valores de 1660 - 1665 cm^{-1} , já a conformação f- β apresenta deslocamento para 1670 - 1680 cm^{-1} [183]. Essa frequência correspondente à vibração de estiramento C = O [219]. AmI é a região usual para caracterização de conformação secundária de proteínas, amplamente utilizada por espectroscopia de Infravermelho [220] e espectroscopia Raman [221], [222]. No caso das placas amiloides, por serem formadas pelo peptídeo β A, a conformação f- β (ver **FIGURA 8**) deve, obrigatoriamente, ser predominante nas fibrilas.

Além da vibração de AmI, ficou bastante visível o deslocamento na banda de AmIII, que na fibrila β A se desloca para menores frequências em relação à albumina (**FIGURA 22**). Esse modo de vibração, que também se relaciona com a estrutura secundária de proteínas, apresenta-se em um intervalo de banda mais largo, variando na faixa ~1200 – 1270 cm^{-1} para a f- β , enquanto que para α -h, a faixa é ~1260 – 1320 cm^{-1} [179].

Desse modo, confirmamos a conformação f- β esperada nas fibrilas β A₄₂ sintéticas e identificamos as diversas nuances de sua assinatura espectral, que podem então ser utilizadas para estudar a presença de placas de β A em tecido biológico.

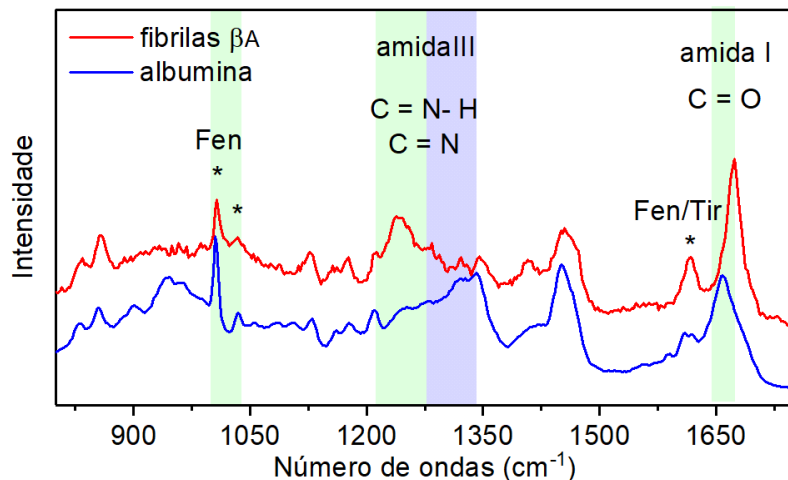


FIGURA 22. Espectros Raman de fibrilas βA sintéticas

Gráfico mostrando espectro de fibrilas de βA (vermelho) e albumina sérica bovina (BSA) (azul). Os picos Raman que se relacionam com a estrutura secundária de $f\text{-}\beta$ estão destacados em verde, assim como fenilalanina. Nas fibrilas, a frequência amida I apresenta um desvio para a direita ($\sim 1672\text{ cm}^{-1}$) e a amida III um desvio para a esquerda (faixa verde, em uma banda larga de $\sim 1203\text{-}1263\text{ cm}^{-1}$). Esses valores correspondem à vibrações relacionadas à estrutura de $f\text{-}\beta$. A BSA apresenta valores de amida I ($\sim 1658\text{ cm}^{-1}$) e amida III (destacado em roxo, $\sim 1286\text{-}1346\text{ cm}^{-1}$). Esses valores coincidem com estrutura $\alpha\text{-h}$. Os três asteriscos apontam para as faixas de fenilalanina (Fen) em 1007 cm^{-1} e 1036 cm^{-1} , e Fen e tirosina (Tir) sobreposto em 1609 cm^{-1} e 1612 cm^{-1} , respectivamente. Adaptado de Fonseca et al., Analyst 2019.

2ª PARTE: Caracterização de *ex vivo* de placa amiloide: Uso de espectroscopia Raman espontânea e estimulada

4.4 Caracterização *ex vivo* de placas amiloides por hiperespectro Raman – cortes de cérebros

Uma vez que conseguimos fazer uma clara diferenciação entre as duas formas secundárias de estrutura – α e β – *in vitro*, procedemos à caracterização das placas amiloide *ex vivo* no cérebro de camundongos transgênicos para Alzheimer.

As placas amiloides nos tecidos não podem ser visualizadas por microscopia sem algum tipo de marcação, seja com vermelho Congo, impregnação por prata, ThioS, anticorpo ou curcumina, que são marcadores amiloidais usuais de tecidos na imunohistoquímica [85], [223]. Dessa maneira, pode-se identificar a distribuição espacial de placas amiloides no tecido por microscopia óptica convencional ou de fluorescência. Entretanto, por espectroscopia Raman, qualquer desses marcadores impossibilita a técnica, por terem fluorescência que mascaram o sinal Raman. Dessa maneira, foi preciso identificar previamente as placas nos cortes sem o uso de marcadores, para em seguida localizá-las ao microscópio Raman, a fim de se promover as varreduras sobre as placas. Para tanto, fizemos imagens de autofluorescência do tecido usando microscopia de EDF para, através dos detalhes das estruturas do tecido, sermos capazes de encontrar no microscópio óptico do equipamento de imageamento espectroscópico Raman (WITec) a região próxima das placas (**FIGURA 23**).

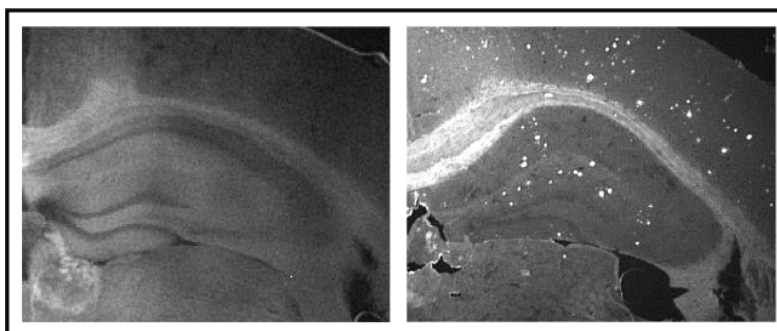


FIGURA 23. Autofluorescência de placa amiloide por EDF

Imagem representativa de autofluorescência da placas amiloides em uma fatia cérebro de camundongo Tg 12 meses (direita) por microscopia EDF. Camundongo Ctrl (esquerda). Foi usado comprimento de onda de excitação de 830 nm e potência de 400 mw com 5 acumulações de 5 segundos. Magnificação 10x.

Seguimos um protocolo de trabalho com as seguintes etapas:

- 1) visualização prévia da placa amiloide por EDF,
- 2) varredura de hiperspectro Raman,
- 3) análise de dados,
- 4) marcação da placa com ThioS (**FIGURA 24**).

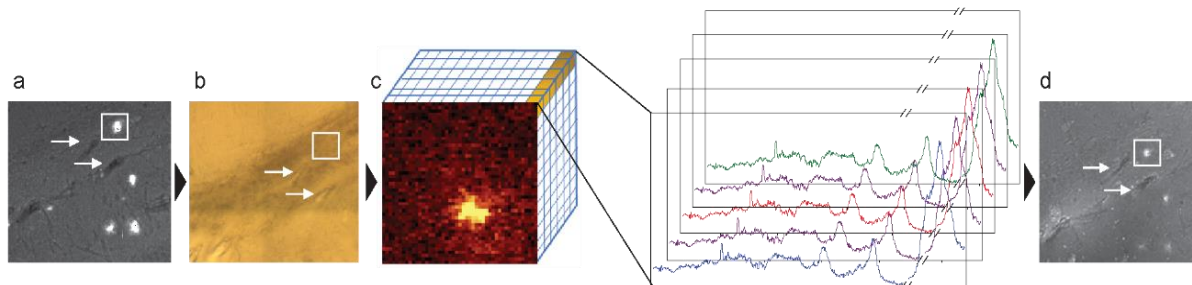


FIGURA 24. Fluxo de trabalho para caracterização de placa amiloide no tecido

(a) Imagem de autofluorescência da placa amiloide em uma fatia de cérebro de camundongo. (b) Imagem óptica da mesma região em (a). As setas brancas indicam estruturas do tecido reconhecidas e usadas como referência para a colocação óptica da placa. (c) Aquisição de dados Raman hiperspectral para análise por unmixing. (d) Marcação do tecido com ThioS. Adaptado de Fonseca et al., *Analyst* 2019.

Uma vantagem inequívoca da ER, além da técnica dispensar marcadores, uma vez estabelecida, ela pode ser realizada em fatias de tecido de biópsia ligeiramente fixadas, não fixadas, em secções de criocortes ou corte em parafina, dispensando coloração. Isso reduziria muito o tempo de diagnóstico da patologia, como demonstrado em outros trabalhos [159], [224]–[228].

A composição do tecido cerebral de aproximadamente 80% de água, 8% de proteína e a quantidade de lipídio varia de 5% na substância cinzenta à 15% na substância branca [229]. Os lipídios apresentam um modo de vibração intenso relacionado ao estiramento CH_2 ($\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$) [216], [229], [230]. Quando se trata de proteínas, a região de maior contribuição de vibrações a elas relacionadas está entre as frequências de 800 e 1680 cm^{-1} . A **FIGURA 25** mostra um espectro representativo de tecido de cérebro, retirado da varredura de hiperspectro, com essas frequências discriminadas.

Uma vez demonstrado que a vibração de AmI na fibrila sintética se relaciona com a conformação f- β , selecionamos a frequência 1675/10 cm^{-1} (o número após a barra indica a largura da janela espectral, centrada no número antes da barra) usando *software* WITec Project 5.0 para visualização da imagem hiperespectral em cada varredura feita. Foi possível identificar as placas amiloides no tecido através dessa frequência (AmI) distribuída pelo hipocampo de animais Tg (FIGURA 26).

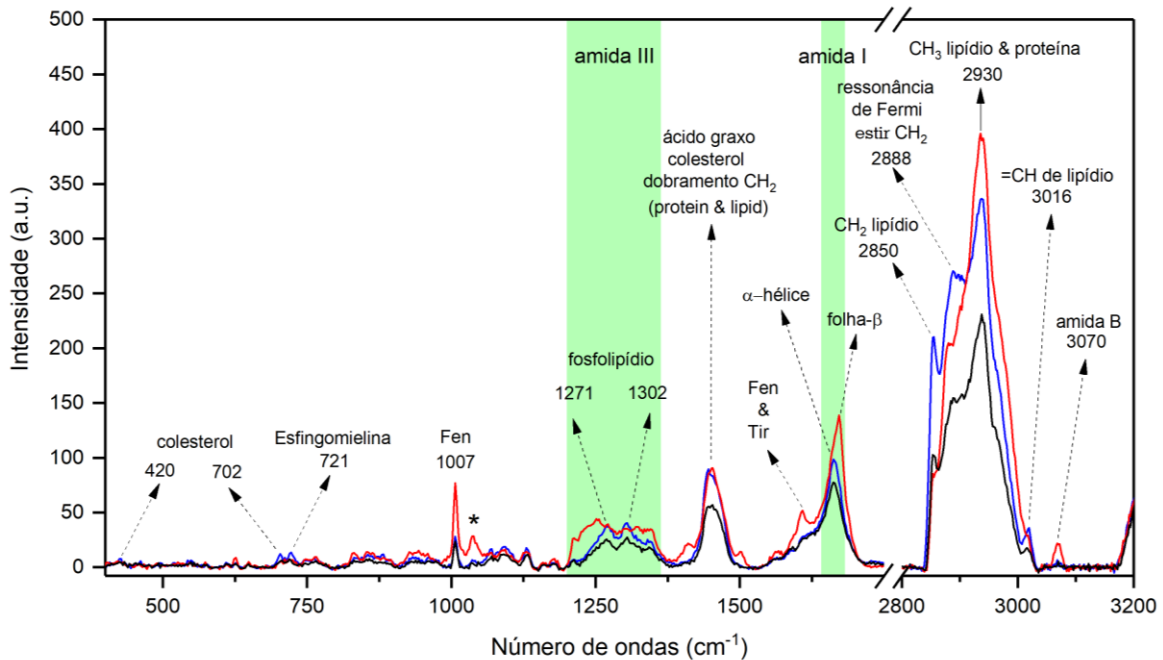


FIGURA 25. Espectro Raman representativo de cérebro de camundongo Tg 6 meses

Em vermelho observa-se espectro sobre placa amiloide. Em azul, na região circundante à placa. Em preto, região de tecido distante da borda da placa amiloide. Região de amida III e I destacada em verde.

4.4.1 Caracterização de placa por análise não supervisionada - unmixing

A fim de identificar, dentre o conjunto de espectros, o espectro que melhor caracteriza a placa amiloide, capaz de diferenciar uma região de placa de uma região de “não placa”, usamos um método de análise não supervisionada denominada *unmixing*, que identifica os espectros representativos (*end members*) do conjunto de dados. Através de análises de *unmixing* de um conjunto de hiperespectros, são selecionados um ou mais espectros que correspondem à imagem da placa amiloide. O espectro *unmixing* é uma técnica estatística não supervisionada para identificação de espectros específicos, muito usada para caracterização de componentes espectrais e tem se mostrado bastante eficiente para caracterização espectral de compostos bioquímicos em células e tecidos biológicos [210], [224], [231]. A análise por *unmixing* foi usada para identificar o conjunto de picos que compõem determinado espectro (**FIGURA 27**).

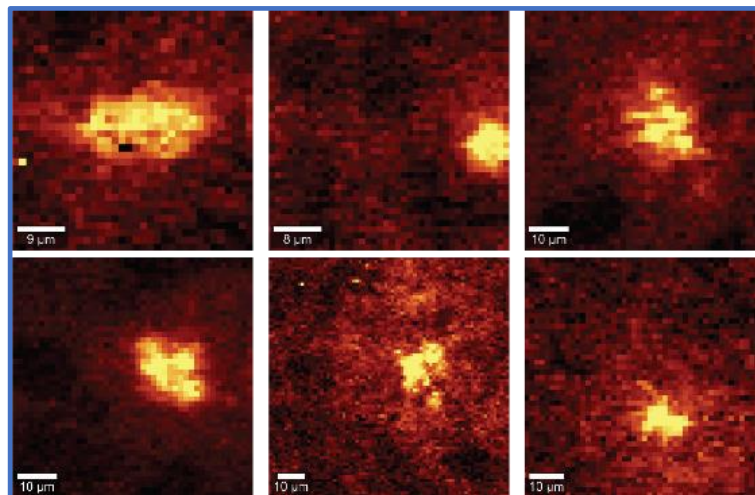


FIGURA 26. Imagem de hiperespectro Raman de placa amiloide

Varredura sobre regiões de placas amiloides em cortes de cérebros de camundongos Tg de 6 meses, região do hipocampo. Imagens hiperespectrais produzidas a partir da seleção de filtro para região de $1675/10\text{ cm}^{-1}$ corresponde à AmI de $f\text{-}\beta$, usando software Witec Project 5.0. Adaptado de Fonseca et al., Analyst 2019.

Ao entrarmos com os dados para análise *unmixing*, definimos 4 *end members* apenas, como *output*, um espectro representativo da placa amiloide, um representativo do tecido do entorno, um do *background* e um de ruído. Análises com 4 *end members* retornaram espectros que se correlacionam muito bem com a placa amiloide, sendo capaz de formar uma imagem clara de placa (**FIGURA 28**). Ao observamos com cuidado o gráfico da placa (EM3) e do entorno (EM2), ficam nítidas as frequências que se diferem entre um e outro.

O EM3 apresenta o espectro da placa com (i) aumento de intensidade do pico de fenilalanina; (ii) perfil diferente da banda de AmIII com deslocamento para esquerda (*red shift*); (iii) pico de fenilalanina e tirosina; (iv) aumento de intensidade de AmI com deslocamento para direita (*blue shift*); (iv) diminuição de intensidade do estiramento $\text{CH}_2^{\text{lípido}}$, com aumento de $\text{CH}_2^{\text{lípido/proteína}}$ e $\text{CH}_3^{\text{lípido/proteína}}$ (**FIGURA 27**).

Embora sejam muitas as mudanças bioquímicas e histológicas no tecido nervoso na doença de Alzheimer, em função da formação de oligômeros e fibrilas neurotóxicos, resultando em placas amiloides, emaranhados neurofibrilares, neuroinflamação, células apoptóticas, degeneração neuronal, tudo isso em um processo contínuo e parcialmente simultâneo, para a espectroscopia Raman, as principais contribuições na identificação da placa parecem ser: (i) a presença aumentada de vibração de estiramento $\text{C} = \text{O}$, comum às diversas moléculas biológicas, nas quais o deslocamento da vibração é característico no dobramento de proteínas nas suas conformações α e β ; (ii) vibração de fenilalanina; (iii) as vibrações de CH_2 e CH_3 . Em função da presença aumentada de βA no tecido formando enormes placas, conseguimos identificar a vibração de AmI de $f\text{-}\beta$ e localizar as placas no tecido cerebral de camundongos Tg para DA (**FIGURAS 28**).

Além disso, nossos resultados mostram que outras frequências também são capazes de indentificar placas amiloides no tecido, embora com menor resolução. Pela primeira vez, foi demonstrada a imagem de placas amiloide por ER em suas

diversas frequências acessíveis. Para mais detalhes, ver artigo do nosso grupo no **APÊNDICE B**. Comparando com a literatura, nossos resultados mostram-se mais robustos [186]–[188], [232].

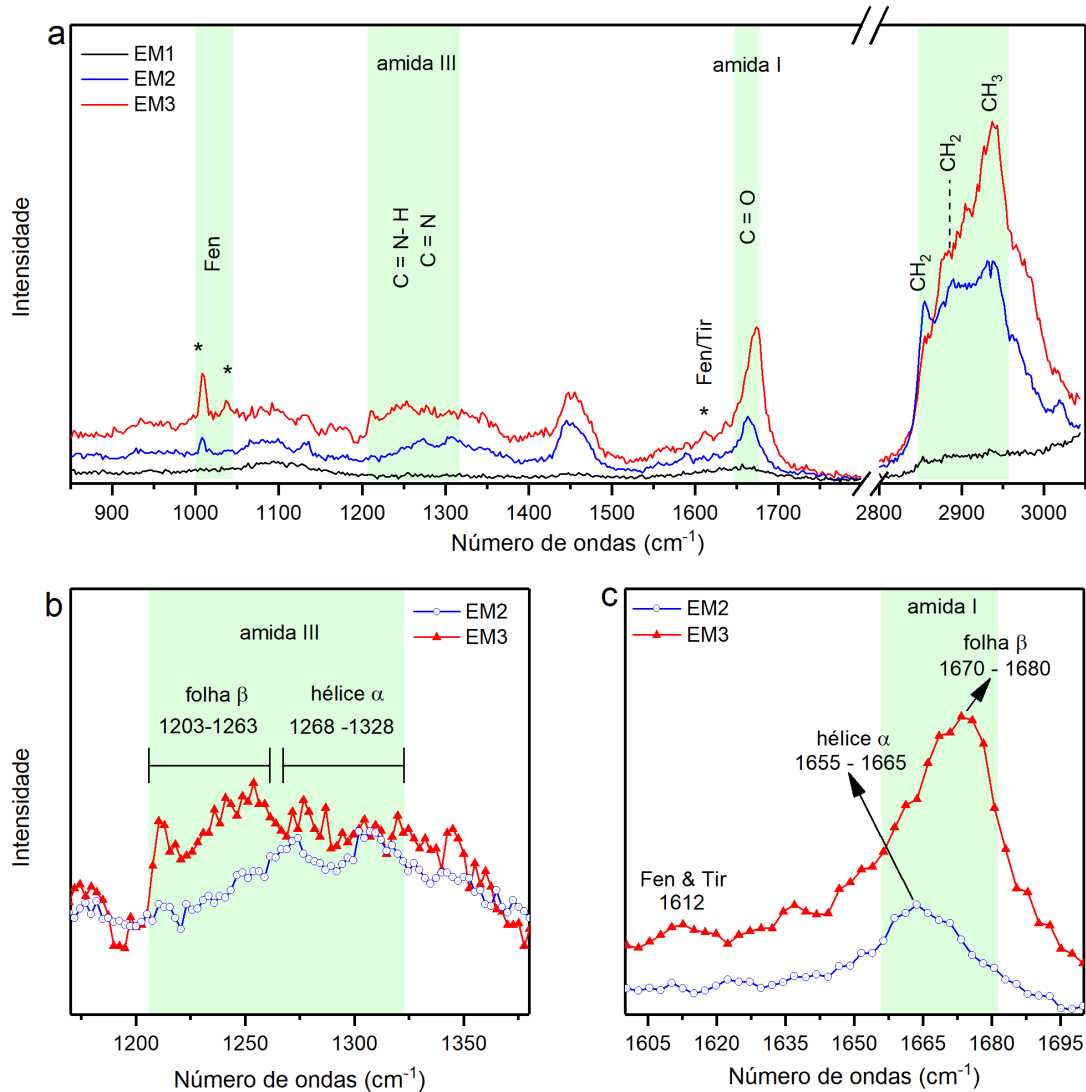


FIGURA 27. Gráficos end members (EM)

EM contendo espectros fora e dentro da região de placa amiloide. Em (a) os 3 espectros mais distintos de todo o conjunto segundo unmixing. EM 1, background. EM2, espectro do tecido circundante à placa amiloide no tecido. EM 3, espectro da placa no cérebro. As bandas que mostraram diferença em intensidade e ou deslocamento foram destacadas em verde. c) Recorte da região de AmIII mostrando o deslocamento para esquerda (red shift). c) Recorte da região de AmI mostrando o deslocamento para direita (blue shift). Note que na placa amiloide o pico de fenilalanina (Fen) em 1007 cm^{-1} tem significativo aumento de intensidade na placa amiloide. Em $\sim 1612 \text{ cm}^{-1}$ é possível observar o pico correspondente à Fen e Tri (tirosina), 1610 cm^{-1} e 1612 cm^{-1} , respectivamente. Adaptado de Fonseca et al., Analyst 2019.

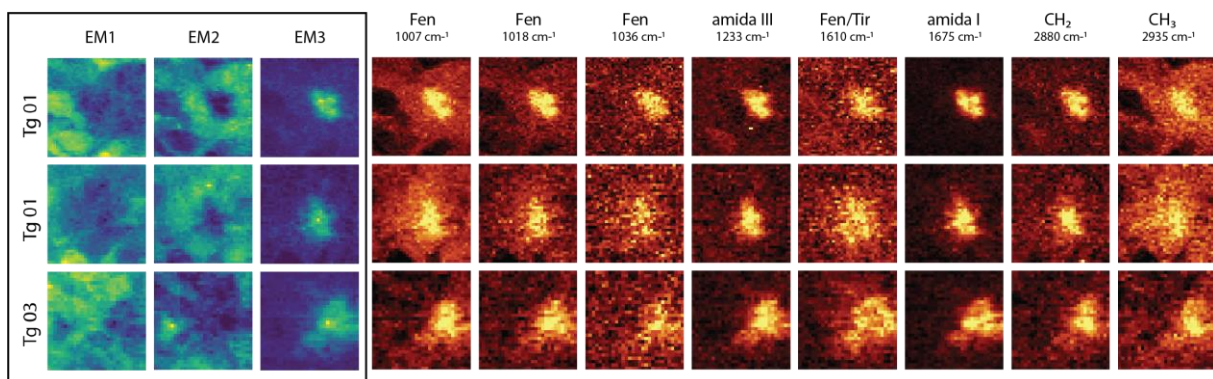


FIGURA 28. Imagem End Members e Imagem WITec

Imagens representativas das análises EM estão demonstradas à direita delineadas por um quadrado. As 3 imagens EM relativas aos 3 espectros formam imagens de placas amiloides (EM3), do entorno da placa (EM2) e do background (EM1). Ao lado seguem as imagens WITec correspondentes às frequências que apresentam diferença no espectro EM3 em comparação com EM2 conforme gráfico da **FIGURA 27**. Cada linha representa um animal diferente. Imagens WITec foram produzidas a partir da seleção de filtros para cada região discriminada na figura usando software Witec Project 5.0. Varreduras feitas com objetiva de 50x, NA 0,55. Resolução $\sim 1.2 \mu\text{m}$. Adaptado de Fonseca et al., Analyst 2019.

4.4.2 Caracterização de placa amiloide por hiperespectro

A partir desse primeiro conjunto de resultados, fizemos caracterizações mais detalhadas das placas amiloides em camundongos Tg, a começar com animais de 6 meses de vida. Na **FIGURA 29** são apresentadas algumas imagens de hiperespectro de placas em tecido de cérebro desses animais. As medidas foram feitas com maior resolução (objetivas de 60x a óleo e NA 1.4), e com essa configuração alcançamos a melhor resolução óptica do sistema ($\sim 350 \text{ nm}$). Caracterizamos com bastante riqueza de detalhes a histologia da placa amiloide no tecido. Graças ao mapa bioquímico que a ER promove, foi possível observar a distribuição, não só da placa amiloide composta de peptídeo βA , mas também de uma borda bastante densa (e maior do que a placa) de material lipídico, subscrita pela frequência de 2850 cm^{-1} relacionada à vibração de estiramento $\text{CH}_2^{\text{lipídico}}$. Através da frequência de 792 cm^{-1} , relativa à ligação fosfodiéster de DNA, foi possível observar vários núcleos de células ao redor da placa e da borda lipídica. A **FIGURA 30**, apresenta imagens de diferentes varreduras de hiperespectro Raman feitas em camundongos de 12 meses de vida.

Como ficou evidenciado pelas **FIGURAS 29 e 30**, a frequência relacionada ao DNA (792 cm^{-1}) forma imagens de núcleos celulares presentes ao redor da placa amiloide. Na **FIGURA 30** é possível observar, na coluna III, os corpos celulares dos neurônios do giro dentado, e núcleos de células com maior intensidade e morfologia diferente próximos da placa, possivelmente células da glia. Esse assunto será tratado com mais detalhes na próxima seção.

A frequência de fenilalanina reproduziu muito bem, em todas as varreduras, a imagem da placa amiloide. Como suspeitávamos, o acúmulo de fibrilas compostas de peptídeos β A, cada um carregando 2 fenilalaninas, torna perceptível a intensa vibração do anel aromático da cadeia lateral desse aminoácido. Essa vibração da Fen é muito específica e serve para confirmar que a imagem formada pelas vibrações de AmIII e I de f- β corresponde à fibrilas da placa amiloide. Essa confirmação fica ainda mais evidente quando observamos a imagem da placa pela frequência, não de um, mas de dois a.a., da fenilalanina e da tirosina. O peptídeo β A carrega uma Tir apenas, entretanto, assim como a Fen, a Tir apresenta anel aromático com uma intensidade Raman alta. O somatório das intensidades da vibração de Fen em $\sim 1610\text{ cm}^{-1}$ com a vibração da Tir em $\sim 1614\text{ cm}^{-1}$ gera um pico (ver **FIGURA 27**) capaz de identificar com bastante nitidez a placa amiloide.

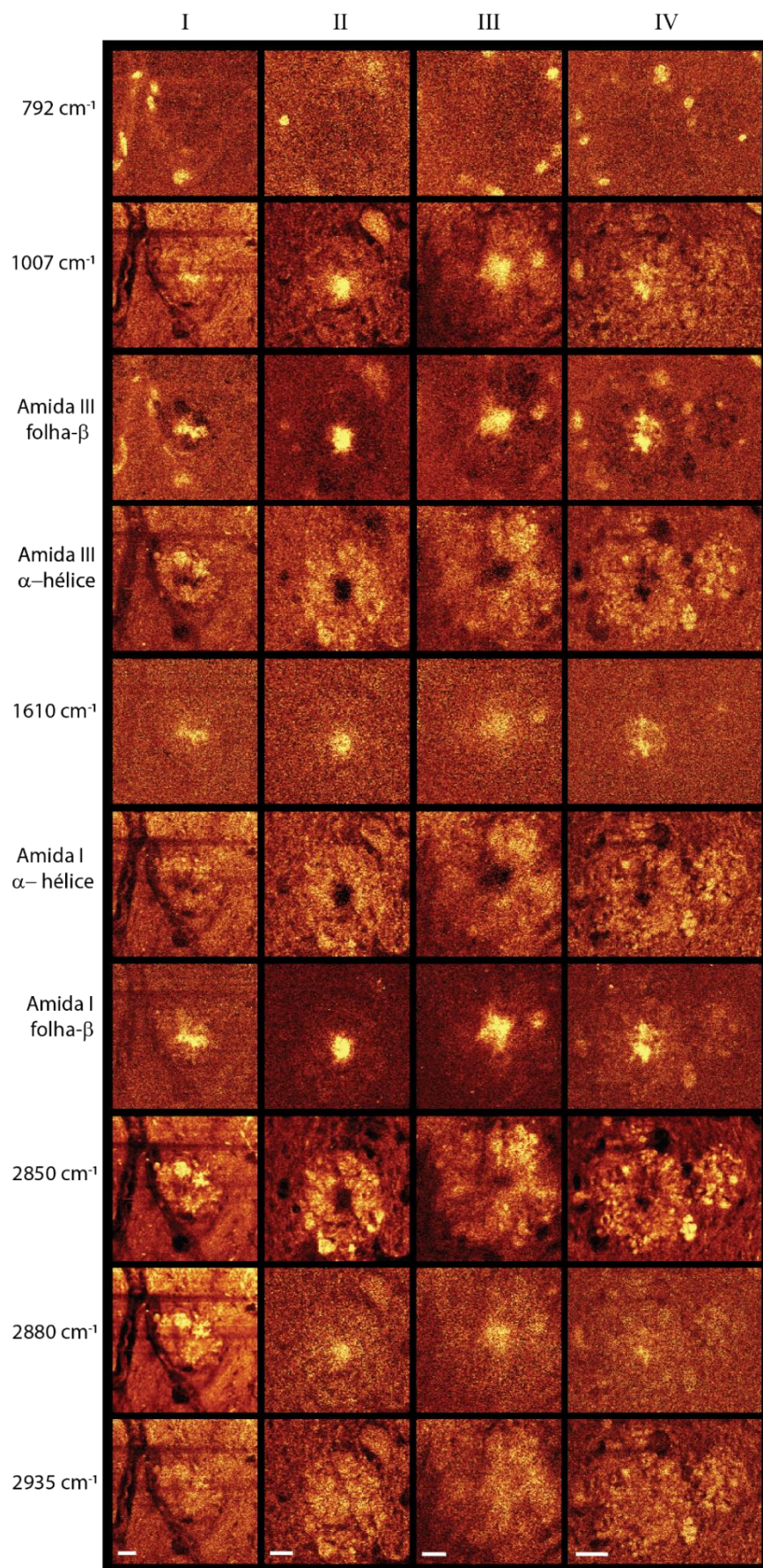
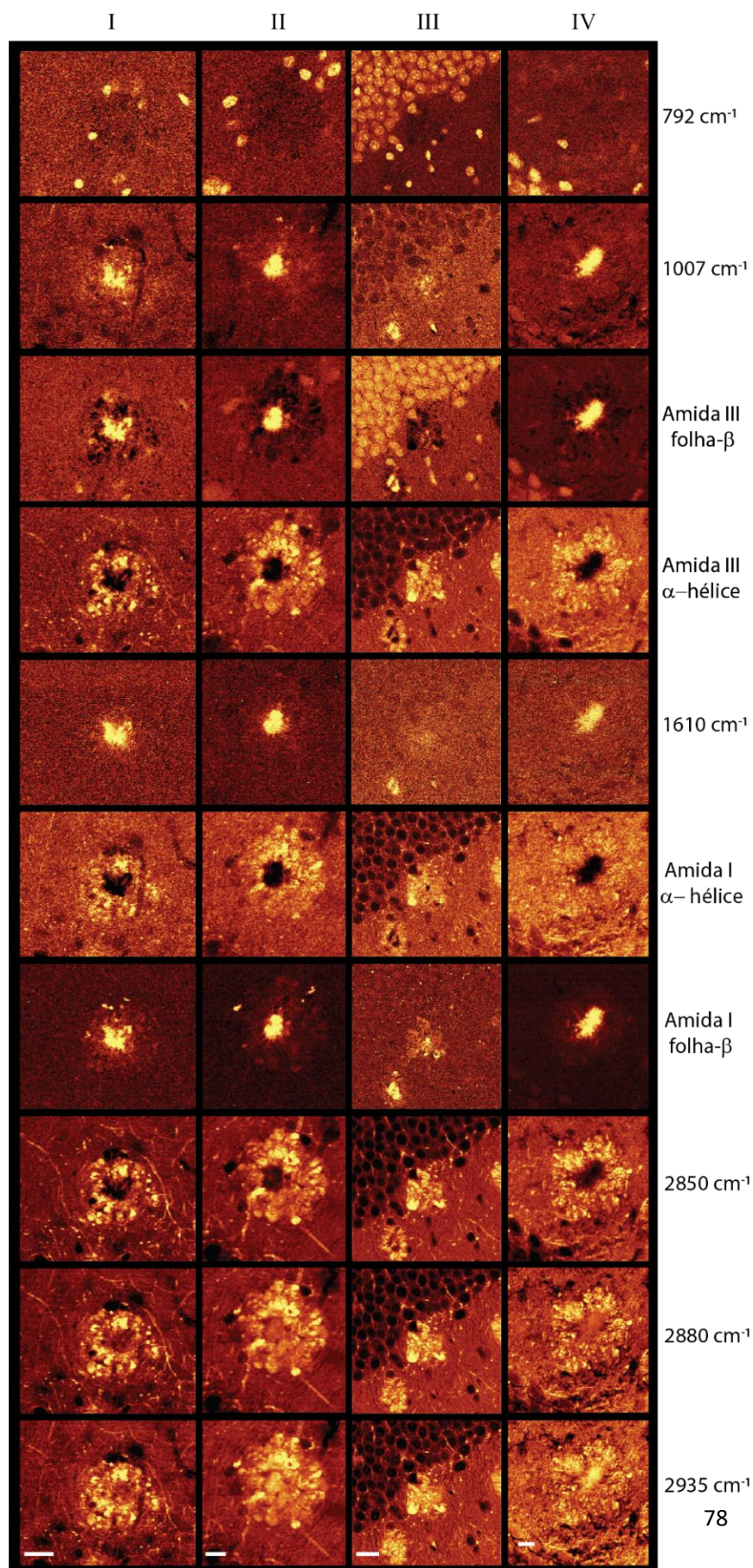


FIGURA 29. Caracterização de Placa amiloide por Varredura Raman em animais de 6 meses

Imagens de hiperespectro mostrando o mapa bioquímico de algumas moléculas distribuídas em regiões contendo placas amiloides. Cada coluna mostra varredura em um animal diferente e cada linha representa a intensidade da luz espalhada em 10 regiões espectrais diferentes: 792 cm^{-1} (DNA), 1007 cm^{-1} (fenilalanina), amida III f- β 1203-1286 cm^{-1} , amida III α -h 1286-1346 cm^{-1} , 1610 cm^{-1} (fenilalanina e tirosina), amida I f- β 1675 cm^{-1} , amida I α -h 1660 cm^{-1} , CH_2 de 2850 cm^{-1} lipídio, CH_2 de 2880 cm^{-1} lipídio e proteína, CH_3 de 2880 cm^{-1} lipídio e proteína. Barra de escala: I, II e III, 10 μm ; IV, 20 μm . Imagens WITec foram produzidas a partir da seleção de filtro para cada região discriminada na figura usando software Witec Project 5.0. Varreduras feitas com objetiva de 60x de imersão em óleo, NA 1,4. Resolução ~ 350 nm.

FIGURA 30. Caracterização de Placa amiloide por Varredura Raman em animais de 12 meses

Imagens de hiperspectro mostrando o mapa bioquímico de algumas moléculas distribuídas em regiões contendo placas amiloides. Cada coluna mostra varredura em um animal diferente e cada linha representa a intensidade da luz espalhada em 11 regiões espectrais diferentes: 792 cm^{-1} (DNA), 1007 cm^{-1} (fenilalanina), amida III f- β 1203-1286 cm^{-1} , amida III α -h 1286-1346 cm^{-1} , 1610 cm^{-1} (fenilalanina e tirosina), amida I f- β 1675 cm^{-1} , amida I α -h 1660 cm^{-1} , CH_2 de 2850 cm^{-1} lipídio, CH_2 de 2880 cm^{-1} lipídio e proteína, CH_3 de 2880 cm^{-1} lipídio e proteína. Barra de escala: I, 20 μm ; II, 10 μm ; III, 20 μm ; IV, 10 μm ; V, 10 μm ; VI, 10 μm . Imagens WITec foram produzidas a partir da seleção de filtro para cada região discriminada na figura usando software Witec Project 5.0. Varreduras feitas com objetiva de 60x de imersão em óleo, NA 1,4. Resolução $\sim 350 \text{ nm}$.



Como esperado, as vibrações de AmIII e AmI de f- β identificam as placas amiloides no tecido. Já as vibrações de AmIII e I α -h formam imagem negativa da região da placa. Interessante destacar, a frequência de CH₂^{lipídico} (2850 cm⁻¹) mostra a distribuição de lipídios e a formação de uma densa borda no entorno da placa. Essa borda tem sido chamada de forma genérica na literatura de “halo lipídico” [40], [233]. É possível observá-lo também pela frequência de AmIII e I α -h, certamente porque lipídio apresenta alguns modos vibracionais nessa faixa do espectro [155], embora com menos intensidade. Várias outras vibrações relacionadas ao lipídio, embora menos intensas, também descrevem esse halo com menor definição e intensidade. Vários trabalhos de espectroscopia de Infravermelho e Raman relatam um halo formado por fosfolipídio e éster de colesterol [40], [234], [235].

Importante ressaltar que as frequências de CH₂^{lipídio/proteína} e CH₃^{lipídio/proteína}, em ~2880 cm⁻¹ e ~2935 cm⁻¹, respectivamente, delimitam toda a região contendo a placa amiloide e a densa borda lipídica. Entretanto, a vibração CH₃ mostra o núcleo proteico mais intenso, quando comparado com CH₂^{lipídio/proteína}. Voltaremos a essa discussão sobre estiramento CH no tecido Alzheimer no tópico 4.6, após demonstrarmos os resultados de *CARS* e *SRS*.

4.4.3 Modo de vibração Amida III

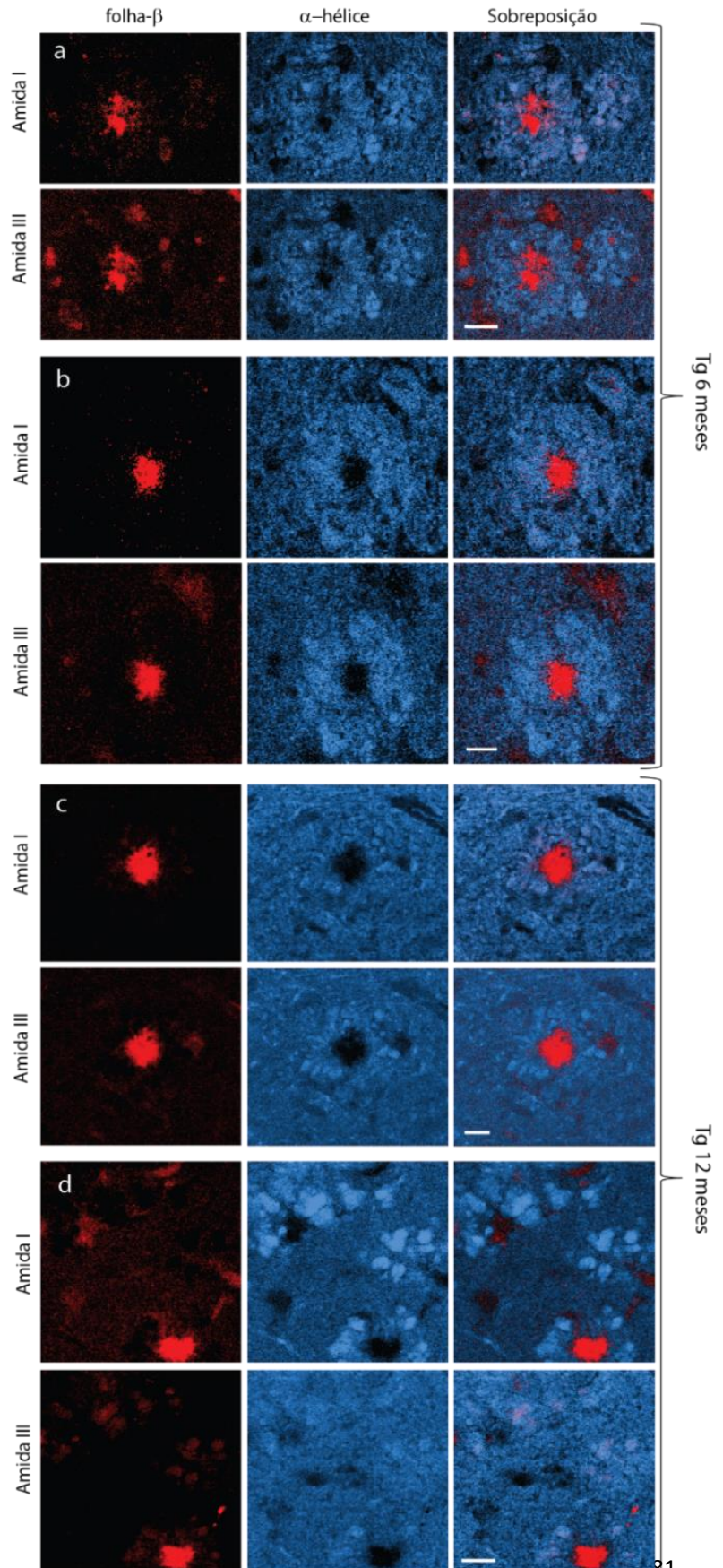
A vibração de AmIII (~1233/60 cm⁻¹) é bastante complexa, sendo formada pela soma de pelo menos 3 vibrações: dobramento de N-H, estiramento de C-N, e do movimento de flexão [C]C _{α} H [236]. Assim, a vibração de AmIII se torna ainda mais sensível à estrutura secundária de proteínas [180]. Entretanto, a banda de AmIII é muito larga e menos intensa do que AmI, o que a torna menos atraente para estudos em espectroscopia Raman. Na **FIGURA 31** são mostradas algumas imagens de região de placa com as frequências de AmIII e I de α e β . Fica bastante clara a definição da placa amiloide no tecido e a falta de vibração relacionada a estrutura de α -h onde há placa.

Nossos resultados mostram a identificação das placas amiloides através da vibração de AmIII pela primeira vez. Essa identificação torna mais sólida nossa caracterização (ver artigo no **APÊNDICE B**).

Como a banda de AmIII é larga, para identificação da placa ela abrange um intervalo de 1203-1263 cm^{-1} . Esse intervalo abriga vibrações de outras várias moléculas biológicas, como por exemplo, vibrações relacionadas à respiração do anel de bases nitrogenadas do DNA e RNA (adenina e timina $\sim 1208 \text{ cm}^{-1}$, 1220 cm^{-1} , 1257 cm^{-1}), vibração do grupo fosfato (PO_2^-) de ácido nucléico (1223 cm^{-1}), ácido ribonucléico (1240 cm^{-1}), estiramento assimétrico de PO_2^- ($\sim 1241 \text{ cm}^{-1}$ a 1243 cm^{-1} , PO_2), vibração de NH_2 de guanina e citosina (1250 cm^{-1} , 1254 cm^{-1} , 1259 cm^{-1}), dentre outras não relacionadas às bases nitrogenadas (ver revisão em ZANYAR MOVASAGHI, 2007). Em função de abrigar tantas vibrações relacionadas ao DNA e RNA, é possível identificar núcleos de neurônios e de células da glia próximos às placas (**FIGURA 29, 30, 33**).

FIGURA 31. Caracterização de Placa amiloide por Varredura Raman-Frequências de amida III & I

Imagens de hiperespectro mostrando o mapa bioquímico de proteínas segundo a conformação secundária, distribuídas em região contendo placa amiloide. Cada linha representa a intensidade da luz espalhada na região de amida III e I (AmIII f- β 1203-1286 cm^{-1} , AmIII α -h 1286-1346 cm^{-1} , AmI f- β 1675 cm^{-1} , AmI α -h 1660 cm^{-1}). Imagens WITec foram produzidas a partir da seleção de filtro para cada região discriminada na figura usando software Witec Project 5.0. Escala em (a), 20 μm , (b-d), 10 μm . Varreduras feitas com objetiva de 60x de imersão em óleo, NA 1,4. Resolução ~350 nm.



Diferentemente do observado nos animais Tg, varreduras nos animais controle não identificaram nem placa amiloides nem região de acúmulo de lipídio (halo lipídico) (FIGURA 32)

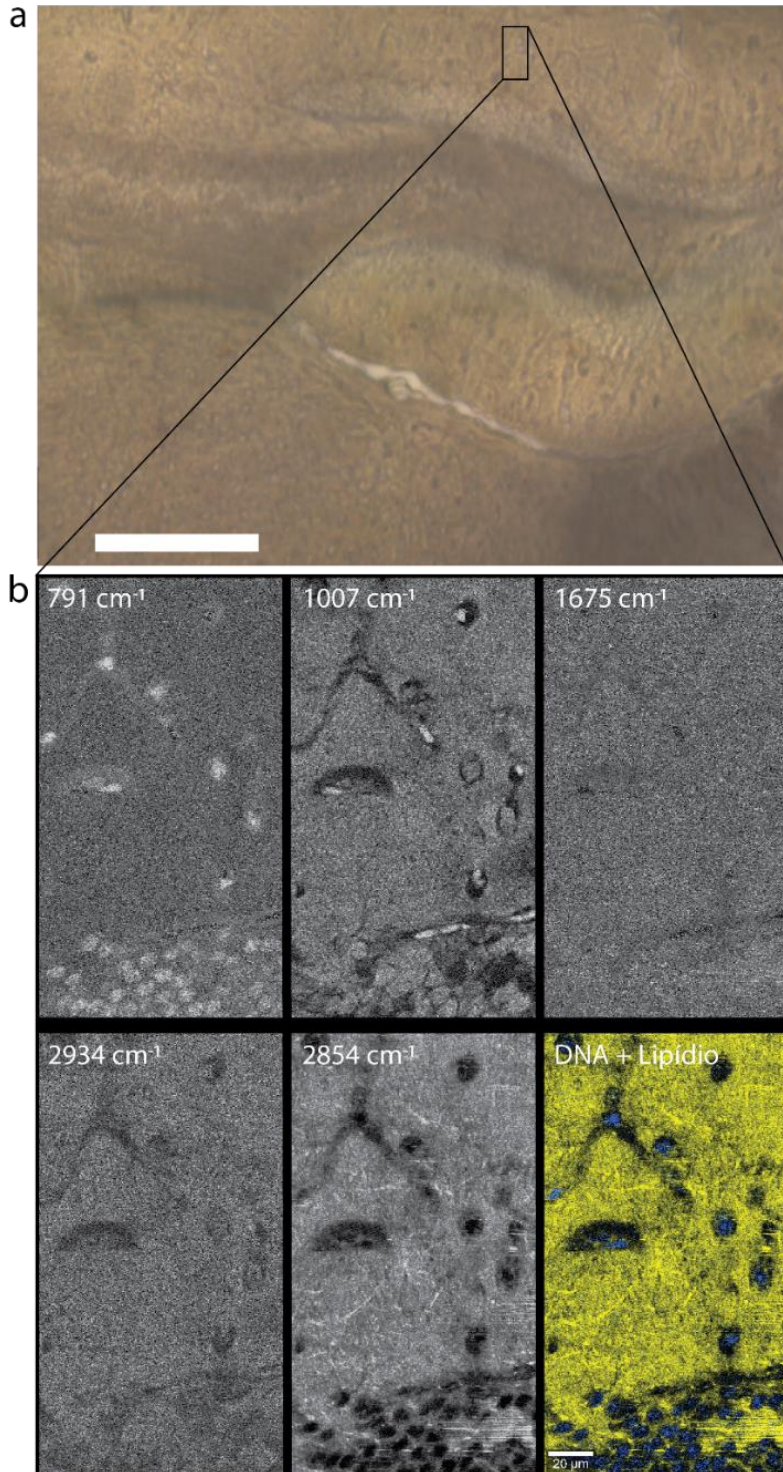


FIGURA 32. Varredura Raman em animais controle de 12 meses

Imagens de hiperespectro mostrando o mapa bioquímico em corte de cérebro Ctrl. (a) Imagem de campo claro mostrando a região do hipocampo analisada destacada por um retângulo. (b) Distribuição das frequências Raman no tecido: 792 cm^{-1} (DNA), 1007 cm^{-1} (fenilalanina), 1675 cm^{-1} (amida I f- β), 2850 cm^{-1} ($\text{CH}_2^{\text{lipídio}}$), e sobreposição de 792 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} (DNA e lipídio). Imagens WITec foram produzidas a partir da seleção de filtro para cada região discriminada na figura usando software Witec Project 5.0. Varreduras feitas com objetiva de 60x de imersão em óleo, NA 1,4. Resolução $\sim 350\text{ nm}$. Barra de escala em (a) $250\text{ }\mu\text{m}$

4.4.4 Glia e Placa amiloide

A relação da neuroinflamação com a DA foi primeiro relatada por Alois Alzheimer que observou células da glia próximas da placa neurítica (**FIGURA 33**). Vários trabalhos mostram que a deposição de β A ativa células da glia para promoverem a degradação desse acumulado de peptídeo [83], [237]–[241]. As microglias são monócitos residentes do SNC e as principais responsáveis pela remoção dos oligômeros e fibrilas de β A. Estímulos patogênicos, debris ou injúria no tecido tornam as microglias ativadas, traduzindo em fenótipo diferenciado envolvendo proliferação, aumento de fagocitose, produção de citocinas proinflamatórias além de mudança na polarização e hipertrofia [242].

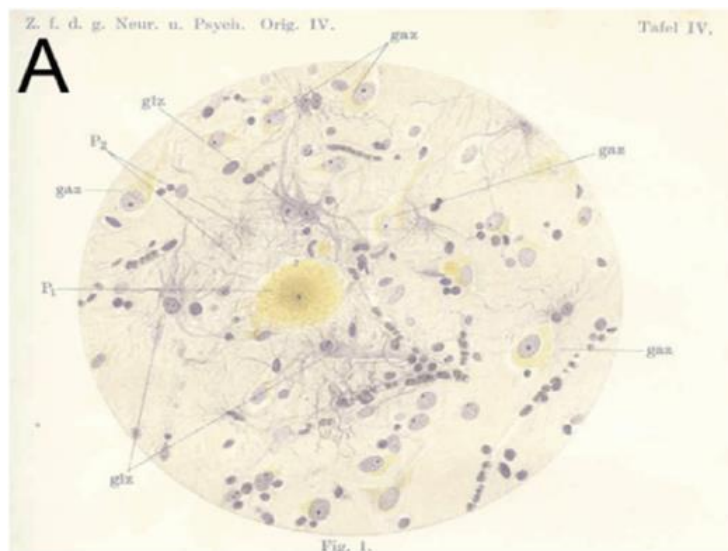


FIGURA 33. Células da glia associadas à placa amiloide em desenho de Alois Alzheimer

Núcleo da placa (P₁), circundado por células da glia ativadas (glz). Adaptado de Rodríguez-Arellano et al. Neuroscience, 2016.

Também na DA, as microglias têm um papel de neuroproteção, participando ativamente na remoção de microagregados de β A [81], [82], [243]. Parece haver uma relação entre o tamanho da placa e a quantidade de microglias ao redor dessa placa. Em córtex humano foi observado aumento de microglias em função do

tamanho da placa amiloide [241], entretanto, trabalhos em camundongos mostram que em animais senis (24 meses) há uma diminuição da quantidade de microglias ao redor da placa [244]. Estudo recente mostra que as microglias formam uma barreira física que visa conter a expansão da placa [244]. Entretanto, a resposta imune das microglias pode gerar neurodegeneração. Spangenberg et al., (2016) demonstraram que ao se depletar micróglias em camundongos 5xfAD, não houve alteração nos níveis de deposição de β A, e houve redução de perda neuronal e redução de danos aos dendritos e axônios [245]. O estudo da relação de microglia e neuroproteção no Alzheimer ainda é muito contraditório [238], [246].

A outra célula da glia que se relaciona com a DA é o astrócito. Essas células têm importante papel no tecido neuronal, seus processos recobrem as sinapses, atuam no transporte de metabólitos, íons, neurotransmissores e regulam a homeostase do fluído intersticial [247], [248]. Os astrócitos também se apresentam reativos em contato com região de placa amiloide, sofrendo alterações morfológicas apresentando atrofia, além da produção de fatores pró-inflamatórios [83]. Diferentemente das microglias, parece que não há relação entre quantidade de astrócitos e tamanho da placa [241]. Entretanto, eles parecem cumprir um papel protetivo e se relacionam mais com a proteção dos neurônios no entorno da placa. Os neurônios que se encontram próximos da placa sofrem distrofia dos dendritos e axônios (neuritos), e os astrócitos parecem estar envolvidos na proteção desses. Esses neurônios apresentam neuritos distróficos, caracterizando-se morfológicamente por uma massa disforme de lipídio ao redor da placa [72], [249]. Esse quadro está relacionado ao processo de neurodegeneração dos neurônios. Os astrócitos reativos envolvem e podem digerir neuritos distróficos pré-sinápticos [250]. Um experimento *in vitro* mostrou que os astrócitos quando em contato com oligômeros de β A tornam-se reativos, aumentam a densidade sináptica e reduzem a ligação dos oligômeros com as sinapses, diminuindo assim a perda sináptica [248].

Quando observamos as vibrações de DNA (792 cm^{-1}) notamos núcleos de células ao redor da placa amiloide (**FIGURA 29, 30, 34**). Interessante observar que na região do giro dentado (onde se encontram vários núcleos de neurônios) é

possível perceber a diferença de intensidade e morfologia entre núcleos próximos à placa em relação aos neurônios do giro dentado (**FIGURA 34**).

Em recente trabalho, Dessai et al. (2019) usaram espectroscopia Raman estimulada (CARS) para visualização e diferenciação de microglia normal e ativada, baseado no perfil metabólico refletido nas frequências de proteína e lipídio [251]. Considera-se que há células da glia em todo o tecido neuronal, mas só foi possível visualizá-las próximo à placa, supomos que esse aumento de intensidade do núcleo se correlacione com o fenótipo ativado da microglia e ou astrócitos reativos. Mais experimentos precisam ser feitos para confirmar essa hipótese. Com base na literatura, é crível que esses núcleos menores e mais intensos ao redor da

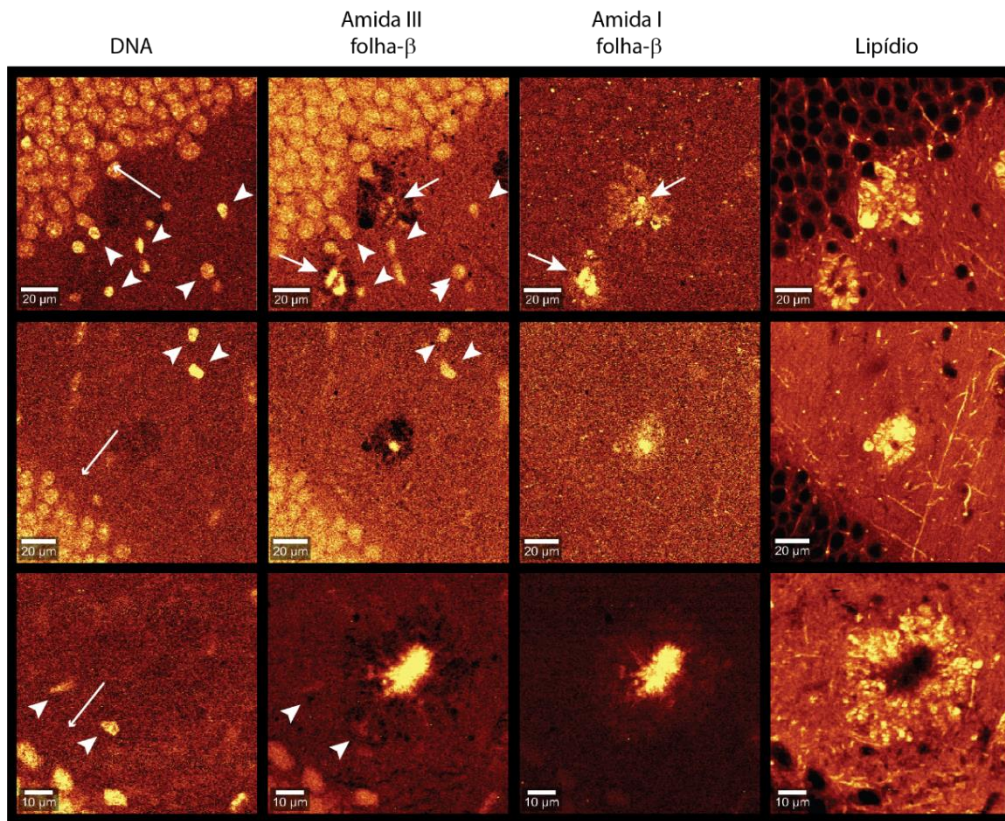


FIGURA 34. Caracterização de placa amiloide por Varredura Raman – Frequências de DNA

Imagens de hiperespectro mostrando o mapa bioquímico de DNA segundo a vibração de ligação de fosfodiéster ($\sim 792\text{ cm}^{-1}$), de proteínas pela vibração de AmI ($1675/10\text{ cm}^{-1}$) & AmIII ($1233/60\text{ cm}^{-1}$) e lipídio (2850 cm^{-1}). Cabeça de seta indicando núcleos celulares mais intensos e próximos da placa amiloide. Setas maiores indicando placa amiloide. Setas menores indicando núcleos de neurônios do giro dentado. Camundongos de 12 meses. Imagens WITec foram produzidas a partir da seleção de filtro para cada região discriminada na figura usando software Witec Project 5.0. Varreduras feitas com objetiva de 60x de imersão em óleo, NA 1,4. Resolução $\sim 350\text{ nm}$.

placa sejam as células da glia. Isso foi confirmado por imunomarcação para microglia e astrócio e será apresentado mais adiante.

Os resultados apresentados sugerem ser possível identificar, através da ER, vários fenômenos celulares que ocorrem no tecido na DA. Resultado similar só seria possível por imunofluorescência e marcação com vários anticorpos (e outros marcadores) diferentes para cada célula ou estrutura. Ainda, a vibração de AmIII descreve igualmente os núcleos celulares, além da placa amiloide. Interessante notar que essa frequência mostra apenas o “núcleo denso” da placa, enquanto AmI mostra a placa com seus limites maiores e uma região periférica mais difusa (**FIGURA 34**). Isso talvez se deva ao fato de a frequência de AmI estar sobreposta às vibrações de lipídio. Há uma incerteza de $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$ que é inerente ao equipamento e grade de difração usada, por isso, exceto para AmIII, para a qual o intervalo é de 60 cm^{-1} , todas as demais imagens foram geradas com um intervalo de 10 cm^{-1} . Assim, AmI é representada pela frequência $1675/10 \text{ cm}^{-1}$. Entretanto, o tecido biológico é composto por um mosaico de moléculas que compartilham os mesmos átomos, majoritariamente C, H, N, O. Todavia, colesterol e seus ésteres, bem como ácido graxo, apresentam vibração em 1670 cm^{-1} e 1674 cm^{-1} [155], [216]. Desse modo, esse fundo difuso observado na imagem de AmI pode ser em função da sobreposição dessas frequências.

Na **FIGURA 35** são apresentadas algumas varreduras para ilustrar a caracterização da placa amiloide por espectroscopia Raman espontânea, com a representação das 3 principais biomoléculas: DNA, proteína e lipídio. A seguir, iremos tratar da caracterização via espectroscopia Raman estimulada. Lembrando que a importância de se utilizar o processo estimulado é porque sua intensidade é várias ordens de grandeza superior ao processo espontâneo, fator essencial para que o método diagnóstico dure um tempo aceitável para o paciente em análise.

Os resultados obtidos mostram que fomos capazes de estabelecer um protocolo para caracterização de placa amiloide no tecido de cérebro e diferenciar as estruturas, identificando, de forma inquévoca, placas amiloides. A partir desse subsídio, continuamos o processo de caracterização por Espectroscopia Raman estimulada.

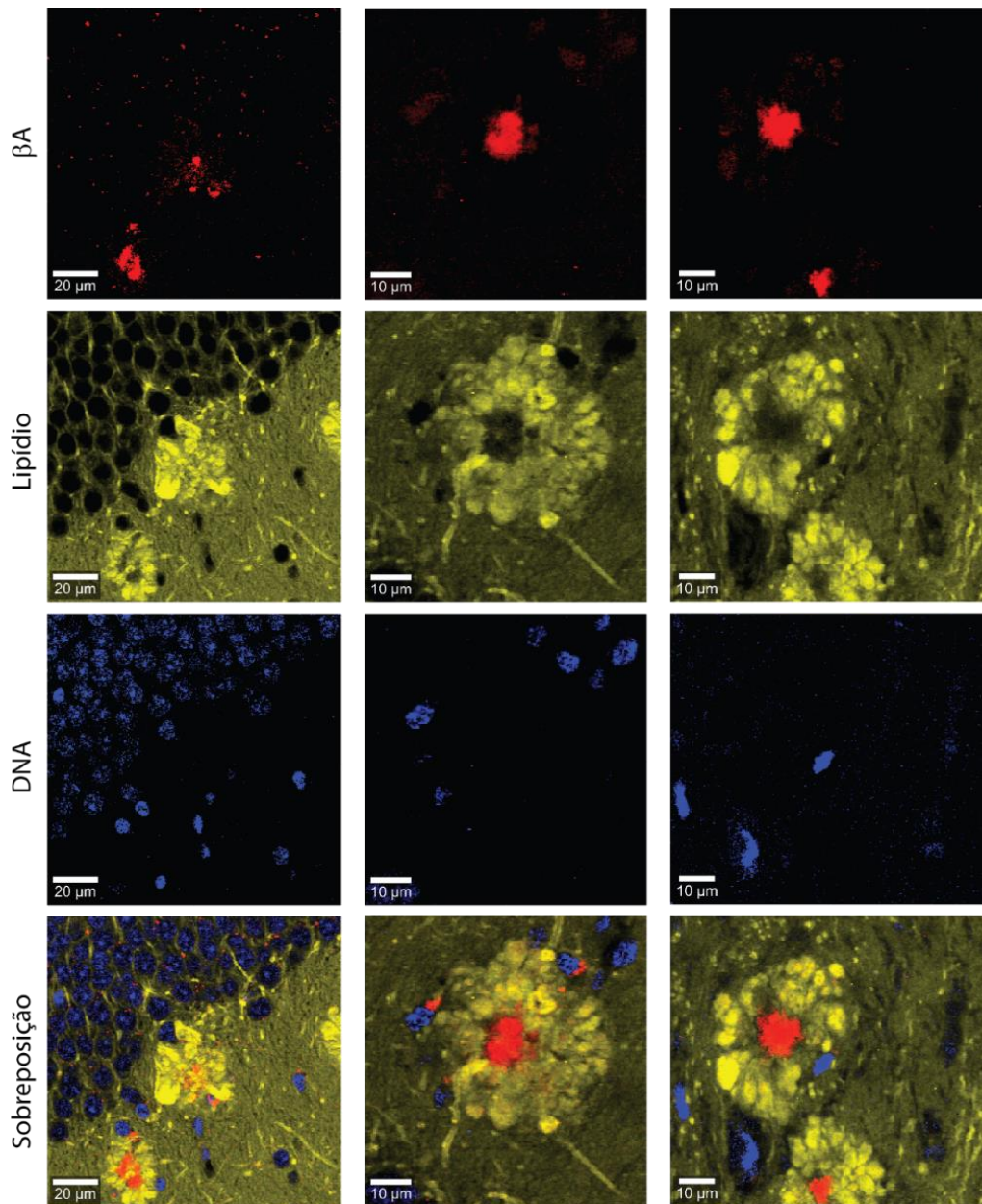


FIGURA 35. Imagem Hiperespectral de região de placa amiloide

Em azul, DNA (792 cm^{-1}); vermelho, placa amiloide (1675 cm^{-1}); amarelo, lipídio (2850 cm^{-1}). Colorido artificialmente.

4.5 Identificação de placas amiloides, *ex vivo*, por espectroscopia Raman estimulada

Quando não se conhece a amostra, realiza-se uma varredura de hiperespectro com o intuito de determinar a assinatura espectral da mesma. De posse das frequências presentes na amostra e do que elas representam, é possível usar a espectroscopia Raman estimulada para se produzir imagens de forma mais rápida, de uma determinada molécula na amostra. Uma vez que conseguimos caracterizar as placas amiloides em tecido de camundongo transgênico usando espectroscopia Raman espontânea, passamos para outra etapa, que é identificar as mesmas placas por espectroscopia Raman estimulada.

Como mencionado anteriormente (Cap.2), a espectroscopia Raman estimulada e a espontânea, esta última podendo ser *CARS* ou *SRS*, nos permitem obter imagens de molécula ou estrutura sem necessidade de marcação. Porém, para se obter uma varredura de alguns micrômetros de um tecido usando a espectroscopia Raman espontânea, são necessárias várias horas de medida (a depender da resolução desejada), enquanto que com a espectroscopia Raman estimulada, gasta-se fração de segundos para se obter a imagem da distribuição de uma determinada molécula na amostra, com resolução temporal suficiente para visualizar o fluxo sanguíneo [176], mantendo-se a mesma resolução espacial da espectroscopia Raman espontânea (**FIGURA 36**). Isso torna a espectroscopia Raman estimulada uma promessa para uso em estudos de biologia e para medicina, incluindo diagnóstico intraocular. Entretanto, a caracterização do tecido via

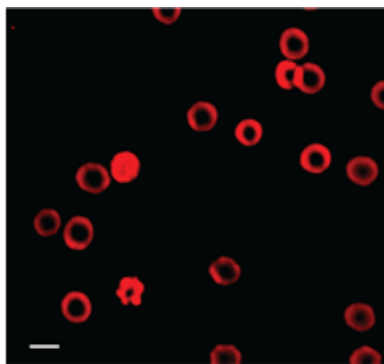


FIGURA 36. Imagem SRS de Células sanguíneas

Imagem de hemácias a partir da vibração de $\text{CH}_2^{\text{lipidio/proteina}}$ (2880cm^{-1}). Barra de escala $10\ \mu\text{m}$. Objetiva 20x, NA 0.75. Fonte: LabNS.

espectroscopia Raman espontânea é indispensável, pois assim é possível fazer um mapeamento bioquímico, identificar a distribuição espacial de todas as moléculas, e conhecer a composição bioquímica do tecido. A partir daí, é seguro escolher uma determinada vibração que seja representativa da estrutura que se deseja visualizar por espectroscopia Raman estimulada.

Uma vez identificadas as assinaturas espectrais de interesse, usamos o *SRS* para aquisição de imagens dessas assinaturas espectrais, individualmente. Em um primeiro momento, para toda placa visualizada e caracterizada por espectroscopia Raman estimulada, foi feita varredura de hiperespectro para confirmação. A seguir mostraremos alguns resultados representativos. Na sequência, iremos apresentar apenas os resultados de espectroscopia Raman estimulada.

As amostras de cérebro de camundongos Tg foram usadas procedendo o seguinte fluxo de experimento:



Serão mostrados alguns resultados compreendendo as etapas do fluxo acima, e a partir da **FIGURA 40** focaremos apenas nos resultados de *SRS*. Conforme fica nítido na **FIGURA 37**, o *SRS* apresentou melhor resolução para caracterização do tecido e da placa amiloide quando comparado ao *CARS*.

O *SRS* apresenta melhor relação sinal/ruído, e em função de outras limitações técnicas, fizemos a caracterização usando essa técnica. A seguir mostraremos algumas imagens de placas amiloides, validadas por varreduras de hiperespectro. Como explicado no Cap 3, a Espectroscopia Raman estimulada usa dois feixes de laser: *pump*, provoca o fenômeno espontâneo, e um segundo feixe de laser – Stokes – estimula a resposta anti-Stokes da amostra. Por ser ordens de magnitude mais intenso que a espectroscopia Raman espontânea, a espectroscopia Raman estimulada permite acessar moléculas e estruturas no tecido de forma muito rápida,

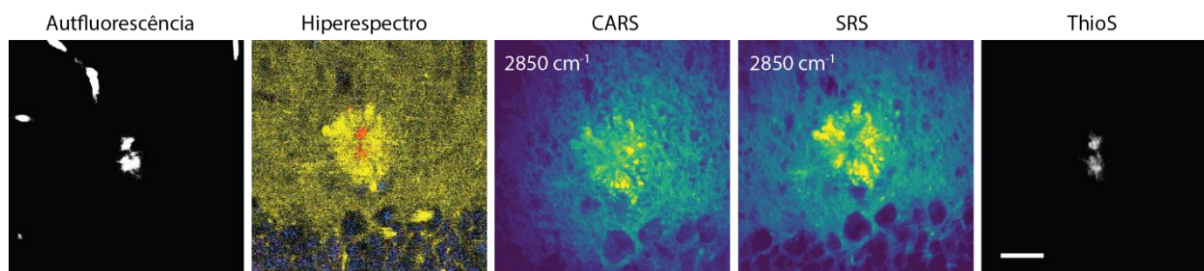
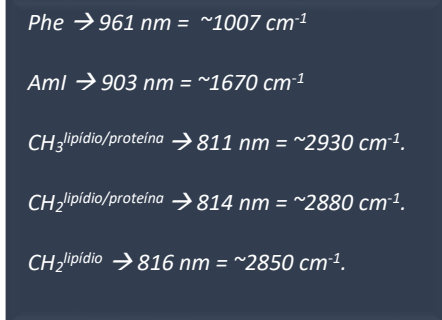


FIGURA 37. Imagem Multimodal

Microscopia EDF mostrando autofluorescência da placa amiloide e de vasos sanguíneos. Imagem composta de hiperespectro mostrando DNA (azul), placa (vermelho), lipídio (amarelo). Imagem CARS e SRS de lipídio. Marcação de placa com ThioS visualizada por microscopia por dois fótons. Barra de escala 20 μm . Colorido artificialmente.

específica e com alta resolução espacial, além de maior penetração em função de se usar o infravermelho.

Conforme apresentado e discutido acima, os comprimentos de onda para o laser *pump* que nos interessam (961 nm, 903 nm, 811 nm, 814 nm, 816 nm), e seus respectivos deslocamento Raman (1007 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} , 2930 cm^{-1}) em relação ao laser *probe* em 1064 nm estão aqui sumarizados:



Na **FIGURA 38** temos na linha superior a imagem de hiperespectro de uma placa amiloide mostrando o núcleo protéico rico em βA com lipídio formando uma densa borda no entorno da placa. O mesmo pode ser observado na imagem de *SRS*.

Há uma diferença em relação à área e à morfologia da placa amiloide entre as duas técnicas Raman, isso provavelmente se deve à diferença experimental relacionada à confocalidade das técnicas e do sistema.

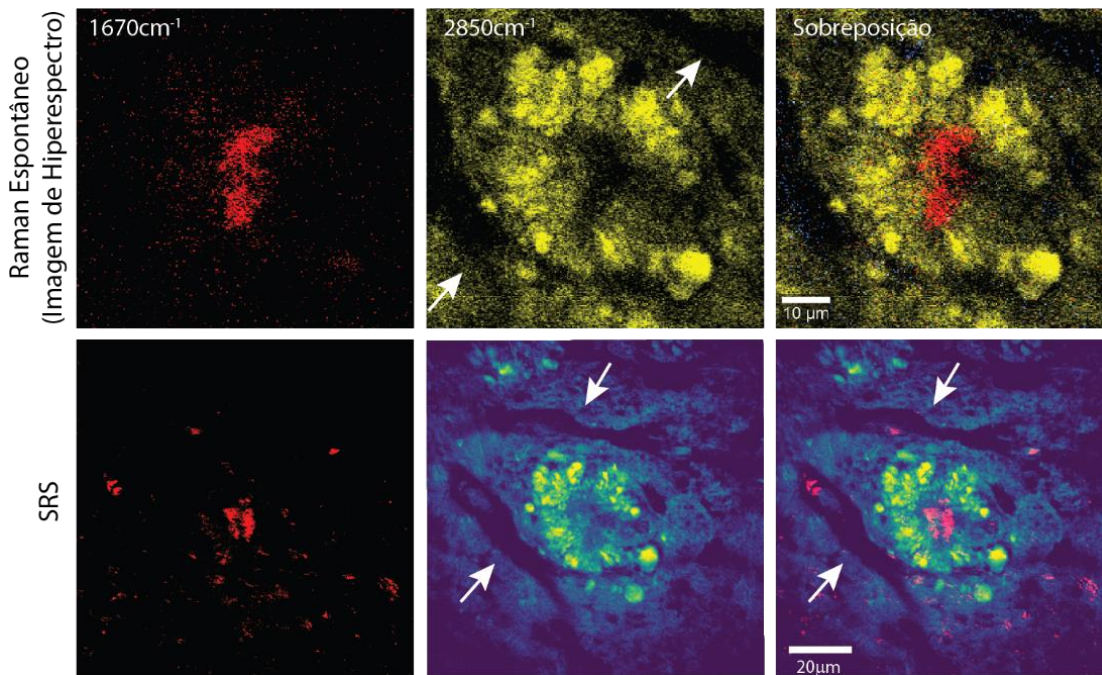


FIGURA 38. Espectroscopia Raman espontânea x Espectroscopia Raman estimulada

Na linha superior está exposta imagem de hiperespectro de placa (vermelho), lipídio (amarelo) e sobreposição das duas imagens. Imagem SRS correspondente na linha de baixo. É possível ver vasos sanguíneos (setas). O SRS mostra o β A dentro e na margem dos vasos e fora do halo lipídico. Colorido artificialmente. Imagem SRS de placa foi adquirida com 50 mW de potência e 60 acumulações, imagem de lipídio, 40 mW e 10 acumulações. Objetiva de 60x de imersão em óleo, NA 1,4. Colorido artificialmente.

Na **FIGURA 39**, mostramos a identificação de placas amiloides pela AmI e Fen por SRS, reproduzindo o resultado de hiperespectro. Nota-se que também por SRS, mesmo nas vibrações de CH relacionadas à lipídio/proteína é possível identificar o núcleo protéico rodeado por uma borda densa de lipídio. Nas colunas laterais estão expostas as imagens de hiperespectros. Quando observamos nas medidas de espectroscopia Raman espontânea a distribuição espacial de Fen, vemos que ela está difusa por todo o tecido - como esperado - e com alta

concentração na placa. O contraste é maior, entretanto, quando observada a distribuição de AmI de $f\text{-}\beta$. Isso é igualmente verdadeiro para o *SRS*. Entretanto, em função da baixa eficiência da CCD do sistema *SRS* e do pico de Fen e AmI serem bem menos intensos que os de CH_2 e CH_3 , a aquisição de imagem nesse faixa de espectro é muito demorada, sendo necessárias várias acumulações (de 30 à 90), maior tempo de exposição e maior potência, levando vários minutos. Já as imagens de CH_2 e CH_3 foram adquiridas com poucos segundos. Foram feitas aquisições com 1, 3, 5, 10 vezes para essas frequências, o que resulta em um tempo de aquisição curto, de aproximadamente 5 à 50 segundos, isso usando a melhor resolução do sistema. Na **FIGURA 40** mostramos com maior detalhe a imagem de placa amiloide e a borda lipídica do entorno por *SRS*, com a posterior marcação por ThioS, comprovando que a imagem formada por 1670 cm^{-1} é de placa amiloide.

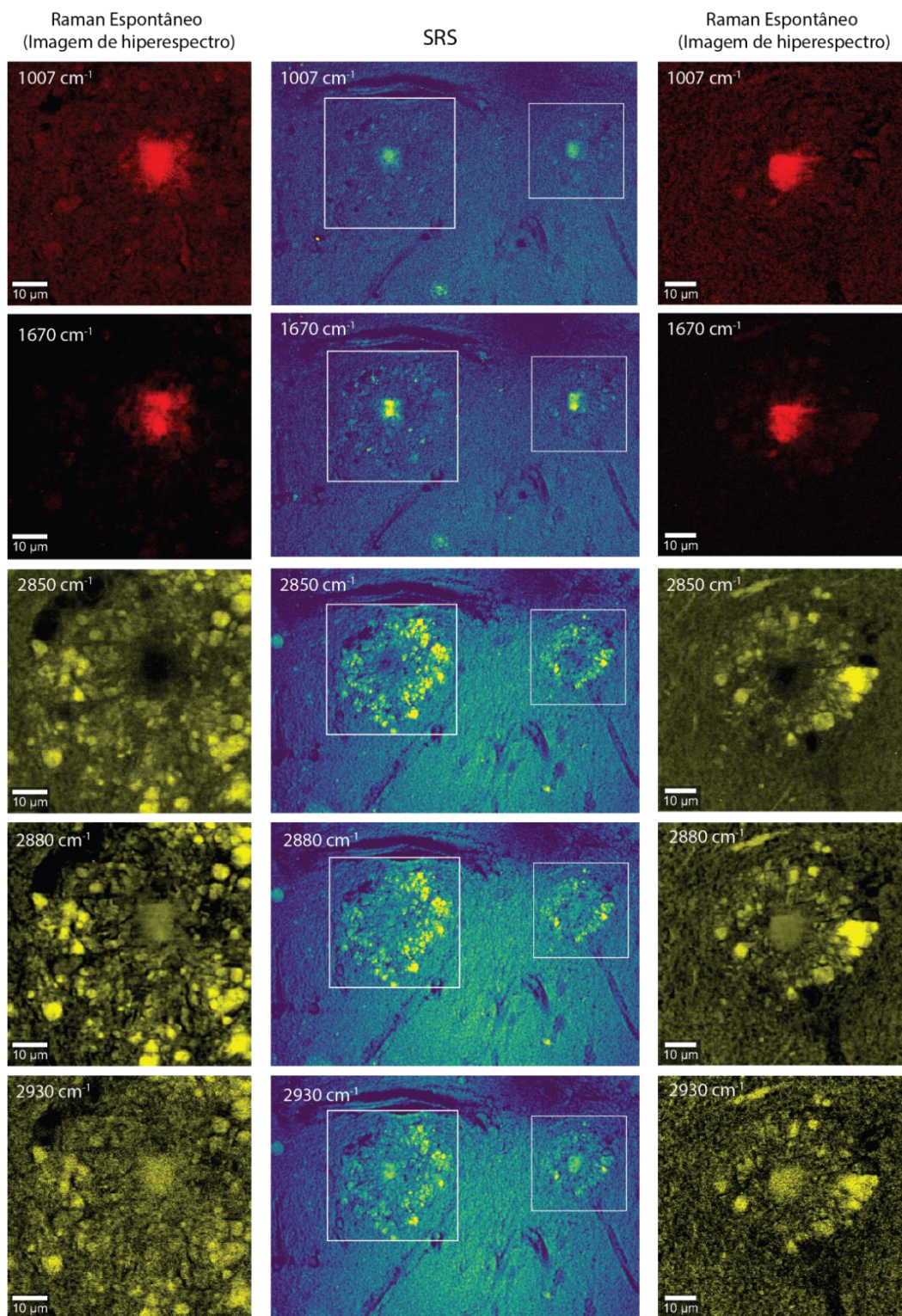


FIGURA 39. Espectroscopia Raman espontânea x Espectroscopia Raman estimulada

Colunas laterais mostrando imagem de varredura de placas amiloides e coluna central mostrando imagem de SRS. Fenilalanina (1007 cm^{-1}), placa amiloide (A β 1670 cm^{-1}), $\text{CH}_2^{\text{lipídio}}$ (2850 cm^{-1}), $\text{CH}_2^{\text{lipídio/proteína}}$ (2880 cm^{-1}), $\text{CH}_3^{\text{lipídio/proteína}}$ (2930 cm^{-1}). Imagens de A β e fenilalanina foram adquiridas com 50 mW de potência e 60 acumulações. Imagens de $\text{CH}_2^{\text{lipídio}}$, $\text{CH}_2^{\text{lipídio/proteína}}$, 40 mW e 10 acumulações. CH_3 , 40 mW e 5 acumulações. Corolido artificialmente. Objetiva de 60x de imersão em óleo, NA 1,4.

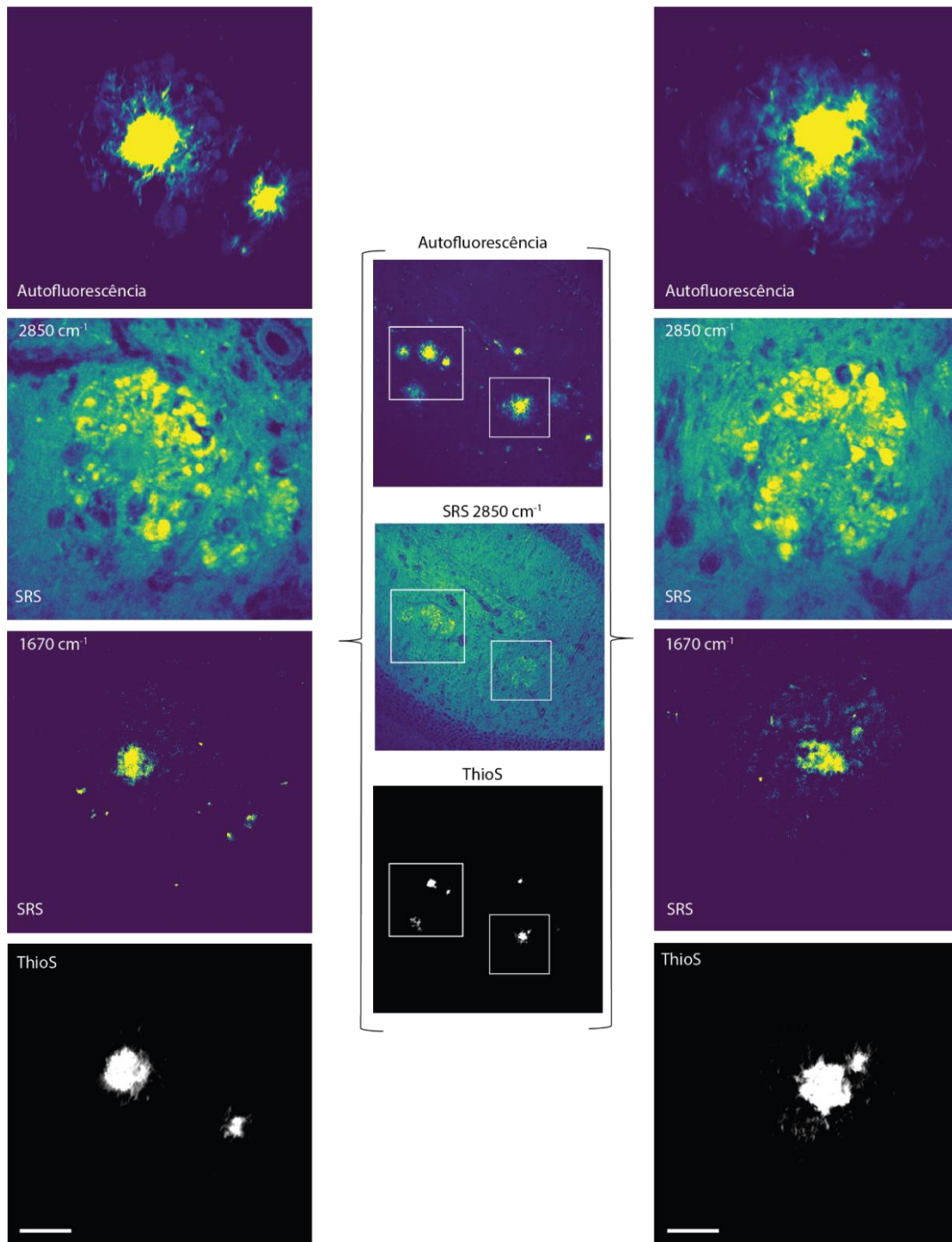


FIGURA 40. Imagem SRS de placas amiloides

As placas amiloides podem ser identificadas previamente por autofluorescência no comprimento de onda de 830 nm. Imagens por SRS de placas amiloides em corte de cérebro de camundongos transgênicos com 12 meses de idade. Placas amiloides visualizadas por SRS pela frequência de 1670 cm^{-1} mostrando o núcleo denso e pontos menores de placas ao redor. Borda lipídica (2850 cm^{-1}). ThioS marcando as placas amiloides. Objetiva de 60x à óleo. Imagens de 1670 cm^{-1} foram adquiridas com 50 mW de potência e 60 acumulações, imagens de 2850 cm^{-1} , 40 mW e 10 acumulações. Imagem de dois fótons de marcação por ThioS foram adquiridas com 5 mW e 5 acumulações. Objetiva de 60x de imersão em óleo, NA 1,4.

Nicole et al. (1997) demonstraram a efetividade de se diferenciar tecido tumoral de tecido sadio pela relação entre as frequências 2850 cm^{-1} e 2930 cm^{-1} [252]. Xie et al. (2013) desenvolveram um protocolo usando também apenas essas duas vibrações para diagnóstico histológico de câncer por *SRS* [33], e isso se transformou no primeiro equipamento comercial para diagnóstico histológico por *SRS* (*Stimulated Raman histology - SRH*) (ver nota de rodapé 20 na página 42).

Neste nosso trabalho, para aquisição de imagens pelo *SRS* de placas amiloides através das frequências de AmI e de Fen, foram necessárias no mínimo 30 acumulações que resultam em vários minutos de aquisição (cada frame leva 5 segundos nessa configuração). *SRS* dessas frequências demandou também alta potência, em torno de 50 mW. Isso porque o pico de AmI e Fen são menos intensos, quando comparados aos picos de CH na região de frequências mais altas, no intervalo de $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, conforme pode ser observado nos gráficos das **FIGURAS 25 e 27**, e porque a eficiência do nosso sistema é menor nessa região do espectro. Já a aquisição de imagens usando frequências de CH são mais rápidas. Sendo possível adquiri-las com alta resolução e contraste em apenas 3 segundos e menor potência, 40 mW. Como as imagens formadas pelas frequências de $\text{CH}_3^{\text{lipídio/proteína}}$ (2930 cm^{-1}), $\text{CH}_2^{\text{lipídio/proteína}}$ (2880 cm^{-1}) mostram, além da borda lipídica, um núcleo protéico, conferimos se era possível obter a imagem da placa amiloide através do processamento de imagens dessas frequências (CH₂ e CH₃). Para tanto, submetemos as imagens de *SRS* da **FIGURA 39** a um simples processamento usando o software *imageJ*, com o intuito de obter uma imagem nítida da placa amiloide.

Foram feitas as seguintes operações:

$$\begin{aligned} &\text{CH}_2^{\text{lipídio/proteína}} - \text{CH}_2^{\text{lipídio}} = \text{Resultado I} \\ &\text{CH}_3^{\text{lipídio/proteína}} - \text{CH}_2^{\text{lipídio}} = \text{Resultado II} \\ &\text{Resultado I} \wedge \text{Resultado II} \end{aligned}$$

onde o símbolo “^” equivale à “intersecção”, equivalente à operação “AND”.

Nas **FIGURA 41** podemos observar o resultado do processamento de imagens de CH. De fato, as imagens adquiridas com as vibrações $\text{CH}_2^{\text{lipídio/proteína}}$ e $\text{CH}_3^{\text{lipídio/proteína}}$, quando subtraídas a contribuição de $\text{CH}_2^{\text{lipídio}}$, revelam o núcleo protéico correspondente à placa amiloide. E a intersecção dos resultados realça ainda mais o núcleo da placa.

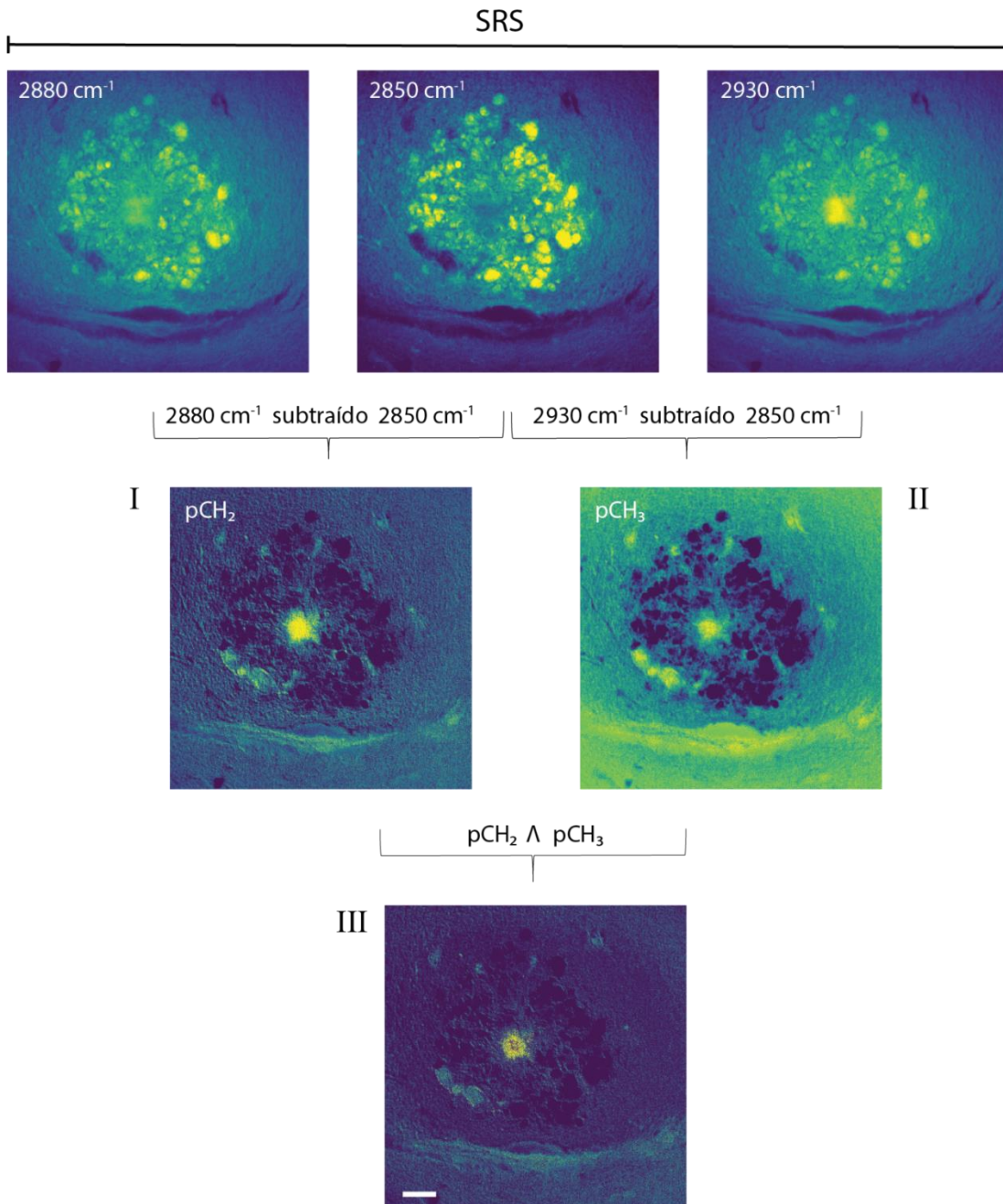


FIGURA 41. Imagem de placa amiloide por SRS

Imagem SRS de placa amiloide pela vibração de CH. Pelo resultado da subtração de CH₂^{lipídio} (2850 cm⁻¹) de CH₂^{lipídio/proteína} (2880 cm⁻¹) interseção com o resultado da subtração de CH₂^{lipídio} (2850 cm⁻¹) de CH₃^{lipídio/proteína} (2930 cm⁻¹), se obtém uma imagem do núcleo denso da placa amiloide. Imagens adquiridas com 40 mW e 10 acumulações. 2930 cm⁻¹, 40 mW e 5 acumulações. Objetiva de 60x de imersão em óleo, NA 1,4. Barra de escala 20µm.

Com isso, concluímos que as frequências de CH₂ e CH₃ são mais indicadas para identificação de placa amiloide por espectroscopia Raman estimulada. As imagens de CH₂^{lipídio/proteína} (2880 cm⁻¹) e CH₂^{lipídio} (2850 cm⁻¹) foram preferencialmente adquiridas com 10 acumulações, totalizando em média, 10 segundos. A frequência de CH₃^{lipídio/proteína} (2930 cm⁻¹), por ser mais intensa, possibilitou aquisição de imagens com apenas 5 acumulações. Em função disso, fizemos mais algumas aquisições usando apenas 2930 cm⁻¹ e 2850 cm⁻¹ e procedemos com o processamento de imagens. Os resultados podem ser vistos nas **FIGURAS 42 e 43**. Um compilado de imagens submetidas a esse processamento estão apresentadas nas **FIGURAS 44a e b**.

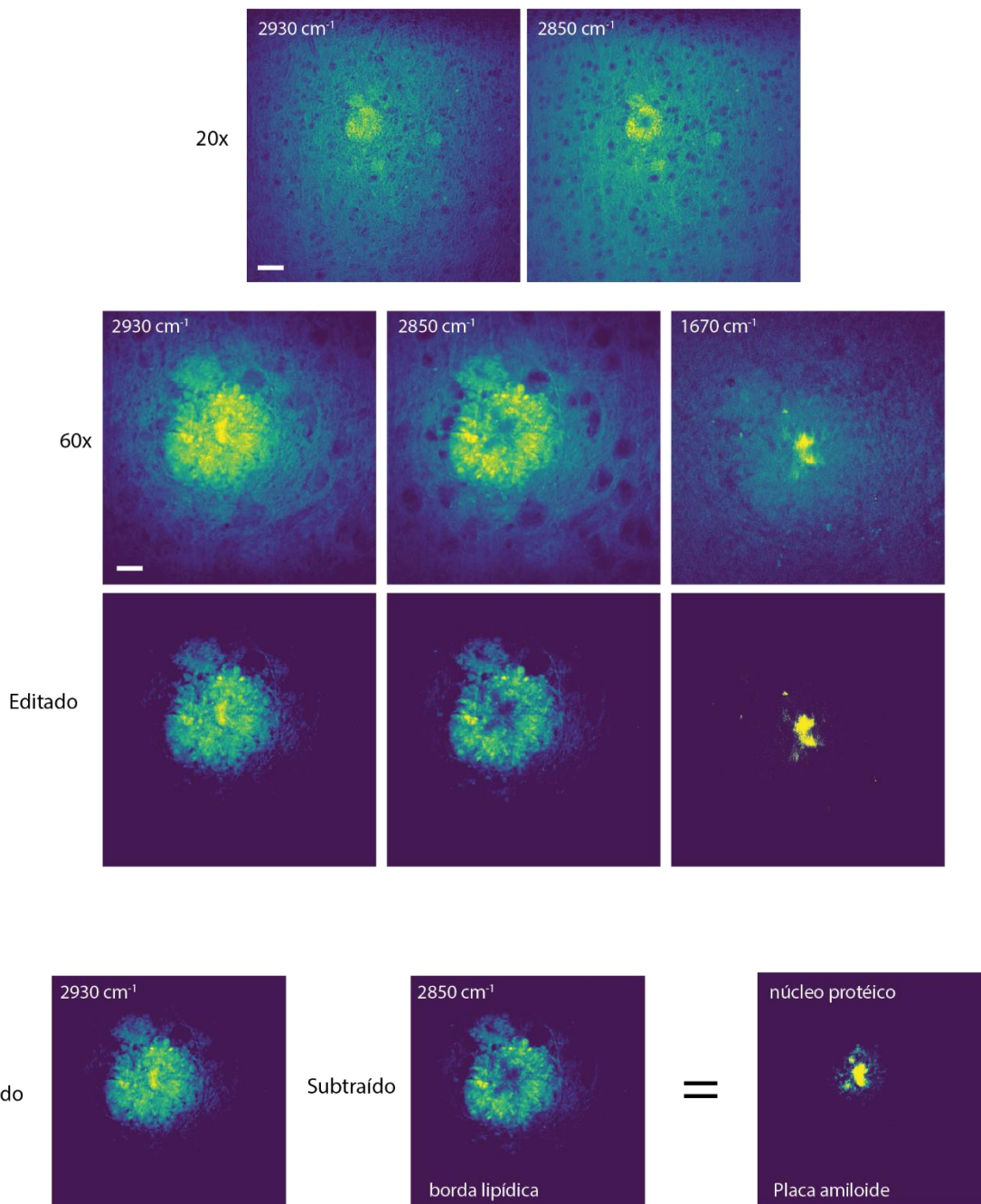


FIGURA 42. Imagem de placa amiloide por SRS

Imagem SRS de placa amiloide pela vibração de CH. Após subtração de CH₂^{lipídio} (2850 cm⁻¹) de CH₃^{lipídio/proteína} (2930 cm⁻¹), se obtém uma imagem do núcleo denso da placa amiloide. Imagem de 1670 cm⁻¹ foi adquirida com 50 mW de potência e 60 acumulações. Imagens de 2850 cm⁻¹, 40 mW e 10 acumulações. 2930 cm⁻¹, 40 mW e 5 acumulações. Objetiva 20x (barras de escala 30µm). Objetiva de 60x de imersão em óleo, NA 1,4. Barras de escala 10µm.

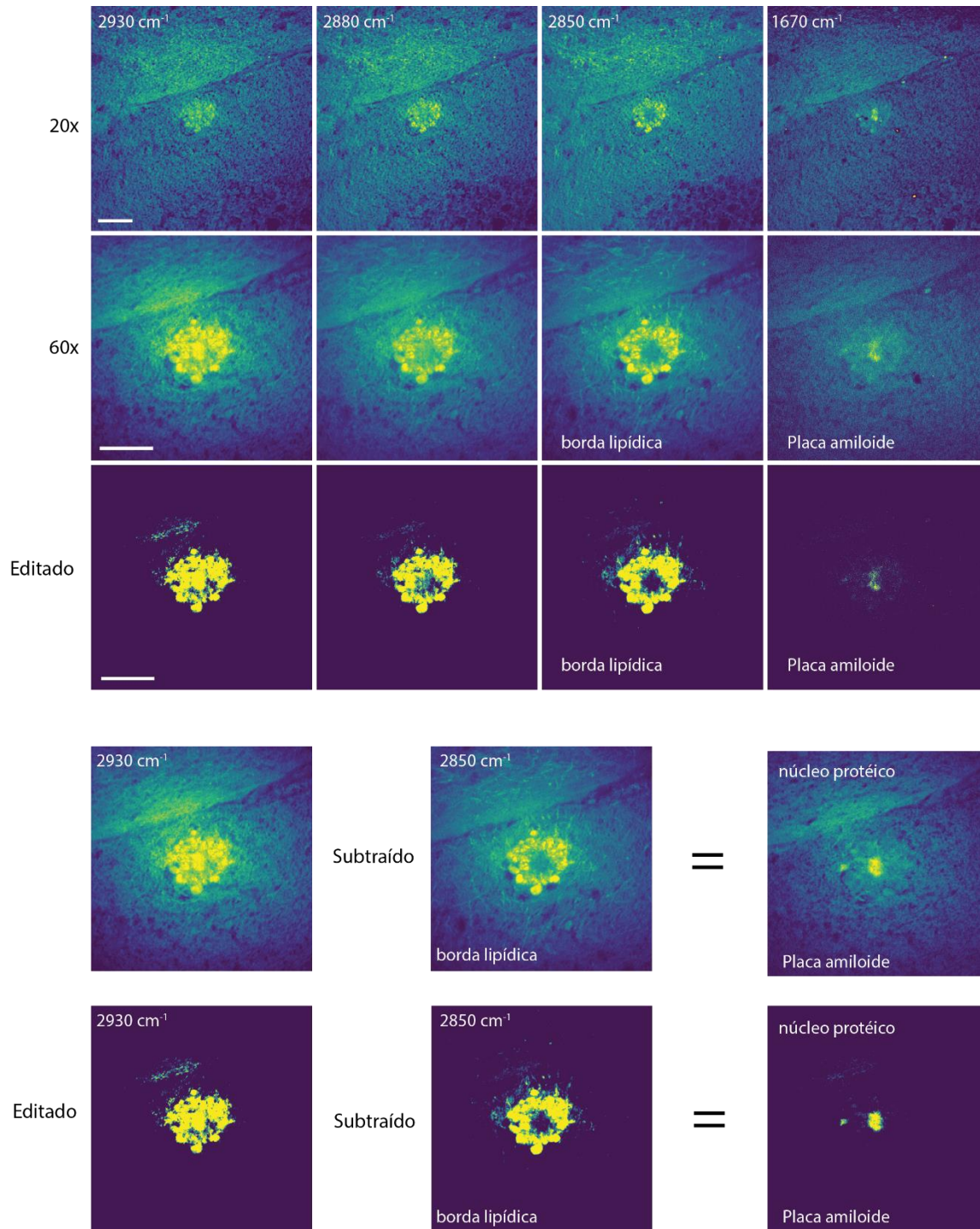


FIGURA 43. Imagem de placa amiloide por SRS

Imagem SRS de placa amiloide pela vibração CH. Após subtração de $\text{CH}_2^{\text{lipídico}}$ (2850 cm^{-1}) de $\text{CH}_3^{\text{lipídico/proteína}}$ (2930 cm^{-1}), se obtém uma imagem do núcleo denso da placa amiloide. Imagens de 1670 cm^{-1} foram adquiridas com 50 mW de potência e 60 acumulações. Imagens de 2850 cm^{-1} e 2880 cm^{-1} , 40 mW e 10 acumulações. 2930 cm^{-1} , 40 mW e 5 acumulações. Objetiva 20x e objetiva de 60x de imersão em óleo, NA 1,4. Barra de escala $30 \mu\text{m}$.

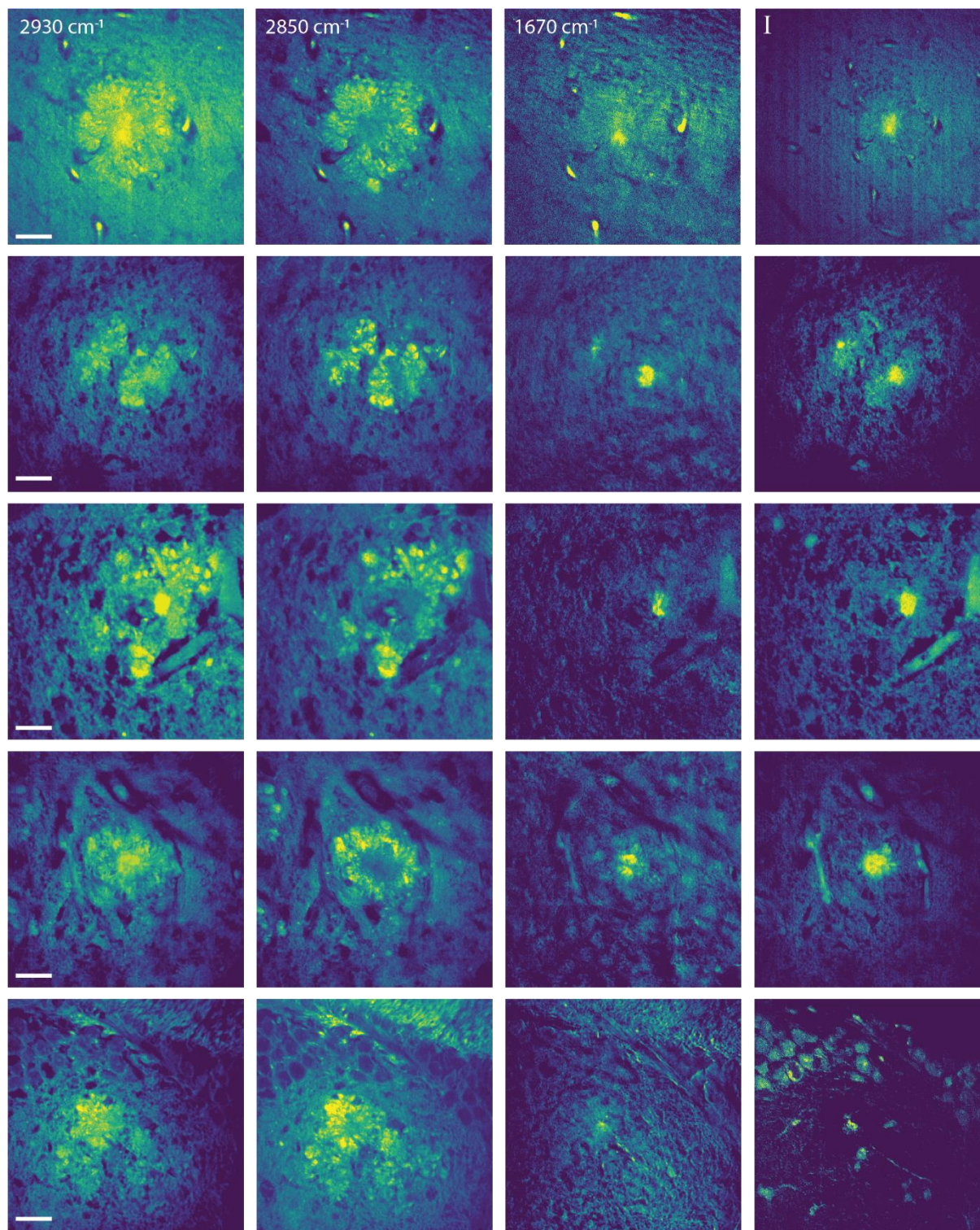


FIGURA 44a. SRS de placas amiloides em camundongos transgênicos de 12 meses

Imagem SRS de placas por AmI e por vibração CH_3 . Após subtração da contribuição de $CH_2^{\text{lípido}}$ (2850 cm^{-1}) da imagem de $CH_3^{\text{lípido/proteína}}$ (2930 cm^{-1}), se obtém uma imagem do núcleo denso da placa amiloide (coluna I). Imagens de 1670 cm^{-1} foram adquiridas com 50 mW de potência e 60 acumulações. Imagens de 2850 cm^{-1} , 40 mW e 10 acumulações. 2930 cm^{-1} , 40 mW e 5 acumulações. Objetiva de 60x de imersão em óleo, NA 1,4. Barra de escala 20 μm .

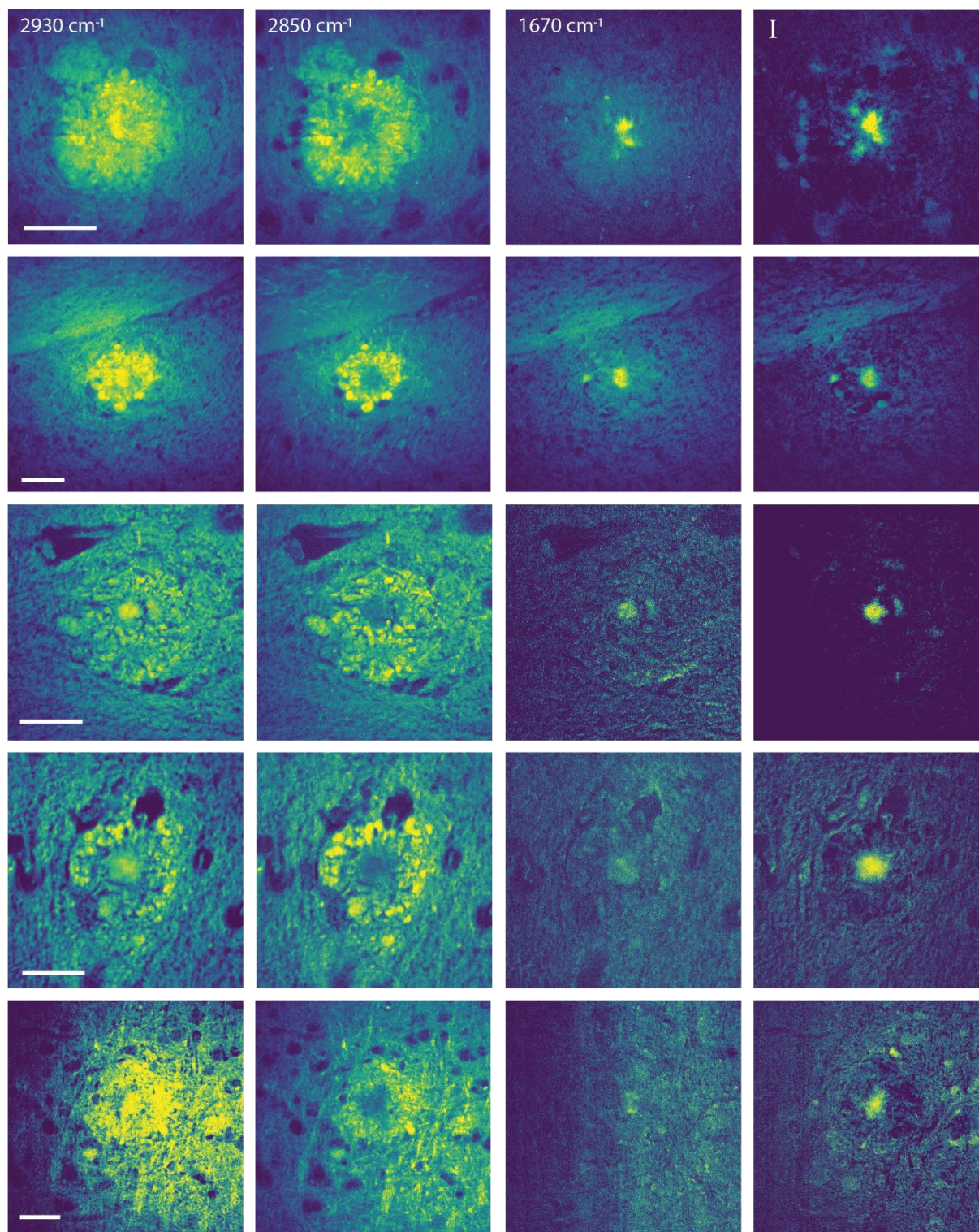


FIGURA 44b. SRS de placas amiloides em camundongos transgênicos de 12 meses

Imagem SRS de placas por AmI e por vibração CH_3 . Após subtração da contribuição de $CH_2^{lipídio}$ (2850 cm^{-1}) da imagem de $CH_3^{lipídio/proteína}$ (2930 cm^{-1}), se obtém uma imagem do núcleo denso da placa amiloide (coluna I). Imagens de 1670 cm^{-1} foram adquiridas com 50 mW de potência e 60 acumulações. Imagens de 2850 cm^{-1} , 40 mW e 10 acumulações. 2930 cm^{-1} , 40 mW e 5 acumulações. Objetiva de 60x de imersão em óleo, NA 1,4. Barra de escala $20\mu\text{m}$.

Conforme nossos resultados mostram, a imagem de placa formada pelas frequências de estiramento de $\text{CH}_2^{\text{lipídio/proteína}}$ (2880 cm^{-1}) e $\text{CH}_3^{\text{lipídio/proteína}}$ (2930 cm^{-1}) descrevem a placa amiloide e a densa borda de lipídio em seu entorno. Essa borda de lipídio é melhor visualizada pelo comprimento de onda do laser de bombeio para $\text{CH}_2^{\text{lipídio}}$ - 2850 cm^{-1} - que apresenta uma imagem negativa do núcleo protéico no centro dessa grande estrutura lipídica. As imagens formadas pelas vibrações $\text{CH}_2\&\text{CH}_3^{\text{lipídio/proteína}}$ refletem maior contribuição proveniente do peptídeo βA do que da vibração proveniente de lipídios, por isso, ao subtraímos a contribuição de lipídios que compõem essas imagens, fica claro o núcleo protéico correspondente à placa amiloide. A correlação desse resultado com o comprimento de onda do laser de bombeio para 1670 cm^{-1} (AmI) prova que as frequências de $\text{CH}_2\&\text{CH}_3^{\text{lipídio/proteína}}$ são efetivas para a identificação de βA no tecido. Essas vibrações (CH) são mais interessantes do ponto de vista de aplicação em diagnóstico, tanto histopatológico quanto *in vivo*, pois são muito mais intensas (ver **FIGURA 24**) e permitem aquisição de imagens em poucos segundos, com potências menores.

Com esses resultados, confirmamos que somos capazes de identificar placa amiloide no tecido Alzheimer usando espectroscopia Raman estimulada, e propomos o uso das frequências de $\text{CH}_2\&\text{CH}_3^{\text{lipídio/proteína}}$ para identificação de placas no tecido, em vez de AmI, ou Fen.

4.6 Estudo de Transversal entre Camundongos 6 e 12 meses

Pela visualização microscópica, observa-se um significativo aumento de placas entre o animal de 12 em relação ao de 6 meses [21]. Como já mencionado anteriormente, esse modelo $\text{APP}_{\text{swe}}\text{PS1}_{\Delta\text{E9}}$ apresenta deposição no cérebro identificável por microscopia, a partir do 5º mês de vida [19].

A capacidade de diferenciar uma doença em fases distintas é uma qualidade buscada em qualquer diagnóstico. Pensando em como as alterações teciduais no cérebro podem correlacionar com diferença no espectro Raman, nós aplicamos a Análise de Componente Principal - *PCA* - nas varreduras de hiperespectro, a fim de diferenciar animais com dois estágios distintos da doença, 6 e 12 meses. Esses

animais Tg com essa diferença de idade correlacionam com uma enorme diferença na quantidade de deposição de placas amiloide e em todas as mudanças teciduais decorrentes disso.

A análise por componente principal tem sido amplamente utilizada em estudos por espectroscopia Raman [212], [253], [254], e aqui foi usada para analisar faixas de espectros relacionadas com proteína, β A e lipídios. Foram selecionadas regiões espectrais de intervalo de 10 cm^{-1} em torno das seguintes frequências: 424 cm^{-1} , 707 cm^{-1} , 725 cm^{-1} , 1007 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} . A PCA foi aplicada não nos pontos do espectro, mas na sua derivada, para que a análise não se fundamentasse em valores absolutos, que dependem fortemente do alinhamento do espectrômetro e morfologia local da amostra, mas sim nas variações relativas dentro de uma faixa espectral, identificando, assim, a componente principal que pode ser utilizada para diferenciar as amostras analisadas. Mais tecnicamente, a PCA é uma transformação linear da matriz de covariância das amostras utilizadas. Essa transformação linear resulta em um novo sistema de coordenadas (componentes principais – *principal components* - PCs) que descreve a variância dos dados. As PCs são ordenadas de forma crescente, onde a primeira componente representa a direção de maior variação no conjunto de dados. Em todos os casos, PC1 (Primeira Componente Principal) representa mais de 80% da variação observada entre os espectros, sendo suficiente para classificar adequadamente os espectros.

Das sete frequências analisadas, com base no PCA, pode-se identificar qual dessas frequências melhor diferencia os animais controle dos animais transgênicos, e entre os transgênicos, os animais com idades de 6 e 12 meses. Foram analisadas quatro placas para animais de 6 e quatro placas para animais de 12 meses. Também foram feitas três varreduras de hiperespectro de um animal controle de 12 meses. Na **FIGURA 45** podemos observar o resultado do PCA. O eixo Y apresenta os valores de PC1 que é utilizado para medir as diferenças entre amostras. Quanto mais distantes em Y, maior a diferença entre as amostras. O eixo X corresponde ao número de ondas (frequência). A sequência das amostras em X apresentadas no

gráfico são: 424 cm^{-1} , 707 cm^{-1} , 725 cm^{-1} , 1007 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , nessa ordem.

Nossos resultados de PCA mostraram uma clara tendência de diferenciação entre animais de 6 e 12 meses para todas as frequências analisadas, com destaque para a região espectral centrada em 2930 cm^{-1} , relacionada com o estiramento de CH_3 de lipídio e proteína. Este destaque vale para os valores absolutos médios de PC1. Entretanto, quando consideramos a variância dos dados, representados pelas

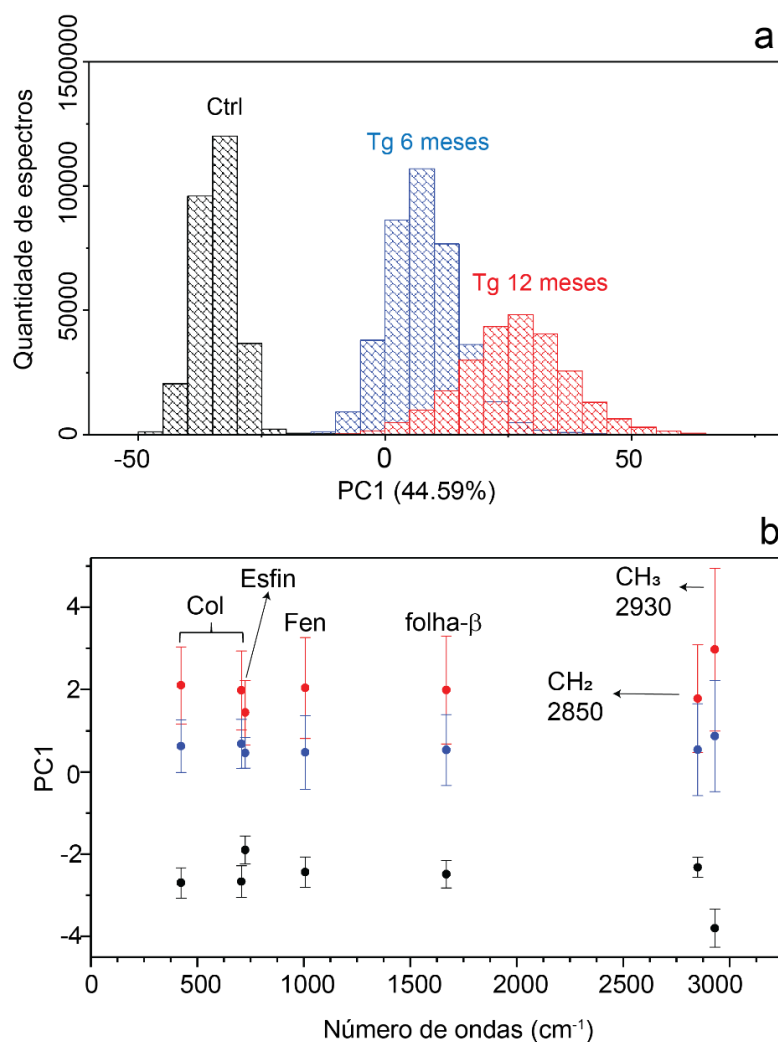


FIGURA 45. Análise PCA de animais Tg 6 e 12 meses

a) Resultados do PCA para janelas de espectro inteira (300 cm^{-1} a 3800 cm^{-1}). Diferença PC1 entre camundongos controles (barras pretas) e Tg, e entre camundongos Tg de 6 (barras azuis) e 12 meses de idade (barras vermelhas). b) histograma mostrado PC1 para cada frequência (424 cm^{-1} , 707 cm^{-1} , 725 cm^{-1} , 1007 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2930 cm^{-1}). As varreduras Ctrl são representadas em preto. A menor variância entre os animais Tg é 424 cm^{-1} , enquanto a maior diferença é observada para 2.930 cm^{-1} ($\text{CH}_3^{\text{lipídeo/proteína}}$). Para todas as frequências, há uma tendência clara de separação entre os animais de cada grupo. Col, colesterol; Esfin, esfingomiélna. As barras de erro são o desvio padrão de PC1.

barras de erro, o pico de 424 cm^{-1} se destaca por ter a menor coincidência de valores observados para PC1 de 6 e 12 meses, dentre as demais frequências analisadas (note a pequena superposição das barras de erro na **FIGURA 45**).

Na **TABELA 1** é possível ver um sumário das médias de PC1. Na última linha da tabela está apresentado o produto da diferença entre as médias de Tg 12 meses e Tg 6 meses.

Tabela 1. Médias de PC1 das frequências analisadas

GRUPOS	424 cm^{-1}	707 cm^{-1}	725 cm^{-1}	1007 cm^{-1}	1670 cm^{-1}	2850 cm^{-1}	2930 cm^{-1}
Ctrl	-2.69	-2.67	-1.9	-2.43	-2.48	-2.31	-3.8
Tg6	0.62	0.68	0.46	0.46	0.53	0.54	0.87
Tg12	2.09	1.98	1.44	2.03	1.99	1.78	2.96
Tg12 - Tg6	1.47	1.3	0.98	1.57	1.46	1.24	2.09

Esse resultado sugere que as alterações na região da placa amiloide não se relacionam *exclusivamente* com a presença de β A. Como a vibração de CH_3 representa os dois maiores grupos de biomoléculas, lipídio e proteína, as mudanças ao nível tecidual estão distribuídas entre essas duas biomoléculas. Também o fato de as frequências de colesterol (424 cm^{-1} e 707 cm^{-1}) terem apresentado *score* semelhante à 1670 cm^{-1} , sugere que as mudanças a nível celular relacionadas à neurodegeneração e neuroinflamação contribuem para a diferenciação por ER, tanto quanto a placa amiloide isoladamente, ou que as mudanças que diferenciam os animais segundo o estágio da doença não se limita à placa amiloide. Embora o N amostral analisado seja pequeno, a análise se mostra robusta uma vez que é possível observar uma tendência clara de diferenciação dos animais em diferentes estágio da doença, consistente para todas as regiões espectrais analisadas.

Esse resultado fortalece nosso argumento de que as imagens de vibração de CH_3 observadas por espectroscopia Raman (estimulada e espontânea) são ideias para identificação de placa amiloide no tecido. A ER mostra, tanto a placa amiloide quanto a área de neurodegeneração e neuroinflamação que circundam a placa.

Embora a presença de placa amiloide se relacione de forma clara com a DA, a progressão da doença não parece depender tanto da quantidade de placas, mas sim da neurodegeneração associada. Estudos neuropatológicos com base na avaliação da placa amiloide mostraram uma correlação fraca entre a deposição de βA e o estado cognitivo [255]. Nesse trabalho, Giannakopoulos et al., (2003) mostraram em análise *post mortem* em cérebros de pacientes DA que emaranhados neurofibrilares, e não a quantidade de placas amiloide, se relaciona mais com a perda neuronal. Pacientes com quantidades semelhantes de placa amiloide no cérebro apresentaram diferença de metabolismo de glicose, sugerindo que a neurodegeneração, e por tanto, a progressão da doença, não depende exclusivamente da quantidade de placa [256]. Indivíduos muito idosos podem ter um grande número de placas e ainda permanecerem estáveis cognitivamente, sugerindo que depósitos de βA de desenvolvimento lento são menos prejudiciais [257]. Trabalhos sustentam que a área de neurodegeneração não depende do tamanho ou quantidade de placas amiloides, pois placas jovens podem apresentar área de neurodegeneração igual ou maior às de placas mais velhas [81], [258].

Existem vários trabalhos tentando estabelecer se há uma relação entre DA, βA e lipídio, principalmente o colesterol. O cérebro é o órgão que tem a maior concentração desse lipídio, aproximadamente 25% de todo colesterol do corpo [259], e ele está presente, principalmente, na bainha mielina e nas membranas de neurônios e células da glia [260]. Entretanto, alterações no conteúdo de colesterol na DA, até agora, permanecem controversas, assim como sua relação com placa amiloide, uma vez que há estudos com resultados variados e contraditórios [261], [262]. Em 2001, foi demonstrado que o colesterol se acumulava nas placas amiloides [263], e em 2003, que colesterol co-localizava com placas amiloides. Lebouvier et al. (2009) provaram que os dois trabalhos apresentavam erros experimentais, e que o colesterol não se acumulava nas placas [264].

Ainda que não haja uma clara relação entre colesterol e DA, o PCA mostrou que a frequência de 424 cm^{-1} , 707 cm^{-1} , ambas relacionadas ao colesterol, e 725 cm^{-1} , relacionada à esfingomielina (**FIGURA 45**), são capazes de diferenciar os animais Tg 6 meses e Tg 12 meses. Outro dado interessante é que 2850 cm^{-1}

também diferencia os animais Tg. Isso sugere que espectro Raman está diferenciando os animais em função das alterações bioquímicas que se relacionam com a borda lipídica entorno da placa amiloide. Considerando que a maior parte do colesterol se encontra nas membranas das células neuronais e da glia, a ER pode estar identificando as alterações relacionadas à neurodegeneração e neuroinflamação.

As placas amiloides apresentam β A difusa ao seu redor, nas formas de oligômeros e protofibrilas, que em contato com axônios e dendritos de neurônios causam neurodegeneração. Isso se traduz, histologicamente, em uma massa lipídica disforme entorno da placa (neuritos distróficos) (**FIGURA 47 e 48**) [77], [249], [265]. Nesse microambiente, a distribuição de lipídio em função de debris e neuritos distróficos pode estar sendo identificada pela ER de maneira a diferenciar os animais de 6 e 12 meses, segundo a distribuição de colesterol e de lipídio total na região de placa.

Na **FIGURA 46** estão apresentadas algumas imagens de hiperespectros das frequências 424 cm^{-1} , 707 cm^{-1} , 725 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} . Exceto para frequência de CH_2 (2850 cm^{-1}), que forma a densa borda lipídica, as demais formam uma fraca distribuição, com aumento de concentração co-localizado a região de borda lipídica.

Pelo PCA não é possível falar em termos quantitativos, se há aumento ou diminuição de lipídio ou colesterol, ou outra biomolécula qualquer, ele dá a Componente Principal que diferencia conjuntos de amostra, entretanto, pela análise visual das imagens de hiperespectro, parece haver maior concentração desses lipídios nos animais de 12 meses. De todo modo, nosso objetivo com essa análise é tentar explorar a capacidade do uso de espectroscopia Raman para identificar e categorizar animais em estágios distintos da doença. Esse objetivo foi alcançado.

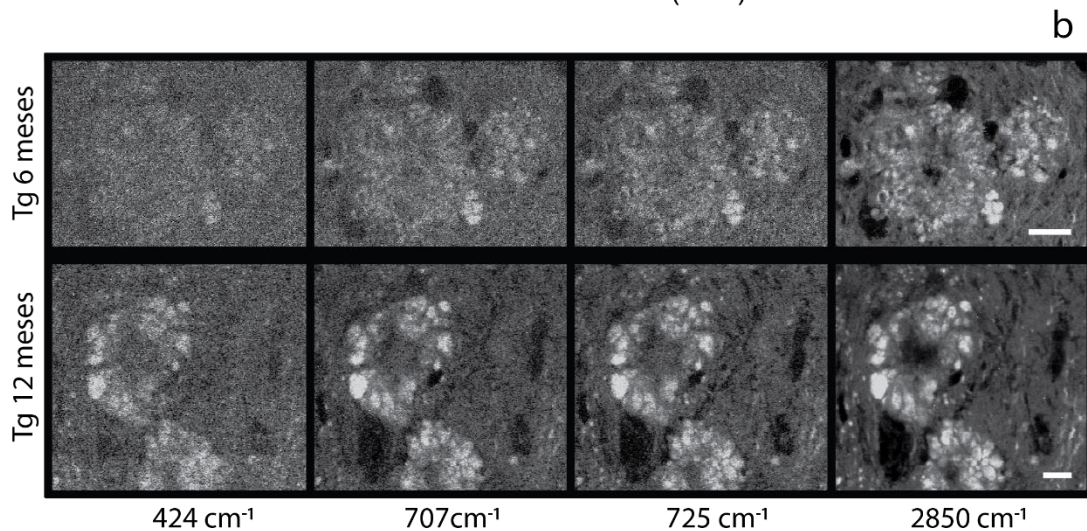
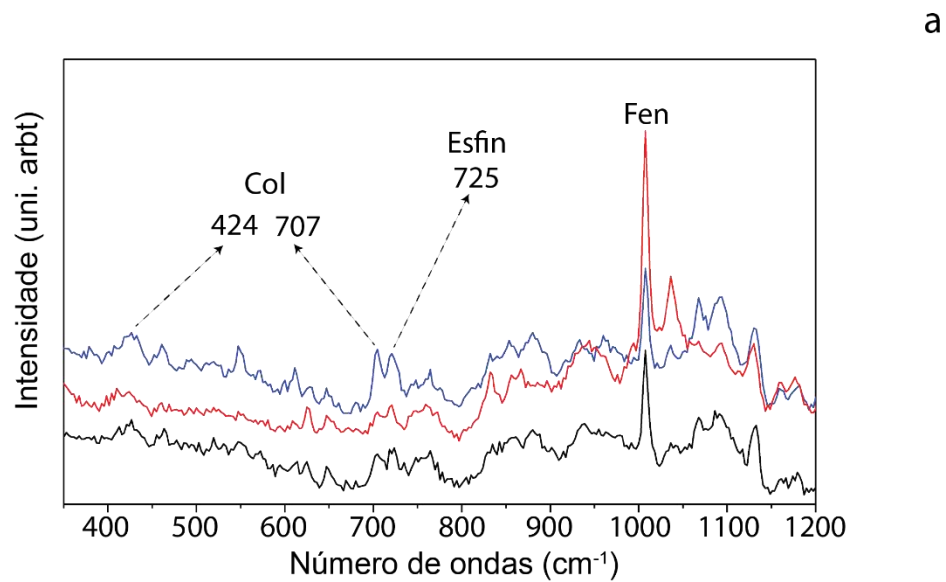


FIGURA 46. Análise Raman do halo lipídico em animais 6 e 12 meses

Gráfico representativo de um animal Tg de 12 meses mostrando a região do espectro contendo as frequências de colesterol (424 cm^{-1} , 707 cm^{-1}) e esfingomielina (725 cm^{-1}). Em azul, espectro da borda lipídica, em vermelho, espectro da placa amilide, em preto, espectro distante da borda lipídica. Imagens de hiperspectro de região de placa amiloide em animais de 6 e 12 meses mostram a formação de imagem do halo lipídico para as frequências de colesterol e esfingomielina analisadas por PCA. Em animais de 12 meses parece haver maior nitidez na imagem sugerindo maior concentração de lipídio. Barra de escala Tg 6 meses $20\mu\text{m}$, Tg 12 meses $10\mu\text{m}$.

4.7 Relação de placa amiloide versus distrofia neuronal

É cada vez maior o número de estudos que tentam desvendar a relação da placa amiloide com as respostas e eventos celulares no tecido cerebral. Estudos mostram que axônios e dendritos dos neurônios que margeiam as placas amiloides, em uma distância de 15 a 40 μm , sofrem efeitos neurotóxicos relacionados à βA , resultando em distúrbios fisiológicos que se refletem em alterações morfológicas [72], [249]. Esses neuritos na vizinhança de placas apresentam-se distróficos, com grandes inchaços, provavelmente em função de interrupção de transporte vesicular devido ao distúrbio estrutural do citoesqueleto [77], [249]. Essa proximidade com a placa causa distrofia axonal com surgimento de várias varicosidades [249]. Por imunomarcção, esses neuritos distróficos se apresentam como uma massa amorfa de grandes bolhas de membranas (**FIGURA 47**) [244].

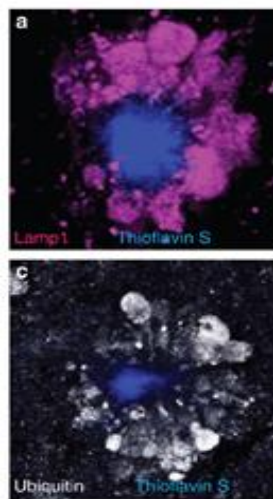


FIGURA 47. Imagem de placa amiloide e neuritos distróficos

(a) Em azul placa amiloide, em rosa, neuritos distróficos. Adaptado de Condello et al. *Nature Commun*

Importante lembrar, a placa amiloide é formada de fibrilas alimentadas por um fluxo de protofibrilas e oligômeros. Essas estruturas menores (protofibrilas e oligômeros) normalmente não são marcadas por marcadores como ThioS ou MX04. É necessário anticorpo específico (ou curcumina) para essas estruturas de

β A de baixo peso molecular, ou conformação diferente de fibrilas maduras [82], [246]. Quando marcadas, observa-se que há uma borda difusa de β A ao redor do núcleo denso da placa amiloide, também denominada “halo” - *halo of oligomeric β A* [266] , “*protofibrillar $A\beta_{42}$ halo*” [244]. Desse modo, os efeitos deletérios da β A nos neuritos não estão necessariamente circuncritos ao contato direto com a placa, mas também (ou principalmente) com seu entorno, rico em protofibrilas e oligômeros.

Na literatura de grupos de espectroscopia Raman e de Infravermelho, essa região em torno da placa constituída por lipídio é genericamente denominada de “halo” [40], [267], [268]. Entretanto, grupos de neurocientistas que estudam placa amiloide e neurodegeneração chamam de halo a região periférica do núcleo denso da placa amiloide que é composto de β A difusa - oligômeros e protofibrilas [82], [241], [244], [258], [269]. Em função disso, nós trataremos por “borda lipídica” essa região formada por lipídio amorfo identificado por espectroscopia Raman (e por espectroscopia de infravermelho) e que nossos resultados ilustram (**FIGURA 48**).

Em um trabalho de Palombo et al., (2018) foi sugerido que a borda lipídica observada por espectroscopia Raman é formada por astrócitos reativos, entretanto, seus resultados não demonstram clara relação visual entre a placa e os astrócitos em torno dela [40]. A fim de examinar essa sugestão, procedemos imunomarcção dos tecidos, após aquisição de imagem *SRS*. As microglias foram marcadas com anti-Iba1 e os astrócitos com anti-GFAP. Como podemos observar nas **FIGURAS 49-52**, os astrócitos ao entorno da placa não correspondem à área de borda lipídica que observamos na ER, tão pouco a presença das microglias intimamente associadas às placas explicam toda essa borda densa de lipídio identificada pela ER. Mesmo a sobreposição de microglias e astrócitos não corresponde à borda lipídica descrita pela imagem Raman.

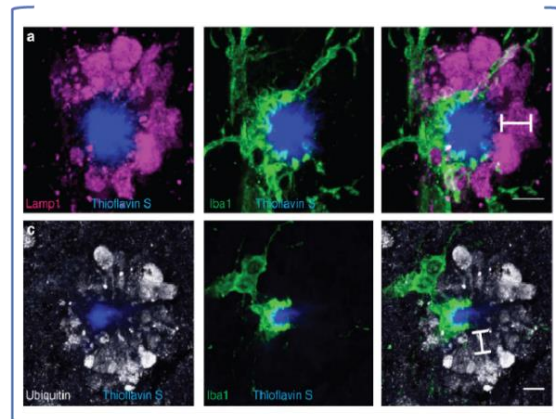
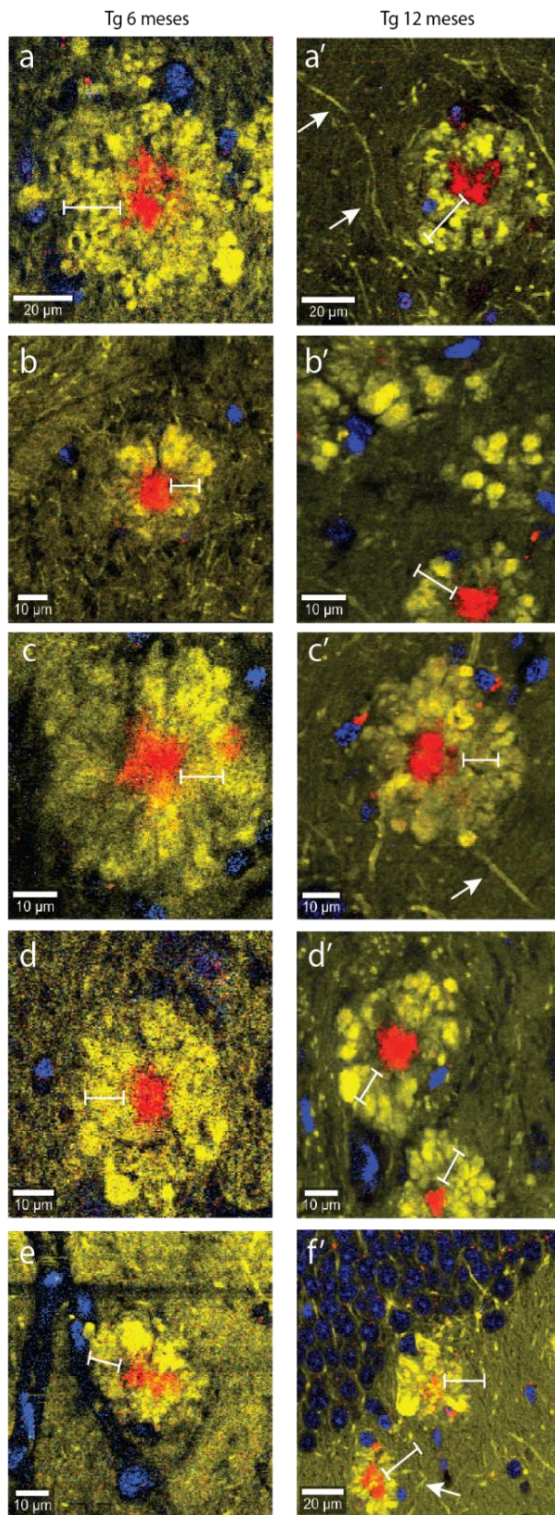


FIGURA 48. Imagem de placa amiloide e neuritos distróficos

À esquerda, hiperespectro de região de placa amiloide em animais de 6 (a) e 12 (a') meses mostrando sobreposição de imagens de DNA (azul), núcleo denso de placa amiloide (vermelho) e borda lipídica (amarelo), produzidas com as respectivas frequências 792 cm^{-1} , 1675 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} . Setas indicando axônios. As barras medindo as bordas de lipídio têm a mesma escala da figura. Entre colchete (direita), imagem de imunofluorescência, para fins de comparação, de Condello et al.(2015) mostrando placa amiloide (azul), microglia (verde), e neuritos distróficos (roxo e cinza). A escala de todas as barras em Condello et al. é de $5\mu\text{m}$. Adaptado de Condello et al. *Nature Commun.* 2015.

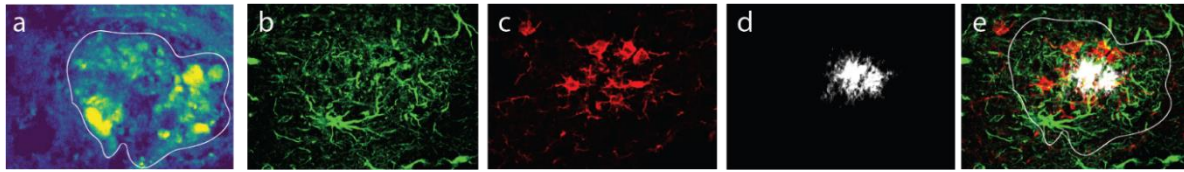


FIGURA 49. Imagem SRS de borda lipídica e imunofluorescência de células da glia

(a) SRS de lipídio. Imagem de excitação por dois fótons mostrando células da glia imunomarcadas; (b) imunopositividade para GFAP em astrócitos, (c) imunopositividade para Iba-1 em micróglia, (d) placa amiloide marcada por ThioS, (e) Sobreposição das imagens de imunofluorescência. Objetiva 60x de imersão em óleo. Barra de escala 10 μ m.

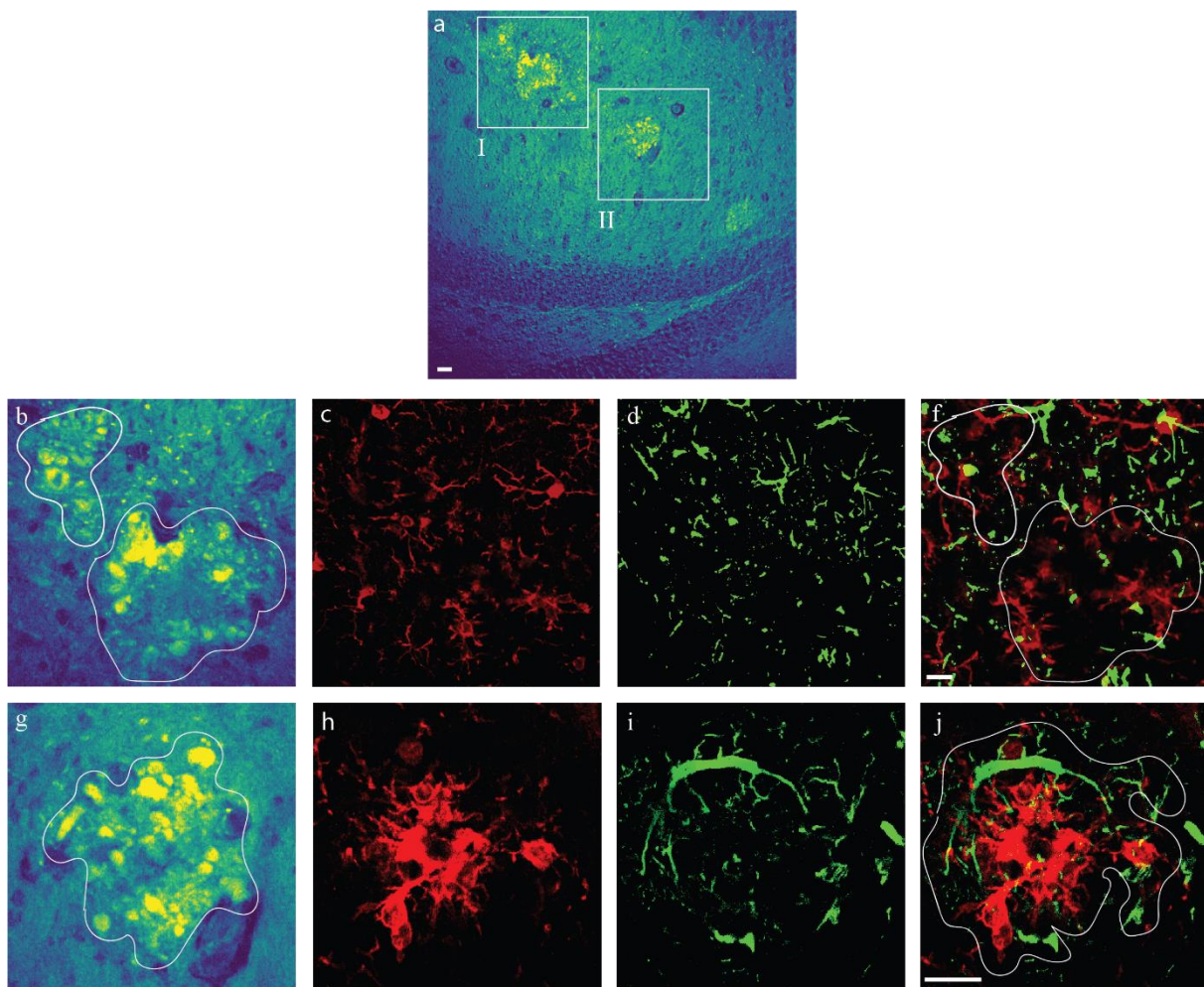


FIGURA 50. Imagem SRS de borda lipídica e imunofluorescência de células da glia

SRS de lipídio com quadrado delimitando as regiões com densas bordas de lipídio em torno de placas, destacadas em maior aumento em b (I) e g (II); (c, h), imunopositividade para Iba-1 em micróglia; (d, i) imunopositividade para GFAP em astrócitos; (f, j) sobreposição da imunomarcção para micróglia e astrócito. Note que a área delimitada correspondente à borda lipídica observada no SRS não corresponde à área onde se encontram as células da glia. Objetiva 20x (a); objetiva 60x (b-j). Barra de escala 10 μ m.

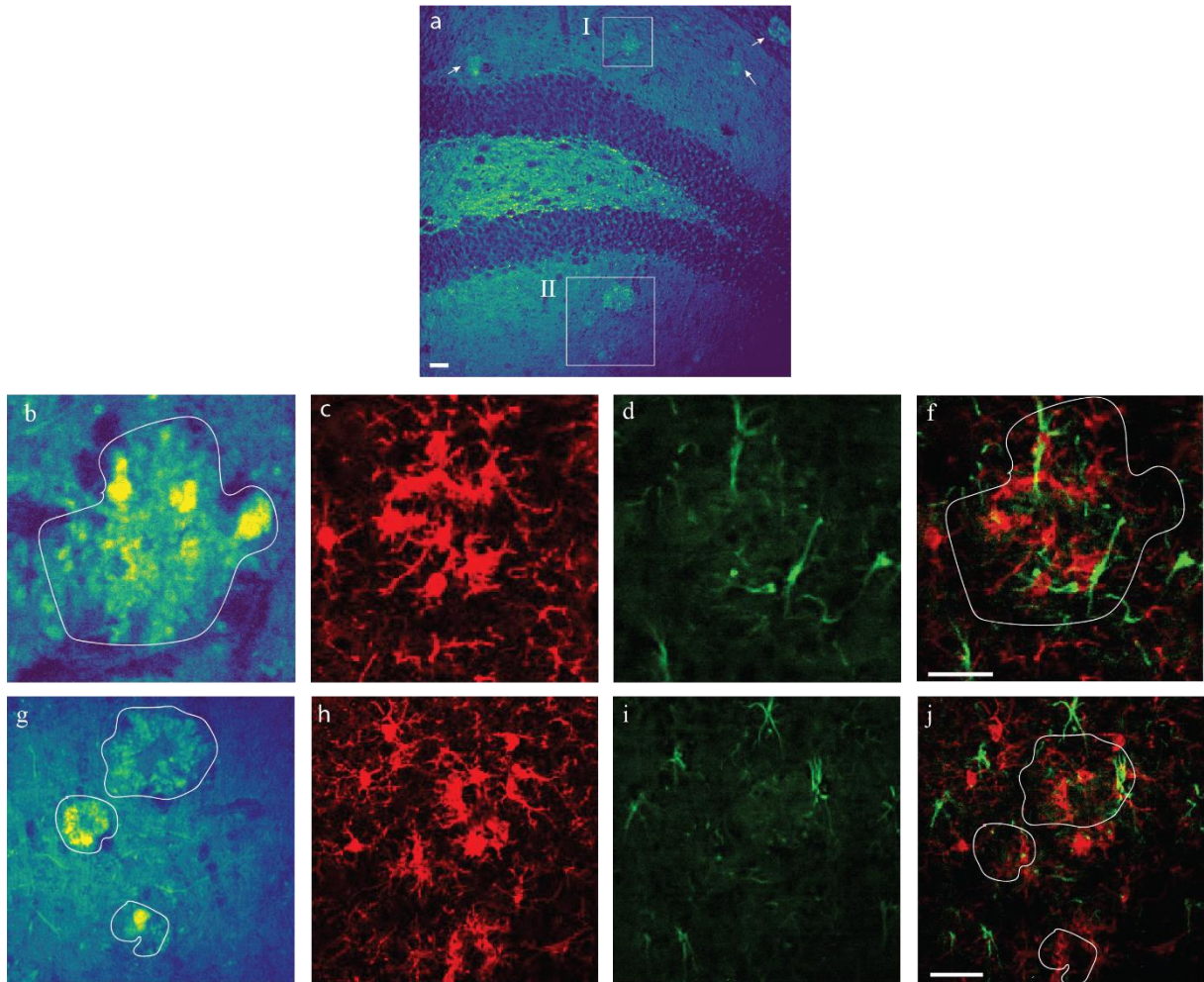


FIGURA 51. Imagem SRS de borda lipídica e imunofluorescência de células da glia

SRS de lipídio com quadrado delimitando as regiões com densas bordas de lipídio em torno de placas, destacadas em maior aumento em b (I) e g (II); (c, h), imunopositividade para Iba-1 em micróglia; (d, i) imunopositividade para GFAP em astrócitos; (f, j) sobreposição da imunomarcção para micróglia e astrócito. Note que a área delimitada correspondente à borda lipídica observada no SRS não corresponde à área onde se encontram as células da glia. Objetiva 20x (a); objetiva 60x (b-j). Barra de escala 20 μ m.

Notamos que, diferente do que foi sugerido por Palombo et al. (2018) a borda lipídica não é formada por astrócitos reativos. O conjunto deles não reproduz a área lipídica observada por SRS. E embora haja muita microglia intimamente ligada à placa, elas, mesmo associadas aos astrócitos, não explicam completamente a área delimitada pela densa borda lipídica identificada pelas vibrações de CH₂ e CH₃ (FIGURA 52).

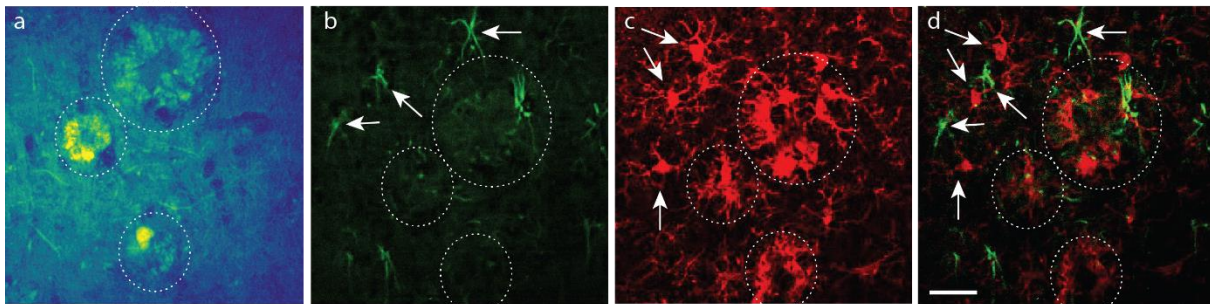


FIGURA 52. Imagem SRS de borda lipídica e imunofluorescência de células da glia

(a) SRS de lipídio. Imagem de excitação por dois fótons mostrando células da glia imunomarcadas; (b) imunopositividade para GFAP em astrócitos; (c) imunopositividade para Iba-1 em micróglia;; (d) em (b) setas apontam para astrócitos próximos a região de borda lipídica, mas não sobre ela. Em (c), setas mostrando microglias com morfologia compatível com fenótipo ativado, mas fora da região de borda, enquanto várias se encontram intimamente sobre a borda lipídica. (d) Sobreposição das imagens de imunofluorescência. Círculos destacando região de borda lipídica (a) e suas esperadas correspondências em b, c, e d. Objetiva 60x. Barra de escala 20µm.

Como se pode observar nas imagens de imunomarcção, a morfologia da borda lipídica observada na ER não se explica pelo somatório de microglias e astrócitos próximos da placa. Além disso, e mais intimamente ligado à placa, existem neuritos distróficos que apresentam a morfologia muito semelhante à observada pela ER, formando bolhas de membrana lipídica disformes. Baseado na literatura e nos nossos dados, concluímos que a borda lipídica que se observa nas imagens de hiperespectro e SRS são compostas por neuritos distróficos, além de microglias ativadas e astrócitos reativos que circundam as placas amiloide. Essa microregião da placa está em constante transformação, menos em função da constituição do núcleo denso da placa, mas em função do entorno, em razão de β A difusa [81], [258]. Com surgimento de varicosidades nos neuritos circundantes,

eliminação desses neuritos anormais, fagocitose de fibrilas, e surgimento de mais neuritos distróficos, assim como debris, em função tanto da morte de neurônios quanto de microglias ativadas [246], [249].

Uma vez confirmados, nossos resultados abrem uma nova possibilidade para o estudo de neurodegeneração na DA. Existe uma lacuna na correlação estatística entre o declínio cognitivo e o número de placas encontradas no tecido cerebral *post mortem*, uma vez que o declínio se correlaciona com a neurodegeneração, e não com a placa amiloide [255], [258] com observada neuroinflamação [270]. Assim, uma técnica que seja capaz de identificar tanto placa amiloide quanto neurodegeneração traria ganhos substanciais no estudo da patologia e também no diagnóstico. Nós sustentamos que a técnica de Espectroscopia Raman estimulada tem potencial de ser aplicada, tanto para o diagnóstico de Alzheimer *via* espectroscopia intraocular, quanto para estudos e diagnóstico histopatológico. O método de diagnóstico *post mortem* de Alzheimer usa um laborioso protocolo para análise histopatológica, fixação, corte, marcação e microscopia, e não é rotina o diagnóstico de neurodegeneração por marcação de neuritos distróficos, uma vez que demanda uso de anticorpos, que é caro e impraticável para rotina de diagnóstico *post mortem* de Alzheimer. Nossos resultados de SRS em placa amiloide de cérebro sugerem uma nova possibilidade mais completa de diagnóstico histopatológico da DA, que dispensa fixação ou marcação de tecido, e é capaz de fazer identificação, tanto da placa amiloide quanto de neurodegeneração e neuroinflamação associadas. Um método capaz de dar tanta informação em uma única análise histológica, sem necessidade de processamento de amostra, e de rápida aquisição de resultados, abre uma possibilidade de compreensão maior da relação de depósito de β A e neurodegeneração. Ainda que a nossa principal motivação seja o diagnóstico intraocular – em andamento – nossos resultados mostram que a aplicação de SRS para diagnóstico histológico de Alzheimer pode ser uma excelente oportunidade no campo de instrumentação científica.

5 – SUMÁRIO E PERSPECTIVAS

SUMÁRIO

Essa tese teve como objetivo fazer a caracterização de placa amiloide em tecido, usando o espalhamento Raman estimulado, e validar, assim, seu uso para possível identificação intraocular de placa amiloide para diagnóstico precoce de Alzheimer.

Inicialmente, foram sintetizadas e caracterizadas fibrilas de βA_{1-42} sintética *in vitro*, como o objetivo de se estabelecer a assinatura espectroscópica em um material de referência. Identificamos as frequências características da estrutura secundária que caracteriza o peptídeo amiloide – folha β – em seus modos de vibração típicos, amida I e amida III.

Procedemos, então, à caracterização por varredura hiperespectral de fibrilas *in locu* nas placas de fatias de cérebro de camundongos transgênicos para Alzheimer. Várias placas amiloides foram mapeadas e caracterizadas espectralmente, segundo os modos de vibração da amida I e III. Além disso, demonstramos que a presença de fenilalanina na placa amiloide reflete em um aumento na intensidade do sinal Raman desse aminoácido, de modo que a vibração do anel aromático de Fen – 1007 cm^{-1} – também identifica a placa no tecido. Além dessas frequências, demonstramos outras assinaturas espectrais que são capazes de identificar a placa amiloide. Esse conjunto de dados foi submetido a uma análise não supervisionada (*unmixing*) para identificação de espectro representativo da placa. Os resultados do *unmixing* identificaram o espectro de placa amiloide. Nesse espectro, identificamos todas as frequências que melhor se relacionam com a identificação espacial da placa no tecido, para fins de identificação espacial/visual.

Usando o conhecimento adquirido pela caracterização das placas amiloides por espectroscopia Raman espontânea, fizemos a caracterização das placas de cérebro usando *SRS*, uma técnica capaz de fazer as imagens em segundos ou fração de segundo. Este é um aspecto técnico imprescindível para o uso da técnica como diagnóstico intraocular, uma vez que o imageamento por espectroscopia Raman

espontânea leva dezenas de minutos. Concluímos que por espectroscopia Raman estimulada a frequência de estiramento de CH₃ é ideal para identificação de placa amiloide no tecido, e sugerimos que a técnica tem potencial para uso na identificação de placa amiloide por espectroscopia intraocular, usando a frequência de CH₃.

Além disso, toda a região do entorno da placa, que se relaciona com neurodegeneração e neuroinflamação, pode ser identificada com alta resolução espacial e temporal através de ER. Esse resultado levanta a possibilidade do uso da técnica para fins de diagnóstico histopatológico de Alzheimer. Uma vez que, por *SRS*, somos capazes de identificar, em questão de segundos, placa amiloide e neurodegeneração e neuroinflamação associadas à doença. Uma vez confirmados por marcação específica para neurodegeneração, nossos resultados abrem uma nova possibilidade para o estudo de neurodegeneração no Alzheimer. Assim, uma técnica que seja capaz de identificar tanto placa amiloide quanto neurodegeneração traria ganhos substanciais no estudo da patologia e também no diagnóstico. Nós sustentamos que a técnica de espectroscopia Raman estimulada tem potencial de ser aplicada, tanto para o diagnóstico de Alzheimer *via* espectroscopia intraocular, quanto para estudos e diagnóstico histopatológico. Nossos resultados de *SRS* em placa amiloide de cérebro sugerem uma nova possibilidade mais completa de diagnóstico histopatológico de Alzheimer, que dispensa fixação ou marcação de tecido, e é capaz de fazer identificação, tanto da placa amiloide quanto de neurodegeneração e neuroinflamação associadas. Um método capaz de dar tanta informação em uma única análise histológica, sem necessidade de processamento de amostra, e de rápida aquisição de resultados, abre uma possibilidade de compreensão maior da relação de depósito de β A e neurodegeneração. Embora nossa motivação seja o diagnóstico intraocular – em andamento – nossos resultados mostram que a aplicação de *SRS* para diagnóstico histológico de Alzheimer pode ser uma excelente oportunidade de instrumentação científica.

Fizemos um estudo transversal com camundongos de 6 e 12 meses e com camundongo controle, para a caracterização da evolução das mudanças

histopatológicas através da espectroscopia Raman. Usando *PCA*, hiperespectros de placas do cérebro foram analisados em função de algumas frequências pré-determinadas, que representam proteínas, lipídios, β A e colesterol. Através dessa análise, fomos capazes de diferenciar animais Tg de Controle. Também fomos capazes de diferenciar animais Tg de 6 meses dos de 12 meses, mostrando uma evolução espectral consistente do camundongo de 6 e então o de 12 meses, e a diferença de ambos em relação ao animal controle. Embora todas as frequências analisadas tenham sido capazes de diferenciar os grupos de animais entre si, a frequência de colesterol e de CH_3 de lipídio e proteína foram as que melhor diferenciaram os animais Tg de diferentes idades. Esse resultado sugere que, por espectroscopia Raman, é possível fazer, além da identificação de placas amiloides e neurodegeneração e neuroinflamação associadas, também a diferenciação do estágio da doença, segundo a distribuição de colesterol na região de placa.

Uma vez estabelecida de forma positiva uma das quatro atividades necessárias para a implementação do OVL (Oftalmoscópio de Varredura a Laser), como perspectivas para a continuação deste projeto, apresentamos agora nossos esforços iniciais de um processo que visa padronizar a identificação de placa amiloide em retinas.

PERSPECTIVAS

5.1 Uso da espectroscopia Raman estimulada para identificação de placa amiloide em retina

Como mencionado nos capítulos 1 e 2, a retina é parte do Sistema Nervoso Central e composta, majoritariamente, por neurônios que se conectam diretamente ao encéfalo pelo nervo óptico. As placas amiloides presentes no cérebro e na retina têm a mesma constituição e podem ser identificadas com os mesmos anticorpos e corantes, o que confirma sua característica antigênica idêntica (**FIGURAS 53 e 54**).

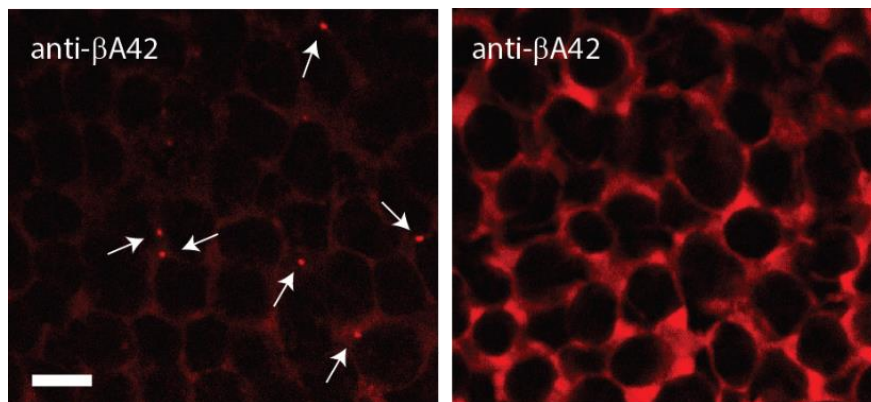


FIGURA 53. Imunomarcção de placas amiloides em retina de camundongos Tg

Imunomarcção de placas amiloides em retina de camundongos Tg visualizadas através de microscopia por dois Fótons. À esquerda, retina Tg com seta mostrando depósitos de placa amiloide na superfície da camada de células intermediárias da retina. À direita, Ctrl. Objetiva de 100x de imersão em óleo. Potência 5 mW. Barra de escala 10 μ m.

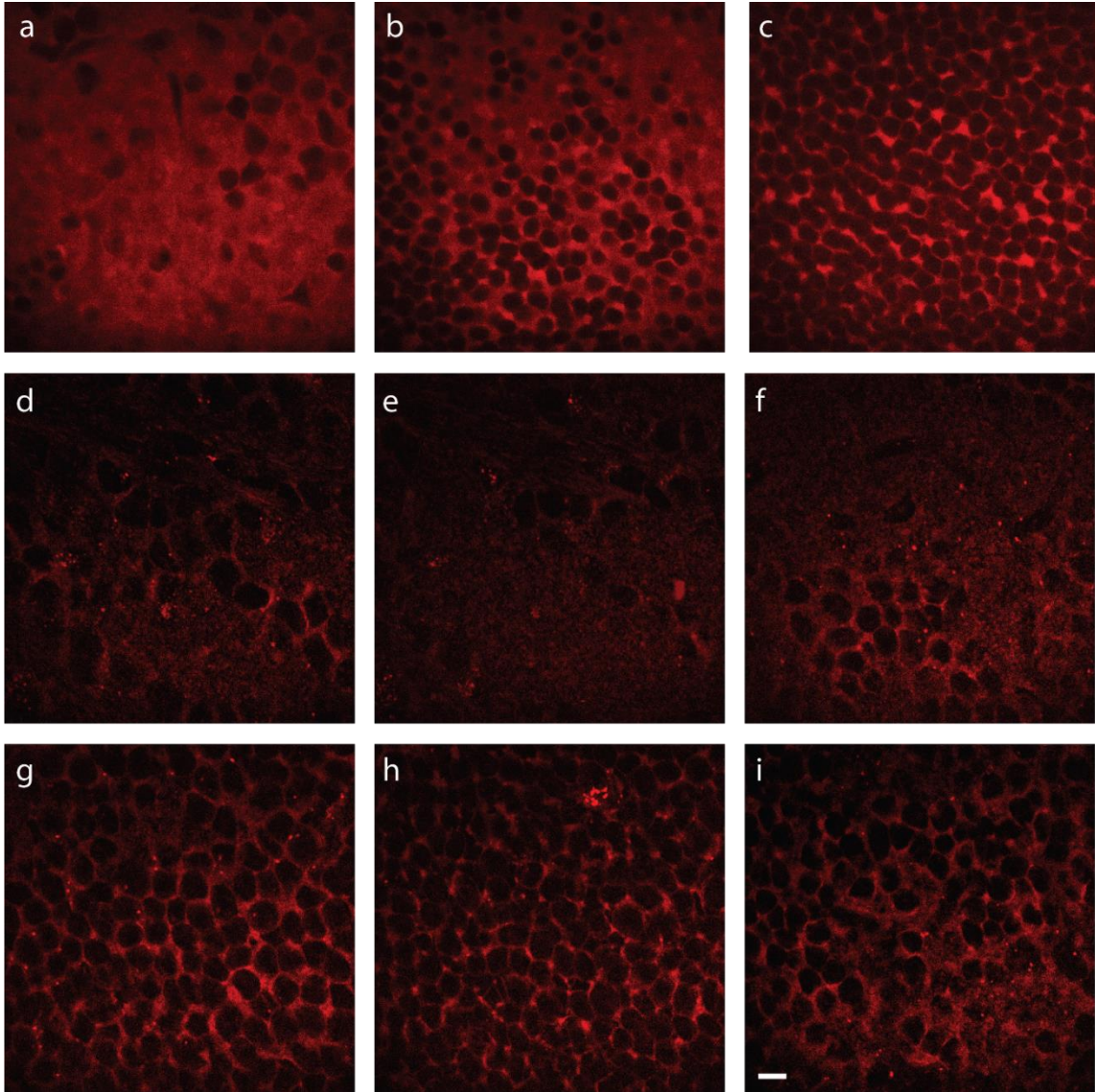


FIGURA 54. Imunomarcção de placas amiloides em retina de camundongos Tg

Imunomarcção de placas amiloides em retina de camundongos Tg visualizada através de microscopia por dois Fótons. Imagem sequenciais de série Z de retinas Tg e Ctrl marcadas com anti- βA_{42} . (a – c) Ctrl, (d-i)Tg. Camadas de células ganglionares (a, d, e) e camada de células intermediárias (b, c, f, g, h, i). Retina Tg apresentando várias placas amiloides nessas duas camadas. Objetiva de 100x de imersão em óleo. Potência 5 mW. Barra de escala 10 μ m.

Convencionamos obter espectros de placas de cortes de cérebros antes de fazermos o experimento na retina devido à maior quantidade de amostras (fatias de cérebro) e a facilidade de manuseio. Uma vez padronizado o experimento, iniciamos a caracterização e identificação de placas amiloide em retinas de camundongos. Com base nos resultados que obtivemos nos cortes de cérebro, e com a literatura sobre a relação de Alzheimer e retina, sustentamos que o uso de Raman estimulado para identificação de placa amiloide, bem como neurodegeneração na retina, pode se tornar uma nova ferramenta, tanto para estudo da relação dos marcadores histopatológicos com as alterações visuais e cognitivas apontada na literatura, como para uma proposta inovadora de diagnóstico intraocular por espectroscopia Raman.

Nosso grupo está iniciando a fase de caracterização da retina por *SRS* e *CARS* para validar essas técnicas na identificação de placa amiloide, neurodegeneração e neuroinflamação associadas. Assim como ocorre no cérebro, na retina se observa deposição de placa amiloide, neuroinflamação e neurodegeneração [135], [270]. Entretanto, ainda não foi demonstrado o mesmo processo de degeneração de neuritos. Nosso processo de caracterização de retina será majoritariamente via *SRS*, mas apresentamos alguns resultados do esforço de caracterização feito por Raman espontâneo e *CARS*. O *CARS* foi a nossa primeira opção de técnica de espectroscopia Raman estimulada em função de maior facilidade técnica. Fizemos as primeiras tentativas de aquisição de imagem em retinas de camundongos controle. Na **FIGURA 55** vemos em (a) a camada de células intermediárias e em (b) a camada de fotos receptores, evidenciando a potencialidade da técnica.

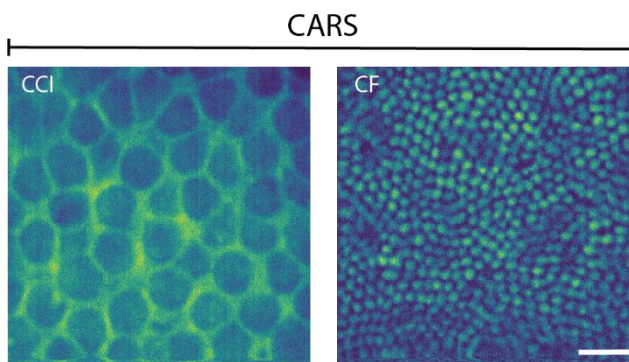


FIGURA 55. Imagem CARS de retina de camundongo Ctrl

Imagem CARS de retina de camundongo (ex vivo). A imagem foi obtida a partir da frequência de 2850 cm^{-1} , relacionada ao estiramento do CH_2 em lipídio. CCI (camada de células intermediárias), CF (camada de fotorreceptores). Aquisição 10 segundos. Objetiva de 60x de imersão em óleo. Potência 50 mW, 10 acumulações. Barra de escala 10 μm .

5.2 Imagem SRS de retinas *ex-vivo*

O uso de Raman estimulado para imageamento de retina é muito recente, e até o presente momento só dois trabalhos foram publicados. Masihzadeh et al., (2013) publicaram um trabalho usando microscopia CARS para imageamento de retina de camundongo [203]. He et al. (2015) publicaram um estudo usando SRS [205]. Como se nota, o uso da espectroscopia Raman estimulada foi ainda pouco explorado no estudo de retina. Nosso grupo iniciou o estudo da manifestação neuropatológica da DA em retina de camundongos com o intuito de validar a técnica para uso em diagnóstico intraocular precoce da doença. Essa técnica pode ser usada para identificar outras retinopatias.

Fizemos os primeiros testes de imageamento de retina por SRS usando as frequências que validamos em corte de cérebro de camundongos transgênicos. A **FIGURA 56** mostra imagens de células ganglionares para as frequências de 2930 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} . Em nossos testes iniciais, não identificamos placas amiloides. Entretanto, a qualidade de imagem de SRS apresentou melhor nitidez, em comparação com CARS (**FIGURA 55**).

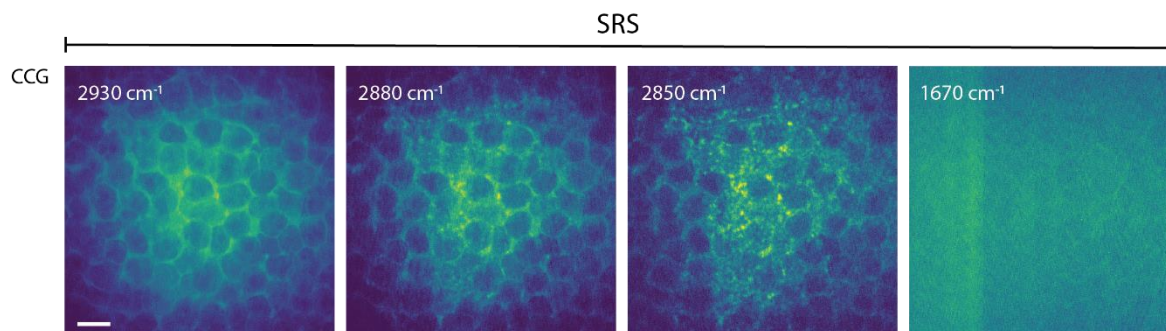


FIGURA 56. Imagens SRS de retina de camundongo Tg

Imagens SRS de retina de camundongo (ex vivo). As imagens foram obtidas pelas frequências 2930 cm⁻¹, (CH₃^{lipídio/proteína}), 2880 cm⁻¹ (CH₂^{lipídio/proteína}), 2850 cm⁻¹ (CH₂^{lipídio}) e 1670 cm⁻¹ (AmI de f-β). CCG (camada de células intermediárias). Objetiva de 100x de imersão em óleo. Potência 50 mW, 20 aquisições. Barra de escala 10 μm.

Fizemos subtrações de imagens, conforme mostrado anteriormente (ver **FIGURA 41**, Cap. 4) para tentar indentificar placas amiloides, mas com esses resultados iniciais, ainda não fomos capazes (**FIGURAS 57**).

Na **FIGURA 58** são apresentadas algumas imagens de SRS de fotorreceptores em uma sequência de série Z. Os fotorreceptores têm um diâmetro menor que as células das demais camadas da retina (**FIGURA 55 e 59**) e, ainda assim, foi possível ter uma boa definição dos fotorreceptores. Na **FIGURA 59** são mostradas imagens das camadas da retina. Em (a) apresentamos células ganglionares em várias sequências de uma série Z. Observam-se, indicados pelas setas, feixes nervosos que formam o nervo óptico. Em (b) é possível visualizar hemácias dentro dos vasos (cabeça de seta) e alguns pontos com maior intensidade de espalhamento de luz, sugerindo placas amiloides. Em (c), vemos imagens sequencias de uma série Z na camada de fotorreceptores. Como não conseguimos co-localizar com imunomarcção, ainda não temos certeza se os pontos (setas em b) são realmente placas amiloides.

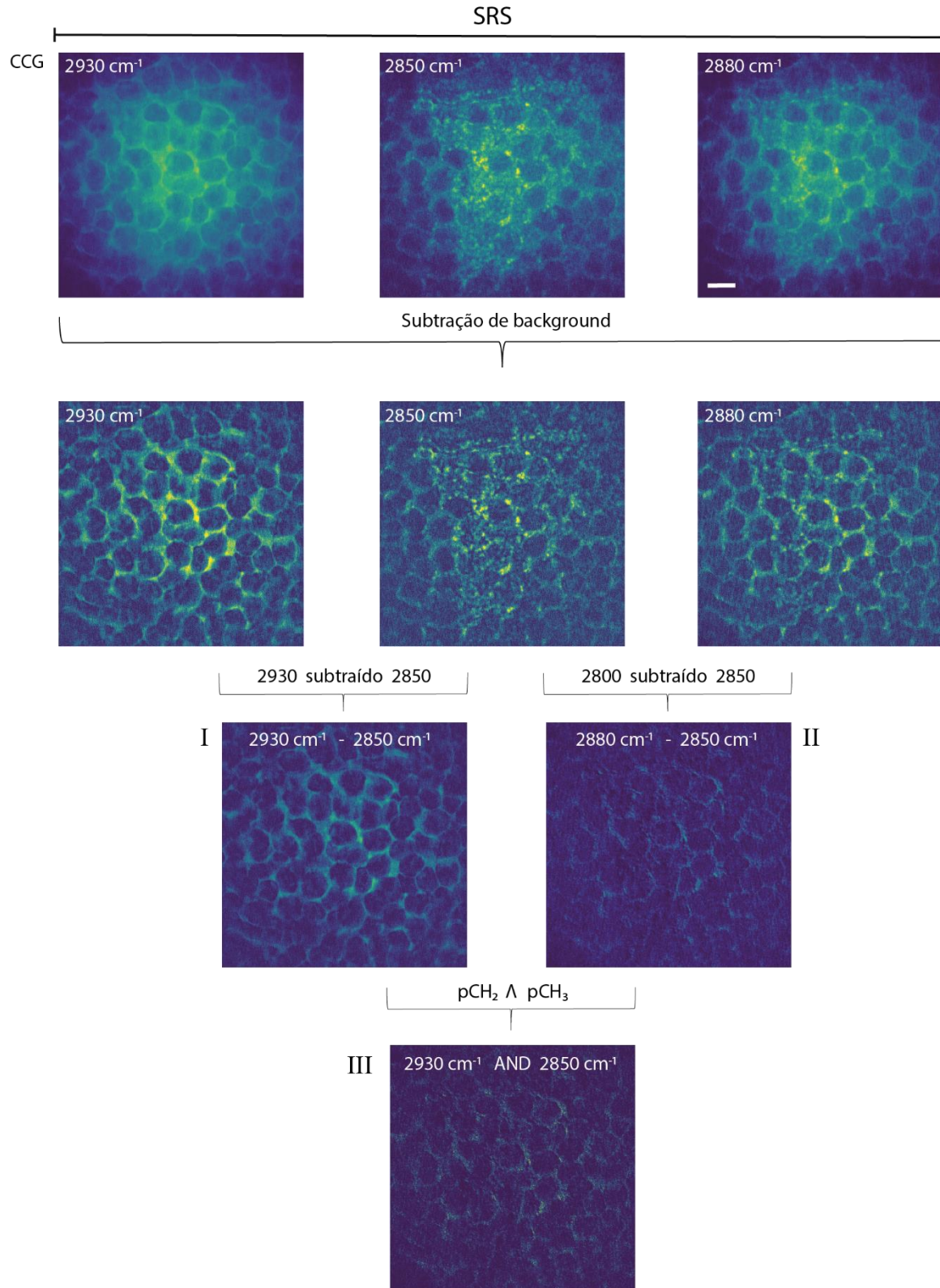


FIGURA 57. Processamento de imagem SRS de retina de camundongo Tg

Imagem SRS de retina pela vibração de CH. Pelo resultado da subtração de CH₂^{lipídio} de CH₂^{lipídio/proteína} mais interseção com o resultado da subtração de CH₂^{lipídio} de CH₃^{lipídio/proteína} não foi possível obter imagem do núcleo denso da placa amiloide. Objetiva de 100x de imersão em óleo. Potência 50 mW, 5 aquisições. Barra de escala 10 μm.

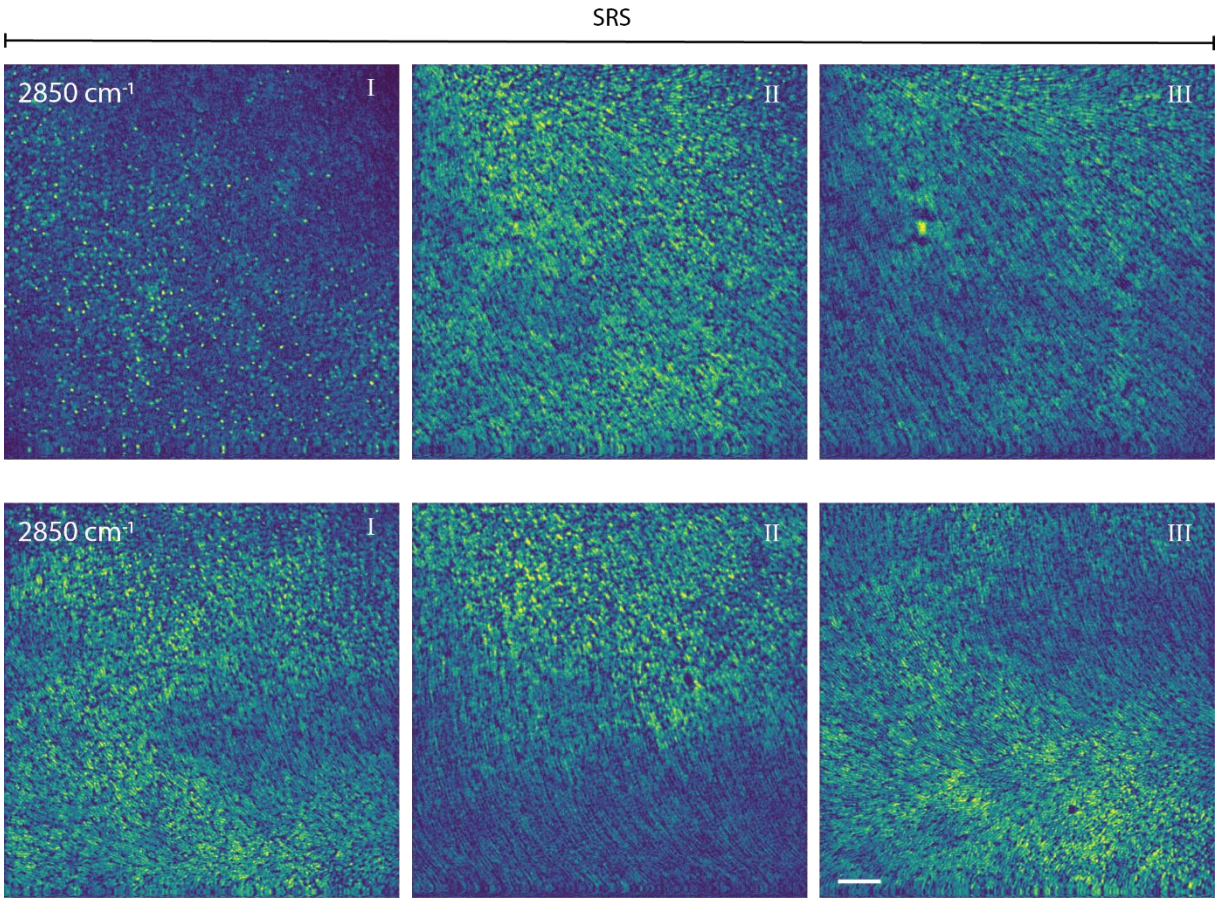


FIGURA 58. Imagem SRS de retina de camundongo Tg
 Sequência de imagem de uma série Z de vibração CH₂^{lipídio} mostrando células fotorreceptores. Objetiva de 20x.
 Potência 50 mW, 15 aquisições. Barra de escala 30 μm.

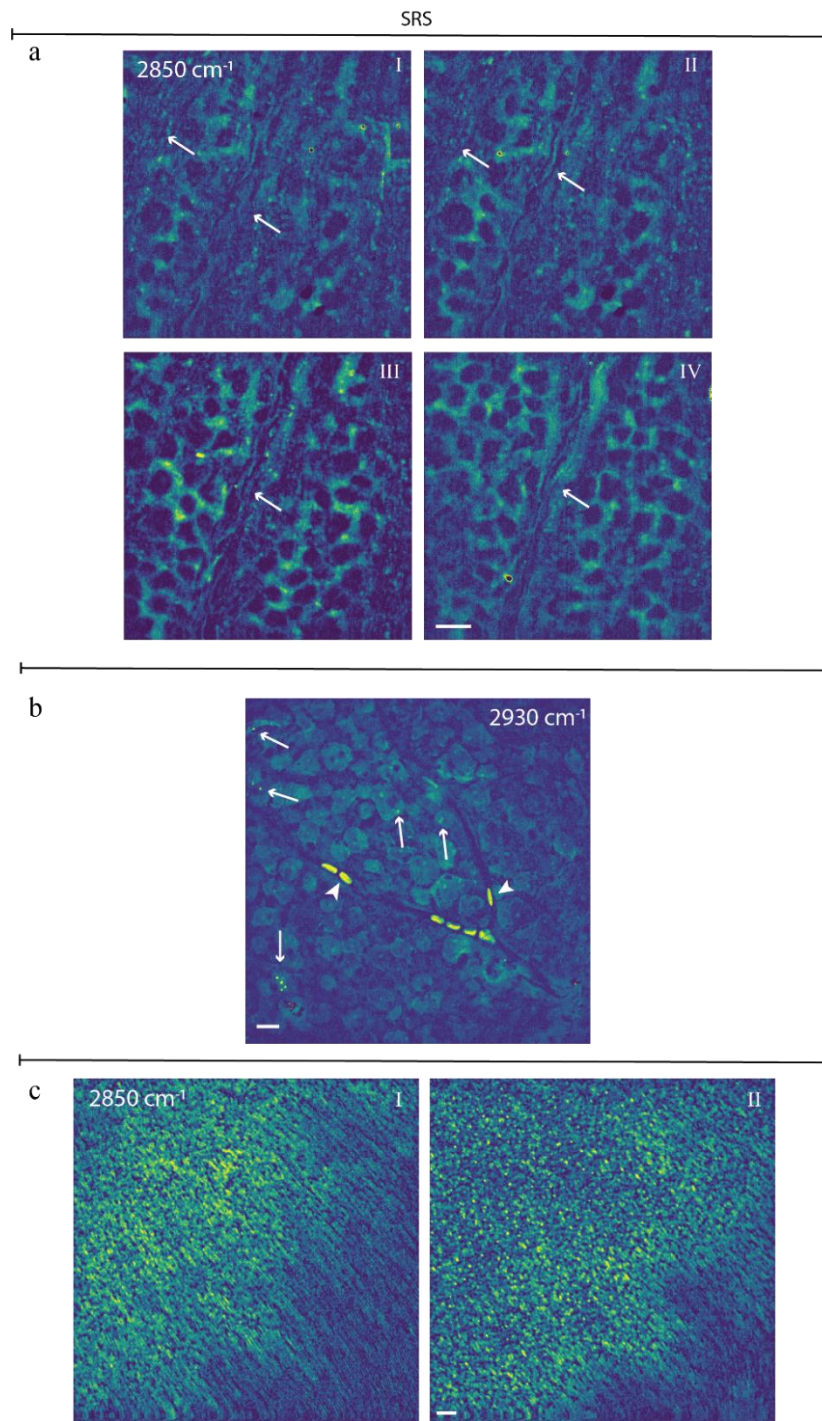


FIGURA 59. Imagem SRS de retina de camundongo Tg

Em (a), sequência de imagem de uma série Z de vibração $\text{CH}_2^{\text{lipídio}}$ mostrando células ganglionares e feixe nervoso formado por seus axônios (setas) e (c) mostrando fotorreceptores. (b) $\text{CH}_3^{\text{lipídio/proteína}}$ mostrando hemácias em vasos sanguíneos (cabeça de seta) na camada de células ganglionares. Nota-se pontos com maior intensidade (setas) parecidos com placas amiloides. Imagem com fase invertida em (a). Objetiva de 20x. Potência 50 mW, 10 aquisições. Barra de escala 10 μm .

5.3 SRS em hipocampo fresco

Embora tenhamos demonstrado uma alta resolução espacial e temporal para aquisição de imagens de retina *ex vivo*, mais experimentos precisam ser feitos para qualificar nossos resultados, além de estabelecermos um protocolo de experimentação que nos permita referenciar espacialmente a área analisada. É possível que, em função da menor dimensão e da alta intensidade de espalhamento de luz do tecido retiniano, que satura com pouco tempo de exposição, seja necessário desenvolver um processamento de imagem para identificarmos as placas amiloide.

Em tecido fresco, a definição das estruturas celulares fica melhor e o sinal SRS é mais intenso (SUMMERS et al., 2017b), facilitando a aquisição de imagem de placa amiloide (JI et al., 2018). Dificuldades técnicas impedem o manuseio de retina fresca, mas experimentos em hipocampo fresco de camundongos mostram um considerável ganho de definição (**FIGURA 60**). As imagens da **FIGURA 60** mostram axônios de neurônios do hipocampo, através da vibração de $\text{CH}_2^{\text{lípido}}$. É possível ver com nitidez os axônios dos neurônios de forma individualizada, resolução que não é possível em tecido fixado.

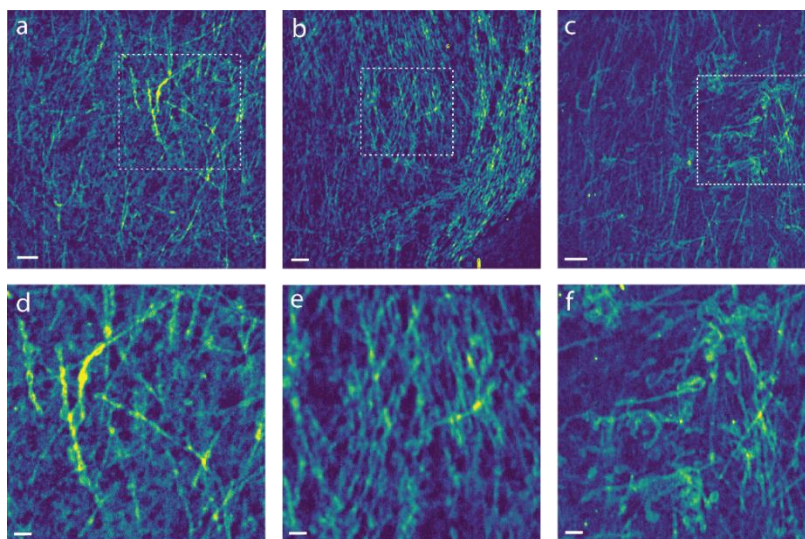


FIGURA 60. Imagem SRS hipocampo fresco de camundongo Tg 12 meses.

Após perfusão com PBS, o cérebro do camundongo foi removido, os hemisférios foram partidos ao meio e uma banda do hipocampo foi removida e levada ao microscópio sob constante hidratação em meio fisiológico e em baixa temperatura mantida por gelo. Observa-se com nitidez os axônios dos neurônios através da vibração $\text{CH}_2^{\text{lípido}}$. Na linha inferior, zoom da área delimitada pelo quadrado pontilhado da figura acima. Objetiva de 20x. Potência 60 mW, 10 aquisições. Barra de escala (a-c) 30 μm ; (d-f) 10 μm .

REFERÊNCIAS

- [1] W. W. Barker *et al.*, “Relative Frequencies of Alzheimer Disease, Lewy Body, Vascular and Frontotemporal Dementia, and Hippocampal Sclerosis in the State of Florida Brain Bank,” *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, vol. 16, no. 4, 2002.
- [2] A. Association, “2019 Alzheimer’s disease facts and figures,” *Alzheimer’s Dement.*, vol. 15, no. 3, pp. 321–387, 2019.
- [3] L. E. Hebert, J. Weuve, P. A. Scherr, and D. A. Evans, “Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census,” *Neurology*, vol. 80, no. 19, pp. 1778 LP – 1783, May 2013.
- [4] H. R. Brunnström and E. M. Englund, “Cause of death in patients with dementia disorders,” *Eur. J. Neurol.*, vol. 16, no. 4, pp. 488–492, 2009.
- [5] J. P. Romero, J. Benito-León, E. D. Louis, and F. Bermejo-Pareja, “Under reporting of dementia deaths on death certificates: A systematic review of population-based cohort studies,” *J. Alzheimer’s Dis.*, vol. 41, no. 1, pp. 213–221, 2014.
- [6] A. T. R. de Oliveira, “Envelhecimento populacional e políticas públicas : desafios para o Brasil no século XXI,” *Espaço e Econ.*, no. 8, 2016.
- [7] J. A. M. de Carvalho and R. A. Garcia, “O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico,” *Cad. saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Esc. Nac. Saúde Pública*, vol. 19, no. 3, pp. 725–733, 2003.
- [8] J. B. Teixeira, P. R. B. de Souza Junior, J. Higa, and M. M. Theme Filha, “Mortality from Alzheimer’s disease in Brazil, 2000-2009,” *Cad. Saude Publica*, vol. 31, no. 4, pp. 850–860, 2015.
- [9] J. de J. Sandoval, C. M. Turra, and R. H. Loschi, “Adjusted mortality rates attributable to Alzheimer’s disease dementia, Brazil, 2009-2013,” *Cad. Saude Publica*, vol. 35, no. 6, p. e00091918, 2019.
- [10] A. Association, “2018 Alzheimer’s disease facts and figures,” *Alzheimer’s Dement.*, vol. 14, no. 3, pp. 367–429, Mar. 2018.
- [11] D. S. Knopman *et al.*, “The diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease,” *Alzheimer’s Dement.*, vol. 7, no. 3, pp. 263–269, 2011.
- [12] C. R. Jack *et al.*, “Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease,” *Alzheimer’s Dement.*, vol. 7, no. 3, pp. 257–262, 2011.
- [13] R. J. Perrin, A. M. Fagan, and D. M. Holtzman, “Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer’s disease,” *Nature*, vol. 461, no. 7266, pp. 916–922, Oct. 2009.
- [14] J. Cummings, G. Lee, A. Ritter, and K. Zhong, “Alzheimer’s disease drug development pipeline: 2018,” *Alzheimer’s Dement. Transl. Res. Clin. Interv.*, vol. 4, no. 2018, pp. 195–214, 2018.
- [15] R. S. Wilson, S. E. Leurgans, P. A. Boyle, and D. A. Bennett, “Cognitive decline in prodromal Alzheimer disease and mild cognitive impairment,” *Arch. Neurol.*, vol. 68, no. 3, pp. 351–356, Mar. 2011.
- [16] L. Guo, J. Duggan, and M. Cordeiro, “Alzheimers Disease and Retinal Neurodegeneration,” *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 3–14, 2010.

- [17] A. London, I. Benhar, and M. Schwartz, "The retina as a window to the brain - From eye research to CNS disorders," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 9, no. 1, pp. 44–53, 2013.
- [18] S. Chiquita *et al.*, "The Retina as a Window or Mirror of the Brain Changes Detected in Alzheimer's Disease: Critical Aspects to Unravel," *Mol. Neurobiol.*, vol. 56, no. 8, pp. 5416–5435, 2019.
- [19] M. Koronyo-hamaoui *et al.*, "Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model," *Neuroimage*, vol. 54, pp. S204–S217, 2011.
- [20] J. L. Jankowsky, H. H. Slunt, T. Ratovitski, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and D. R. Borchelt, "Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: A comparison of strategies," *Biomol. Eng.*, vol. 17, no. 6, pp. 157–165, 2001.
- [21] M. Garcia-Alloza *et al.*, "Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease," *Neurobiol. Dis.*, vol. 24, no. 3, pp. 516–524, 2006.
- [22] D. R. Borchelt and G. Thinakaran, "Familial Alzheimer's Disease–Linked Presenilin 1 Variants Elevate Ab_{1–42}/1–40 Ratio In Vitro and In Vivo," *Neuron*, vol. 17, no. 43, pp. 1005–1013, 1996.
- [23] Y. Koronyo *et al.*, "Retinal amyloid pathology and proof-of-concept imaging trial in Alzheimer's disease," *JCI Insight*, vol. 2, no. 16, pp. 1–19, 2017.
- [24] J. den Haan *et al.*, "Amyloid-beta and phosphorylated tau in post-mortem Alzheimer's disease retinas," *Acta Neuropathol. Commun.*, vol. 6, no. 1, p. 147, 2018.
- [25] X. Hadoux, "Non-invasive in vivo hyperspectral imaging of the retina for potential biomarker use in Alzheimer's disease," pp. 1–12, 2019.
- [26] S. Jentsch *et al.*, "Retinal fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy measures depend on the severity of Alzheimer's disease," *Acta Ophthalmol.*, vol. 93, no. 4, pp. e241–e247, 2015.
- [27] S. S. More and R. Vince, "Hyperspectral Imaging Signatures Detect Amyloidopathy in Alzheimer's Mouse Retina Well before Onset of Cognitive Decline," *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 6, no. 2, pp. 306–315, Feb. 2015.
- [28] *et al.* Gadelha, *A saúde no Brasil em 2030: organização e gestão do sistema de saúde - Vol. 3*, Fiocruz. Rio de Janeiro, 2013.
- [29] N. Rosenberg, "Scientific instrumentation and university research," *Res. Policy*, vol. 21, no. 4, pp. 381–390, 1992.
- [30] C. L. Evans and X. S. Xie, "Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine," *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 1, no. 1, pp. 883–909, 2008.
- [31] J. P. Pezacki, J. A. Blake, D. C. Danielson, D. C. Kennedy, R. K. Lyn, and R. Singaravelu, "Chemical contrast for imaging living systems: Molecular vibrations drive CARS microscopy," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 3, pp. 137–145, 2011.
- [32] P. Matousek and N. Stone, "Development of deep subsurface Raman spectroscopy for medical diagnosis and disease monitoring," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 45, no. 7, pp. 1794–1802, 2016.
- [33] M. Ji *et al.*, "Rapid, Label-Free Detection of Brain Tumors with Stimulated Raman Scattering Microscopy," *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, no. 201, pp. 201ra119 LP-201ra119, Sep. 2013.

- [34] R. Pandey *et al.*, "Noninvasive Monitoring of Blood Glucose with Raman Spectroscopy," *Acc. Chem. Res.*, vol. 50, no. 2, pp. 264–272, 2017.
- [35] J. R. Beattie *et al.*, "Raman spectroscopy as a predictive tool for monitoring osteoporosis therapy in a rat model of postmenopausal osteoporosis," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 30, no. 2, 2019.
- [36] U. Neugebauer, S. Trenkmann, T. Bocklitz, D. Schmerler, M. Kiehntopf, and J. Popp, "Fast differentiation of SIRS and sepsis from blood plasma of ICU patients using Raman spectroscopy," *J. Biophotonics*, vol. 7, no. 3–4, pp. 232–240, 2014.
- [37] M. T. Cicerone and C. H. Camp, "Potential roles for spectroscopic coherent raman imaging for histopathology and biomedicine," in *Neurophotonics and Biomedical Spectroscopy*, Elsevier Ltd, 2018, pp. 547–570.
- [38] E. A. Fonseca *et al.*, "A fingerprint of amyloid plaques in a bitransgenic animal model of Alzheimer's disease obtained by statistical unmixing analysis of hyperspectral Raman data," *Analyst*, vol. 144, pp. 7049–7056, 2019.
- [39] M. Ji *et al.*, "Label-free imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease with stimulated Raman scattering microscopy," *Sci. Adv.*, vol. 4, no. 11, p. eaat7715, 2018.
- [40] F. Palombo *et al.*, "Detection of A β plaque-associated astrogliosis in Alzheimer's disease brain by spectroscopic imaging and immunohistochemistry," *Analyst*, vol. 143, no. 4, pp. 850–857, 2018.
- [41] S. S. More, J. M. Beach, and R. Vince, "Early detection of amyloidopathy in Alzheimer's mice by hyperspectral endoscopy," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 57, no. 7, pp. 3231–3238, 2016.
- [42] E. J. Mufson *et al.*, "Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer's disease," *Neuroscience*, vol. 309, pp. 51–67, Nov. 2015.
- [43] R. A. Stelzmann, H. Norman Schnitzlein, and F. Reed Murtagh, "An english translation of alzheimer's 1907 paper, 'über eine eigenartige erkankung der hirnrinde,'" *Clin. Anat.*, vol. 8, no. 6, pp. 429–431, 1995.
- [44] R. J. O. and P. C. Wong, "Amyloid Precursor Protein Processing in Alzheimer's Disease," *Annu Rev Neurosci*, vol. 6, no. 1, pp. 1–4, 2011.
- [45] D. J. Selkoe, "Alzheimer's Disease : Genes , Proteins , and Therapy," *Physiol. Rev.*, vol. 81, no. 2, pp. 741–766, 2001.
- [46] H. J. Aizenstein *et al.*, "Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly," *Arch. Neurol.*, vol. 65, no. 11, pp. 1509–1517, 2008.
- [47] O. Zolocheska, N. Bjorklund, R. Woltjer, J. E. Wiktorowicz, and G. Tagliatela, "Postsynaptic Proteome of Non-Demented Individuals with Alzheimer's Disease Neuropathology," *J. Alzheimer's Dis.*, vol. 65, pp. 1–24, 2018.
- [48] R. J. O'Brien and P. C. Wong, "Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease," *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 34, no. 1, pp. 185–204, 2011.
- [49] G. G. Glenner and C. W. Wong, "Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 120, no. 3, pp. 885–890, 1984.
- [50] J. Weingarten, M. Weingarten, M. Wegner, and W. Volkandt, "APP—A novel player within the presynaptic active zone proteome," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 10, no. February, pp. 1–6, 2017.

- [51] T. A. Bayer, R. Cappai, C. L. Masters, K. Beyreuther, and G. Multhaup, "It all sticks together—the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease," *Mol. Psychiatry*, vol. 4, no. 6, pp. 524–528, 1999.
- [52] M. O. Ott and S. L. Bullock, "A gene trap insertion reveals that amyloid precursor protein expression is a very early event in murine embryogenesis," *Dev. Genes Evol.*, vol. 211, no. 7, pp. 355–357, 2001.
- [53] U. C. Müller, T. Deller, and M. Korte, "Not just amyloid: Physiological functions of the amyloid precursor protein family," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 18, no. 5, pp. 281–298, 2017.
- [54] U. C. Müller and H. Zheng, "Physiological functions of APP family proteins," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, no. 2, pp. 1–17, 2012.
- [55] L. J. Sosa, A. Cáceres, S. Dupraz, M. Oksdath, S. Quiroga, and A. Lorenzo, "The physiological role of the amyloid precursor protein as an adhesion molecule in the developing nervous system," *J. Neurochem.*, vol. 143, no. 1, pp. 11–29, 2017.
- [56] S. Jiang, Y. Li, X. Zhang, G. Bu, H. Xu, and Y. Zhang, "Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease," *Mol. Neurodegener.*, vol. 9, p. 6, Jan. 2014.
- [57] J. M. Zolezzi, S. Bastías-Candia, M. J. Santos, and N. C. Inestrosa, "Alzheimer's disease: Relevant molecular and physiopathological events affecting amyloid- β brain balance and the putative role of PPARs," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 6, no. JUL, pp. 1–12, 2014.
- [58] K. Duff *et al.*, "Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1," *Nature*, vol. 383, no. 6602, pp. 710–713, 1996.
- [59] S. R. DeBoer, G. Dolios, R. Wang, and S. S. Sisodia, "Differential Release of β -Amyloid from Dendrite- Versus Axon-Targeted APP," *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 37, pp. 12313 LP – 12327, Sep. 2014.
- [60] M. Ahmed *et al.*, "Structural conversion of neurotoxic amyloid- β 1–42 oligomers to fibrils," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 17, no. 5, pp. 561–567, 2010.
- [61] M. Ahmed *et al.*, "Structural conversion of neurotoxic amyloid- β 1–42 oligomers to fibrils," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 17, no. 5, pp. 561–567, 2010.
- [62] M. A. Wälti *et al.*, "Atomic-resolution structure of a disease-relevant A β (1–42) amyloid fibril," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 34, pp. E4976–E4984, 2016.
- [63] A. T. Petkova, R. D. Leapman, and Z. Guo, "Self-Propagating , Molecular-Level Polymorphism in Alzheimer ' s b -Amyloid Fibrils," vol. 307, no. January, pp. 262–265, 2005.
- [64] J. X. Lu, W. Qiang, W. M. Yau, C. D. Schwieters, S. C. Meredith, and R. Tycko, "Molecular structure of beta-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue," *Cell*, vol. 154, no. 6, pp. 1257–1268, 2013.
- [65] H. W. Querfurth and F. M. LaFerla, "Alzheimer's disease," *N. Engl. J. Med.*, pp. 329–344, 2010.
- [66] R. J. O'Brien and P. C. Wong, "Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease," *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 34, pp. 185–204, 2011.
- [67] N. Shepardson, D. Walsh, G. Chen, D. J. Selkoe, T. Yang, and M. Jin, "Soluble amyloid - protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 14, pp. 5819–5824, 2011.
- [68] G. M. Shankar *et al.*, "Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory," *Nat. Med.*, vol. 14, no. 8, pp. 837–842, 2008.

- [69] T. F. Gendron, "The role of tau in neurodegeneration," *Mol. Neurodegener.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–19, 2009.
- [70] L. I. Binder, A. L. Guillozet-Bongaarts, F. Garcia-Sierra, and R. W. Berry, "Tau, tangles, and Alzheimer's disease," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1739, no. 2, pp. 216–223, 2005.
- [71] R. Adalbert, J. Gilley, and M. P. Coleman, "A β , tau and ApoE4 in Alzheimer's disease: the axonal connection," *Trends Mol. Med.*, vol. 13, no. 4, pp. 135–142, 2007.
- [72] R. Adalbert *et al.*, "Severely dystrophic axons at amyloid plaques remain continuous and connected to viable cell bodies," *Brain*, vol. 132, no. 2, pp. 402–416, 2009.
- [73] K. Herrup, "The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis," *Nat. Neurosci.*, vol. 18, no. 6, pp. 794–799, 2015.
- [74] P. Vemuri, "'Exceptional brain aging' without Alzheimer's disease: Triggers, accelerators, and the net sum game Rik Ossenkoppele," *Alzheimer's Res. Ther.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–8, 2018.
- [75] F. Kametani and M. Hasegawa, "Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease," *Front. Neurosci.*, vol. 12, no. JAN, 2018.
- [76] D. J. Selkoe, "Alzheimer's Disease : Genes , Proteins , and Therapy," vol. 81, no. 2, pp. 741–767, 2001.
- [77] J. Grutzendler, K. Helmin, J. Tsai, and W. B. Gan, "Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1097, pp. 30–39, 2007.
- [78] E. Vicario-Orri, C. M. Opazo, and F. J. Muñoz, "The pathophysiology of axonal transport in Alzheimer's disease," *J. Alzheimer's Dis.*, vol. 43, no. 4, pp. 1097–1113, 2014.
- [79] M. Fakhoury, "Microglia and astrocytes in Alzheimer's disease: implications for therapy," *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 15, pp. 508–518, 2017.
- [80] R. E. González-Reyes, M. O. Nava-Mesa, K. Vargas-Sánchez, D. Ariza-Salamanca, and L. Mora-Muñoz, "Involvement of astrocytes in Alzheimer's disease from a neuroinflammatory and oxidative stress perspective," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 10, no. December, pp. 1–20, 2017.
- [81] C. Condello, P. Yuan, A. Schain, and J. Grutzendler, "Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques," *Nat. Commun.*, vol. 6, no. May 2014, pp. 1–14, 2015.
- [82] P. Yuan *et al.*, "TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy," *Neuron*, vol. 90, no. 4, pp. 724–739, 2016.
- [83] J. J. Rodríguez-Arellano, V. Parpura, R. Zorec, and A. Verkhratsky, "Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease," *Neuroscience*, vol. 323, pp. 170–182, 2016.
- [84] A. Bhadbhade and D. W. Cheng, "Amyloid Precursor Protein Processing in Alzheimer's Disease," *Iran. J. Child Neurol.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–4, 2012.
- [85] E. I. Yakupova, L. G. Bobyleva, I. M. Vikhlyantsev, and A. G. Bobylev, "Congo Red and amyloids: history and relationship," *Biosci. Rep.*, vol. 39, no. 1, p. BSR20181415, Jan. 2019.
- [86] V. Van Giau, E. Bagyinszky, Y. S. Yang, Y. C. Youn, S. S. A. An, and S. Y. Kim, "Genetic analyses of early-onset Alzheimer's disease using next generation sequencing," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 8368, 2019.
- [87] I. T. Lott and E. Head, "Dementia in Down syndrome: unique insights for Alzheimer disease research," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 15, no. 3, pp. 135–147, 2019.

- [88] D. Avramopoulos, "Genetics of Alzheimer's disease: recent advances," *Genome Med.*, vol. 1, no. 3, p. 34, Mar. 2009.
- [89] J. M. Castellano *et al.*, "Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- β Peptide Clearance," *Sci. Transl. Med.*, vol. 3, no. 89, pp. 89ra57 LP-89ra57, Jun. 2011.
- [90] R. L. Buckner, "Molecular, Structural, and Functional Characterization of Alzheimer's Disease: Evidence for a Relationship between Default Activity, Amyloid, and Memory," *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 34, pp. 7709–7717, 2005.
- [91] G. Mckhann, D. Drachman, M. Folstein, and R. Katzman, "Clinical diagnosis of Alzheimer," no. July, 1984.
- [92] A. G. Vlassenko, T. L. S. Benzinger, and J. C. Morris, "PET amyloid-beta imaging in preclinical Alzheimer's disease," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1822, no. 3, pp. 370–379, 2012.
- [93] T. Higashi *et al.*, "¹⁸F-FPYBF-2, a new F-18-labelled amyloid imaging PET tracer: first experience in 61 volunteers and 55 patients with dementia," *Ann. Nucl. Med.*, vol. 32, no. 3, pp. 206–216, 2018.
- [94] J. Sepulcre *et al.*, "In vivo tau, amyloid, and gray matter profiles in the aging brain," *J. Neurosci.*, vol. 36, no. 28, pp. 7364–7374, 2016.
- [95] D. Prvulovic, A. L. W. Bokde, F. Faltraco, and H. Hampel, "Functional magnetic resonance imaging as a dynamic candidate biomarker for Alzheimer's disease," *Prog. Neurobiol.*, vol. 95, no. 4, pp. 557–569, 2011.
- [96] C. Aguilar *et al.*, "Different multivariate techniques for automated classification of MRI data in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment," *Psychiatry Res. - Neuroimaging*, vol. 212, no. 2, pp. 89–98, 2013.
- [97] L. Beltrachini, M. Marco, Z. Taylor, J. Lotjonen, A. Frangi, and A. Venneri, "Integration of Cognitive Tests and Resting State fMRI for the Individual Identification of Mild Cognitive Impairment," *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 12, no. 6, pp. 592–603, 2015.
- [98] K. Blennow and H. Hampel, "CSF markers for incipient Alzheimer's disease," *Lancet Neurol.*, vol. 2, no. 10, pp. 605–613, 2003.
- [99] B. J. Snider *et al.*, "Cerebrospinal fluid biomarkers and rate of cognitive decline in very mild dementia of the Alzheimer type," *Arch. Neurol.*, vol. 66, no. 5, pp. 638–645, May 2009.
- [100] T. Sunderland *et al.*, "Decreased β -Amyloid1-42 and Increased Tau Levels in Cerebrospinal Fluid of Patients With Alzheimer Disease," *JAMA*, vol. 289, no. 16, pp. 2094–2103, Apr. 2003.
- [101] J. Vogelgsang, H. Shahpasand-Kroner, R. Vogelgsang, F. Streit, R. Vukovich, and J. Wiltfang, "Multiplex immunoassay measurement of amyloid- β 42 to amyloid- β 40 ratio in plasma discriminates between dementia due to Alzheimer's disease and dementia not due to Alzheimer's disease," *Exp. Brain Res.*, vol. 236, no. 5, pp. 1241–1250, 2018.
- [102] J. Sevigny *et al.*, "The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease," *Nature*, vol. 537, no. 7618, pp. 50–56, 2016.
- [103] P. C. May *et al.*, "Robust Central Reduction of Amyloid- β in Humans with an Orally Available, Non-Peptidic β -Secretase Inhibitor," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 46, pp. 16507 LP – 16516, Nov. 2011.
- [104] R. S. Doody *et al.*, "A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 4, pp. 341–350, Jul. 2013.

- [105] J. Cummings, G. Lee, A. Ritter, M. Sabbagh, and K. Zhong, "Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020," *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–29, 2020.
- [106] L. K. Huang, S. P. Chao, and C. J. Hu, "Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease," *J. Biomed. Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–13, 2020.
- [107] D. Nilsson and S. Pelger, "A pessimistic estimate of the time required for an eye to evolve," *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.*, vol. 256, no. 1345, pp. 53–58, Apr. 1994.
- [108] I. R. Schwab, "The evolution of eyes: Major steps. the Keeler lecture 2017: Centenary of Keeler Ltd," *Eye*, vol. 32, no. 2, pp. 302–313, 2018.
- [109] V. H. Perry and R. D. Lund, "Evidence that the lamina cribrosa prevents intraretinal myelination of retinal ganglion cell axons," *J. Neurocytol.*, vol. 19, no. 2, pp. 265–272, 1990.
- [110] J. W. Streilein, "Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 11, pp. 879–889, 2003.
- [111] M. Filippi *et al.*, "Multiple sclerosis," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 4, no. 1, p. 43, 2018.
- [112] E. M. Frohman, J. G. Fujimoto, T. C. Frohman, P. A. Calabresi, G. Cutter, and L. J. Balcer, "Optical coherence tomography: a window into the mechanisms of multiple sclerosis," *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, vol. 4, no. 12, pp. 664–675, 2008.
- [113] J. Britze, G. Pihl-Jensen, and J. L. Frederiksen, "Retinal ganglion cell analysis in multiple sclerosis and optic neuritis: a systematic review and meta-analysis," *J. Neurol.*, vol. 264, no. 9, pp. 1837–1853, 2017.
- [114] A. J. Green, S. McQuaid, S. L. Hauser, I. V. Allen, and R. Lyness, "Ocular pathology in multiple sclerosis: Retinal atrophy and inflammation irrespective of disease duration," *Brain*, vol. 133, no. 6, pp. 1591–1601, 2010.
- [115] H. Carrete, "A doença de Parkinson e os parkinsonismos atípicos: A importância da ressonância magnética como potencial biomarcador," *Radiol. Bras.*, vol. 50, no. 4, pp. V–VI, 2017.
- [116] S. Mohana Devi, I. Mahalaxmi, N. P. Aswathy, V. Dhivya, and V. Balachandar, "Does retina play a role in Parkinson's Disease?," *Acta Neurol. Belg.*, vol. 120, no. 2, pp. 257–265, 2020.
- [117] P. Sengupta, K. Dutta, S. Ghosh, A. Mukherjee, S. Pal, and D. Basu, "Optical Coherence Tomography Findings in Patients of Parkinson's Disease: An Indian Perspective," *Ann. Indian Acad. Neurol.*, vol. 21, no. 2, pp. 150–155, 2018.
- [118] M. B. A. Djamgoz, M. W. Hankins, J. Hirano, and S. N. Archer, "Neurobiology of retinal dopamine in relation to degenerative states of the tissue," *Vision Res.*, vol. 37, no. 24, pp. 3509–3529, 1997.
- [119] I. Ortuño-Lizarán, T. G. Beach, G. E. Serrano, D. G. Walker, C. H. Adler, and N. Cuenca, "Phosphorylated α -synuclein in the retina is a biomarker of Parkinson's disease pathology severity," *Mov. Disord.*, vol. 33, no. 8, pp. 1315–1324, Aug. 2018.
- [120] L. Stefanis, " α -Synuclein in Parkinson's disease," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, no. 2, pp. a009399–a009399, Feb. 2012.
- [121] D. R. Hinton, A. A. Sadun, J. C. Blanks, and C. A. Miller, "Optic-Nerve Degeneration in Alzheimer's Disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 315, no. 8, pp. 485–487, Aug. 1986.
- [122] A. A. Sadun and C. J. Bassi, "Optic Nerve Damage in Alzheimer's Disease," *Ophthalmology*, vol. 97, no. 1, pp. 9–17, 1990.
- [123] J. C. Blanks, D. R. Hinton, A. A. Sadun, and C. A. Miller, "Retinal ganglion cell degeneration in Alzheimer's disease," *Brain Res.*, vol. 501, no. 2, pp. 364–372, 1989.

- [124] J. C. Blanks, S. Y. Schmidt, Y. Torigoe, K. V. Porrello, D. R. Hinton, and R. H. I. Blanks, "Retinal pathology in Alzheimer's disease. II. Regional neuron loss and glial changes in GCL," *Neurobiol. Aging*, vol. 17, no. 3, pp. 385–395, 1996.
- [125] K. Chiu, K.-F. So, and R. Chuen-Chung, "Progressive Neurodegeneration of Retina in Alzheimer's Disease — Are β -Amyloid Peptide and Tau New Pathological Factors in Glaucoma?," *Glaucoma - Basic Clin. Asp.*, 2013.
- [126] B. Katz, S. Rimmer, V. Iragui, and R. Katzman, "Abnormal pattern electroretinogram in Alzheimer's disease: Evidence for retinal ganglion cell degeneration?," *Ann. Neurol.*, vol. 26, no. 2, pp. 221–225, Aug. 1989.
- [127] C. Q. Mountjoy, M. Roth, N. J. R. Evans, and H. M. Evans, "Cortical neuronal counts in normal elderly controls and demented patients," *Neurobiol. Aging*, vol. 4, no. 1, pp. 1–11, 1983.
- [128] D. A. Lewis, M. J. Campbell, R. D. Terry, and J. H. Morrison, "Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices," *J. Neurosci.*, vol. 7, no. 6, pp. 1799 LP – 1808, Jun. 1987.
- [129] P. R. Hof and J. H. Morrison, "Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: II. Primary and secondary visual cortex," *J. Comp. Neurol.*, vol. 301, no. 1, pp. 55–64, Nov. 1990.
- [130] N. J. Hart, Y. Koronyo, K. L. Black, and M. Koronyo-Hamaoui, "Ocular indicators of Alzheimer's: exploring disease in the retina," *Acta Neuropathol.*, vol. 132, no. 6, pp. 767–787, Dec. 2016.
- [131] J. H. Kam, E. Lenassi, and G. Jeffery, "Viewing ageing eyes: Diverse sites of amyloid beta accumulation in the ageing mouse retina and the up-regulation of macrophages," *PLoS One*, vol. 5, no. 10, 2010.
- [132] B. Liu, S. Rasool, Z. Yang, J. Ge, and Z. Tan, "Amyloid-Peptide Vaccinations Reduce β -Amyloid Plaques but Exacerbate Vascular Deposition and Inflammation in the Retina of Alzheimer's Transgenic Mice," *Am. J. Pathol.*, vol. 175, no. 5, pp. 2099–2110, 2009.
- [133] K. U. Löffler, D. P. Edward, and M. O. Tso, "Immunoreactivity against tau, amyloid precursor protein, and beta-amyloid in the human retina," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 36, no. 1, pp. 24–31., 1995.
- [134] L. Guo *et al.*, "Targeting amyloid- β in glaucoma treatment," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 33, pp. 13444 LP – 13449, Aug. 2007.
- [135] A. Ning, J. Cui, E. To, K. H. Ashe, and J. Matsubara, "Amyloid- β Deposits Lead to Retinal Degeneration in a Mouse Model of Alzheimer Disease," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 49, no. 11, pp. 5136–5143, Nov. 2008.
- [136] J.-D. Ding *et al.*, "Anti-amyloid therapy protects against retinal pigmented epithelium damage and vision loss in a model of age-related macular degeneration," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 28, p. E279 LP-E287, Jul. 2011.
- [137] M. Shimazawa *et al.*, "Reduced retinal function in amyloid precursor protein-over-expressing transgenic mice via attenuating glutamate-N-methyl-d-aspartate receptor signaling," *J. Neurochem.*, vol. 107, no. 1, pp. 279–290, Oct. 2008.
- [138] H. V. Danesh-Meyer, H. Birch, J. Y.-F. Ku, S. Carroll, and G. Gamble, "Reduction of optic nerve fibers in patients with Alzheimer disease identified by laser imaging," *Neurology*, vol. 67, no. 10, pp. 1852 LP – 1854, Nov. 2006.

- [139] F. Berisha, G. T. Feke, C. L. Trempe, J. W. McMeel, and C. L. Schepens, "Retinal Abnormalities in Early Alzheimer's Disease," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 48, no. 5, pp. 2285–2289, May 2007.
- [140] C. S. Tsai *et al.*, "Optic Nerve Head and Nerve Fiber Layer in Alzheimer's Disease," *Arch. Ophthalmol.*, vol. 109, no. 2, pp. 199–204, 1991.
- [141] A. Ning, J. Cui, E. To, K. H. Ashe, and J. Matsubara, "Amyloid-beta deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 49, no. 11, pp. 5136–5143, Nov. 2008.
- [142] C. Poroy and A. Â. Yücel, "Optical Coherence Tomography: Is Really a New Biomarker for Alzheimer's Disease?," *Ann. Indian Acad. Neurol.*, vol. 21, no. 2, pp. 119–125, 2018.
- [143] V. Polo *et al.*, "Visual dysfunction and its correlation with retinal changes in patients with Alzheimer's disease," *Eye*, vol. 31, no. 7, pp. 1034–1041, 2017.
- [144] M. S. Rafii *et al.*, "The down syndrome biomarker initiative (DSBI) pilot: proof of concept for deep phenotyping of Alzheimer's disease biomarkers in down syndrome," *Front. Behav. Neurosci.*, vol. 9, no. September, pp. 1–11, 2015.
- [145] A. Sidiqi *et al.*, "In vivo Retinal Fluorescence Imaging With Curcumin in an Alzheimer Mouse Model," *Front. Neurosci.*, vol. 14, no. July, pp. 1–13, 2020.
- [146] C. Dysli, S. Wolf, M. Y. Berezin, L. Sauer, M. Hammer, and M. S. Zinkernagel, "Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy," *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 60, pp. 120–143, 2017.
- [147] S. S. More and R. Vince, "Hyperspectral imaging signatures detect amyloidopathy in alzheimers mouse retina well before onset of cognitive decline," *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 6, no. 2, pp. 306–315, 2015.
- [148] S. S. More, J. M. Beach, and R. Vince, "Early detection of amyloidopathy in Alzheimer's mice by hyperspectral endoscopy," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 57, no. 7, pp. 3231–3238, 2016.
- [149] H. J. Butler *et al.*, "Using Raman spectroscopy to characterize biological materials," *Nat. Protoc.*, vol. 11, no. 4, pp. 664–687, 2016.
- [150] C. V RAMAN and K. S. KRISHNAN, "A New Type of Secondary Radiation," *Nature*, vol. 121, no. 3048, pp. 501–502, 1928.
- [151] R. S. Das and Y. K. Agrawal, "Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications," *Vib. Spectrosc.*, vol. 57, no. 2, pp. 163–176, 2011.
- [152] L. A. Woodward, "Raman spectra of inorganic compounds," *Q. Rev. Chem. Soc.*, vol. 10, no. 2, pp. 185–207, 1956.
- [153] L. Sirleto, A. Vergara, and M. A. Ferrara, "Advances in stimulated Raman scattering in nanostructures," *Adv. Opt. Photonics*, vol. 9, no. 1, pp. 169–217, 2017.
- [154] J. De Gelder, K. De Gussem, P. Vandenabeele, and L. Moens, "Reference database of Raman spectra of biological molecules," no. April, pp. 1133–1147, 2007.
- [155] S. R. & D. I. U. R. Zanyar Movasaghi, "Raman Spectroscopy of Biological Tissues," *Appl. Spectrosc. Rev.*, no. September 2010, 2007.
- [156] M. B. Fenn, P. Xanthopoulos, G. Pyrgiotakis, S. R. Grobmyer, P. M. Pardalos, and L. L. Hench, "Raman Spectroscopy for Clinical Oncology," *Adv. Opt. Technol.*, vol. 2011, p. 213783, 2011.
- [157] D. I. Ellis and R. Goodacre, "Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: Biomedical

- applications of infrared and Raman spectroscopy," *Analyst*, vol. 131, no. 8, pp. 875–885, 2006.
- [158] A. S. Haka, K. E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 35, pp. 12371–12376, 2005.
- [159] M. S. Bergholt *et al.*, "Characterizing variability of in vivo Raman spectroscopic properties of different anatomical sites of normal colorectal tissue towards cancer diagnosis at colonoscopy," *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 2, pp. 960–966, 2015.
- [160] I. J. Pence *et al.*, "Clinical characterization of in vivo inflammatory bowel disease with Raman spectroscopy," *Biomed. Opt. Express*, vol. 8, no. 2, p. 524, 2017.
- [161] B. W. D. De Jong *et al.*, "Discrimination between nontumor bladder tissue and tumor by Raman spectroscopy," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 22, pp. 7761–7769, 2006.
- [162] J. Mo, W. Zheng, J. J. H. Low, J. Ng, A. Ilancheran, and Z. Huang, "High wavenumber raman spectroscopy for in vivo detection of cervical dysplasia," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 21, pp. 8908–8915, 2009.
- [163] A. Beljebbar, S. Dukic, N. Amharref, and M. Manfait, "Ex vivo and in vivo diagnosis of C6 glioblastoma development by Raman spectroscopy coupled to a microprobe," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 1, pp. 477–487, 2010.
- [164] M. Jermyn *et al.*, "Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans," *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, no. 274, p. 93180D, 2015.
- [165] K. Kong, C. Kendall, N. Stone, and I. Notingham, "Raman spectroscopy for medical diagnostics - From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 89, pp. 121–134, 2015.
- [166] T. C. Hollon *et al.*, "Near real-time intraoperative brain tumor diagnosis using stimulated Raman histology and deep neural networks," *Nat. Med.*, vol. 26, no. 1, pp. 52–58, 2020.
- [167] A. Zumbusch, G. R. Holtom, and X. S. Xie, "Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-stokes raman scattering," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 82, no. 20, pp. 4142–4145, 1999.
- [168] M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, "Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope," *Opt. Lett.*, vol. 7, no. 8, p. 350, 1982.
- [169] P. O. Brown *et al.*, "Label-Free Biomedical Imaging with High Sensitivity by Stimulated Raman Scattering Microscopy," *Science (80-.)*, vol. 1857, no. December, pp. 1857–1861, 2008.
- [170] C. L. Evans and X. S. Xie, "Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine," *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 1, no. 1, pp. 883–909, 2008.
- [171] F. Hu, L. Shi, and W. Min, "Biological imaging of chemical bonds by stimulated Raman scattering microscopy," *Nat. Methods*, vol. 16, no. 9, pp. 830–842, 2019.
- [172] T. A. Henderson and L. D. Morries, "Near-infrared photonic energy penetration: can infrared phototherapy effectively reach the human brain?," *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, vol. 11, pp. 2191–2208, Aug. 2015.
- [173] S. Stolik, J. A. Delgado, A. Pérez, and L. Anasagasti, "Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human 'ex vivo' tissues," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 57, no. 2, pp. 90–93, 2000.

- [174] T. C. Hollon *et al.*, "Rapid intraoperative diagnosis of pediatric brain tumors using stimulated raman histology," *Cancer Res.*, vol. 78, no. 1, pp. 278–289, 2018.
- [175] B. G. Saar, L. R. Contreras-Rojas, X. S. Xie, and R. H. Guy, "Imaging drug delivery to skin with stimulated raman scattering microscopy," *Mol. Pharm.*, vol. 8, no. 3, pp. 969–975, 2011.
- [176] L. Shi *et al.*, "Optical imaging of metabolic dynamics in animals," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, 2018.
- [177] L. Wei *et al.*, "Live-cell imaging of alkyne-tagged small biomolecules by stimulated Raman scattering," *Nat. Methods*, vol. 11, no. 4, pp. 410–412, 2014.
- [178] J. Bandekar, "Amide modes and protein conformation," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.*, vol. 1120, no. 2, pp. 123–143, 1992.
- [179] T. Hayashi and S. Mukamel, "Vibrational-exciton couplings for the amide I, II, III, and a modes of peptides," *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 37, pp. 11032–11046, 2007.
- [180] A. V. Mikhonin, Z. Ahmed, A. Ianoul, and S. A. Asher, "Assignments and conformational dependencies of the amide III peptide backbone UV resonance Raman bands," *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 49, pp. 19020–19028, 2004.
- [181] A. T. Michele Di Foggia, Paola Taddei, Armida Torreggiani, Monica Dettin, "Self-assembling peptides for biomedical applications: IR and Raman spectroscopies for the study of secondary structure," *Proteomics Res. Journal*, no. January, 2012.
- [182] F. Mallamace, C. Corsaro, D. Mallamace, S. Vasi, C. Vasi, and G. Dugo, "The role of water in protein's behavior: The two dynamical crossovers studied by NMR and FTIR techniques," *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 13, pp. 33–37, Nov. 2014.
- [183] A. Barth and C. Zscherp, "What vibrations tell us about proteins," *Q. Rev. Biophys.*, vol. 35, no. 4, pp. 369–430, 2002.
- [184] B. S. Krimm and J. Bandekar, "Vibrational Spectroscopy and Conformation," *Adv. Protein Chem.*, p. 48109, 1986.
- [185] E. A. Fonseca *et al.*, "A fingerprint of amyloid plaques in a bitransgenic animal model of Alzheimer's disease obtained by statistical unmixing analysis of hyperspectral Raman data," *Analyst*, vol. 144, no. 23, 2019.
- [186] J. Dong *et al.*, "Metal binding and oxidation of amyloid- β within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence," *Biochemistry*, vol. 42, no. 10, pp. 2768–2773, 2003.
- [187] P. Chen, A. Shen, W. Zhao, S.-J. Baek, H. Yuan, and J. Hu, "Raman signature from brain hippocampus could aid Alzheimer's disease diagnosis.," *Appl. Opt.*, vol. 48, no. 24, pp. 4743–4748, 2009.
- [188] R. Michael, A. Lenferink, G. F. J. M. Vrensen, E. Gelpi, R. I. Barraquer, and C. Otto, "Hyperspectral Raman imaging of neuritic plaques and neurofibrillary tangles in brain tissue from Alzheimer's disease patients," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- [189] K. L. Summers *et al.*, "A Multimodal Spectroscopic Imaging Method to Characterize the Metal and Macromolecular Content of Proteinaceous Aggregates ('Amyloid Plaques')," *Biochemistry*, vol. 56, no. 32, pp. 4107–4116, 2017.
- [190] R. J. Erckens, F. H. M. Jongsma, J. P. Wicksted, F. Hendrikse, W. F. March, and M. Motamedi, "Raman spectroscopy in ophthalmology: From experimental tool to applications in vivo," *Lasers Med. Sci.*, vol. 16, no. 4, pp. 236–252, 2001.
- [191] N. T. Yu and E. J. East, "Laser Raman spectroscopic studies of ocular lens and its isolated protein fractions," *J. Biol. Chem.*, vol. 250, no. 6, pp. 2196–2202, 1975.

- [192] J. W. K. S.C. GOHEEN, L.J. LIS and Biomedical, "RAMAN SPECTROSCOPY OF INTACT FELINE CORNEAL COLLAGEN," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 6, pp. 197–204, 1978.
- [193] R. J. Erckens, M. Motamedi, W. F. March, and J. P. Wicksted, "Raman Spectroscopy for Non-Invasive Characterization of Ocular Tissue: Potential for Detection of Biological Molecules," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 28, no. 5, pp. 293–299, 1997.
- [194] F. H. M. Jongsma *et al.*, "Confocal Raman spectroscopy system for noncontact scanning of ocular tissues: an in vitro study," *Opt. Eng.*, vol. 36, no. 11, pp. 3193–3199, Nov. 1997.
- [195] C. Stiebing *et al.*, "Nonresonant Raman spectroscopy of isolated human retina samples complying with laser safety regulations for in vivo measurements Nonresonant Raman spectroscopy of isolated human retina samples complying with laser," vol. 6, no. 4, 2019.
- [196] N. Yu, J. F. R. Kuck, C. C. Askren, S. Chem, G. I. Technol, and D. Ophthalmol, "Laser Raman spectroscopy of the lens in situ, measured in an anesthetized rabbit Current," *Curr. Eye Res.*, vol. 1, no. 10, pp. 615–618, 1982.
- [197] I. V. Ermakov, R. W. McClane, W. Gellermann, and P. S. Bernstein, "Resonant Raman detection of macular pigment levels in the living human retina," *Opt. Lett.*, vol. 26, no. 4, p. 202, 2001.
- [198] R. J. Erckens *et al.*, "Noninvasive Raman spectroscopic identification of intraocular lens material in the living human eye," *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 27, no. 7, pp. 1065–1070, 2001.
- [199] I. Ermakov, M. Ermakova, W. Gellermann, and P. S. Bernstein, "Macular pigment Raman detector for clinical applications," *J. Biomed. Opt.*, vol. 9, no. 1, p. 139, 2004.
- [200] W. Gellermann, I. V Ermakov, M. R. Ermakova, R. W. McClane, D.-Y. Zhao, and P. S. Bernstein, "In vivo resonant Raman measurement of macular carotenoid pigments in the young and the aging human retina.," *J. Opt. Soc. Am. A. Opt. Image Sci. Vis.*, vol. 19, no. 6, pp. 1172–86, 2002.
- [201] R. E. Hogg, R. S. Anderson, M. R. Stevenson, M. B. Zlatkova, and U. Chakravarthy, "In vivo macular pigment measurements: A comparison of resonance Raman spectroscopy and heterochromatic flicker photometry," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 91, no. 4, pp. 485–490, 2007.
- [202] J. W. Evans, R. J. Zawadzki, R. Liu, J. W. Chan, S. M. Lane, and J. S. Werner, "Optical coherence tomography and Raman spectroscopy of the ex-vivo retina," *J. Biophotonics*, vol. 2, no. 6–7, pp. 398–406, Jul. 2009.
- [203] O. Masihzadeh, D. A. Ammar, M. Y. Kahook, and T. C. Lei, "Coherent anti-stokes raman scattering (CARS) microscopy: A novel technique for imaging the retina," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 54, no. 5, pp. 3094–3101, 2013.
- [204] O. Masihzadeh, D. A. Ammar, T. C. Lei, and M. Y. Kahook, "Imaging the intact mouse cornea using Coherent Antistokes Raman scattering (cars)," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 54, no. 8, pp. 5258–5265, 2013.
- [205] S. He, C. Ye, Q. Sun, C. K. S. Leung, and J. Y. Qu, "Label-free nonlinear optical imaging of mouse retina," *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 3, p. 1055, 2015.
- [206] W. Gellermann, R. McClane, N. Balashov, and P. S. Bernstein, "Raman detection of human macular carotenoid pigments," vol. 39, no. 11, pp. 307–308, 1998.
- [207] I. V. Ermakov, R. W. McClane, W. Gellermann, and P. S. Bernstein, "Resonant Raman detection of macular pigment levels in the living human retina," *Opt. Lett.*, vol. 26, no. 4, p. 202, 2007.

- [208] T. Pazderka and V. Kopecký, "Drop coating deposition Raman spectroscopy of proteinogenic amino acids compared with their solution and crystalline state," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 185, pp. S1–S4, 2017.
- [209] D. R. Borchelt *et al.*, "Accelerated Amyloid Deposition in the Brains of Transgenic Mice Coexpressing Mutant Presenilin 1 and Amyloid Precursor Proteins," vol. 19, pp. 939–945, 1997.
- [210] M. Hedegaard, C. Matthäus, S. Hassing, C. Krafft, M. Diem, and J. Popp, "Spectral unmixing and clustering algorithms for assessment of single cells by Raman microscopic imaging," *Theor. Chem. Acc.*, vol. 130, no. 4–6, pp. 1249–1260, 2011.
- [211] M. A. B. Hedegaard, M. S. Bergholt, and M. M. Stevens, "Quantitative multi-image analysis for biomedical Raman spectroscopic imaging," *J. Biophotonics*, vol. 9, no. 5, pp. 542–550, 2016.
- [212] H. NOOTHALAPATI, K. IWASAKI, and T. YAMAMOTO, "Biological and Medical Applications of Multivariate Curve Resolution Assisted Raman Spectroscopy," *Anal. Sci.*, vol. 33, no. 1, pp. 15–22, 2017.
- [213] B. Sjöberg, S. Foley, B. Cardey, and M. Enescu, "An experimental and theoretical study of the amino acid side chain Raman bands in proteins," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 128, pp. 300–311, 2014.
- [214] I. Benilova, E. Karran, and B. De Strooper, "The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes," *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 3, pp. 349–357, 2012.
- [215] A. Rygula, K. Majzner, K. M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk, and M. Baranska, "Raman spectroscopy of proteins: A review," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 44, no. 8, pp. 1061–1076, 2013.
- [216] K. Czamara, K. Majzner, M. Z. Pacia, K. Kochan, A. Kaczor, and M. Baranska, "Raman spectroscopy of lipids: A review," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 46, no. 1, pp. 4–20, 2014.
- [217] A. M. Miranda *et al.*, "Line shape analysis of the Raman spectra from pure and mixed biofuels esters compounds," *Fuel*, vol. 115, pp. 118–125, 2014.
- [218] J. Dybas *et al.*, "Raman spectroscopy as a sensitive probe of soft tissue composition – Imaging of cross-sections of various organs vs. single spectra of tissue homogenates," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 85, pp. 117–127, 2016.
- [219] A. Rygula, K. Majzner, K. M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk, and M. Baranska, "Raman spectroscopy of proteins: A review," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 44, no. 8, pp. 1061–1076, 2013.
- [220] S. D. Moran and M. T. Zanni, "How to get insight into amyloid structure and formation from infrared spectroscopy," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 5, no. 11, pp. 1984–1993, 2014.
- [221] I. H. McColl *et al.*, "A new perspective on β -sheet structures using vibrational raman optical activity: From poly(L-lysine) to the prion protein," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 33, pp. 10019–10026, 2003.
- [222] R. W. Williams and A. K. Dunker, "Determination of the Secondary Structure of Proteins from the Amide-I Band of the Laser Raman-Spectrum," *J. Mol. Biol.*, vol. 152, no. 4, pp. 783–813, 1981.
- [223] M. A. DeTure and D. W. Dickson, "The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease," *Mol. Neurodegener.*, vol. 14, no. 1, p. 32, 2019.
- [224] N. Bergner, C. Krafft, K. D. Geiger, M. Kirsch, G. Schackert, and J. Popp, "Unsupervised unmixing of Raman microspectroscopic images for morphochemical analysis of non-dried brain tumor specimens," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 403, no. 3, pp. 719–725, 2012.
- [225] S. Ding, "Effects of tissue fixation on Raman spectroscopic characterization of retina,"

- 2015.
- [226] A. J. Hobro and N. I. Smith, "An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging," *Vib. Spectrosc.*, vol. 91, pp. 31–45, 2017.
- [227] T. Meyer *et al.*, "Nonlinear microscopy, infrared, and Raman microspectroscopy for brain tumor analysis," *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 2, p. 021113, 2011.
- [228] D. A. Orringer *et al.*, "Rapid intraoperative histology of unprocessed surgical specimens via fibre-laser-based stimulated Raman scattering microscopy," *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 1, no. 2, 2017.
- [229] C. Krafft, L. Neudert, T. Simat, and R. Salzer, "Near infrared Raman spectra of human brain lipids," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 61, no. 7, pp. 1529–1535, 2005.
- [230] R. G. Snyder, S. L. Hsu, and S. Krimm, "Vibrational spectra in the CH stretching region and the structure of the polymethylene chain," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.*, vol. 34, no. 4, pp. 395–406, 1978.
- [231] C. Stiebing *et al.*, "Complexity of fatty acid distribution inside human macrophages on single cell level using Raman micro-spectroscopy," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 27, pp. 7037–7046, 2014.
- [232] K. L. Summers *et al.*, "A Multimodal Spectroscopic Imaging Method to Characterize the Metal and Macromolecular Content of Proteinaceous Aggregates ('Amyloid Plaques')," *Biochemistry*, vol. 56, no. 32, pp. 4107–4116, 2017.
- [233] M. Z. Kastyak-Ibrahim *et al.*, "Biochemical label-free tissue imaging with subcellular-resolution synchrotron FTIR with focal plane array detector," *Neuroimage*, vol. 60, no. 1, pp. 376–383, 2012.
- [234] N. Benseny-Cases, O. Klementieva, M. Cotte, I. Ferrer, and J. Cladera, "Microspectroscopy (μ FTIR) reveals co-localization of lipid oxidation and amyloid plaques in human Alzheimer disease brains," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 24, pp. 12047–12054, 2014.
- [235] G. K. Rak M, Del Bigio MR, Mai S, Westaway D, "Dense-core and diffuse Abeta plaques in TgCRND8 mice studied with synchrotron FTIR microspectroscopy," *Biopolymers*, vol. 86, no. 5, pp. 345–347, 2007.
- [236] S. A. Asher *et al.*, "Dihedral ψ angle dependence of the amide III vibration: A uniquely sensitive UV resonance Raman secondary structural probe," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 47, pp. 11775–11781, 2001.
- [237] C. Condello, P. Yuan, and J. Grutzendler, "Microglia-Mediated Neuroprotection, TREM2, and Alzheimer's Disease: Evidence From Optical Imaging," *Biol. Psychiatry*, vol. 83, no. 4, pp. 377–387, 2018.
- [238] A. ElAli and S. Rivest, "Microglia in Alzheimer's disease: A multifaceted relationship," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 55, pp. 138–150, 2016.
- [239] T. R. Jay *et al.*, "TREM2 is required for microglial instruction of astrocytic synaptic engulfment in neurodevelopment," *Glia*, vol. 67, no. 10, pp. 1873–1892, 2019.
- [240] M. W. Salter and B. Stevens, "Microglia emerge as central players in brain disease," *Nat. Med.*, vol. 23, no. 9, pp. 1018–1027, 2017.
- [241] A. Serrano-Pozo *et al.*, "Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in alzheimer disease," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 72, no. 6, pp. 462–471, 2013.

- [242] U. K. Hanisch and H. Kettenmann, "Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain," *Nat. Neurosci.*, vol. 10, no. 11, pp. 1387–1394, 2007.
- [243] S. Mandrekar, Q. Jiang, C. Y. D. Lee, J. Koenigsnecht-Talboo, D. M. Holtzman, and G. E. Landreth, "Microglia mediate the clearance of soluble A β through fluid phase macropinocytosis," *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 13, pp. 4252–4262, 2009.
- [244] C. Condello, P. Yuan, A. Schain, and J. Grutzendler, "Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques," *Nat. Commun.*, vol. 6, no. May 2014, 2015.
- [245] E. E. Spangenberg *et al.*, "Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology," *Brain*, vol. 139, no. 4, pp. 1265–1281, 2016.
- [246] S. H. Baik, S. Kang, S. M. Son, and I. Mook-Jung, "Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid β in the brain of Alzheimer's disease mouse model," *Glia*, vol. 64, no. 12, pp. 2274–2290, 2016.
- [247] A. M. Arranz and B. De Strooper, "The role of astroglia in Alzheimer's disease: pathophysiology and clinical implications," *Lancet Neurol.*, vol. 18, no. 4, pp. 406–414, 2019.
- [248] L. P. Diniz *et al.*, "Astrocyte transforming growth factor beta 1 protects synapses against A β oligomers in Alzheimer's disease model," *J. Neurosci.*, vol. 37, no. 28, pp. 6797–6809, 2017.
- [249] J. Tsai, J. Grutzendler, K. Duff, and W. B. Gan, "Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches," *Nat. Neurosci.*, vol. 7, no. 11, pp. 1181–1183, 2004.
- [250] A. Gomez-Arboledas *et al.*, "Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease," *Glia*, vol. 66, no. 3, pp. 637–653, 2018.
- [251] C. V. P. Dessai, A. Pliss, A. N. Kuzmin, E. P. Furlani, and P. N. Prasad, "Coherent Raman spectroscopic imaging to characterize microglia activation pathway," *J. Biophotonics*, no. April 2018, pp. 1–5, 2019.
- [252] N. J. Kline and P. J. Treado, "Raman chemical imaging of breast tissue," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 28, no. 2–3, pp. 119–124, 1997.
- [253] P. Y. Sacré, C. De Bleye, P. F. Chavez, L. Netchacovitch, P. Hubert, and E. Ziemons, "Data processing of vibrational chemical imaging for pharmaceutical applications," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 101, pp. 123–140, 2014.
- [254] C. Krafft *et al.*, "Label-Free Molecular Imaging of Biological Cells and Tissues by Linear and Nonlinear Raman Spectroscopic Approaches," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 56, no. 16, pp. 4392–4430, 2017.
- [255] P. Giannakopoulos *et al.*, "Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease," *Neurology*, vol. 60, no. 9, pp. 1495–1500, 2003.
- [256] G. D. Rabinovici *et al.*, "Increased metabolic vulnerability in early-onset Alzheimer's disease is not related to amyloid burden," *Brain*, vol. 133, no. 2, pp. 512–528, 2010.
- [257] G. Forster, B. Sc, F. E. Matthews, D. Ph, and C. Brayne, "Age, Neuropathology, and Dementia," 2009.
- [258] C. Condello, A. Schain, and J. Grutzendler, "Multicolor time-stamp reveals the dynamics and toxicity of amyloid deposition," *Sci. Rep.*, vol. 1, 2011.
- [259] P. Gamba, G. Testa, S. Gargiulo, E. Staurengi, G. Poli, and G. Leonarduzzi, "Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 7, no. JUN, pp. 1–21, 2015.

- [260] M. O. W. Grimm, J. Mett, H. S. Grimm, and T. Hartmann, "App function and lipids: A bidirectional link," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 10, no. March, pp. 1–18, 2017.
- [261] A. N. Lazar *et al.*, "Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) imaging reveals cholesterol overload in the cerebral cortex of Alzheimer disease patients," *Acta Neuropathol.*, vol. 125, no. 1, pp. 133–144, 2013.
- [262] W. G. Wood, L. Li, W. E. Müller, and G. P. Eckert, "Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: A debatable hypothesis," *J. Neurochem.*, vol. 129, no. 4, pp. 559–572, 2014.
- [263] T. Mori *et al.*, "Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APPsw mice," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 60, no. 8, pp. 778–785, 2001.
- [264] T. Lebouvier, C. Perruchini, M. Panchal, M. C. Potier, and C. Duyckaerts, "Cholesterol in the senile plaque: Often mentioned, never seen," *Acta Neuropathol.*, vol. 117, no. 1, pp. 31–34, 2009.
- [265] T. L. Spires *et al.*, "Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy," *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 31, pp. 7278–7287, 2005.
- [266] R. M. Koffie *et al.*, "Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques," *PNAS*, vol. 106, pp. 4012–4017, 2009.
- [267] C. R. Liao *et al.*, "Synchrotron FTIR reveals lipid around and within amyloid plaques in transgenic mice and Alzheimer's disease brain," *Analyst*, vol. 138, no. 14, pp. 3991–3997, 2013.
- [268] R. J. Tidy, V. Lam, N. Fimognari, J. C. Mamo, and M. J. Hackett, "FTIR studies of the similarities between pathology induced protein aggregation in vivo and chemically induced protein aggregation ex vivo," *Vib. Spectrosc.*, vol. 91, pp. 68–76, 2017.
- [269] A. Daria *et al.*, "Young microglia restore amyloid plaque clearance of aged microglia," *EMBO J.*, vol. 36, no. 5, pp. 583–603, 2017.
- [270] A. Grimaldi *et al.*, "Inflammation, neurodegeneration and protein aggregation in the retina as ocular biomarkers for Alzheimer's disease in the 3xTg-AD mouse model," *Cell Death Dis.*, vol. 9, no. 6, 2018.

APÊNDICE A

FIGURA 61 mostrando a caracterização do espectro Raman em região de baixas frequências dos 16 aminoácidos constituintes do peptídeo β A. Foi usado o filtro “super *notch*” para conseguirmos acessar essa região do espectro abaixo de 40 cm^{-1} e a região de Anti-Stoke. Na **FIGURA 62** está apresentada a caracterização dos a.a. no intervalo de 40 à 4000 cm^{-1} . Nos dois casos, as amostras de a.a. estavam em pó. **FIGURA 63**, espectro dos aminoácidos em solução apresentados juntamente com o respectivo espectro em pó. O intervalo de frequência de 400 a 1800 cm^{-1} .

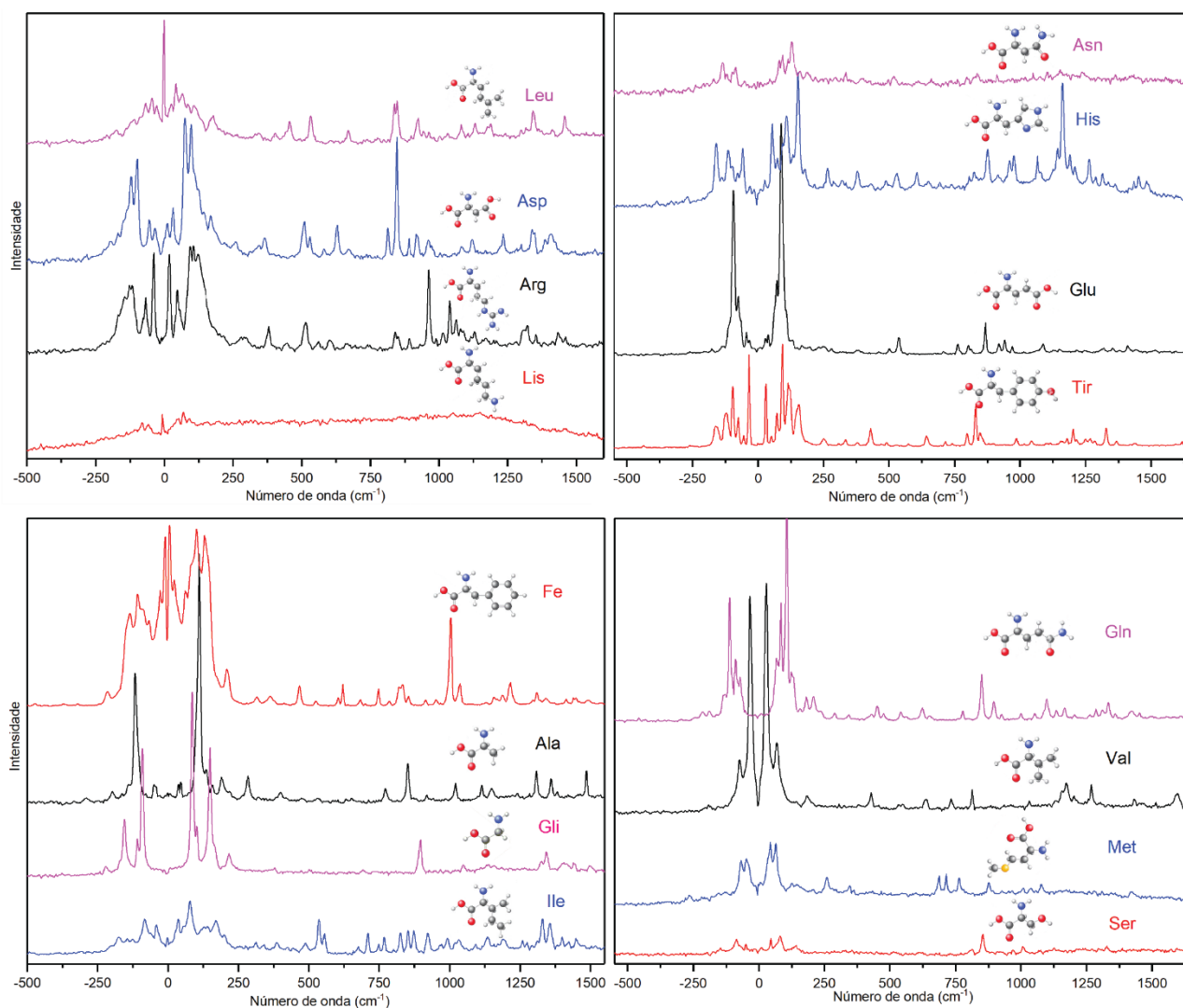
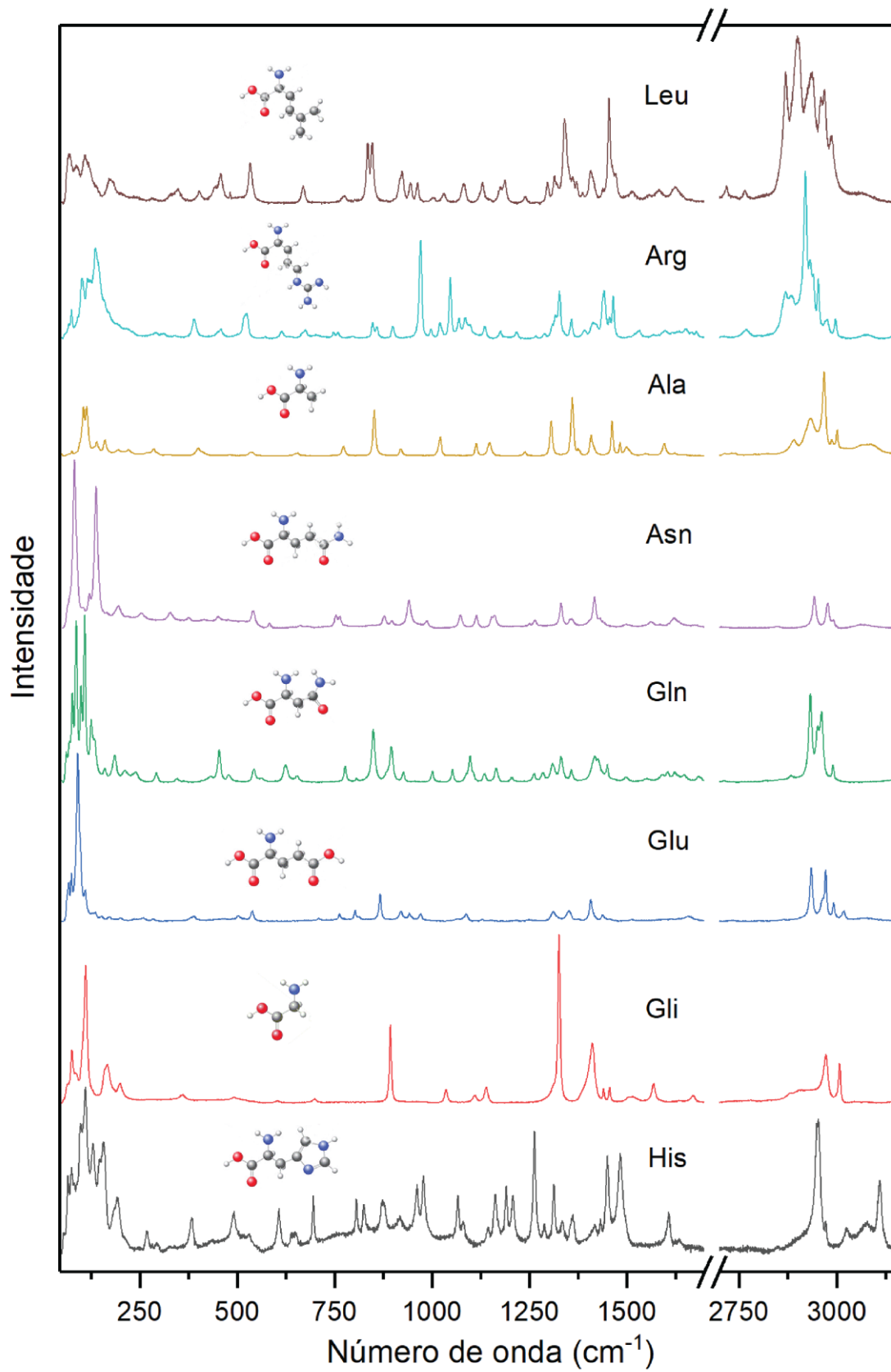


FIGURA 61. Espectro Raman de aminoácidos.

A região de vibrações anti-Stokes dos a.a. foi observada pela 1ª vez. A região entre 15 e 200 cm^{-1} apresenta picos intensos observados em tecidos biológicos. A estrutura molecular de cada a.a. está representada por desenho esquemático acima de cada espectro (representação dos círculos conforme sua cor: vermelha Oxigênio; cinza Carbono; azul Nitrogênio; branca Hidrogênio). Leu, leucina; Asp, ácido aspártico; Arg, arginina; Lis, lisina; Fe, fenilalanina; Ala, alanina; Gli, glicina; Ile, isoleucina; Gln, glutamina; Val, valina; Met, metionina; Ser, serina; Asn, asparagina; His, histidina, Glu, ácido glutâmico, Tir, tirosina.



Continua...

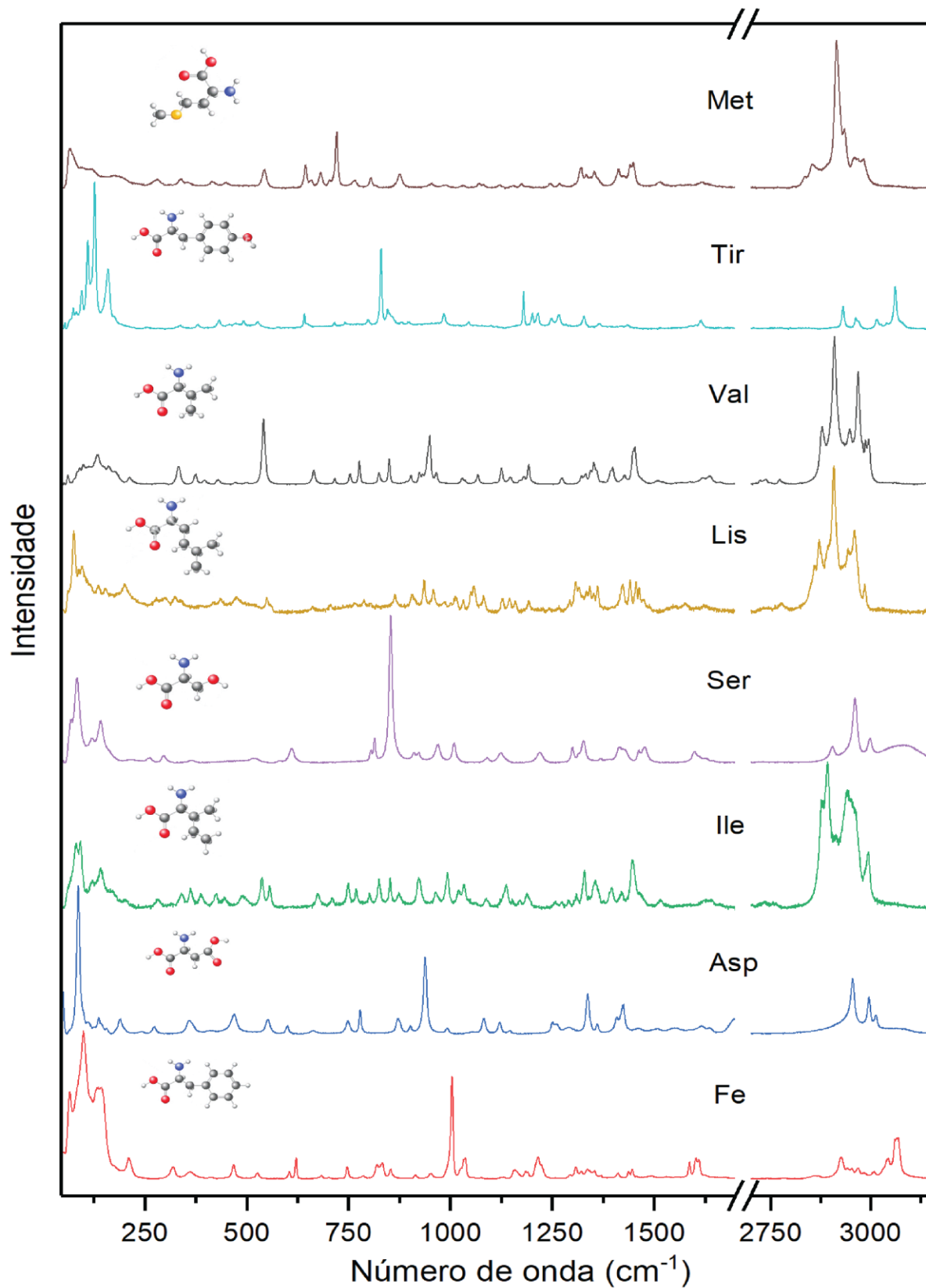
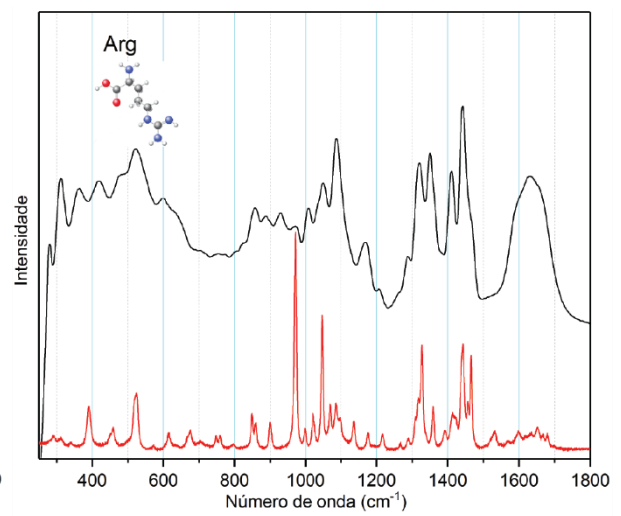
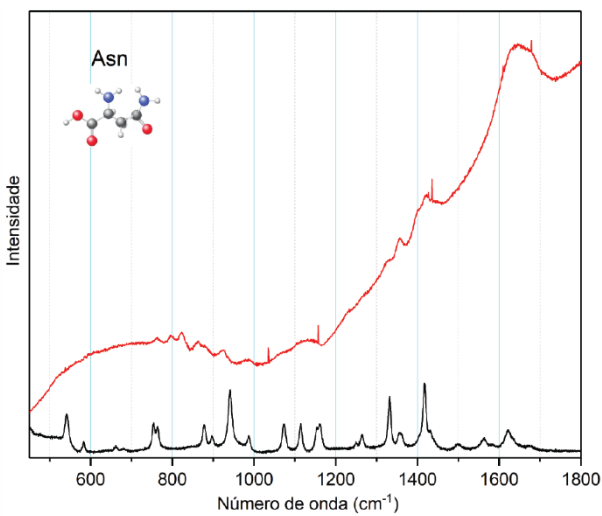
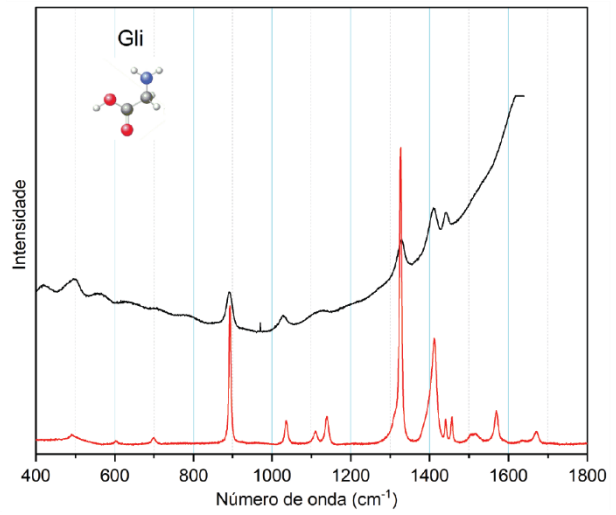
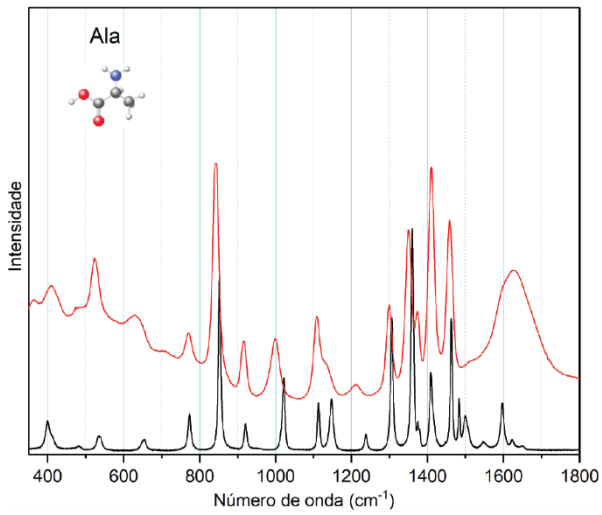
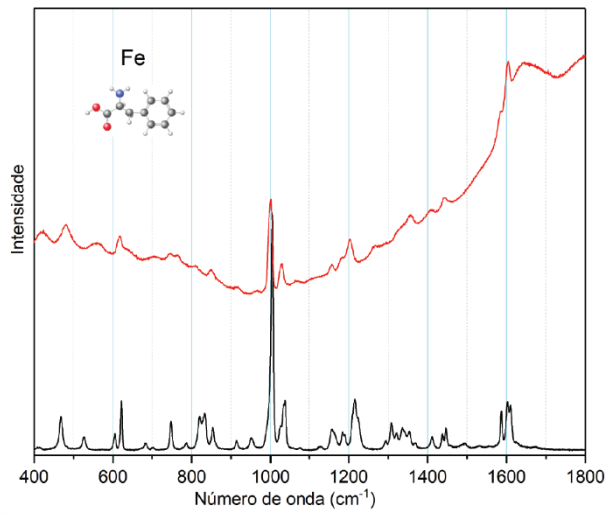
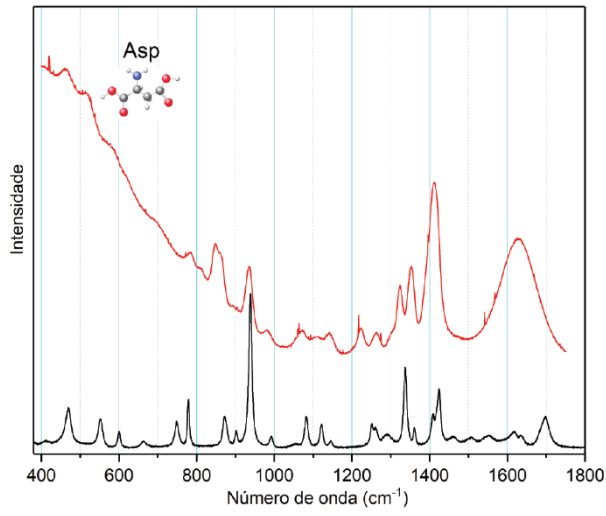
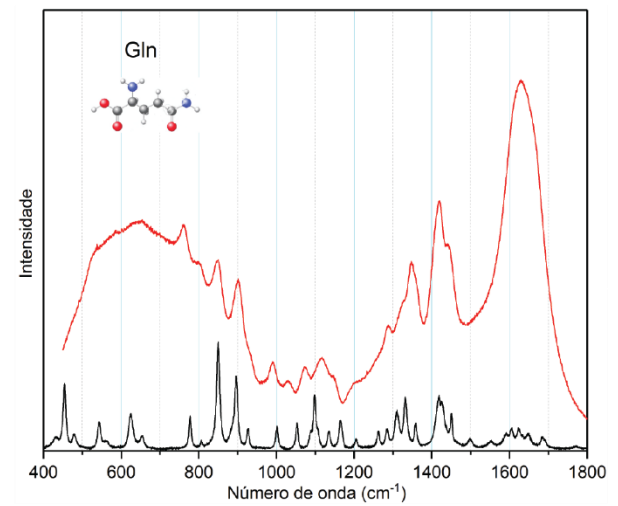
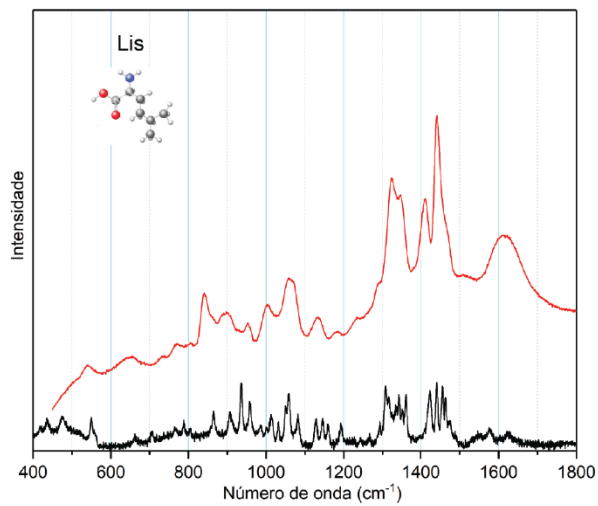
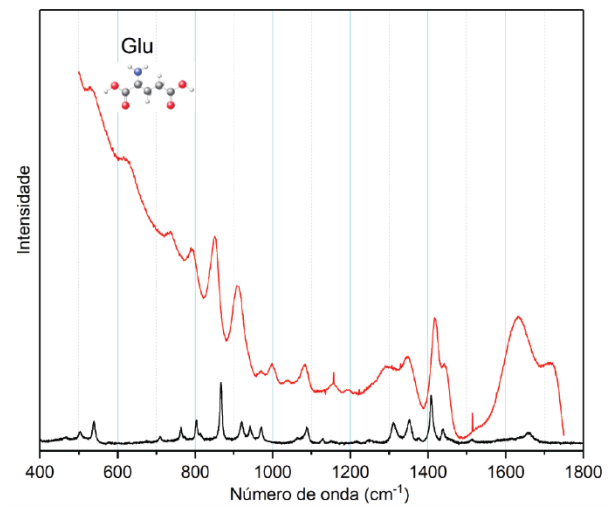
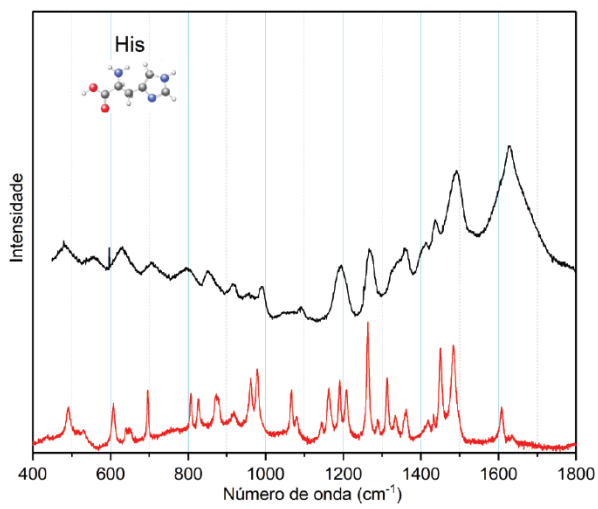
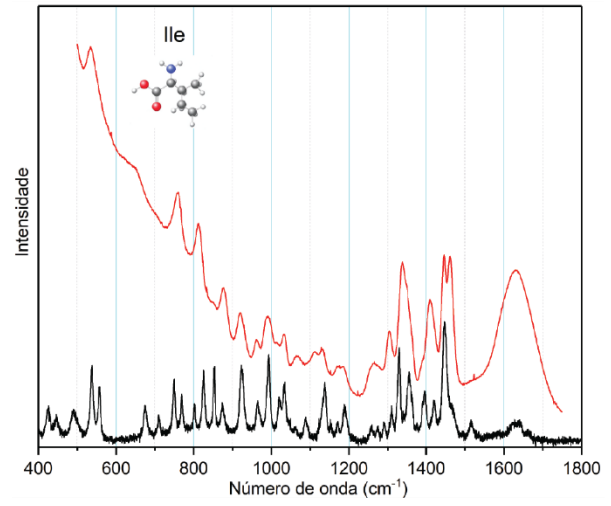
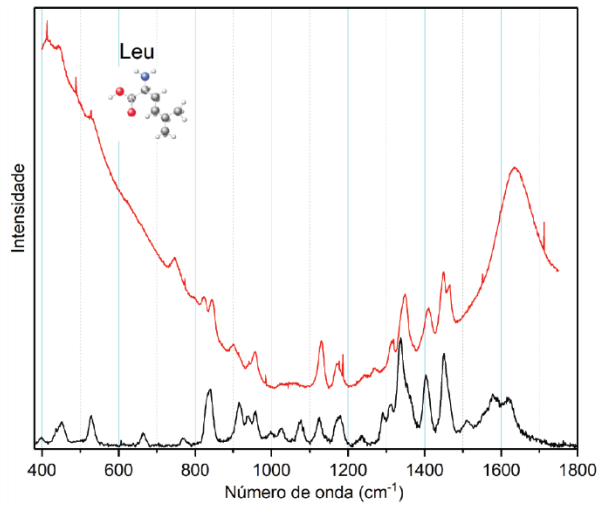


FIGURA 62. Espectro Raman dos a.a. em pó

Os espectros abrangem o intervalo de 40 a 4000 cm⁻¹. A estrutura molecular de cada a.a. está representada por desenho esquemático acima de cada espectro (representação dos círculos conforme sua cor: vermelha Oxigênio; cinza Carbono; azul Nitrogênio; branca Hidrogênio).



Continua...



Continua...

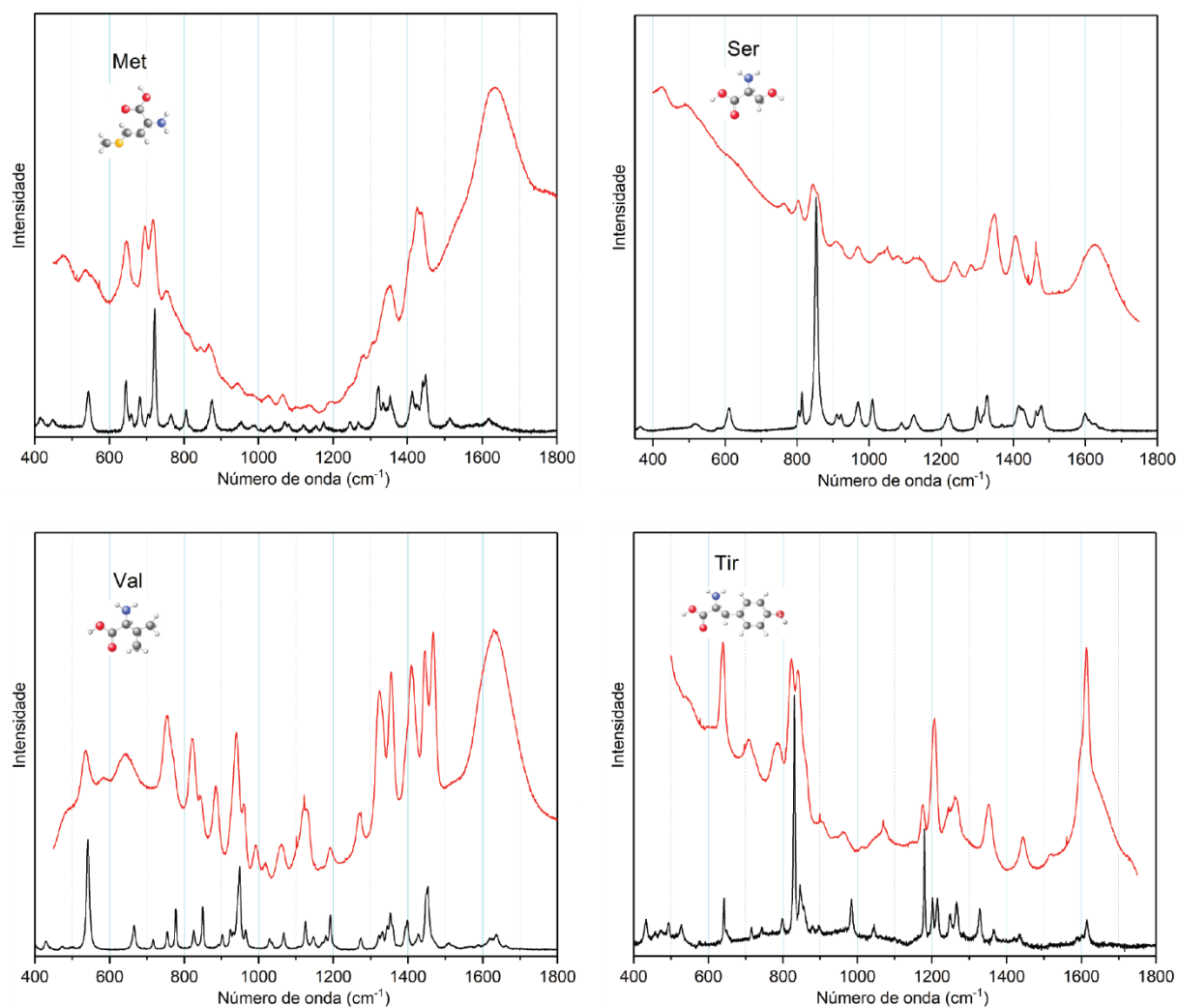


FIGURA 63. Comparação entre os espectros Raman de a.a. em solução e em pó

Várias frequências (picos) observados em pó (preto) estão presentes nas amostras em solução (vermelho). A estrutura molecular de cada a.a. está representada por desenho esquemático acima de cada espectro (representação dos círculos conforme sua cor: vermelha Oxigênio; cinza Carbono; azul Nitrogênio; branca Hidrogênio).

APÊNDICE B



Cite this: *Analyst*, 2019, **144**, 7049

A fingerprint of amyloid plaques in a bitransgenic animal model of Alzheimer's disease obtained by statistical unmixing analysis of hyperspectral Raman data

Emerson A. Fonseca,^{*a} Lucas Lafetá,^a Renan Cunha,^a Hudson Miranda,^b João Campos,^{id a} Helton G. Medeiros,^c Marco A. Romano-Silva,^{id d} Raigna A. Silva,^{a,e} Alexandre S. Barbosa,^{a,f} Rafael P. Vieira,^{id g} Leandro M. Malard^{id a} and Ado Jorio^{id *a}

The global prevalence of Alzheimer's disease (AD) points to endemic levels, especially considering the increase of average life expectancy worldwide. AD diagnosis based on early biomarkers and better knowledge of related pathophysiology are both crucial in the search for medical interventions that are able to modify AD progression. In this study we used unsupervised spectral unmixing statistical techniques to identify the vibrational spectral signature of amyloid β aggregation in neural tissues, as early biomarkers of AD in an animal model. We analyzed spectral images composed of a total of 55 051 Raman spectra obtained from the frontal cortex and hippocampus of five bitransgenic APP_{SWE}PS1 Δ E9 mice, and colocalized amyloid β plaques by other fluorescence techniques. The Raman signatures provided a multifrequency fingerprint consistent with the results of synthesized amyloid β fibrils. The fingerprint obtained from unmixed analysis in neural tissues is shown to provide a detailed image of amyloid plaques in the brain, with the potential to be used as biomarkers for non-invasive early diagnosis and pathophysiology studies in AD on the retina.

Received 23rd August 2019,
Accepted 13th October 2019

DOI: 10.1039/c9an01631g

rscl.li/analyst

Introduction

Global average life expectancy has increased in the last few decades, followed by a remarkable increase in the prevalence of age-related chronic diseases. Neurodegenerative disorders are highlighted among these, especially Alzheimer's disease (AD), the most severe and disabling form of dementia.¹ Due to the progressive neurodegeneration related to AD, as well as the limited impact of medical interventions in already disabled AD patients, there is a worldwide effort in establishing biomarkers for early AD diagnosis.^{2,3} The histopathological hallmarks of AD, the extracellular depositions of misfolded amyloid-beta

peptide ($A\beta$) forming amyloid plaques associated with neurofibrillary tangles, are the major subjects of investigation in AD diagnosis and pathophysiology.⁴

Raman spectroscopy, a technique based on the inelastic scattering of light by molecules, is a marker-free, widely used tool for identifying and characterizing biomaterials and biological tissues.^{5,6} However, tissues are composed of a mixture of distinct biomolecules,⁷ exhibiting a very complex Raman spectral signature that also depends on environmental conditions. In this context, identifying the spectral fingerprint of specific biomolecular structures in a biomedical relevant environment is challenging. The objective of this work is to establish a robust multifrequency Raman based fingerprint for the identification and compositional analysis of amyloid plaques.

Dong *et al.* characterized amyloid plaque cores from the human brain with Raman microscopy;⁸ Chen *et al.* performed a similar analysis from the rat brain after injection of the A β _{25–35} peptide into the hippocampus;⁹ a frequency blue-shift in the amide I Raman feature has been established as the main biomarker in amyloid plaque identification. Later, R. Michael *et al.* successfully imaged optically amyloid plaques in the human brain using a hyperspectral Raman technique.¹⁰ In a recent study using the APP/PS1 bitransgenic mice brain, stimulated Raman spectroscopy (SRS) exhibited the blue-shifted amide I frequency at 1670 cm⁻¹.¹¹

^aDepartamento de Física, ICEX, UFMG, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.
E-mail: ado.jorio@fisica.ufmg.br

^bPrograma de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, UFMG, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil

^cDivisão de Metrologia de Materiais, Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia (Inmetro), 25250-020 Duque de Caxias, RJ, Brazil

^dDepartamento de Saúde Mental-Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brazil

^eInstituto de Física, UFU, Uberlândia, MG, 38400-920, Brazil

^fDepartamento de Oftalmologia, Faculdade de Medicina, HC/UFMG, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brazil

^gDepartamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, CEP 30161-70 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Here we characterize amyloid plaques in brain tissues from an APP_{swe}PS1 Δ E9 AD mouse model using a hyperspectral Raman imaging technique and study the massive set of Raman data using unsupervised unmixing spectral analysis. The main aim of this work is to analyze and to comprehensibly demonstrate how the multifrequency set of vibration modes comprise a fingerprint to consistently identify amyloid plaques in the AD mice brain, paving the way to validate Raman imaging as an accurate method in amyloid plaque identification and study in neural tissues. The importance of this result resides on the fact that the optical identification of A β aggregation in amyloid plaques located in neural tissues could be extended to the retina, proposed as an inexpensive and non-invasive early AD diagnosis method,^{12–14} due to the transparency of anterior ocular structures (cornea and lens) and the high synaptic density of its plexiform layers.¹⁵

Experimental results

Characterization of amyloid beta fibrils

Before performing Raman imaging on tissues, we prepared synthetic fibrils for Raman spectroscopy characterization using an adapted incubation protocol.¹⁶ Fibril-like structure formation was confirmed by Atomic Force Microscopy (AFM) (Fig. 1A) and by Transmission Electronic Microscopy (TEM) (Fig. 1B). Fig. 1C

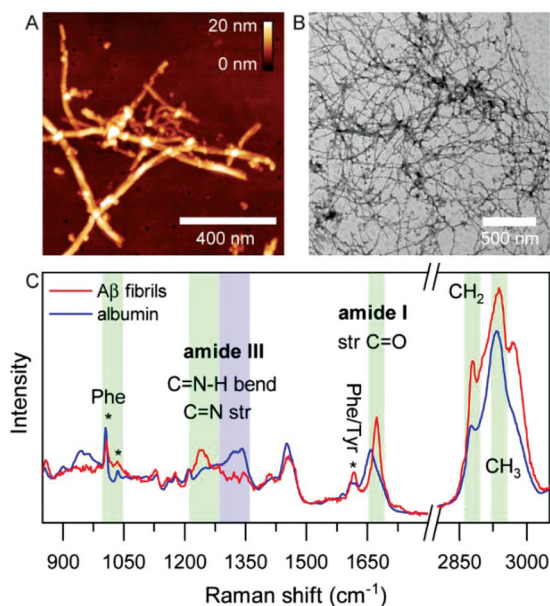


Fig. 1 Characterization of synthetic amyloid- β (A β) fibrils. (A) AFM and (B) TEM images of synthetic A β fibrils. (C) Raman spectra of synthetic A β fibrils (red) and bovine serum albumin (BSA) (blue). Raman peaks important for β sheet identification are highlighted in green. Amide I shows a frequency blue-shift in A β fibrils (1672 cm^{-1}) and amide III a red-shift (centered at 1233 cm^{-1}) when compared with BSA amide I (1658 cm^{-1}) and amide III (1310 cm^{-1}). Amide III for the β sheet is highlighted in green, while for the α helix it is highlighted in purple. The three asterisks point to the Phe bands at 1007 cm^{-1} and 1036 cm^{-1} , and the overlapped Phe at 1609 cm^{-1} and Tyr at 1612 cm^{-1} .

shows (red trace) the characteristic Raman spectrum for the A β_{1-42} fibrils. For a comparison purpose, Fig. 1C also shows (blue trace) the Raman spectrum of bovine serum albumin (BSA) which contains about 55% α helix and 45% disordered structures.¹⁷

Hyperspectral Raman measurement

In order to characterize the spectral Raman fingerprint that could be used as a reference for *in vivo* conditions, tissues were prepared for assays following a minimum of sample preparation. Cryosection was kept as the only standard procedure. Prior to staining, amyloid plaques were Raman scanned, preventing an overlap by the fluorescent dye. The experiment workflow followed the sequence: amyloid plaque visualization by autofluorescence (Fig. 2A); optical image on the same region of interest (ROI) (Fig. 2B); Raman hyperspectral mapping acquisition (Fig. 2C); ThioS staining for the confirmation of amyloid plaques (Fig. 2D); and data analysis (Fig. 2E, 3 and 4). Snap-frozen, 80 μm thick slices of perfused 6-month-old APP_{swe}PS1 Δ E9 mice (4 Tg mice) showed an intense plaque autofluorescence signal (*e.g.* Fig. 2A), following established procedures.^{18,19} After TPEF identification, the slices were analyzed with Raman hyperspectral imaging. The mapped area ranged from 25 \times 25 μm^2 to 240 \times 240 μm^2 , with step sizes of 1.2 μm (low spatial resolution) and 500 nm (high spatial resolution), and a spectral resolution of 2.45 cm^{-1} . The green excitation chosen (532 nm wavelength) proved to be ideal for improved Raman efficiency in our biological samples, with an optimized signal-to-noise ratio.¹⁹

Amyloid plaque imaging

Unsupervised spectral unmixing analysis of the hyperspectral data was performed, and each data set (each plaque image) was loaded separately to the spectral unmixing algorithm. As an output, we obtained the most dissimilar spectra, established as end members (EMs) in the data set. Fig. 2E shows one example, from one data set, of the EM spectra obtained, which corresponds to the spectra of the background (EM1), the surrounding tissue (EM2) and the amyloid plaque (EM3). The same procedure was carried out for all the amyloid plaque samples studied in this work (Fig. 3 and 4). Raman spectra were analysed at 18 different amyloid plaques and surrounding areas, located in two regions of the brain (hippocampus and frontal cortex), from 5 different mice: four mice of 6 months of age for low spatial resolution imaging (Fig. 3), and one of 12 months of age for high spatial resolution imaging (Fig. 4). Here we report the results from a total of 55 051 spectra obtained from 7 plaque regions. In the latter (12 months mouse), five EMs were obtained, but only three are shown in Fig. 4, where the EM for the background and an alternative EM for the plaque identification are not discussed.

Discussion

A spectroscopic fingerprint of amyloid β fibrils

Amyloid plaques are extracellular depositions of misfolded amyloid-beta peptide (A β), mostly A β_{1-40} and A β_{1-42} species.

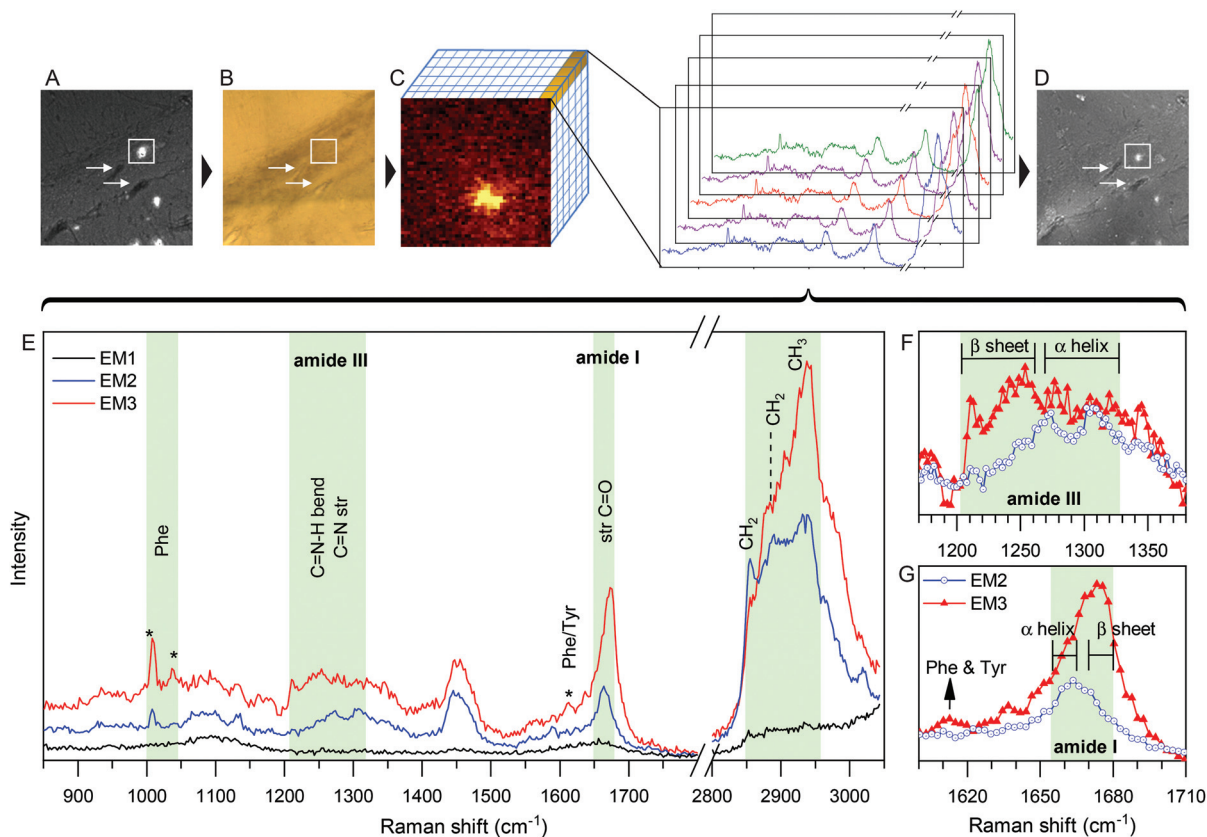


Fig. 2 Hyperspectral Raman imaging of the AD mice brain section and the spectral unmixing analysis. (A) Autofluorescence image of the amyloid plaque in a frontal cortex brain slice. (B) Optical image of the same region in (A). White arrows indicate tissue profiles utilized for optical co-localization. (C) Hyperspectral Raman data acquisition in the squared location in (A) and (B). (D) ThioS staining. (E) Results of spectral unmixing analysis showing three end members (EMs): black, blue and red EM spectra are the fingerprint of the background, the surrounding tissue and the amyloid plaque, respectively. Amide III presents a red-shift (centered at 1233 cm^{-1} , highlighted in (F)); amide I shows a blue-shift (1675 cm^{-1} , highlighted in (G)). The three asterisks point to the Phe bands at 1007 cm^{-1} and 1036 cm^{-1} , and the overlapped Phe at 1609 cm^{-1} and Tyr at 1612 cm^{-1} . The high-frequency CH stretching regions of CH_2 ($\sim 2854\text{ cm}^{-1}$) and CH_3 ($\sim 2930\text{ cm}^{-1}$) bands were associated with lipids and proteins/lipids, respectively.

These aggregates present a β -pleated sheet conformation, well stabilized by hydrophobic interactions and hydrogen bonding.¹⁶ $\text{A}\beta$ peptide monomers derived from transmembrane protein cleavage of the amyloid precursor protein (APP) form oligomers, intermediary neurotoxic structures which aggregate producing amyloid fibrils and plaques.^{4,20} The amyloid aggregating process has been correlated to tau pathology, characterized by tau neurofibrillary tangles of microtubule-associated proteins, as well as neurodegeneration and neuronal death.^{4,21}

According to the literature, amyloid plaques in brain tissues have been analyzed with different spectroscopic methods and protocols. Molecular identifications and characterization are based here on the Raman effect, a highly accurate and label-free method according to which incident light is scattered by exchanging energy with molecular vibrations in the sample. Distinct patterns of light scattering related to specific molecular modes of vibration provide a vibration-based molecular identification. Raman spectroscopy identifies the α helix and the β sheet secondary structures of proteins and peptides^{22–25} and is also used for the characterization and distribution of lipids^{26,27} in tissue samples.^{6,28,29} It has been

shown that the amide I vibration, which is associated with $\text{C}=\text{O}$ stretching in the peptide backbone, is subjected to different restoring forces in the α helix and β sheet.³⁰ Studies have also shown the vibrational fingerprint of proteins, peptides, and amino acid structures by Fourier transform infrared micro-spectroscopy (μFTIR),^{30,31} as well as amyloid plaques in brain tissues from AD transgenic mice.^{32,33} However, IR spectroscopy has limited applicability for spectroscopic imaging in an aqueous medium and dispersive Raman scattering microscopy, unlike μFTIR , achieves higher spatial resolution due to the smaller excitation wavelength in both dried and wet samples, which can be studied with relatively simple sample preparation. Given the superior specificities of Raman spectroscopy compared to other techniques, it has been chosen in many studies exploring chemical, biochemical and histological mapping of various tissues,^{5,19,34,35} providing valuable label-free and non-destructive data in AD neurodegeneration.^{10,11,36}

The $\text{A}\beta$ peptide vibrational modes are mainly composed of $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{H}$, $\text{C}-\text{N}$ and amino acid side chains. The peptide/protein folding, e.g. α helix and β sheet, results in the characteristic amide I peak, which is established as the most accurate

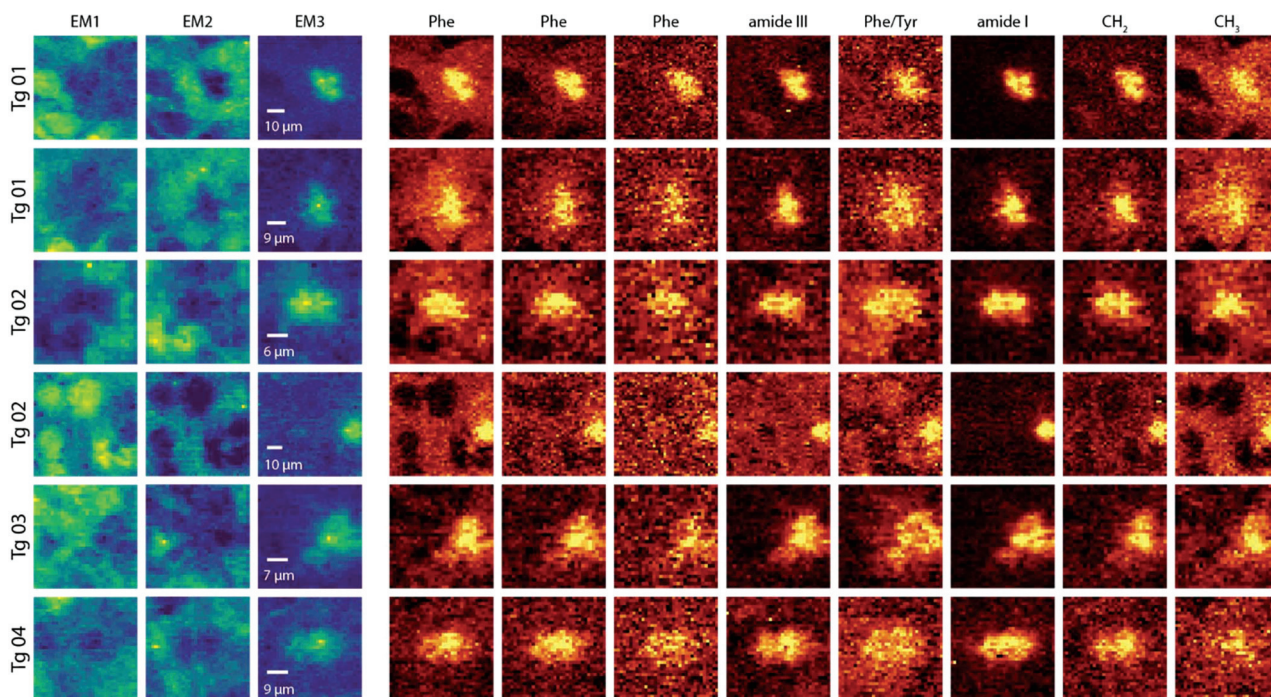


Fig. 3 Hyperspectral imaging of amyloid plaques. Raman spectroscopic mapping of four 6 month old transgenic mice (Tg01–Tg04) is represented here. Each row of images shows spectral imaging of one different amyloid plaque region. Each column represents different selected spectral information. The three first columns are obtained from the unsupervised spectral unmixing: EM1, background; EM2, the surrounding tissue; EM3, amyloid plaque spectral image. The next eight columns represent the intensity of scattered light in eight different spectral regions, obtained by selecting filters for each frequency in Project FIVE 5.0 WITec software. From left to right: Phe ($1000\text{--}1012\text{ cm}^{-1}$), Phe ($1000\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$), Phe ($1028\text{--}1043\text{ cm}^{-1}$), amide III ($1203\text{--}1263\text{ cm}^{-1}$), Phe/Tyr ($1604\text{--}1614\text{ cm}^{-1}$), amide I ($1670\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$), CH_2 ($2869\text{--}2884\text{ cm}^{-1}$), and CH_3 ($2920\text{--}2940\text{ cm}^{-1}$).

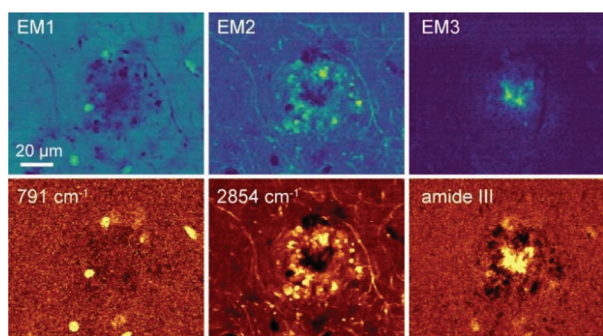


Fig. 4 High resolution hyperspectral imaging of amyloid plaques. Top – Results from the unsupervised spectral unmixing using 5 EMs: EM1, cell nucleus; EM2, the surrounding tissue; EM3, amyloid plaque spectral image. Two EMs (background and alternative plaque imaging) are not shown. Bottom – Analysis in WITec software selecting filters for DNA frequency (centered at 791 cm^{-1}), lipid (2854 cm^{-1}) and amide III ($1203\text{--}1263\text{ cm}^{-1}$).

biomarker of the protein secondary conformation in Raman spectroscopic analysis.^{22,23,37} The β sheet secondary structure is assigned mainly to the $\text{C}=\text{O}$ stretching vibration, which characterizes amide I ($1670\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$). The 1672 cm^{-1} Raman peak related to the β sheet folding was confirmed here in the synthetic fibril samples (red trace in Fig. 1C), consistent

with previous studies.^{8,11,38} For a comparison purpose, the blue trace in Fig. 1C shows the Raman spectrum of BSA (majorly α helix),¹⁷ exhibiting the amide I peak at 1658 cm^{-1} . In addition to amide I, the β sheet structure characterizing amyloid plaques show several other distinct characteristic vibration modes poorly explored. Among these, amide III is a complex vibration mode obtained from the sum of N–H bending and C–N stretching, and is influenced by $(\text{C})\text{C}_\alpha\text{H}$ bending motion.³⁹ Data support amide III as the most sensitive vibration mode related to the peptide bond conformation in the secondary structure.⁴⁰ Besides, amide III in $\text{A}\beta$ fibrils shows a band centered at $\sim 1233\text{ cm}^{-1}$ ($1203\text{--}1263\text{ cm}^{-1}$) and a red-shift compared with BSA, which is centered at 1310 cm^{-1} ($1280\text{--}1340\text{ cm}^{-1}$). The spectra of both $\text{A}\beta$ fibrils and BSA also showed the expected peaks of the phenylalanine (Phe) aromatic ring side chains ($1004, 1032, 1609\text{ cm}^{-1}$), tyrosine (Tyr, 1612 cm^{-1}),^{41,42} and the CH_2 bending (δCH_2) vibration modes at 1452 cm^{-1} .³⁸

Consistent with the results of the synthetic material, we observed in EM3 for tissues (Fig. 2E and G) the characteristic frequency shift in amide I, appearing centered at 1675 cm^{-1} , corresponding to the vibrational frequency of the β sheet secondary structure. These results support that the unsupervised analysis was able to accurately capture this spectral fingerprint in amyloid plaques, allowing the identification of further spectral features. We here point out four other Raman bands for

amyloid plaque identification, which are shown in the EM3 spectrum: Phe (1007–1036 cm^{-1}), amide III (1200–1330 cm^{-1}), Phe/Tyr ($\sim 1010 \text{ cm}^{-1}$) and CH stretching frequency (2800 to 3000 cm^{-1}). The Raman band intensity, which is attributed to Phe residues is increased at the amyloid plaque regions, probably due to the high concentration of these residues in A β peptides. The amide III region showed a red shift at the amyloid plaque compared to the surrounding tissue (Fig. 2E and F). This frequency mode is more complex than the others, since it involves a coupling of the C α -H bending to the N-H in-plane-bending and the C-N stretching.³⁹ Furthermore, the CH stretching frequency mode showed a higher intensity near 2930 cm^{-1} , which is assigned to the higher concentration of the A β peptide at the plaques compared to the surrounding tissue. Therefore, the unsupervised spectral unmixing established the Raman fingerprint for amyloid plaque identification, obtained from amide I, amide III, Phe and CH stretching frequencies.

Hyperspectral imaging of amyloid plaques

Fig. 3 shows a combined set of spectral data obtained from different spectral regions of amyloid plaques. The six rows of images represent six different samples. In the first three columns, abundance mapping is shown in the function of the three end members, in which the brighter and spectrally more significant regions correspond to EM1 (first column), EM2 (second column) and EM3 (third column). Spectral unmixing is a statistical technique for the identification of specific spectra, which is used in the characterization of biological components in tissue ensembles.^{29,43–45} As discussed in Fig. 2E, the EM3 image clearly shows the amyloid plaque, while EM2 highlights the surrounding tissue and EM1 the overall spectroscopic background. Guided by the different spectral features found in the EMs (Fig. 2), Fig. 3 displays, from the left to the right, the Raman intensity images in different spectral regions: Phe (1000–1012 cm^{-1} , 1000–1040 cm^{-1} and 1028–1043 cm^{-1}), amide III (1203–1263 cm^{-1}), Phe/Tyr (1604–1614 cm^{-1}), amide I (1670–1680 cm^{-1}), CH₂ (2877–2887 cm^{-1}), and CH₃ (2920–2940 cm^{-1}).

In all these regions, Raman spectra were able to properly detect and highlight amyloid plaques. Since the 1007 cm^{-1} peak of the Phe aromatic ring is one of the most intense bands in Raman spectra, the spectrum region from 1000 cm^{-1} to 1040 cm^{-1} was used to identify amyloid plaques with high contrast with the surrounding area. Another band related to Phe/Tyr at $\sim 1610 \text{ cm}^{-1}$ presented a similar effect in amyloid plaque identification. The amide III region centered at 1233 cm^{-1} , the amide I region at 1675 cm^{-1} and the region of higher frequency modes also highlighted plaques. The band centered at 2877 cm^{-1} , which is assigned to the CH₂ antisymmetric stretching vibrations of lipids and proteins,⁴⁶ produced a spectral image of the amyloid plaque that was sharper than that of the CH₃ symmetric stretching (2930 cm^{-1}).²⁶ Among CH frequencies, both have been associated with proteins and lipids; however, data suggest that the CH band presents higher accuracy in amyloid plaque identification.

Finally, Fig. 4 shows another set of hyperspectral Raman imaging performed in brain slices of older mice (12 months) with higher spatial resolution (500 nm step size) showing that the highest definition of the amyloid plaque demonstrates that Raman spectroscopy can be used for more complex compositional analysis. EM2 and EM3 describe the surrounding area and plaque core, respectively, while EM1 seems to highlight the cell nucleus. In the spectral image, DNA vibration (791 cm^{-1}), CH₂ symmetric stretching of the lipid (2854 cm^{-1}) and amide III frequencies reproduce the structures obtained in EM1, EM2 and EM3, respectively, showing that the precise limit of the plaque formed for the lipid-rich halo structure can be observed. Several spectroscopic studies with Raman and FTIR have demonstrated a region with lipid accumulation surrounding dense-core plaques forming the halo structure.^{11,19,36,47–49}

No clear difference in the set of EM spectra was observed between 6 month and 12 month old mice. However, a longitudinal robust study is necessary for better characterization of the amyloid plaque difference between young and old transgenic mice.

Protein misfolding is a basic event in AD and other major neurodegenerative diseases, such as Parkinson and Huntington diseases, prion-related encephalopathies, and more than fifty other medical conditions.⁵⁰ In AD, amyloid plaque identification using positron emission tomography (PET) is a major complementary test in AD differential diagnosis. New radiotracers for PET have been able to mark amyloid plaques and tau tangles in AD patients.^{51,52} However, PET imaging is an expensive technique which presents limited accuracy in early AD. The definite diagnosis of AD still relies on histopathological staining using Congo red,⁵³ which represents the gold standard diagnostic biomarker for AD *post mortem* diagnosis. Raman spectroscopy is pointed here as an inexpensive non-invasive early diagnostic technique enabling *in vivo* intraocular amyloid plaque identification.

Previous Raman studies were performed using A β synthetic peptides,⁹ A β peptide inoculation into rat brains, and different spectroscopic methods and protocols, including distinct procedures for sample preparation, as fresh or cryosectioning slices.^{10,11,19,36} In this study, we describe an unbiased statistical modelling analysis of the hyperspectral Raman data of amyloid plaques and surrounding tissues, as well as perform imaging using different spectral signatures. The identification of the different spectral features allowed a more reliable spectral identification protocol which provides tools to better understand the complexity of biochemical and pathophysiological events that take place in neurodegenerative diseases, especially AD.

In both synthetic fibrils and amyloid plaques, the amide III band can be used, in addition to amide I, as an accurate Raman fingerprint for A β peptide identification. This is supported by studies that demonstrate the sensitivity of amide III to identify the A β backbone conformation.^{39,54–57} For both the A β synthetic fibrils (Fig. 1C) and the amyloid plaque tissue (Fig. 2F), a similar red-shift is observed. It is important to highlight that the broad amine III Raman profile harbors various other vibrational modes related to several bio-

molecules, like DNA, phosphodiester groups in nucleic acids, stretching of C–N, CH bending of lipids, triglycerides, CH₂ in-plane deformation, and typical phospholipids.⁷ Despite its complexity, the shift related to the β conformation of the protein, as shown in Fig. 2F, is prominent.

In the amide I spectral region, we observed a frequency shift as high as 1672 cm⁻¹, with the maximum at 1675 cm⁻¹, whereas the spectra remained at around 1665 cm⁻¹ in the surrounding tissue. Therefore, when prominent, the blue-shift in amide I comes together with the red-shift in amide III, as discussed above. We presented three spectra of Phe in the A β peptide, as well as their distribution in the plaque (Fig. 2 and 3). For the CH₂ stretching, the frequency centered at 2877 cm⁻¹ (Fig. 3) displays the amyloid plaque spectral image with appropriate spatial resolution and contrast, as with the amide III band. By combining the hyperspectral Raman imaging and the spectral unmixing statistical method, we were able to obtain the most distinct set of spectra in a complex ensemble in neural tissues. Therefore, these spectra can be used as a robust multifrequency spectral fingerprint of the amyloid plaques and the surrounding tissue.

Conclusions

In this study, hyperspectral Raman imaging and spectral unmixing were achieved in synthetic fibrils and neural tissues from an AD model of bitransgenic APP_{swe}PS1 Δ E9 mice, with the aim to characterize amyloid plaques. The high spectral and spatial resolution of Raman spectroscopy allowed us to distinguish the β sheet fibril structures of the amyloid plaques from the surrounding tissues. The spectral unmixing method relies on the overall spectral differences in order to find distinct spectral signatures, thus providing a robust method of plaque identification, enabling further histological examination and characterization of hallmarks of β sheet-related neurodegenerative disorders.

Recent results have shown that it is possible to find amyloid plaques in the retina.^{14,58,59} For establishing Raman spectroscopy as a diagnosis method, laser power and wavelength are important aspects to be considered for defining the measurement protocol. It is possible that the use of a defocused light source and stimulated Raman¹¹ may be needed. The need to scan larger areas of the tissue to find plaques, and the possible differences in autofluorescence of the live retinal tissue are challenges to be addressed in future studies. Anyhow, the comprehensive multi-frequency spectral understanding that we have established here provides a complete fingerprint to guide future work in this field.

Methods

In vitro A β experiments

The A β _{1–42} synthetic peptide was purchased from Geneone (Rio de Janeiro). Before the fibril formation procedure, we standardized the monomerization process of the peptide,

using 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. The peptide was solubilized with 10 μ L of 100 mM NaOH solution and diluted in ultrapure water to a 200 μ M final concentration. The pH value was set to 7.8 and the final solution was incubated at 37 °C for 48 h to allow fibril formation.¹⁶ A drop of A β fibrils was deposited onto glass cover slips and dried in air at room temperature. Bovine serum albumin (1 mg mL⁻¹) was deposited onto glass cover slips for Raman spectra acquisition.

Animal model

Six- and twelve-month old double transgenic mice (Tg) APP_{swe}PS1 Δ E9 bearing a chimeric human/mouse APP_{swe}PS1 Δ E9 mutation (Jackson Laboratory) were used in this study. These double transgenic mice show increased and early A β deposition in the brain after 5 months of age.^{60–62} Our investigation was in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Ethics Committee for Animal Utilization in Research (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais (protocol 225/2014), under the criteria of the National Animal Experimentation Control Council (CONCEA).

Tissue preparation

Four Tg mice (6 months) were perfused transcardially with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS (pH 7.4). Brains were removed and kept overnight in 4% PFA for complete fixation. Afterwards, they were embedded in the O.C.T. compound (Fisher Healthcare) followed by coronary cryosectioning of the frontal cortex and hippocampus (80 μ m). Serial tissue sections were washed three times for 15 minutes with PBS to remove the O.C.T. compound completely, avoiding spectral interference. Slices of an additional Tg mouse (12 months) were analyzed using a vibrating 330 blade microtome (Leica Microsystems; Wetzlar, Hesse, Germany).

Thioflavin S staining

Tissue sections were stained using 1% ThioS solution (w/v) in 70% ethanol (v/v) (Sigma-Aldrich). Briefly, samples were immersed for 10 minutes in ThioS solution, immediately dipped three times in 70% ethanol, and washed with PBS and seeded directly on coverslips. Subsequently, fluorescence images were obtained.

Fluorescence microscopy

Autofluorescence imaging was performed before Raman spectroscopic measurements and Thioflavin S (ThioS) fluorescence was measured after the Raman spectroscopic measurements. Autofluorescence and fluorescence imaging was performed by two-photon-excited fluorescence (TPEF) microscopy. An inverted Nikon laser scanning microscope (Lasion Biotec) with an 80 MHz, 7 picosecond laser (APE PicoEmerald) centered at 830 nm was used for TPEF. A GaAsP photomultiplier with a bandpass filter of 525/40 nm was used as the detector.

Transmission electronic microscopy

Samples were diluted 10 \times , deposited onto carbon-coated copper mesh grids and negatively stained with 2% (w/v) uranyl

acetate. The fibrils were imaged with a Tecnai G2-12-FEI SpiritBiotwin 120 kV Camera CCD Mega View III.

Atomic force microscopy

Atomic force microscopy (AFM) images were acquired in the tapping mode with a NanoWizard BioScience Atomic Force Microscope (JPK Instruments). The samples were placed onto clean glass substrates and dried under a gentle nitrogen flow.

Raman spectroscopy

A confocal Raman Microscope WITec Alpha 300 SAR was used for Raman spectroscopy and imaging. All measurements were performed with 532 nm excitation. For the A β fibril deposited sample, a 50 \times (0.55 NA) objective was used and the spectra were integrated for 5 \times 5 s, excited with 5 mW laser power. For Raman mapping, data were collected at 1 s dwell time per pixel every 1.2 μ m step, at 20 mW laser power. For 12 month old Tg mice, the data were collected with 0.5 s dwell time per pixel and 0.5 μ m steps. The sum of the acquired spectra for the end member analysis shown here was 55 051, with plaque imaging ranging from 25 \times 25 to 220 \times 198 hyperspectra. However, in total, more than 87 811 spectra were measured and analyzed, providing consistent results (not shown).

Data analysis and processing or cluster analysis

A supervised method was used for image generation using Project FIVE 5.0 WITec software. All hyperspectral data were submitted to the unsupervised unmixing software using N-FINDR and FCLS (Fully Constrained Least Squares) algorithms,^{29,44} which decompose the collection of constituent spectra in end members (EMs), as well as their corresponding fractions (abundances) that indicate the proportion of each endmember in the pixel.⁶³ EM spectra were plotted using OriginPro software.

Author contributions

E.A.F. contributed to the acquisition, analysis, and interpretation of the data and wrote the paper. L.L. and R.C. developed the two-photon system and collected the data. H.M. and J.C. developed the unmixing software and analyzed the data. H.G. M. performed the AFM. M.R.S. provided the very early conceptual idea and contributed to the establishment of the colony of mice. R.A.S., A.S.B. and R.P.V. contributed to the scientific interpretation of the data and significantly revised the article. L.M.M. and A.J. contributed to the conception and design of the work and substantively revised the article. All authors read and approved the submitted version of the article.

Conflicts of interest

The authors declare non-financial interest in relation to the work described here.

Acknowledgements

We acknowledge Cassiano Rabelo for the technical help. Raman analysis was performed at LabNS and LCPNano, Physics Department, UFMG. Electron microscopy analysis was performed at the UFMG Microscopy Center. This work was financed by the Brazilian Agency FINEP (contract no. 01.13.0330.00) and FAPEMIG (Rede Mineira).

References

- 1 D. J. Selkoe, *Physiol. Rev.*, 2001, **81**, 741–767.
- 2 B. Olsson, *Lancet Neurol.*, 2016, **15**, 673–684.
- 3 B. Frisoni, M. Boccardi, F. Barkhof, K. Blennow, S. Cappa, K. Chiotis, *et al.*, *Lancet Neurol.*, 2017, **16**, 661–676.
- 4 D. J. Selkoe and J. Hardy, *EMBO Mol. Med.*, 2016, **8**, 595–608.
- 5 N. Amharref, A. Beljebbar, S. Dukic, L. Venteo, L. Schneider, M. Pluot and M. Manfait, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1768**, 2605–2615.
- 6 J. Dybas, K. M. Marzec, M. Z. Pacia, K. Kochan, K. Czamara, K. Chrabaszcz, E. Staniszevska-Slezak, K. Malek, M. Baranska and A. Kaczor, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2016, **85**, 117–127.
- 7 Z. Movasaghi, S. Rehman and I. U. Rehman, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2007, **42**, 493–541.
- 8 J. Dong, C. S. Atwood, V. E. Anderson, S. L. Siedlak, M. A. Smith, G. Perry and P. R. Carey, *Biochemistry*, 2003, **42**, 2768–2773.
- 9 P. Chen, A. Shen, W. Zhao, S. L. Baek, H. Yuan and J. Hu, *Appl. Opt.*, 2009, **48**, 4743–4748.
- 10 R. Michael, A. Lenferink, G. F. J. M. Vrensen, E. Gelpi, R. I. Barraquer and C. Otto, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1–11.
- 11 M. Ji, M. Arbel, L. Zhang, C. W. Freudiger, S. S. Hou, D. Lin, X. Yang, B. J. Bacsikai and X. S. Xie, *Sci. Adv.*, 2018, **4**, eaat7715.
- 12 M. Koronyo-Hamaoui, Y. Koronyo, A. V. Ljubimov, C. A. Miller, M. K. Ko, K. L. Black, M. Schwartz and D. L. Farkas, *NeuroImage*, 2011, **54**, S204–S217.
- 13 M. Raffii, H. Wishnek, J. B. Brewer, M. C. Donohue, S. Ness, W. C. Mobley, P. S. Aisen and R. A. Rissman, *Front. Behav. Neurosci.*, 2015, **9**, 1–11.
- 14 Y. Koronyo, D. Biggs, E. Barron, D. S. Boyer, J. A. Pearlman, W. J. Au, S. J. Kile, A. Blanco, D. T. Fuchs, A. Ashfaq, S. Frautschy, G. M. Cole, C. A. Miller, D. R. Hinton, S. R. Verdooner, K. L. Black and M. Koronyo-Hamaoui, *JCI Insight*, 2017, **2**, 1–19.
- 15 S. E. Perez, S. Lumayag, B. Kovacs, E. J. Mufson and S. Xu, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 2009, **50**, 793–800.
- 16 M. Ahmed, J. Davis, D. Aucoin, T. Sato, S. Ahuja, S. Aimoto, J. I. Elliott, W. E. Van Nostrand and S. O. Smith, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2010, **17**, 561–567.
- 17 V. J. C. Lin and J. L. Koenig, *Biopolymers*, 1976, **15**, 203–218.
- 18 A. C. Kwan, K. Duff, G. K. Gouras and W. W. Webb, *Opt. Express*, 2009, **17**, 3679–3689.

- 19 K. L. Summers, N. Fimognari, A. Hollings, M. Kiernan, V. Lam, R. J. Tidy, D. Paterson, M. J. Tobin, R. Takechi, G. N. George, I. J. Pickering, J. C. Mamo, H. H. Harris and M. J. Hackett MJ, *Biochemistry*, 2017, **56**, 4107–4116.
- 20 G. M. Shankar, S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini and D. J. Selkoe, *Nat. Med.*, 2008, **7**, 3374.
- 21 M. Jin, N. Shepardson, T. Yang, G. Chen, D. Walsh and D. J. Selkoe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011, **108**, 5819–5824.
- 22 A. Barth and C. Zscherp, *Q. Rev. Biophys.*, 2002, **35**, 369–430.
- 23 A. Rygula, K. Majzner, K. M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk and M. Baranska, *J. Raman Spectrosc.*, 2013, **44**, 1061–1076.
- 24 S. Krimm and J. Bandekar, *Adv. Protein Chem.*, 1986, **38**, 181–364.
- 25 J. L. Lippert, D. Tyminski and P. J. Desmeules, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 7075–7080.
- 26 C. Krafft, L. Neudert, T. Simat and R. Salzer, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2005, **61**, 1529–1535.
- 27 K. Czamara, K. Majzner, M. Z. Pacia, K. Kochan, A. Kaczor and M. Baranska, *J. Raman Spectrosc.*, 2014, **46**, 4–20.
- 28 M. Daković, *et al.*, *Talanta*, 2013, **117**, 133–138.
- 29 N. Bergner, C. Krafft, K. D. Geiger, M. Kirsch, G. Schackert and J. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **403**, 719–725.
- 30 S. D. Moran and M. T. Zanni, *J. Phys. Chem.*, 2014, **5**, 1984–1993.
- 31 A. Barth, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2000, **74**, 141–173.
- 32 O. Klementieva, K. Willén, I. Martinsson, B. Israelsson, A. Engdahl, J. Cladera, P. Uvdal and G. K. Gouras, *Nat. Commun.*, 2017, **8**, 14726.
- 33 M. Z. Kastyak-Ibrahim, M. J. Nasse, M. Rak, C. Hirschmugl, M. R. Del Bigio, B. C. Albensi and K. M. Gough, *NeuroImage*, 2012, **60**, 376–383.
- 34 M. J. Hackett, J. A. McQuillan, F. El-Assaad, J. B. Aitken, A. Levina, D. D. Cohen, R. Siegele, E. A. Carter, G. E. Grau, N. H. Hunt and P. A. Lay, *Analyst*, 2011, **136**, 2941–2952.
- 35 K. Kochan, K. Chrabaszcz, B. Szczur, E. Maslak, J. Dybas and K. M. Marzec, *Analyst*, 2016, **141**, 5329–5338.
- 36 F. Palombo, F. Tamagnini, J. C. G. Jaynes, S. Mattana, I. Swift, J. Nallala, J. Hancock, J. T. Brown, A. D. Randall and N. Stone, *Analyst*, 2018, **143**, 850–857.
- 37 J. Bandekar, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1992, **1120**, 123–143.
- 38 Z. Křištofiková, V. Kopecký, K. Hofbauerová, P. Hovorková and D. Řípková, *Neurochem. Res.*, 2008, **33**, 412–421.
- 39 S. A. Asher, A. Ianoul, G. Mix, M. N. Boyden, A. Karnoup, M. Diem and R. Schweitzer-Stenner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 11775–11781.
- 40 A. V. Mikhonin, Z. Ahmed, A. Ianoul and S. A. Asher, *J. Phys. Chem.*, 2004, **108**, 19020–19028.
- 41 B. Sjöberg, S. Foley, B. Cardey and M. Enescu, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2014, **128**, 300–311.
- 42 T. Pazderka and V. Kopecký, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2017, **185**, S1–S4.
- 43 T. W. Bocklitz, S. Guo, O. Ryabchykov, N. Vogler and J. Popp, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 133–151.
- 44 M. Hedegaard, C. Matthäus, S. Hassing, C. Krafft, M. Diem and J. Popp, *Theor. Chem. Acc.*, 2011, **130**, 1249–1260.
- 45 C. Kallepitis, M. S. Bergholt, M. M. Mazo, V. Leonardo, S. C. Skaalure, S. A. Maynard and M. M. Stevens, *Nat. Commun.*, 2017, **8**, 14843.
- 46 R. G. Snyder, S. L. Hsu and S. Krimm, *Spectrochim. Acta, Part A*, 1978, **34**, 395–406.
- 47 M. Rak, M. R. Del Bigio, S. Mai and D. G. K. Westaway, *Biopolymers*, 2007, **86**, 345–347.
- 48 C. R. Liao, *et al.*, *Analyst*, 2013, **138**, 3991–3997.
- 49 R. J. Tidy, V. Lam, N. Fimognari, J. C. Mamo and M. J. Hackett, *Vib. Spectrosc.*, 2017, **91**, 68–76.
- 50 T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo and C. M. Dobson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2014, **15**, 384–396.
- 51 L. Yang, D. Rieves and C. Ganley, *N. Engl. J. Med.*, 2010, **367**, 885–887.
- 52 H. Zetterberg and J. M. Schott, *Nat. Med.*, 2019, **25**, 201–203.
- 53 P. Frid, S. V. Anisimov and N. Popovic, *Brain Res. Rev.*, 2007, **53**, 135–160.
- 54 K. Kaiden, T. Matsui and S. Tanaka, *Appl. Spectrosc.*, 1987, **41**, 180–184.
- 55 I. H. McColl, E. W. Blanch, A. C. Gill, A. G. Rhie, M. A. Ritchie, L. Hecht, K. Nielsen and L. D. Barron, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 0–7.
- 56 S. Cai and B. R. Singh, *Biochemistry*, 2004, **43**, 2541–2549.
- 57 J. Huang, K. Tian, S. Ye and Y. Luo, *J. Phys. Chem.*, 2016, **120**, 15322–15328.
- 58 S. S. More and R. Vince, *ACS Chem. Neurosci.*, 2015, **6**, 306–315.
- 59 X. Hadoux, *Nat. Commun.*, 2019, **10**, 4227.
- 60 D. R. Borchelt, T. Ratovitski, J. van Lare, M. K. Lee, V. Gonzales, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, D. L. Price and S. S. Sisodia, *Neuron*, 1997, **19**, 939–945.
- 61 J. L. Jankowsky, H. H. Slunta, T. Ratovitskia, N. A. Jenkins, N. G. Copeland and D. R. Borchelta, *Biomol. Eng.*, 2001, **17**, 157–165.
- 62 M. Garcia-Alloza, E. M. Robbins, S. X. Zhang-Nunes, S. M. Purcell, R. A. Betensky, S. Raju, C. Prada, S. M. Greenberg, B. J. Bacskai and M. P. Frosch, *Neurobiol. Dis.*, 2006, **24**, 516–524.
- 63 N. Keshava and J. F. Mustard, *IEEE Signal Process. Mag.*, 2002, **19**, 44–57.

ANEXOS



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 225 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Projeto Piloto para a identificação do beta-amiloide retiniano em modelo experimental de Alzheimer, por meio da espectroscopia Raman.", que tem como responsável ADO JÓRIO DE VASCONCELOS, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 07/07/2015. Este certificado espira-se em 07/07/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 225 / 2014, related to the Project entitled "Pilot study for the identification of retinal beta-amyloid in an experimental model of Alzheimer, obtained with Raman spectroscopy", under the supervision of ADO JÓRIO DE VASCONCELOS, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 07/07/2015. This certificates expires in 07/07/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 07/07/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@ppq.ufmg.br

RELATÓRIO TÉCNICO
AUTOR: PLÍNIO BERGES

Oftalmoscópio de Varredura a Laser (OVL)

Tabela de Conteúdo

RELATÓRIO TÉCNICO.....	168
Tabela de Conteúdo.....	169
1. Escopo	170
2. Introdução	170
3. Requisitos	170
3.1 R1 - Imagem Ocular	170
3.2 R2 - Excitação a Laser da Retina.....	171
3.3 R3 - Análise Multiespectral.....	171
4. Descrição do Design	172
4.1 Design da Câmera Ocular.....	172
4.2 Design do Sistema Excitação a Laser da Retina e recolhimento do sinal espectral	173
5. Verificação dos Requisitos	175
5.1 Verificação da Imagem Ocular – R1	175
5.2 Verificação da Excitação a Laser da Retina – R2.....	176
5.3 Verificação da Análise Multiespectral – R3.....	176
6. Conclusão	182

1. Escopo

Esse documento tem como objetivo mostrar o processo de desenvolvimento do protótipo Oftalmoscópio de Varredura a Laser – OVL – onde são mostrados os requerimentos gerais do protótipo, conceitos óticos utilizados para satisfazer os requerimentos e os testes de verificação da funcionalidade do instrumento. O instrumento foi desenvolvido por professores, pesquisadores e estudantes do LabNS.

2. Introdução

O protótipo do Oftalmoscópio de Varredura a Laser (OVL) tem como principal funcionalidade a realização de espectroscopia intraocular para aquisição de imagem por espectroscopia Raman estimulada da retina e detecção de placas amiloides. Além disso, o OVL deverá ser capaz de fazer imagem da retina por diferentes tipos de estimulações luminosas do tecido, como por exemplo, com luz visível para realizar análises de imagens do fundo de olho. O OVL é um sistema modular que possibilita a adaptação para a adição de canais de excitação e decomposição espectral para as técnicas de análise baseadas em fluorescência, Raman espontâneo, SRS, CARS, e fluorescência por excitação por dois fótons.

3. Requisitos

O design óptico, mecânico e eletrônico do OVL tem como diretriz os requisitos abaixo. Embora de forma geral a estrutura pode ser aplicada em humanos e animais, o que foi montado e será mostrado aqui foi dimensionado para camundongos.

3.1 R1 - Imagem Ocular

O R1 consiste de uma câmera ocular que permite visualizarmos quando o olho está sendo posicionado e alinhado pela primeira vez para análise, e também para termos uma imagem com grande área da retina. R1 possui os seguintes subrequisitos e objetivos:

1. Permitir a visualização do posicionamento da cabeça e olho do animal relativo à pupila de entrada óptica do OVL, assim facilitando o alinhamento com o eixo ótico do olho do animal e do eixo do OVL.

2. Obter imagens *in vivo* e em tempo real da retina que permitam o foco e posicionamento em diferentes regiões de interesse do tecido para análise.
3. Servir de ferramenta de alinhamento em regiões representativas do tecido permitindo assim a análise com técnicas citadas no requerimentos R2 e R3 abaixo, as quais necessitam de um alinhamento mais rigoroso para funcionarem adequadamente.

3.2 R2 - Excitação a Laser da Retina

O R2 consiste na capacidade de estimular áreas específicas da retina com laser para posterior captação da emissão espectral e decomposição do espectro para análise do material. R2 possui os seguintes requisitos e objetivos:

- R2.1 A excitação do retina do animal com laser tem que ser realizada quando o olho do camundongo está acomodado. Isso quer dizer que os músculos que contraem o cristalino do olho tem que estar relaxados sob ação de midriático. Isso faz com que que a luz de objetos distantes (luz de objeto no infinito; ou luz colimada do laser) ao incidir através do olho, seja focada sobre a retina.
- R2.2 As características do laser utilizado como comprimento de onda, potência, pulso, etc, dependem da técnica a ser utilizada, descrita no requerimento R3.
- R2.3 A pupila do olho do animal determina os limites óticos do sistema.
- R2.4 Todo feixe de laser chega colimado em direção à pupila e tem a sua centroide coincidindo com o centro da pupila.
- R2.5 O ângulo de incidência da centroide do feixe colimado em relação ao eixo ótico saindo da pupila varia de 0° até ~35°.
- R2.6 O sistema de direcionamento do laser tem que se basear nas técnicas de imagem confocal. Essa técnica permite a decomposição da luz emitida pela retina e projetada pelo cristalino em forma de um feixe colimado com diversos ângulos de saída, dependentes das posições espaciais de emissão da retina.

3.3 R3 - Análise Multiespectral

R3 consiste na compatibilidade do OVL com outros instrumentos e técnicas de análises espectrais. R3 possui os seguintes requisitos e objetivos:

- R3.1 A pupila de entrada (abertura dos espelhos galvos) e pupila de saída (pupila do olho do animal) podem transmitir apenas feixes de luz colimados. Isso garante que o sistema é

óptico do OVL é afocal e assim permite o acoplamento em série de outros módulos ópticos.

R3.2 O OVL possibilita a adaptação do sistema para a adição de canais de excitação e decomposição para as técnicas de fluorescência de um e dois fótons, espectroscopia Raman espontânea, SRS e CARS.

4. Descrição do Design

O design óptico do OVL tem um aspecto modular de forma que subsistemas ópticos podem ser adicionados ou removidos dependendo da sua utilização. Durante o desenvolvimento do protótipo, os submódulos tinham suas funcionalidade testada individualmente. Nesse capítulo, mostramos a descrição do design dos módulos que satisfazem os requerimentos R1, R2, e R3, juntamente com o design que foi criado após os testes desses requisitos.

4.1 Design da Câmera Ocular

O design da Câmera Ocular (CMO), capaz de fazer imagens oculares como requerido em R1, foi feito a partir da adaptação de uma câmera de fundo retinal para humanos em outra para visualizar a retina de camundongos ou ratos (animais com olho com distância focal entre 2mm e 5mm). Na **FIGURA 1a**, temos o design ótico da câmera ocular que é composto por:

1. Um canal de iluminação que permite a iluminação com luz visível de uma grande área da retina, ou de área de interesse durante o alinhamento do olho;
2. Um canal de imagem que permite o foco da imagem tanto na superfície do olho como a córnea quanto na retina;
3. Um canal central de redistribuição e acoplamento composto por dicróicos ou beamplitters e que, ao mesmo tempo, permite a acoplamento do excitação a laser (R2) e análise multiespectral (R3).
4. A câmera ocular é fléxivel e permite a adapção das fontes de luz, beamplitters, dicróicos e a adição de filtros para a realização de imagens com marcadores fluorescentes ou outras modalidades de imagem.

4.2 Design do Sistema Excitação a Laser da Retina e recolhimento do sinal espectral

Na **FIGURA 1b**, temos o Sistema de Imagem Confocal (SIC) que foi adaptado à câmera ocular para satisfazer R2 - Excitação a Laser da Retina) e R3 - Análise Multiespectral). A **FIGURA 1c**, mostra os sistemas SIC e CMO acoplados.

O sistema de imagem confocal tem os seguintes componentes com suas respectivas funções:

1. Um filtro espacial que gera um feixe gaussiano do laser de excitação e, ao mesmo tempo, filtra a emissão espectral do volume da amostra excitado, selecionando apenas o sinal espectral dessa região espacial proporcional ao tamanho do pinhole de ~10 μ m.
2. Um sistema de varredura a laser que utiliza espelhos galvânicos para redirecionar um feixe laser colimado através de uma lente;
3. Subsequentemente, por um sistema de retransmissão ótica composta por 3 lentes que permitem o ajuste do foco e localização da centroide do feixe colimado em direção à pupila do animal.

Ao incidir na pupila do olho, o feixe está novamente colimado e é capaz de incidir com um ângulo de ~30° em relação ao eixo ótico do olho. Essa varredura angular permite a análise de uma área de aproximadamente 2 mm da retina de camundongos.

Ao realizar a excitação do tecido, o sinal espectral volta pelo mesmo caminho ótico, fazendo assim o percurso ótico (relativo ao sistema de excitação e câmera ocular) necessário para diversas modalidade espectrais requeridas em R3.

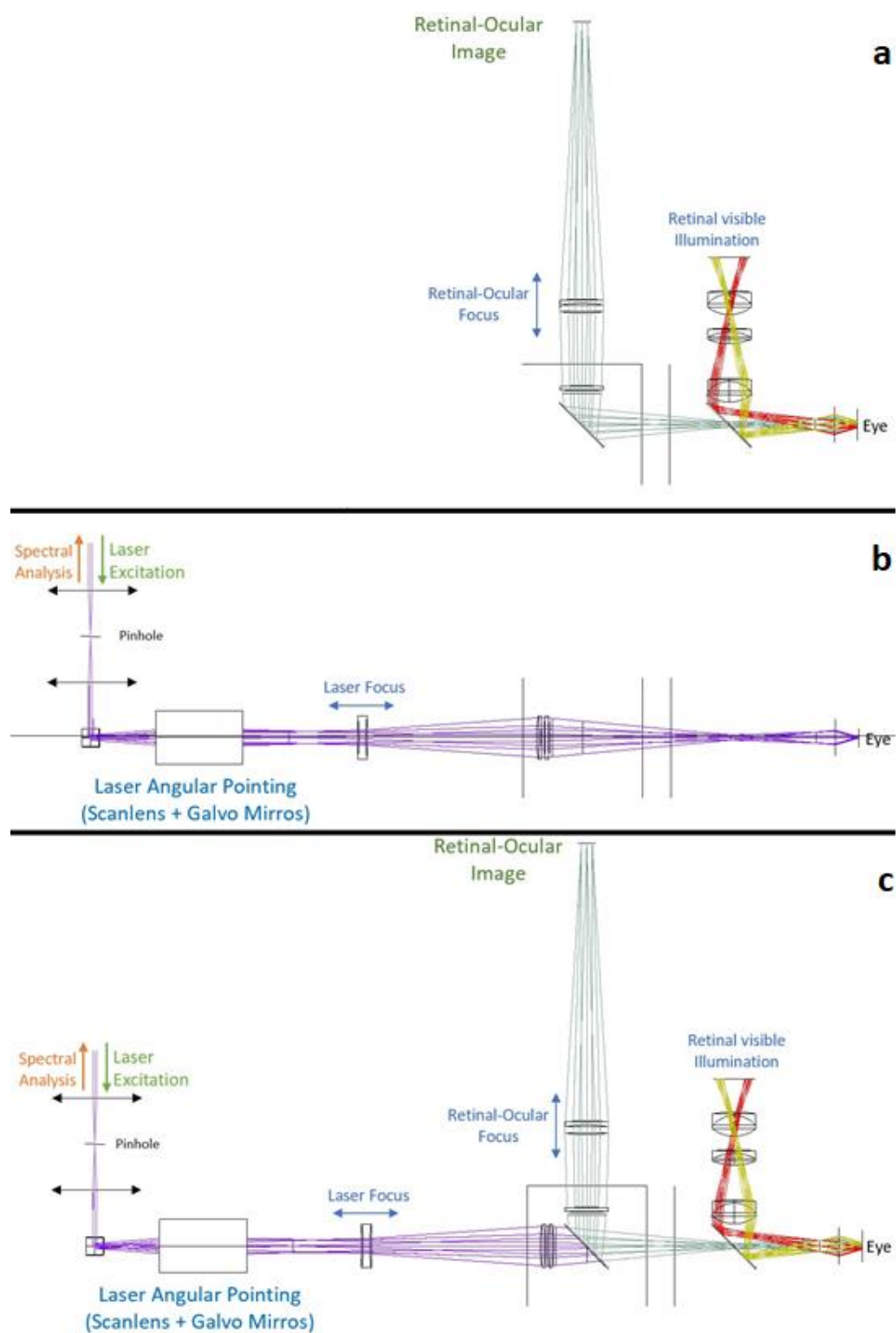


FIGURA 1

Sistema de Imagem Confocal (SIC) adaptado à câmera ocular. (a) Design da câmera ocular. (b) Design do sistema de excitação a laser. (c) Acoplamento da câmera ocular com o sistema de excitação a laser.

5. Verificação dos Requisitos

5.1 Verificação da Imagem Ocular – R1

Um sistema baseado no design da câmera ocular da **FIGURA 1** foi montado, como mostrado na **FIGURA 2**. Os requerimentos R1 foram verificados pela obtenção da imagem *in vivo* de um olho de um rato (**FIGURA 3**). Nessa foto podemos ver a estrutura central que inclui o nervo óptico e os capilares da retina.

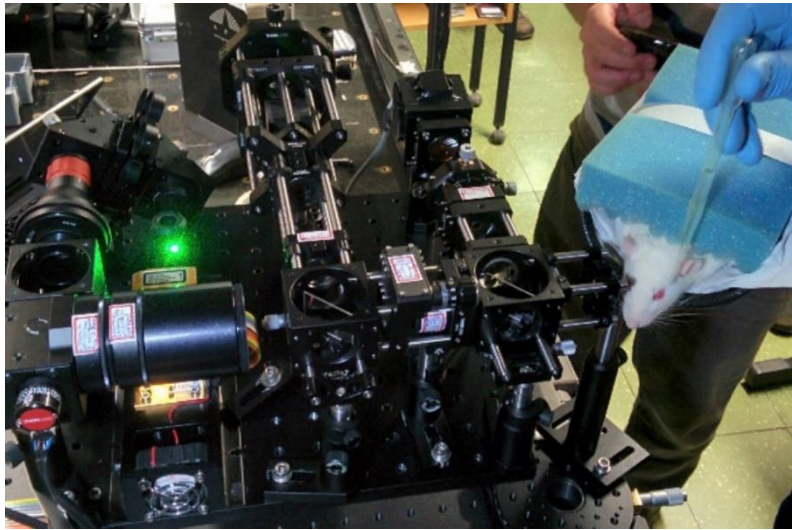


FIGURA 2

Experimento para verificação de imagem intraocular e varredura a laser da retina de rato.

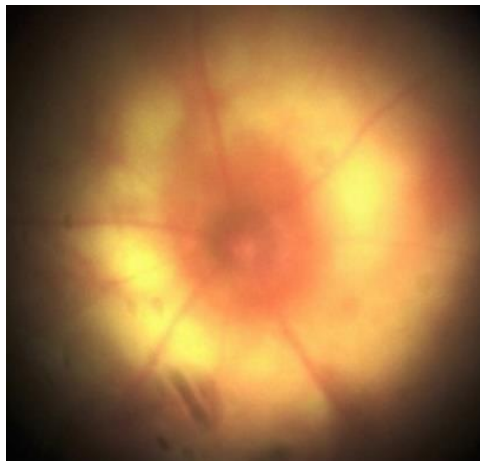


FIGURA 3

Imagem de fundo de olho obtida com a câmara ocular da retina do rato.

5.2 Verificação da Excitação a Laser da Retina – R2

No mesmo experimento do capítulo anterior, 5.1, foi realizado o teste de *pointing* e varredura do sistema de excitação. Vemos na **FIGURA 4** o feixe laser focar sobre a área da retina visualizada pela câmera ocular. Esse teste verifica R2 e R1, mostrando a capacidade do sistema de ser utilizado como ferramenta de alinhamento para as técnicas espectrais mais sensíveis, e de permitir o posicionamento e foco em regiões de interesse da retina.

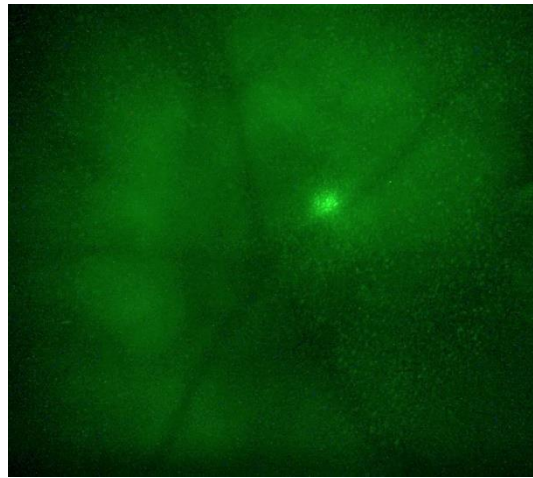


FIGURA 4

Imagem obtida com a câmera ocular da retina do rato sendo varrida com um feixe laser.

5.3 Verificação da Análise Multiespectral – R3

As verificações anteriores da excitação a laser da retina e também da imagem ocular demonstraram que o sistema é capaz de fazer varredura a laser com feixes colimados.

Para que as análises de imagens espectrais da retina sejam possíveis, precisamos detectar a intensidade da irradiância espectral que é emitida em cada ponto de foco do laser na retina, e posteriormente gerar a imagem após o escaneamento da região. Baseando-se na instrumentação do Sistema de Imagem Confocal (SIC) (**FIGURA 1**), a técnica usada para conseguir essas imagens consistem nos seguintes passos:

1. Direcionar o feixe de laser com um ângulo específico com os espelhos galvânicos que, subsequentemente, através da retransmissão das luz nas lentes, irá projetar o feixe com um ângulo de incidência proporcional no olho do animal (ou modelo de olho).
2. Estimular o tecido por um período constante de tempo com o laser.
3. Nesse intervalo de tempo, detectar os fótons emitidos por um detector óptico (espectrômetro, fotodiodo, fotodiodo de avalanche ou APD – do inglês *avalanche photodiode*, etc).
4. Sincronizar os passos 1 – 2 – 3 para percorrer uma área do tecido de interesse.
5. Criar uma matriz com a intensidade da contagem de fótons para cada posição angular/espacial.
6. Gerar a imagem a partir da matriz.

O SIC pode ser acoplado a módulos ópticos que permitam a estimulação e decomposição espectrais para as técnicas de fluorescência, Raman, SRS e CARS.

Entretanto, para que tenha boa performance, a seleção das lentes do SIC deve levar em consideração a transmitância para cada comprimento de onda e outras especificidades ópticas necessárias para cada modalidade citada acima.

O objetivo dessa verificação é testar a capacidade de criar imagens confocais de uma amostra de tecido em um modelo de olho, utilizando simultaneamente duas técnicas espectrais, o espalhamento Rayleigh e a fluorescência.

Com esse intuito, foi adicionado a pupila de entrada (espelho galvos) do SIC o módulo de fluorescência e Rayleigh como mostrado na **FIGURA 5**. Ele é composto por:

1. Um canal de estimulação com laser 532nm para a emissão de fluorescência da amostra.
2. Um canal de análise espectral da fluorescência. Este canal usa um detector APD para contar os fótons da emissão pelo tecido após as fontes de estimulações serem bloqueadas por filtros *notchs* (532 nm e 785 nm) e dicróico 532 nm.
3. Um canal de estimulação a laser 785 nm para a emissão Rayleigh da amostra.
4. Um canal de detecção do espalhamento Rayleigh do laser 785 nm sobre o tecido. A detecção apenas da emissão da região do foco do laser 785 nm sobre a amostra é possível pelo uso dos filtros espaciais que filtram essa região espacial do foco sobre o material e, também, graças ao isolador óptico composto pelo PBS e filtro $\lambda/4$ que eliminam as reflexões fantasmas dos componentes do sistema. Ambas técnicas aumentam a razão sinal/ruído (SNR) da imagem, devido à diminuição do *straylight* do laser 785 nm.

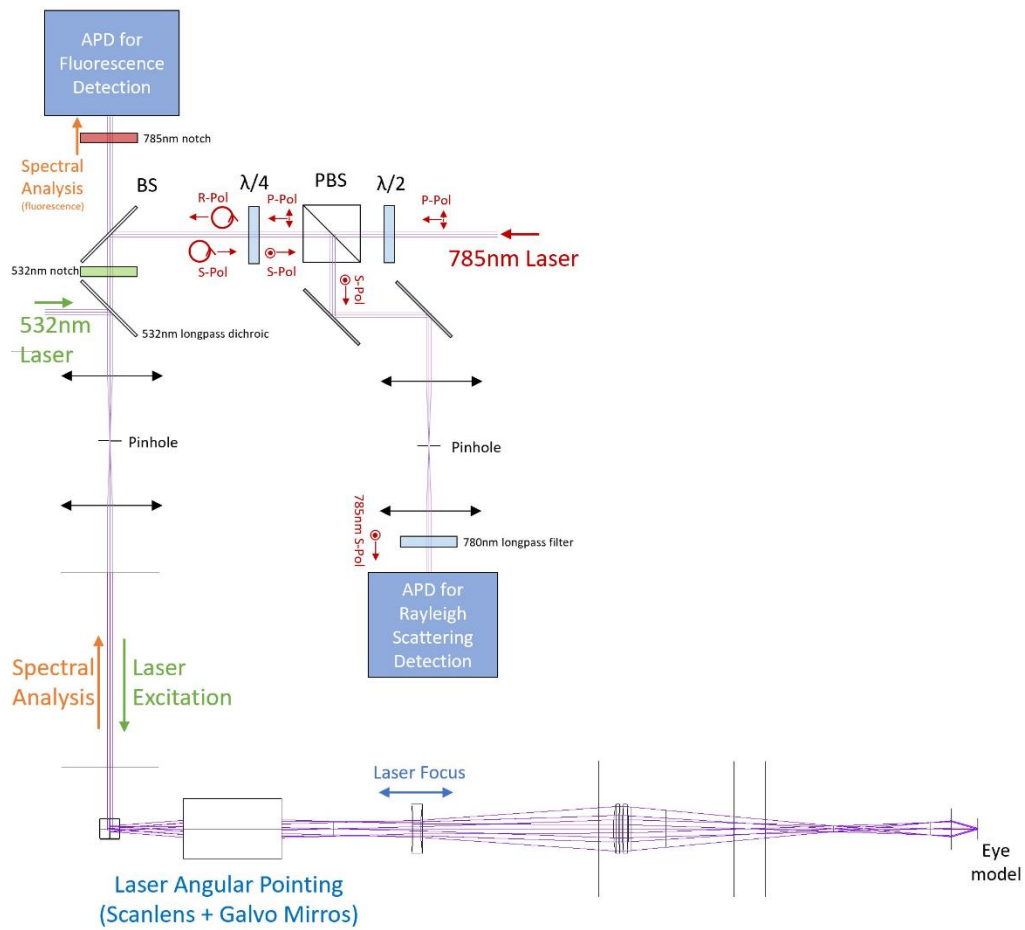


FIGURA 5
Design óptico do Sistema de Imagem Confocal acoplado ao módulo de fluorescência e Rayleigh

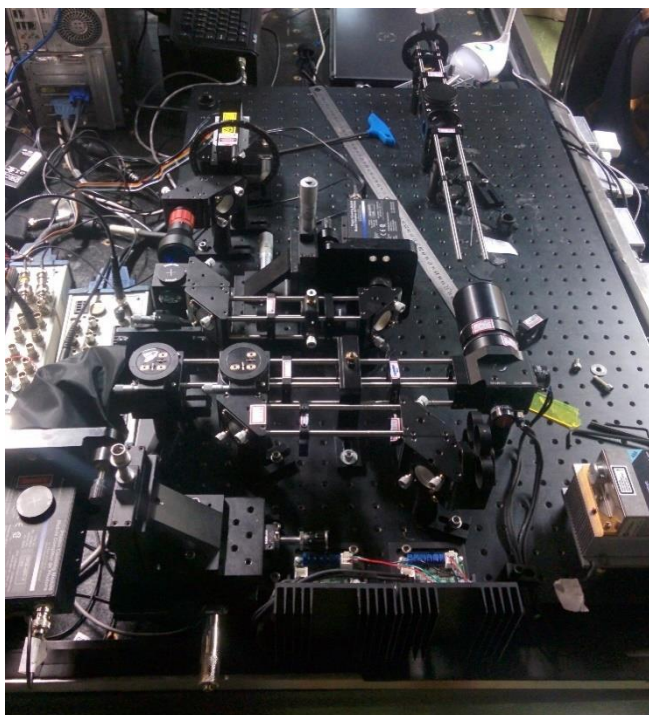


FIGURA 6

Montagem do design óptico do Sistema de Imagem Confocal acoplado ao módulo de fluorescência e Rayleigh

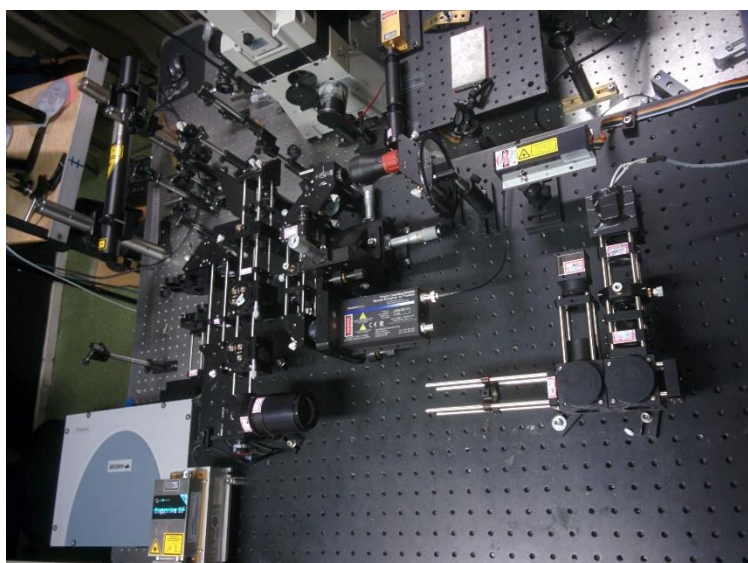


FIGURA 7

Montagem do design óptico do Sistema de Imagem Confocal acoplado ao módulo de Rayleigh, câmera ocular e espectrômetro

Os requisitos de 3.3, R3 - Análise Multiespectral, foram verificados para técnicas de Rayleigh e fluorescência ao fazermos imagens hyperespectrais de um tecido retinal e cerebral **FIGURA 8** e **FIGURA 9**, respectivamente.

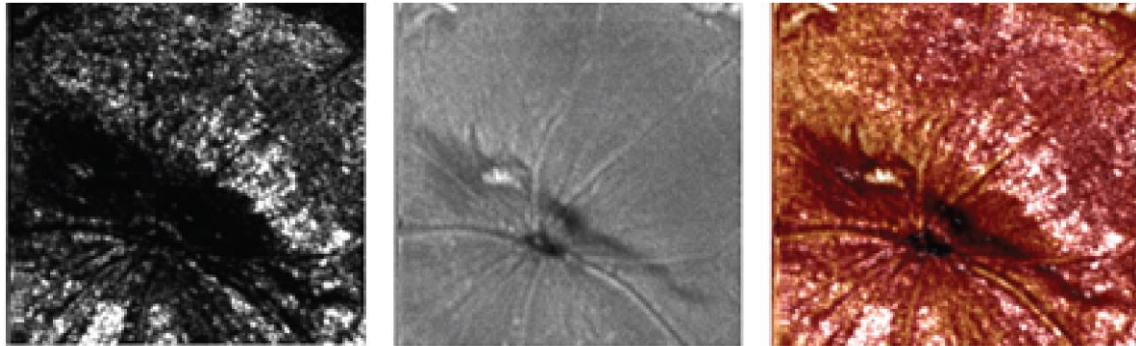


FIGURA 8

Retina de rato ex-vivo. Imagem espalhamento Rayleigh; A. Imagem Fluorescência; B. Combinação de imagem A e B mostra em amarelo as regiões com maior fluorescência relativa ao espalhamento elástico Rayleigh.

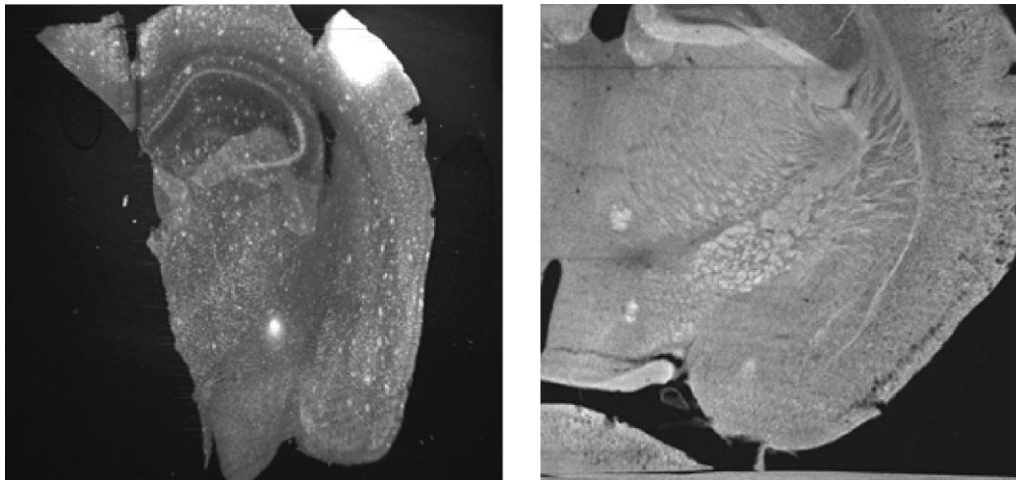


FIGURA 9

Imagem de fluorescência de placa amiloide em corte de cérebro. Tecido marcado com curcumina e excitado com comprimento de onda verde (561 nm). À esquerda, Tg mostrando placas amiloide. À direita, animal Ctrl.

6. Conclusão

A partir dos requisitos óticos de alto nível para do Oftalmoscópio de Varredura a Laser, foram realizados design óticos e prototipagem para testar os requerimentos. Foi demonstrada a capacidade de obter imagens do fundo da retina de um rato durante teste *in vivo*. No mesmo experimento, foi verificada a capacidade de projeção de um laser no olho do animal para realização de análises com o sistema de imagem confocal, que também possibilita a adaptação de módulos extras para análises espectrais. Em seguida, a composição de imagens confocais utilizando varredura a laser para criar imagens hiperespectrais de tecidos da retina e cérebro foi gerada. Foram utilizadas análise do espalhamento Rayleigh e fluorescência para testar a criação da imagens de diferentes bandas espectrais simultaneamente do mesmo tecido. Esses testes permitem checar a viabilidade do sistema para a adição de módulos de Raman, SRS, CARS e dois fótons.

MODELO DE NEGÓCIO

(em laboração)

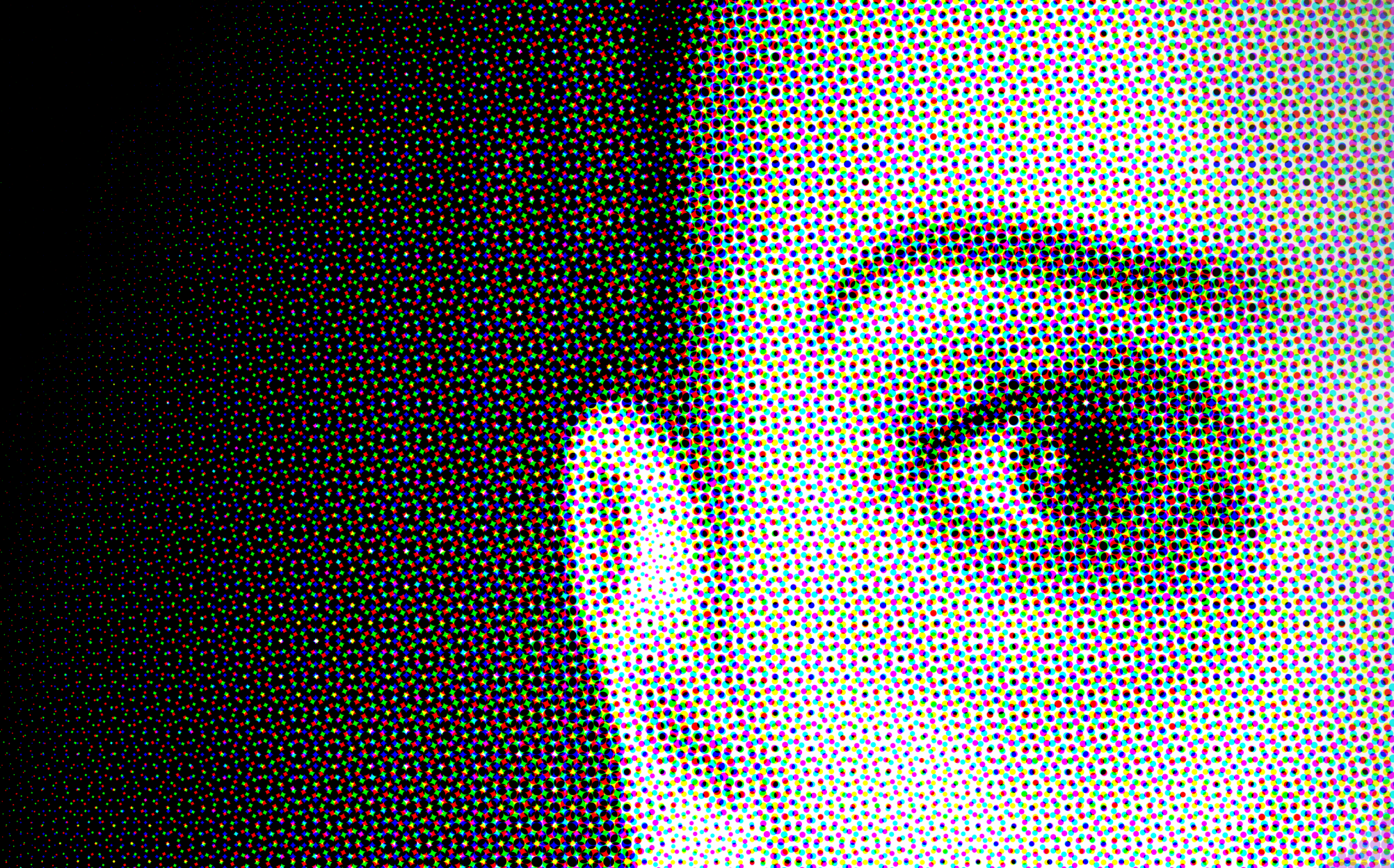
Autora Márcia Diniz

**Com colaboração de Emerson Fonseca, Alexandre Barbosa e Ado Jorio
Diagramação, Cassiano Rabelo**

BioNS - Soluções em Bionanotecnologia

Belo Horizonte

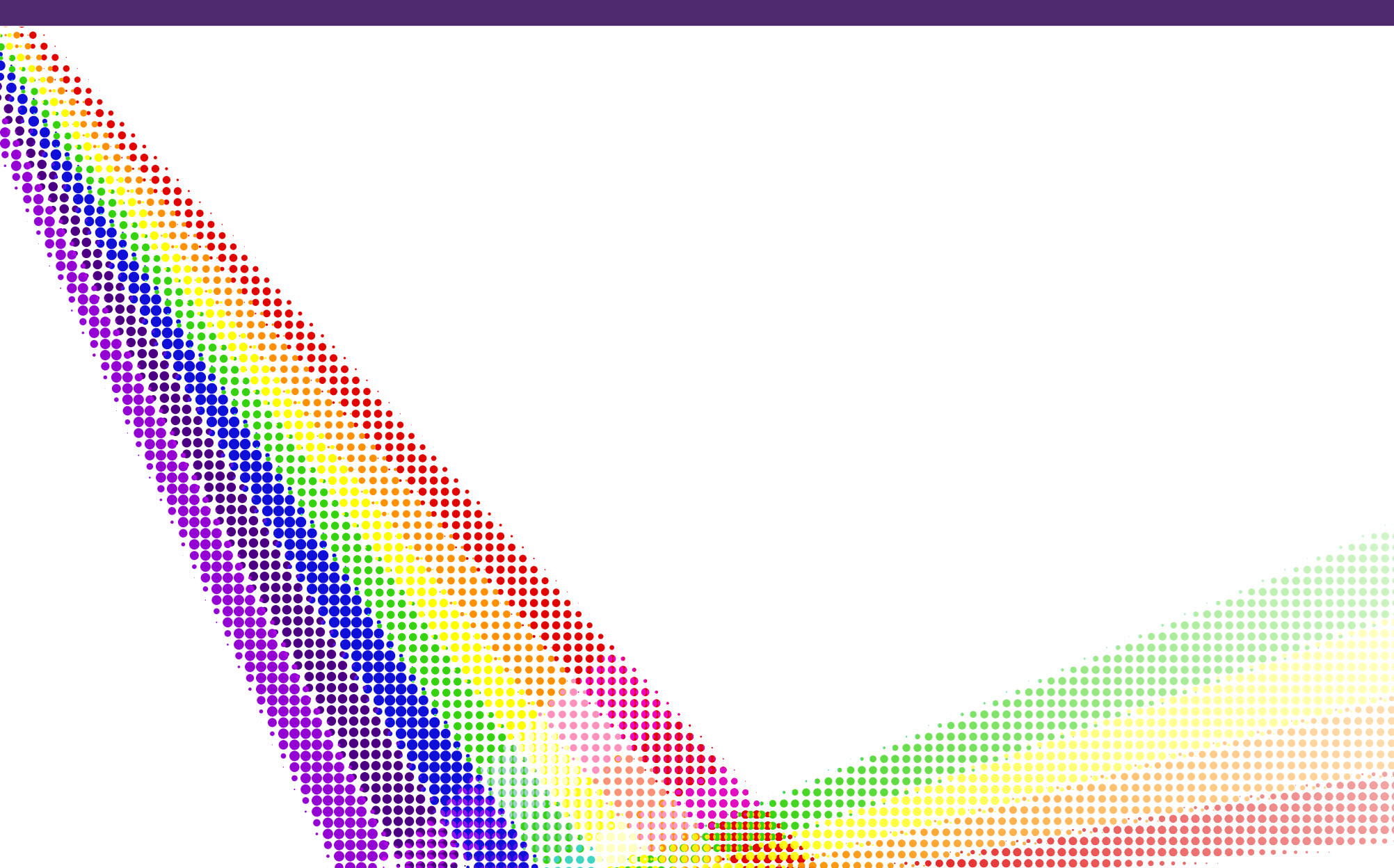
Outubro, 2020





BioNS

MODELO DE
NEGÓCIOS



1. RESUMO EXECUTIVO

Este documento tem como objetivo apresentar o Modelo de Negócios da **BioNS** – Soluções em Bionanotecnologia.

A **BioNS** é uma empresa brasileira que pretende ser referência na produção de equipamentos baseados em espectroscopia óptica para aplicações biomédicas, atuando de forma a colaborar com o desenvolvimento da instrumentação biomédica no Brasil.

1.1. OS PRIMEIROS EQUIPAMENTOS

As demências, entre elas o **Alzheimer**, seu tipo mais comum, são doenças neurodegenerativas que acometem mais de 50 milhões de pessoas globalmente. Com tendência de crescimento com o envelhecimento da população, gerando um aumento significativo nos custos da saúde com o passar dos anos, um diagnóstico precoce, essencial para qualquer tratamento efetivo, ainda inexistente.

Com foco inicial no desenvolvimento de equipamentos para pesquisa e diagnóstico precoce do mal de Alzheimer, surge a **BioNS**, cuja missão é:

“Desenvolver soluções para biomedicina fundamentadas em espectroscopia óptica”

A **BioNS** é uma spinoff do LabNS – Laboratório de Nano-espectroscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que produzirá e comercializará um equipamento nacional de alta tecnologia, o OVL – oftalmoscópio de varredura a laser, baseado na técnica de espectroscopia Raman. Esta técnica utiliza a luz para identificar a impressão digital molecular de qualquer substância, com informação físico-química das biomoléculas características de doenças.

Para desenvolver e produzir o OVL e outros produtos derivados dessa plataforma tecnológica, a **BioNS** contará com uma equipe composta por profissionais provenientes do LabNS, com ampla experiência e conhecimento no desenvolvimento de instrumentação e neuro-oftalmologia.

Para a implementação e funcionamento do empreendimento, é previsto um investimento de aproximadamente **R\$ 5,7 milhões** ao longo de **6 anos**. O montante será necessário para subsidiar infraestrutura, equipe, registro dos produtos junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária, certificação da empresa, despesas relacionadas à venda dos produtos da **BioNS** e outros dispêndios considerados essenciais para a operação da empresa.

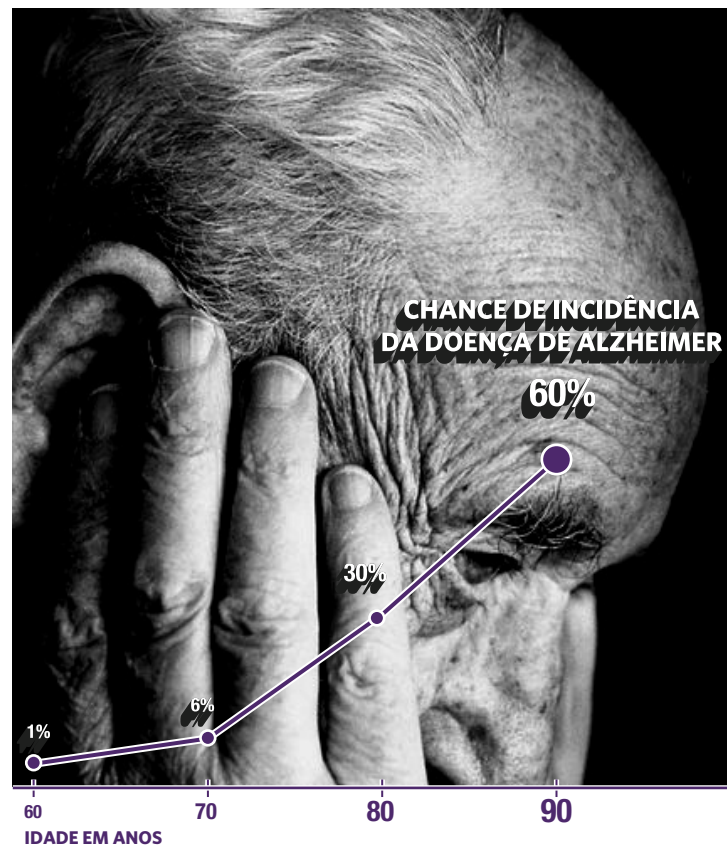
A **BioNS** irá atuar principalmente no mercado de unidades de atendimento, hospitais e clínicas de saúde, que têm grande potencial para a compra do OVL, sendo os principais usuários os oftalmologistas, neurologistas e neuro-oftalmologistas. O OVL poderá ser comercializado em duas versões: uma versão para pesquisa, com finalidade científica, OVL-R (*research*), de preço estimado em R\$ 1,45 milhões, e uma versão para diagnóstico, OVL-D (*diagnosis*), para uso na prática clínica, com preço estimado em **R\$ 360 mil**.

2. OPORTUNIDADE VISLUMBRADA

Dados da *Alzheimer's Disease International*¹ reportam que, no mundo, mais uma pessoa desenvolve demência a cada 3 segundos. Estima-se que, em 2015, a demência atingia 46,8 milhões de pessoas globalmente, número que cresceu para próximo de 50 milhões em 2017. A previsão é que até 2030 acometa 75 milhões e, em 2050, 131,5 milhões de pessoas no planeta, mais da metade em países de renda baixa e média.

O custo total estimado das formas de demência era de US\$ 818 bilhões em 2015 (1,09% do PIB global), o que

1. Disponível em: www.alz.co.uk. Data de acesso: 25 de junho de 2018



inclui custos médicos diretos, assistência social e cuidados informais². Estima-se que em 2018 ele aumente para US\$1 trilhão e, até 2030, chegue a US\$2 trilhões, montante que pode prejudicar o desenvolvimento social e econômico e sobrecarregar os serviços sociais e de saúde (SLOANE et al., 2002).

A Doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum de demência, representando de 60 a 70% dos casos (WHO, 2012). Como outras demências, apresenta tendência anual de crescimento da ocorrência no mundo, com o envelhecimento da população (WANG et al., 2017), e custo social dos cuidados aumenta drasticamente com o aumento da gravidade da doença (GUTIERREZ et al., 2014).

Apesar de já terem sido mapeados fatores de risco para a DA, com um terço deles potencialmente modificáveis (NORTON et al., 2014), a doença ainda é incurável, e resulta em um desafio econômico para a sociedade. Os desafios da pesquisa de fronteira da DA envolvem a falta de biomarcadores confiáveis para seu diagnóstico precoce e a falta de estratégias preventivas e tratamentos efetivos, para impedir ou reduzir a progressão da doença. A literatura inclui como marcadores patológicos da DA a deposição da proteína amiloide, e inclui também a presença de proteína tau hiperfosforilada (LIM et al., 2016), com intri-

cado mecanismo e caráter multifatorial. Atualmente, esses biomarcadores são detectados por análise do fluido cefalorraquidiano (líquor), método muito invasivo, e imagem cerebral (via PET-scan, com exposição à radiação). Apesar de efetivos, esses métodos estão limitados para a utilização em larga escala na população, devido a dificuldades em aquisição de amostras, falta de infraestrutura e alto custo. Até 2014, o diagnóstico definitivo da DA ainda era a imagem de tecido cerebral *post mortem*³.

Além de grande incidência, a doença de Alzheimer é também a mais incapacitante forma de demência, comprometendo várias estruturas cerebrais, como córtex e hipocampo, e produzindo perdas de memória e linguagem. A retina também contém células nervosas e fibras que formam uma extensão sensorial do cérebro, constitui tecido neuronal, sendo parte integrante do sistema nervoso central, de localização extracerebral. Por ser uma neurodegeneração, as manifestações que ocorrem no cérebro também ocorrem na retina, fazendo com que o imageamento retiniano represente uma técnica diagnóstica acessível, não invasiva e relativamente de baixo custo para o diagnóstico precoce do desenvolvimento do Alzheimer, através da identificação de acúmulos da proteína amiloide em sua configuração β .

2. Disponível em: www.paho.org/bra/. Data de acesso: 25 de junho de 2018.

3. International Working Group 2 (IWG2): New guidelines for diagnosis of Alzheimer's Disease.

Dado que imagens de PET-scan detectaram deposição de β -amiloide no cérebro muito antes dos sintomas clínicos da DA, imageamento in vivo da acumulação de β -amiloide na retina apresenta-se como uma abordagem altamente promissora (LIM et al., 2016). Um teste não invasivo para o diagnóstico precoce da DA preenche a lacuna existente no acompanhamento e tratamento da doença, permitindo o acompanhamento de pacientes e uma melhor compreensão dos determinantes da neurodegeneração da DA. (FROST et al., 2010). No caso da técnica de PET-Scan, o alto custo do procedimento inviabiliza sua utilização rotineira.

A oportunidade vislumbrada pelos empreendedores da **BioNS** é a atuação em espectroscopia intraocular, primeiramente com o desenvolvimento de diagnóstico precoce da DA. Entretanto, a tecnologia da espectroscopia intraocular abre nova perspectiva para a investigação de doenças da retina e do sistema nervoso central, como outros tipos de demências (como a frontotemporal e a associada a corpos de Löwy), Doença de Parkinson e doenças neurodegenerativas do sistema nervoso central. A empresa iniciará sua atuação com o lançamento de um produto para espectroscopia intraocular, específica para diagnóstico precoce de DA, devido a sua grande relevância em termos de saúde pública, e desenvolverá também, outros testes para doenças de retina e neurológicas de

ampla importância clínica. Assim como na DA, os testes por meio de espectroscopia ocular proporcionarão diagnósticos precoces e acompanhamento dessas doenças, podendo gerar outros produtos específicos/customizados para novas aplicações.

Além da plataforma tecnológica que gerará os primeiros produtos, a **BioNS** atuará na assistência técnica e manutenção dos equipamentos. No Brasil, a quase totalidade dos equipamentos médicos de alta complexidade é importada, com manutenção de alto custo e ineficiente. A **BioNS** investirá na formação de recursos humanos e educação continuada para agregar pessoal qualificado às suas atividades a ao mercado de instrumentação biomédica.

Referências

FROST, S.; MARTINS, R.N.; KANAGASINGAM, Y. Ocular biomarkers for early detection of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2010, 22(1):1-16. doi: 10.3233/JAD-2010-100819.

GUTIERREZ, B.A.O.; SILVA, H.S.; GUIMARÃES, C.; CAMPINO, A.C. Impacto econômico da doença de Alzheimer no Brasil: é possível melhorar a assistência e reduzir custos? *Ciência & Saúde Coletiva*, 19(11):4479-4486, 2014.

LIM, J.K.H.; LIQ-X; H.E. Z.; VINGRYS, A.J.; WONG, V.H.Y.; CURRIER, N.; MULLEN, J.; BUI, B.; VAND NGUYEN, C.T.O. (2016) The eye as a biomarker for Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* 10:536. doi: 10.3389/fnins.2016.00536

NORTON, S.; MATTHEWS, F.E.; BARNES, D.E.; YAFF, K.; BRAYNE, C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet Neurology* 2014; 13: 788-94.

SLOANE, P.D.; ZIMMERMAN, S.; SUCHINDRAN, C.; REED, P.; WANG, L.; BOUSTANI, M.; SUDHA, S. The Public Health Impact of Alzheimer's Disease, 2000-2050: potential implication of treatment advances. *Annu. Rev. Public Health* 2002. 23:213-31.

WANG, J.; GU, B.J.; MASTERS, C.L.; WANG, Y-J. A systemic view of Alzheimer disease – insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nature Reviews Neurology* (2017), vol 13 (10), pp. 612-623. doi: 10.1038/nrneurol.2017.111.

WHO (2012). "Dementia: a Public Health Priority". World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/. Data de acesso: 26 junho 2018.



3. BioNS

3.1. CONCEITO

A **BioNS** – Soluções em Bionanotecnologia é uma spin-off do Laboratório de Nanoespectroscopia (LabNS) da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. É constituída, em sua maior parte, por pesquisadores provenientes do LabNS e que possuem experiência na construção de equipamentos de pesquisa e caracterização para o desenvolvimento da bionanotecnologia.

A empresa será criada com o objetivo de fornecer soluções inovadoras em biotecnologia que contribuirão com a geração de conhecimento em instituições de ciência e tecnologia (ICTs) de todo país e para o desenvolvimento de novos dispositivos diagnósticos baseados em óptica.

Missão

“Desenvolver soluções para biomedicina fundamentadas em espectroscopia óptica”

Com esta finalidade, a empresa desenvolverá, em parceria com o LabNS, um equipamento para espectroscopia

intraocular, inicialmente com foco na detecção de biomarcadores para doenças neurodegenerativas na retina, começando pela doença de Alzheimer. Este equipamento terá um módulo básico, que contempla o uso da espectroscopia Raman, e módulos adicionais, que contemplam o uso de técnicas ópticas variadas. A utilização da espectroscopia Raman, suas variações e outras técnicas ópticas, proporciona a possibilidade da detecção de outros biomarcadores, e em diferentes estruturas oculares, com a finalidade de diagnosticar outras doenças bem como outros processos bioquímicos, como a ação de fármacos.

A estratificação dos profissionais que utilizarão esses equipamentos pode ser dividida entre médicos em estruturas de atendimento secundárias e terciárias, agências de pesquisa em neurodegeneração, farmácia, entre outros. A **BioNS** oferecerá as versões do oftalmoscópio de varredura a laser cuja venda será direcionada a Institutos de Ciência e Tecnologia (ICTs), hospitais, clínicas de diagnóstico, ou diretamente a neurologistas, oftalmologistas e neuro-oftalmologistas. No caso das ICTs, o cliente principal é o pesquisador biólogo, farmacologista, bioquímico,

neurologista, oftalmologista e neuro-oftalmologista que realiza pesquisa em detecção de biomarcadores e outras aplicações. É possível, ainda, customizar o dispositivo e aumentar o portfólio de produtos, em estreita colaboração com os clientes. Associados à venda do equipamento serão comercializados serviços de manutenção, assistência técnica, assim como atualização, educação continuada e treinamento.

A concepção de uma empresa dessa natureza no Brasil valoriza os investimentos em ciência, tecnologia e inovação realizados no país. A existência de uma empresa nacional de alta tecnologia estimula o surgimento de fornecedores capacitados tecnologicamente, a formação de recursos humanos, produtores e usuários de tecnologia, bem como o empreendedorismo na Universidade, além de aproximar a pesquisa feita na academia da sociedade e do mercado.

3.2. EQUIPE

A **BioNS** é composta por profissionais provenientes do Laboratório de Nanoespectroscopia (LabNS) da UFMG que participaram do desenvolvimento do equipamento para espectroscopia intraocular do laboratório, o primeiro desenvolvido no mundo.

Os profissionais possuem ampla experiência em espectroscopia Raman e suas aplicações em biomedicina. Alguns deles já foram coordenadores ou membros de importantes organizações nacionais como o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular, redes e grupos brasileiros de pesquisa em nanoespectroscopia e inovação para bioengenharia de nanossistemas, dentre outros. A equipe envolvida é multidisciplinar e mantém estreita relação com instituições de pesquisa e com indústrias, além de um integrante ter ampla prática de consultório em neuro-oftalmologia.

O grupo obteve vários resultados científicos descritos em centenas de publicações nacionais e internacionais em espectroscopia óptica; detém o depósito de uma dezena de pedidos de patente, em âmbito nacional e internacional, tendo patentes concedidas no escritório americano (United States Patent and Trademark Office – USPTO).

A seguir, a equipe técnica da empresa é apresentada.

Ado Jorio de Vasconcelos

Professor Titular no Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais, trabalha com pesquisa e desenvolvimento de instrumentação científica em óptica para o estudo de nanoestruturas com aplicações em novos materiais e biomedicina. É membro da Sociedade Brasileira de Física, da Academia Brasileira de Ciências, da Ordem Nacional do Mérito Científico (classe Comendador) e recebeu o “membership award to the American Chemical Society” (2015-2018). Em 2016 foi incluído na lista dos “Highly Cited Researchers” da Thomson Reuters. Possui mais de 200 artigos publicados⁴ com mais de 40 mil citações⁵, sendo autor em mais de uma dezena de pedidos de patente. Ocupou os cargos de Coordenador de Estudos Estratégicos e Informação no Inmetro (2008-2009) e, na UFMG, de Diretor da Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (2010-2012), chefe do Departamento de Física (2015-2016), Pró-Reitor de Pesquisa (2016-2018), membro do Comitê Gestor do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular. Recebeu diversos prêmios internacionais pelas suas contribuições científicas e a Medalha da Inconfidência do governo do Estado de MG (2016).

CV disponível em:

<http://lattes.cnpq.br/0034894070455412>

4. Disponível em <http://www.somos.ufmg.br/professor/ado-jorio-de-vasconcelos>.
Data de acesso: 27 ago. 2019.

5. Disponível em: <https://bit.ly/2CEzE3D>. Data de acesso: 27 ago. 2019.

Leandro Malard Moreira

Possui graduação em Física Bacharelado pela UFMG (2004), mestrado e doutorado em Física pela UFMG (2009); é Pós-doutor pela Universidade de Columbia, EUA (2011). Atualmente é professor associado do Departamento de Física da UFMG. Trabalha na área de propriedades ópticas e espectroscopia óptica, além de desenvolver diferentes técnicas de microscopias ópticas não lineares e vibracionais aplicadas a matéria condensada e em sistemas biológicos. Possui mais de 6500 citações em artigo científicos, é membro afiliado da Academia Brasileira de Ciências e recebeu menção honrosa no Prêmio CAPES de tese de 2011.

CV disponível em:

<http://lattes.cnpq.br/4670907354729674>

Alexandre Simões Barbosa

Possui graduação em Medicina/UFMG (1995), residência em Oftalmologia/UFMG (1997), especialização em Neuro-Oftalmologia (1998), Ecografia Ocular/Orbitária (1998) e Retina (1999), doutorado em Oftalmologia/UFMG (2004), pós-doutorado em Física/UFMG (2016), especialização em Estatística, Métodos Multivariados e Bioestatística/UFMG (2008). Atua na clínica oftalmológica, com ênfase nas áreas de Neuro-Oftalmologia e Retina, é diretor clínico e responsável técnico na Neurooftalmica-Clínica Alexandre Barbosa. Foi responsável pelo Serviço de Neuro-Oftalmologia do Instituto Hilton-Rocha (2000-2003), preceptor dos Serviços de Neuro-Oftalmologia do Instituto e Fundação Hilton Rocha (2000-2003). Atua como preceptor da residência de Oftalmologia no Hospital das Clínicas/UFMG e Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas Gerais (IPSEMG) desde 2004. Pesquisador nas áreas de perfusão ocular no Hospital das Clínicas/UFMG, em equipe interdisciplinar junto com a Medicina Fetal/UFMG desde 1999. Pesquisador nas áreas de neuropatias ópticas e doenças neurodegenerativas no Serviço de Oftalmologia do Ipsemg, serviço de referência no Estado de Minas Gerais desde 2004. Membro do Conselho Brasileiro de Oftalmologia e do Clube Latino-americano de Neuro-Oftalmologia (CLAN). É membro do LabNS, participando do desenvolvimento do instrumento para diagnóstico de doenças neurológicas e oculares por

meio da espectroscopia Raman desde 2012. Resultados preliminares do estudo sobre o diagnóstico precoce da Doença de Alzheimer por meio do Raman resultou no “Prêmio Pesquisa Clínica” do Conselho Brasileiro de Oftalmologia, Rio de Janeiro/2019. Os estudos de perfusão ocular por meio de Doppler orbitário resultaram no ISSHP Zuspan Award, Lisboa (2009), ISSHP Young Investigator Award, Viena (2004) e no Prêmio Varilux/Essilor/Sociedade Brasileira de Oftalmologia, Rio de Janeiro/2004. Escreveu dezenas de capítulos de livros e artigos.

CV disponível em:

<http://lattes.cnpq.br/7737615903264341>

Rafael Pinto Vieira

Farmacêutico industrial graduado pela UFMG (2003), Mestre em Fármaco e Medicamentos, área de Produção e Controle Farmacêuticos, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2008), Doutor em Química pela UFMG (2013) e Residente Pós-doutoral na Simon Fraser University, Burnaby, Canadá (2013-2015), no Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG (2015-2017) e no Departamento de Física do ICEx-UFMG (2017-2018). Experiência na indústria farmacêutica, atuando como Analista e Coordenador de Garantia de Qualidade (2004-2008). Em pesquisa científica,

atua no preparo e testes in vitro e in vivo de compostos orgânicos, complexos metálicos e formulações farmacêuticas com atividade biológica em modelos experimentais de dor, inflamação, doenças infecciosas e distúrbios do sistema nervoso central, especialmente Doença de Alzheimer. Também atua em projetos transdisciplinares de caracterização das interações metal-proteína na Doença de Alzheimer por meio de técnicas espectroscópicas. Atualmente é Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

CV disponível em:

<http://lattes.cnpq.br/2300064372165096>

Emerson Alberto da Fonseca

Possui graduação em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário UNA e mestrado em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, com ênfase em Biologia Molecular. Seu Doutorado em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica foi voltado para o desenvolvimento da tecnologia em foco. Integra a equipe do laboratório de NanoEspectroscopia como pesquisador DTI em projetos de engenharia biomédica na área de diagnóstico precoce de Alzheimer. Atua nas áreas de biotecnologia, nanotecnologia, células-tronco, biomateriais, sinalização celular.

CV disponível em:

<http://lattes.cnpq.br/7503600220038459>

Lucas Lafetá Prates da Fonseca

É doutorando em Física na UFMG desde 2018. É Mestre (2017) e Bacharel (2015) também em Física pela UFMG. Tem interesse nas áreas de Física aplicada a Medicina, Espectroscopia Raman, Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) e Second-Harmonic Generation (SHG), trabalha no Laboratório de Nanoespectroscopia (LabNS) do Departamento de Física da UFMG desde 2013.

CV disponível em:

<http://lattes.cnpq.br/8543312087602807>

Renan Souza Cunha

Possui graduação (Bacharelado) e mestrado em Física obtidos na UFMG, e atualmente é doutorando em Física na mesma instituição. Tem interesse na investigação teórica e experimental de temas em espectroscopia, óptica não linear, óptica quântica, neurofísica e fundamentos da teoria quântica. Tem experiência docente no ensino superior, tendo trabalhado no programa Universidade Aberta do Brasil, na modalidade Ensino à Distância da UFMG.

CV disponível em:

<http://lattes.cnpq.br/7880213956945579>

Márcia Dias Diniz Costa

Possui Bacharelado em Química pela UFMG (1994) e Mestrado em Química pela UFMG (1997). É pós-graduada em Capacitação Gerencial pela Fundação Instituto de Administração - FIA-SP (2005). Desde 2010 trabalha com Gestão da Inovação Tecnológica, tendo atuado como Redatora de Patentes, Analista de Projetos e Transferência de Tecnologia na Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica - CTIT da UFMG (2012-2014). É Pesquisadora Tecnologista em Metrologia e Qualidade do INMETRO da área de Inovação e Tecnologia. Desde 2014 exerce suas funções no Laboratório Associado ao Inmetro para Inovação em Instrumentação Científica - LA3IC, nucleado no Laboratório de NanoEspectroscopia - Lab-

NS do Departamento de Física da UFMG.

CV disponível em:

<http://lattes.cnpq.br/4392316361930365>

A **BioNS** surge com uma equipe altamente qualificada, diversificada e apta a promover um salto no desenvolvimento de instrumentação científica e biomédica no país, aproximando do mercado os conhecimentos gerados na academia, atuando com produtos, processos e serviços de alto valor agregado e promovendo inovação.

3.3. PORTFOLIO DE PRODUTOS

A **BioNS** atuará para o desenvolvimento e produção de plataforma tecnológica com recursos para realização de espectroscopia intraocular, com foco em detecção de marcadores biológicos para doenças neurodegenerativas. Dentro desse conceito, o primeiro produto será voltado para a detecção do peptídeo β -amiloide na retina, com equipamento otimizado para esta detecção.

Nessa linha, serão desenvolvidos dois produtos: um para diagnóstico (D) e um para pesquisa (R).

O Oftalmoscópio de Varredura a Laser OVL-D (*diagnosis*) será dedicado essencialmente para detecção do peptí-

deo na retina em exames clínicos e será o foco de atuação inicial da empresa. Este produto, de fácil operação por um profissional oftalmologista ou técnico de imagem, poderá ser vendido para clínicas de imagem, hospitais, e mesmo consultórios de neuro-oftalmologistas especialistas.

O Oftalmoscópio de Varredura a Laser OVL-R (*research*) será um produto mais versátil, constituindo-se de uma plataforma contendo vários módulos de operação, dedicado a atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação, com foco mercadológico em ICTs. Este produto poderá ser customizado em seus módulos e componentes, a depender das necessidades de clientes.

A **BioNS** prestará o serviço de assistência técnica, manutenção e treinamento para clientes.

3.4. PLANEJAMENTO ORGANIZACIONAL

Embora o OVL-D (*diagnosis*) seja o equipamento de maior impacto social e econômico, sua viabilidade comercial depende do amadurecimento dos protocolos de diagnóstico e tratamento da doença de Alzheimer. Assim sendo, vislumbra-se que o OVL-R (*research*) será o primeiro equipamento comercial, tendo papel habilitador e facilitador da implementação da **BioNS** e do OVL-D.

Durante dois anos a equipe da empresa irá se dedicar à finalização do desenvolvimento e aprimoramento das duas versões do OVL, em parceria com o LabNS, incluindo a execução de testes de segurança e eficácia e testes clínicos. Neste período, a equipe atuará também na prospecção de parcerias e captação de investimentos, e compartilhará da infraestrutura do laboratório. A equipe da **BioNS** será constituída por um Gestor Executivo – responsável pelas funções administrativas e prospecção de parceria / investidores – e dois Coordenadores Técnicos – responsáveis pela finalização do equipamento junto à universidade (um engenheiro e um biólogo/biomédico). Para este período, será necessário captar recurso de fomento eminentemente da esfera pública, para elevar o *technology readiness level* do equipamento e conduzir os testes clínicos.

A partir do terceiro ano, a empresa será efetivamente criada e iniciará uma fase de transição entre desenvolvimento e comercialização do produto no mercado. Este período terá duração de dois anos. A equipe se instalará em infraestrutura própria e serão contratados um engenheiro, um programador, um técnico em biomedicina e um estagiário para acompanhar a operação do produto e estabelecer os padrões de processos necessários para a montagem e do equipamento para comercialização. Nesse momento será iniciado o processo de registro junto à Anvisa.

A empresa terá uma sede em uma sala locada, de aproximadamente 50m², em região próxima à UFMG. Alguns dos equipamentos utilizados serão: lasers, espectrômetros, microscópio óptico, mesa óptica, componentes ópticos, placas de aquisição de sinais digitais e analógicos, detectores de luz, amplificadores lock-in, nobreak. Para a operacionalização das atividades também serão necessários softwares como o Microsoft Visual Studio, Qt, Zemax, além de aluguel de espaço na nuvem por meio de Github e Dropbox. A infraestrutura permanente será voltada para a parte administrativa e operacional da empresa.

Após cinco anos de empreendimento, serão adicionados à equipe um técnico e um estagiário que ficarão responsáveis pelas atividades produtivas da empresa. A Figura X1 explicita a equipe que constituirá a empresa ao final do 5 ano, enquanto a Figura X2 representa o planejamento da operação da **BioNS** nos primeiros cinco anos antecedentes. Os itens com contorno roxo representam recursos e atividades compartilhados com o LabNS.

- **Conselho Técnico Administrativo:** responsável por definir as diretrizes estratégicas da empresa

- **Gestor Executivo:** responsável pela prospecção de parcerias, captação de financiamento e gestão geral da empresa
- **Coordenadores Técnicos (Engenharia e Biologia/Biomedicina):** responsáveis pelo gerenciamento do desenvolvimento junto ao LabNS e pela coordenação das equipes de desenvolvimento e produção da **BioNS** nas duas áreas.
- **Setor Administrativo/Comercial:** função compartilhada inicialmente pelo Gestor Executivo e Coordenadores Técnicos. É prevista a contratação de um vendedor técnico no quinto ano da empresa.

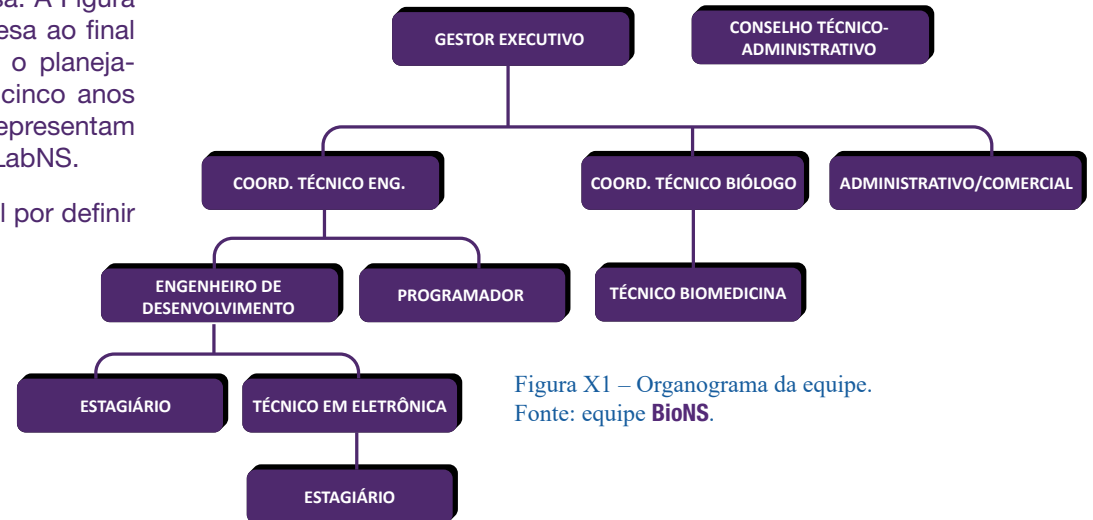


Figura X1 – Organograma da equipe.
Fonte: equipe **BioNS**.

Camadas		Desenvolvimento (0 – 2 anos)	Estruturação (2 – 4 anos)	Operação (+ 4 anos)	
Atividades	Principais		OVL-R	OVL-R, OVL-D Módulos Manutenção Treinamento Outros equip.	
	Apoio	Aprimoramento da detecção Desenvolvim. So ware Testes clínicos	Registro Anvisa Des. design produto Des. proced. montagem Treinamento interno	Desenv. novos equip. Módulos independ.	
Recursos	Físicos	Infra. LabNS	Setor técnico adm. Salas de reuniões	Área de montagem Sala molhada	
	Tecnológicos (softwares, equipamentos)	Infra. LabNS	Aluguel Softwares Mesa óptica	Laser Microscópio Espectrômetro	
	Humanos (profissionais)	Conselho Gestor Exec. Coords. Técns. Equipe LabNS	Engenheiro Programador	Técnico bio. Estagiário	Téc. Eletrôn. Estag. prod.
	Sociais	Neuroftalmica Inmetro LabNS/UFMG InventVision Ag. Tomento	LabNS/UFMG Inmetro	Neuroftalmica InventVision	

Figura X2 – Planejamento da BioNS. Fonte: equipe BioNS.

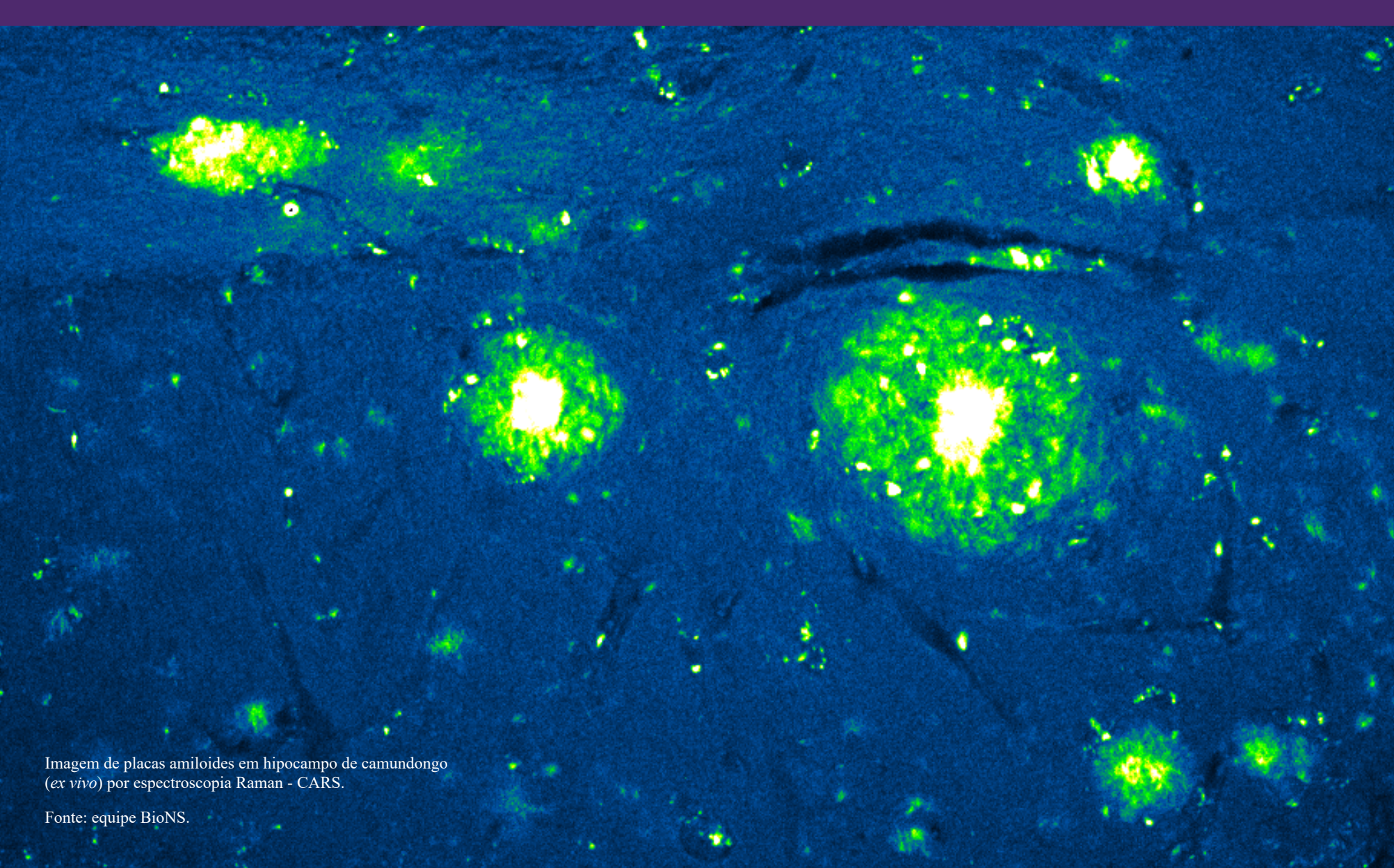


Imagem de placas amiloides em hipocampo de camundongo
(*ex vivo*) por espectroscopia Raman - CARS.

Fonte: equipe BioNS.

4. ANÁLISE DE MERCADO

4.1. CONTEXTO DO MERCADO

De acordo com a Evaluate Ltd., a indústria de tecnologia médica deve crescer 5.6% ao ano (CAGR) no período entre 2017 e 2024⁶, atingindo um volume de vendas global de US\$ 595 bilhões em 2024. Esta análise é baseada em dados e projeções das 300 maiores empresas globais do setor de tecnologia médica. Trata-se de um setor aquecido, intensivo em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), com frequentes fusões entre empresas ou divisões de empresas com outras. Os principais players globais do setor são Medtronic, Johnson&Johnson e Abbott Laboratories, todas americanas. Em seguida, Siemens Healthineers (Alemanha) e Philips (Holanda). O maior segmento é o de diagnóstico *in vitro*, seguido por cardiologia e diagnóstico por imagem. Estima-se, ainda, que o gasto total com P&D apresentará um crescimento de 4.5%, atingindo US\$ 39 bilhões em 2024.

Segundo as projeções da Evaluate Ltd., a área de maior crescimento em dispositivos médicos será a neurologia, com CAGR de 9,1% entre 2017 e 2024, e vendas atin-

gindo US\$ 15,8 bilhões em 2024. Segundo especialistas, esse crescimento é devido, em parte, à pesquisa de marcadores laboratoriais e de imagem para o estudo da demência e, sobretudo, da DA.

O setor de imagem diagnóstica, apesar de terceiro colocado em volume de vendas em 2017, apresentará um crescimento modesto, de 3.7% ao ano no mesmo período. Ainda assim, atingirá um volume de vendas de US\$ 51 bilhões em 2024. Nesse setor, os principais grupos do mercado mundial são Siemens Healthineers, General Electric e Philips. Especialistas da área apontam que já houve um crescimento enorme desse setor em anos anteriores e não houve um exame de imagem que modificasse significativamente condutas, e os principais equipamentos já estão bem estabelecidos há alguns anos. Por outro lado, algum controle na indicação desses exames tem sido feito por muitas instituições, pelo alto custo desses procedimentos. Muitos desses exames (número considerado por muitos inaceitável) têm resultado normal (grande parte não deveria ter sido solicitada), enquanto outros mostram resultados alterados, como por exemplo a atrofia cortical na DA, mas não têm impacto, uma vez que nada pode ser feito. Assim, o domínio da *diagnostic imaging* tem pouca margem de crescimento, a menos que uma nova tecnologia (um novo conceito) seja desenvolvida.

6. Disponível em: www.evaluate.com/MedtechWorldPreview2018.
Data de acesso: 27 novembro 2019.

Estes resultados mostram também a lacuna para a prope-dêutica neurológica por via ocular. Se por um lado houve crescimento da neurologia (provavelmente às custas da prope-dêutica das demências e da DA), a ausência de impacto nos exames de imagem (que tem na neurologia sua principal referência), reforçam o espaço e a oportunidade para a tecnologia da **BioNS**.

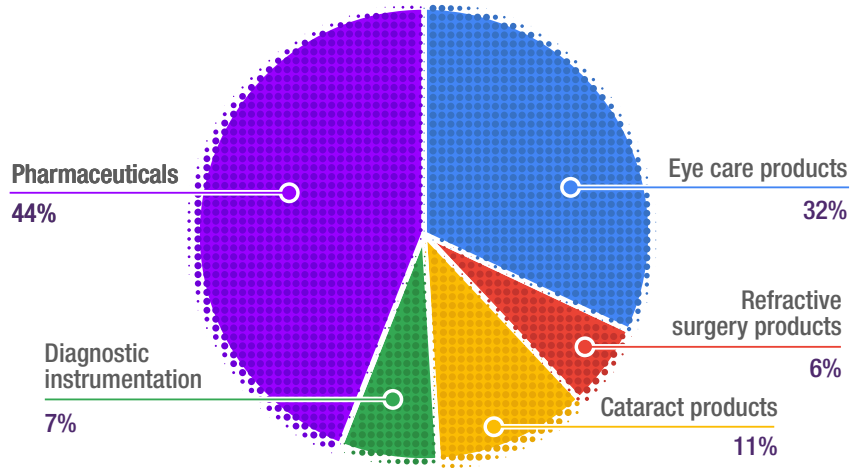


Figura X3 – Participação dos grandes setores no Mercado global de produtos oftalmológicos. Fonte: Stratagem, 2015.

Segundo a *Stratagem Intellectual Property Management Limited*⁷, em novembro de 2015, o mercado mundial total de produtos oftalmológicos era de aproximadamente US\$50 bilhões, com os Estados Unidos representando aproximadamente 40% deste Mercado. O segmento de Instrumentação diagnóstica representava 7% deste total, ou seja, US\$3,5 bilhões, conforme mostra a Figura X3.

Para estimar o mercado do produto OVL, optou-se por utilizar como referência os equipamentos de tomografia de coerência óptica – OCT (sigla em inglês, para *optical coherence tomography*). Tais equipamentos apresentam alguma semelhança, em termos de complexidade, ao produto principal da **BioNS**, apesar de o princípio de operação, bem como a finalidade do imageamento serem diferentes. Ambos são técnicas de imageamento não invasivas.

Os equipamentos de OCT são utilizados para fazer imagens de alta resolução de seções de corte da retina. O princípio do OCT é análogo ao do imageamento por ultrassom, entretanto utilizando luz ao invés de som. O OCT pode fornecer imagem de seções de corte de estruturas de tecido na escala de micrômetros, in situ e em tempo real. No caso da retina, tal técnica permite, por exemplo, obter informações para diagnóstico de glaucoma e outras doenças, tais como degeneração macular relacionada à idade e retinopatia diabética⁸.

7. Disponível em: <https://studyres.com/doc/1247488/the-ophthalmology-market>. Data de acesso: 7 junho 2019.

8. American Academy of Ophthalmology, aao.org, Data de acesso: 13 set. 2019.

A técnica de tomografia de coerência óptica surgiu no início dos anos 1990, embora os princípios da técnica remontam aos anos 1970. Desde então, a técnica tem apresentado crescimento em termos de financiamento de pesquisa, número de publicações científicas e Mercado de vendas de equipamentos. As aplicações médicas do OCT vão desde a oftalmologia, que é a aplicação principal, até a cardiologia e dermatologia⁹.

De acordo com a empresa Statistics MRC, o mercado global de Tomografia de Coerência Óptica foi avaliado em US\$690 milhões em 2017 e espera-se que alcance US\$1,13 bilhões em 2026, apresentando crescimento de um CAGR de 5,6%. Alguns fatores que sustentam essa projeção são o crescimento da população idosa, o aumento da incidência de patologias da pele (apesar de ainda pouco demandada) e neurológicas e o aumento da demanda por modalidades de imageamento sem utilização de radiação, dentre outros. O OCT permite uma análise histopatológica in vivo, o que modificou a prática do segmento posterior, sobretudo nas áreas de glaucoma, neuro-oftalmologia e retina, constituindo-se uma mudança de paradigma para essas áreas. Entretanto, fatores desfavoráveis a esse crescimento estão ligados à insuficiência de dados clínicos e falta de facilidades de re-

9. FUJIMOTO, J. & SWANSON, E. (2016). The development, commercialization and impact of OCT. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57, 9, OCT-1 OCT-13.

embolso. Há ainda um alto custo de manutenção desses equipamentos, e restrição da aprovação do exame diante dos achados da literatura.

As principais empresas a comercializar equipamentos de OCT mundialmente são Abbott Laboratories, Heidelberg Engineering GmbH, Carl Zeiss Meditec Ag, Agfa Healthcare, Imalux Corporation, OPTOPOL Technology S.A, Ninepoint Medical, Novacam Technologies Inc., NIDEK Co., Ltd., Agiltron Incorporated, Shenzhen MOPTIM Imaging Technique Co., Ltd., Oct Medical Imaging Inc., Heliotis AG, Phoenix Research Labs, Thorlabs Inc., Michelson Diagnostics, Leica Microsystems, Topcon Medical Systems, Optovue and Koninklijke Philips N.V.¹⁰

Os preços de equipamentos de OCT podem variar, no Brasil, entre R\$ 590 mil até R\$ 1,6 milhão, na versão completa, com todos os acessórios. Não há fabricantes nacionais desses equipamentos.

De fato, o Brasil é altamente dependente do mercado externo em termos de instrumentos e aparelhos para oftalmologia, incluindo microscópios binoculares utilizados em cirurgia oftalmológica. Entre 1997 e 2019 (até o mês de maio), o país importou aproximadamente US\$670 bilhões em produtos dessa categoria (Figura X4).

10. Disponível em <http://www.strategymrc.com/report/optical-coherence-tomography-oct-market>. Data de acesso: 17 julho 2020.

Balança comercial brasileira para Instrumentos e Equipamentos para oftalmologia

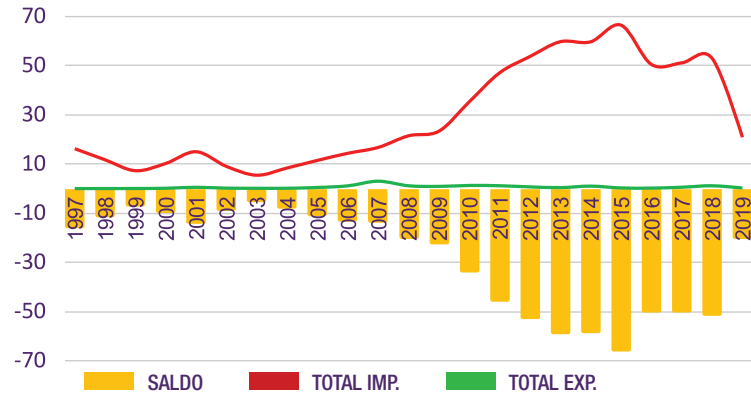


Figura X4 – Balança comercial brasileira para Instrumentos e Equipamentos para oftalmologia (NCM 901850), entre 1997 e 2019 (maio); valores em US\$1 milhão. Fonte: equipe **BioNS** com base em Comexstat (comexstat.mdic.gov.br; acesso em 31 maio 2019).

A dependência externa em termos de produtos oftalmológicos indica uma oportunidade para a atuação da **BioNS**. Ao oferecer um produto complexo sem similar no Brasil, a empresa terá vantagem competitiva. Entretanto, o fator mais relevante é que a tecnologia da **BioNS** representa uma mudança conceitual, assim como o OCT representou quando surgiu, pois foi um primeiro grande aprimoramento (mudança de paradigma) na investigação estrutural da retina. A espectroscopia ocular seria como um segundo grande aprimoramento, sobreposto ao primeiro, capaz de ir além da estrutura para identificar biomoléculas.

Em 2016, o mundo gastou US\$ 7,5 trilhões em saúde, cerca de 10% do PIB mundial¹¹. A despesa média per capita em saúde foi de US\$ 1 mil, mas metade dos países do mundo gastaram menos de US\$ 350 por pessoa. Os gastos em saúde no mundo estão crescendo mais rapidamente do que a economia globalmente; isso ocorre na maioria dos países, particularmente em países de baixa e média rendas.

Segundo relatório da Secretaria do Tesouro Nacional¹², a despesa federal em saúde aumentou continuamente sua participação entre os anos de 2008 e 2017, passando de

11. As Condições de Saúde Ocular no Brasil – 2019. Conselho Brasileiro de Oftalmologia. Disponível em: http://www.cbo.com.br/novo/publicacoes/condicoes_saude_ocular_brasil2019.pdf. Acesso em 29 nov 2019.

12. Disponível em: <http://www.tesouro.fazenda.gov.br/documents/10180/318974/AspectosFiscaisSa%C3%BAde2018/>. Acesso em 9 dez. 2019.

6,7% para 8,3% como proporção da Receita Corrente; e de 1,6% para 1,8% em proporção ao PIB. Nesta década, a despesa com saúde apresentou crescimento acumulado real de 31,9% (3,1% ao ano, em média). A regra do teto dos gastos federais antecipou o percentual mínimo de aplicação em ações e serviços públicos de saúde para 15% da receita corrente líquida em 2017, permitindo restaurar a trajetória de crescimento das despesas mínimas obrigatórias em saúde. Em 2017, o gasto primário da União em saúde totalizou R\$ 117,1 bilhões.

A Figura X5 mostra o gasto público diário com saúde por cidadão brasileiro no período entre 2008 e 2017.

Atualmente, o Brasil gasta em saúde pública cerca de 3,8% do PIB, e o país é o 64º colocado no percentil da distribuição mundial, com projeção de estabilidade da despesa da União em proporção ao PIB para os próximos 10 anos. A dinâmica futura das despesas em saúde é mais desafiadora em um contexto de limitação do crescimento dos gastos públicos e do ajuste fiscal. Portanto, é fundamental o debate sobre maneiras de aumentar a eficiência e a equidade do gasto em saúde.

Por outro lado, o processo de envelhecimento da população também tende a aumentar as despesas de saúde, pois a maior proporção de pessoas idosas, que demandam maiores gastos em saúde, eleva o dispêndio total. A Figura X6 mostra as curvas de custo per capita por idade

dos atendimentos ambulatoriais e hospitalares do SUS. Elas apresentam trajetórias semelhantes ao longo dos anos, evidenciando o efeito do envelhecimento populacional nas despesas de saúde. Em 2017, cerca de 50% de tais despesas foram destinadas a pacientes acima de 50 anos (o correspondente a apenas 55% da população).

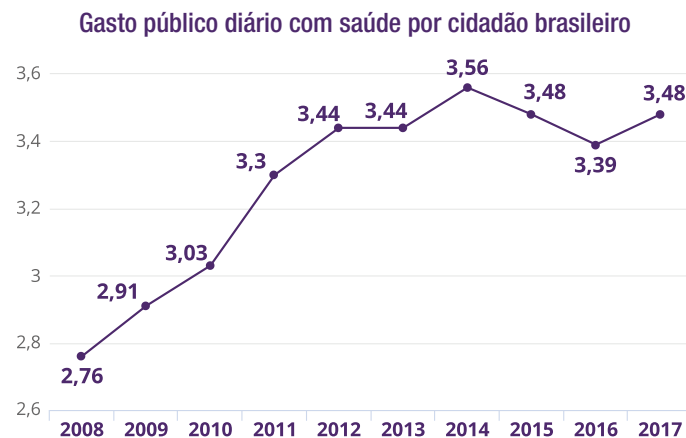


Figura X5 – Gasto público diário com saúde por cidadão brasileiro. Fonte: G1¹³.

13. Disponível em: <https://g1.globo.com/bemestar/noticia/2018/11/13/conselho-federal-de-medicina-aponta-investimento-abaixo-do-ideal-em-saude-publica-no-brasil.ghtml>. Data de acesso: 25 out 2019.

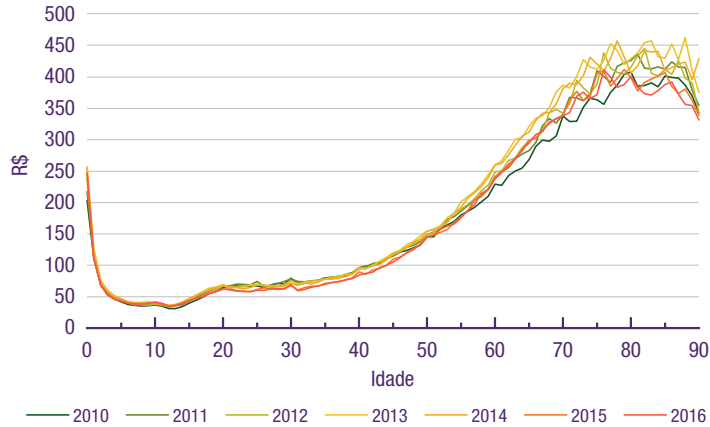


Figura X6 – Custo per capita por idade dos atendimentos ambulatoriais e hospitalares do SUS. Fonte: SIA e SIH/SUS¹⁴.

Por fim, o desenvolvimento de tecnologias diagnósticas mais eficientes e precoces que possibilitem terapias preventivas é uma estratégia crucial para aumentar a eficiência e a equidade do gasto em saúde.

Em 2019, a equipe da **BioNS** participou do XXXI Encontro do Clube Latino-Americano de Neuro-Oftalmologia (CLAN), em São Paulo, da Convenção Nacional dos Departamentos Científicos da Academia Brasileira de

14. Disponível em: <http://www.tesouro.fazenda.gov.br/documents/10180/318974/AspectosFiscaisSa%C3%BAde2018/>. Acesso em 9 dez 2019.

Neurologia, em Campinas, e do Conselho Brasileiro de Oftalmologia em São Paulo. Nesse último evento, que é o maior encontro de Oftalmologia do país, a equipe do **BioNS** recebeu o prêmio de melhor trabalho na categoria “Pesquisa Básica” do Conselho Brasileiro de Oftalmologia, pelo estudo “Resultados Preliminares do Diagnóstico Precoce da Doença de Alzheimer por meio da Identificação do Beta Amiloide Retiniano em Modelo Experimental”. Todas as apresentações e sobretudo a premiação foram amplamente divulgadas. A premiação conferiu ao nosso projeto grande visibilidade, despertando a atenção de pesquisadores, oftalmologistas e neuro-oftalmologistas, mesmo antes da realização de testes clínicos, e criando a expectativa por novos resultados.



Figura X7 – Representando a equipe da BioNS, o Dr. Alexandre Simões Barbosa recebeu, durante o Congresso do Conselho Brasileiro de Oftalmologia, o Prêmio de melhor trabalho na categoria “Pesquisa Básica” das mãos do Prof. Paulo Arruda Mello, da Escola Paulista de Medicina.

4.2. CADEIA DE VALOR

A cadeia de valor na qual a **BioNS** está inserida está representada na Figura X7. A Cadeia está apresentada de forma simplificada e é composta de seis elos que unem as atividades, desde o fornecimento de insumos, equipamentos passando pelos serviços de revenda, medicina diagnóstica e atendimento, intermediação financeira até a chegada ao consumo final, que envolve pacientes e acompanhantes.

No primeiro elo da cadeia está o fornecimento de insumos que dá subsídios para o segundo elo, que é o de fornecimento de equipamentos de diagnóstico por imagem. Dentro deste elo estão fabricantes de equipamentos internacionais e nacionais. Com este último relacionam-se os fornecedores de consumíveis. Os fabricantes fornecem então os equipamentos para os revendedores autorizados, que podem ou não fazer a intermediação no caso dos produtores nacionais. Os revendedores, geralmente, agregam a função de assistência técnica. Ressalta-se, porém, que a venda por meio de revendedores não é uma política frequente empregada pelos fabricantes nacionais, quando há. O próximo elo é o de atendimento, que abrange dois grandes grupos: *Business to Business* (B2B) e *Business to Consumer* (B2C). No caso B2C, fazem parte as unidades de atendimento. No caso B2B, estes atendem por meio de hospitais e clínicas de saúde, empresas de medicina diagnóstica, instituições de pes-

quisa clínica e governo (serviços públicos federais, como serviços de média e alta complexidade do Sistema Único de Saúde - SUS). Fazem parte deste elo as Instituições de Ciência e Tecnologia - ICTs que adquirem tais equipamentos para pesquisa, e laboratórios nacionais ou empresas do governo (ex. Fiocruz). Instituições de pesquisa clínica e governo relacionam-se entre si na produção de conhecimento de pesquisa em medicina diagnóstica, influenciando também os outros atores na geração de conhecimento. O quinto elo representa aqueles que fazem a intermediação financeira, assumindo o risco (como seguro de saúde, por exemplo) de repassar os gastos corridos nos elos anteriores. Neste elo, pode haver o pagamento direto pelo cliente, o pagamento pelo sistema privado, composto por operadoras ou convênios de saúde, ou o pagamento pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O sexto elo é representado pelos clientes que realizam os exames, pelo médico que solicita os exames e pelos acompanhantes dos pacientes, quando necessário.

O financiamento acontece entre o 5º e o 6º elos da cadeia, e é realizado por indivíduos, empresas ou governo (por exemplo, o SUS).

Órgãos reguladores atuam como influenciadores na cadeia de valor, indiretamente, por meio da definição de diretrizes para o mercado.

A **BioNS** se encaixa como fabricante de equipamentos nacionais.

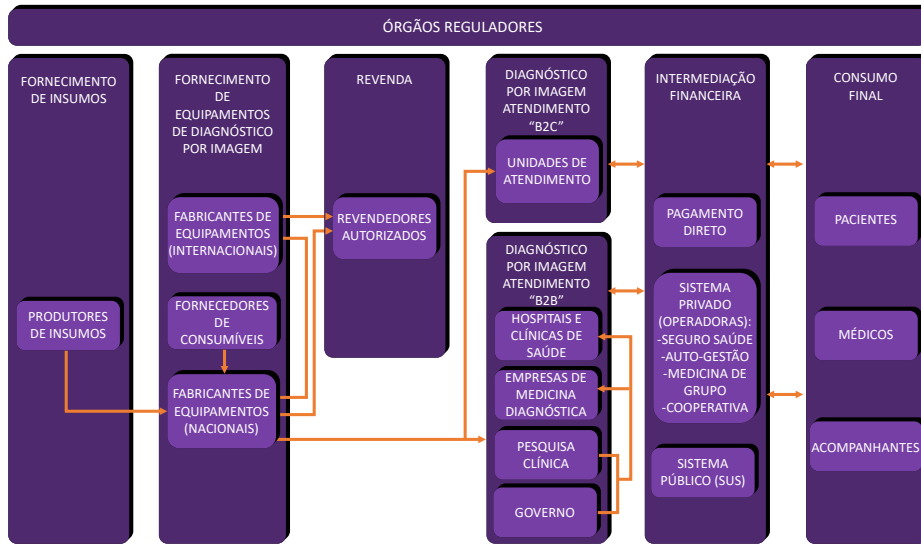


Figura X7 – Cadeia de valor. Fonte: equipe **BioNS**, adaptado de ARNAS (2017).
 Fonte: ARNAS, E.R. Gestão da inovação em medicina diagnóstica: estudo de caso. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, 2017. 161p.

4.3. SEGMENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CLIENTES

Conforme pode ser visto pela cadeia de valor, os clientes da **BioNS** serão unidades de atendimento, hospitais e clínicas de saúde, empresas de medicina diagnóstica, instituições de pesquisa clínica e o governo.

Unidades de atendimento são os consultórios de neurologistas, oftalmologistas com especialidade em retina, e neuro-oftalmologistas que podem adquirir o OVL para operar diretamente em seus pacientes. Cabe aqui destacar que o segmento principal de clientes seria desses profissionais, sendo a demanda principal, pelo volume, de neurologistas (versão OVL-D), e oftalmologistas com especialidade em retina atuando em ICTs (versão OVL-R). Os neuro-oftalmologistas estão na interface, sendo um grupo mais qualificado (cliente qualificado). Este último grupo de clientes será foco de atenção da **BioNS**, uma vez que poderá ser formador de opinião e divulgador da tecnologia para os outros grupos e para a comunidade médica em geral.

Hospitais e clínicas de saúde são unidades de atendimento geral, com profissionais de várias especialidades, como pronto-atendimento, ou hospitais gerais que poderão, eventualmente, adquirir o(s) equipamento(s). Podem

também ser específicos para neurologia, oftalmologia e neuro-oftalmologia, como hospitais de olhos.

Empresas de medicina diagnóstica são estabelecimentos que adquirem diversos equipamentos e fornecem seus serviços a neuro-oftalmologistas (cliente qualificado), neurologistas, e oftalmologistas que não possuem o equipamento. Exemplos: Grupo Fleury, Hermes Pardini, São Marcos etc.

Instituições de pesquisa clínica são universidades ou institutos de pesquisa, ou mesmo unidades de P&D de empresas nacionais ou internacionais.

O Governo é principalmente representado pelo Sistema Único de Saúde e unidades básicas de saúde desse sistema.

4.4. CONCORRENTES

Os concorrentes da **BioNS** são empresas relativamente recentes (em operação há menos de uma década) que desenvolvem equipamentos para imageamento e análise da retina, por diferentes técnicas.



A Optina Diagnostics (<http://optinadx.com>) é uma startup canadense em operação desde 2012. Sediada em Montreal, a empresa é especializada no desenvolvimento de tecnologia para detecção precoce, não invasiva, de doenças via “Retinal Deep Phenotyping”, com foco primário no diagnóstico do mal de Alzheimer. O teste diagnóstico da empresa envolve um escaneamento da retina usando equipamento e técnica similares à fotografia de fundo de olho que já são usados por especialistas para diagnosticar doenças da retina.

Em maio de 2019, a Optina Diagnostics ganhou a “Breakthrough Device Designation” da Agência Reguladora Norte-americana (FDA) por seu teste na detecção do status amiloide (positivo ou negativo).

A tecnologia está descrita no documento de patente WO2016041062A1, primeiramente depositado no USPTO (data de prioridade 19 set 2014) e no artigo, de 2019, “Non-invasive in vivo hyperspectral imaging of the retina for potential biomarker use in Alzheimer’s disease”¹⁵.

15. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12242-1>

Trata-se de imagem hiperespectral baseada em absorvância e refletância, utilizando fontes de laser de diferentes comprimentos de onda, e software de tratamento de dados de grande volume.

O equipamento desenvolvido pela Optina se propõe a identificar placas amiloides, entretanto, a sensibilidade e especificidade para detecção de agregação beta-amiloide é inferior ao Raman. Placas amiloides em formação ou mesmo agregações incipientes podem ser identificadas pelo Raman e não pela tecnologia de refletância com diferentes comprimentos de onda, usada pela Optina.

Em consulta à empresa em novembro de 2019, constatou-se que o equipamento não está à venda, portanto não foi possível obter uma cotação.



A empresa australiana Enlighten Imaging PTY (enlightenimaging.com) é uma startup criada a partir do Centre for Eye Research Australia (CERA) em 2018. Esta empresa alega ser o primeiro grupo no mundo a fornecer evidência clínica de que a retina pode ser usada de forma não invasiva para detectar sinais da doença de Alzheimer, e tem como missão levar a câmera que realiza o imageamento da retina para detectar a doença para a clínica e facilitar os testes clínicos.

O CERA é um centro de pesquisa privado em doenças oftalmológicas, em associação com o Departamento de Oftalmologia da Universidade de Melbourne, e localizado conjuntamente a este departamento no Royal Victorian Eye and Ear Hospital. A parceria entre essas três instituições é chave para levar a pesquisa do CERA ao mercado.

Apesar de a tecnologia da Enlighten Imaging parecer ser relativamente simples e barata, uma análise da principal patente que a descreve (PCT/AU2019/000003) revela que ela tem limitações por não diferenciar outras anomalias da retina que podem estar presentes em diferentes grupos de pacientes. A Enlighten utiliza a mesma tecnologia da Optina, descrita anteriormente. Tanto que colaboradores da Optima e da Enlighten Imaging são coautores da tecnologia.



A NeuroVision Imaging é uma empresa norte-americana em operação desde 2010, em Sacramento (CA). Formada por um time composto por um neurocirurgião do Cedars-Sinai Medical Center e outros profissionais técnicos e de gestão, a empresa havia anunciado um produto em meados de 2015, assim que a principal publicação do grupo foi divulgada, “Retinal amyloid pathology and proof-of-concept imaging trial in Alzheimer’s disease”¹⁶.

A empresa possui patente concedida referente à tecnologia (US9730580B2). Entretanto, a técnica de detecção baseia-se em fluorescência e valendo-se do uso de marcador biológico (curcumina). Essa metodologia se baseia na superfície de impregnação do beta-amiloide pela curcumina, o que depende da estrutura da agregação do beta amoloide e biodisponibilidade da curcumina. Os núcleos das placas, compostas por beta amiloide compacto, não estão disponíveis à impregnação pela curcumina. A concentração da curcumina no tecido depende do atravessamento da barreira hemato-encefálica. Ainda que a curcumina fosse capaz de identificar o beta amiloide,

16. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93621>

ela não identifica a morfologia da placa amiloide, o que é fundamental no estudo da neurodegeneração, um dos braços fundamentais do que pode ser produzido com a metodologia baseada no espectro Raman.

Em maio de 2018, a empresa anunciou que recebeu um financiamento de US\$ 15 milhões para a fase C dos testes clínicos, apoiada pela Johnson & Johnson¹⁷. Posteriormente, a empresa retirou a propaganda online do produto, possivelmente por estar em fase de desenvolvimento. Desde 2017 a empresa tem autorização para testes pré-clínicos e clínicos¹⁸.

Como referência de preços praticados no mercado, equipamentos de tomografia de coerência óptica (OCT) de empresa de referência (Heidelberg), altamente conceituada pelos profissionais de oftalmologia, são vendidos no Brasil por preços que variam de R\$ 590 mil (versão simples) até R\$ 1,6 milhões, na versão com todos os acessórios e módulos¹⁹.

17. Fonte: <https://www.biospace.com/article/releases/neurovision-imaging-release-clinical-study-shows-that-retinal-imaging-may-detect-signs-of-alzheimer-s-disease/>

18. As empresas Enlighten Vision e NeuroVision também foram consultadas por e-mail para obtenção de cotação, em novembro de 2019. Não houve resposta até a finalização deste documento.

19. Cotação junto à Medvision, representante da marca Heidelberg, em

4.5. POTENCIAIS PARECEIROS TECNOLÓGICOS

Com o objetivo de desenvolver novas tecnologias, produtos e competências, e fortalecer o seu principal produto no mercado, a **BioNS** contará com algumas parcerias. As parcerias apresentadas a seguir foram acordadas, embora ainda não tenham sido oficializadas.



O LabNS é um laboratório localizado no Instituto de Ciências Exatas da UFMG, criado em 2006 no Departamento de Física da instituição, com foco de atuação em espectroscopia óptica e instrumentação científica. Seus coordenadores produziram quatro livros na área, têm mais de uma dezena de pedidos de patente depositados junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, três tecnologias depositadas nos escritórios de patente americano (USPTO), e duas no europeu (EPO) e no chinês (SIPO), duas cartas patentes concedidas pelo USPTO, e centenas de artigos científicos, com dezenas de milhares de citações em todo o mundo.

julho/2019.

Nos últimos 12 anos, o laboratório captou aproximadamente R\$ 18 milhões em investimentos de agências de fomento nacionais (CNPq, FINEP, Capes, FAPEMIG), internacionais (US Army, AFORS), e do setor empresarial Codemge, Invent Vision, IBM, Embrapii, entre outros.

O grupo de pesquisadores que compõe o LabNS estabeleceu-se internacionalmente através da aplicação da espectroscopia óptica no estudo e caracterização de nanoestruturas de carbono e materiais de baixa dimensionalidade, possuindo colaborações estabelecidas em diversos países como Estados Unidos da América (Massachusetts Institute of Technology – MIT), Inglaterra (Universidade de Cambridge), Alemanha (Freie Universitat Berlin) e Suíça (ETH Zurique). Dentre os parceiros do laboratório destacam-se: Inmetro, Invent Vision, IBM Research do Brasil, Clínica Alexandre Barbosa, com os quais existem acordos de cooperação científica.

Em 2013, foi criado, a partir do LabNS, o Laboratório Associado ao Inmetro para Inovação em Instrumentação Científica – LA3IC: o primeiro laboratório associado ao Inmetro nos moldes de Laboratórios Associados ao Inmetro para Inovação e Competitividade – LAIIC. O LAIIC é uma unidade funcional de instituições públicas ou privadas, que se destaca pela excelência, convidada a se associar ao Inmetro, compartilhando suas infraestruturas laboratorial e funcional, com o objetivo de ajudar as empresas brasileiras a inovar e resolver problemas que estão

além da sua capacidade estrutural e profissional. O foco de atuação do laboratório é instrumentação científica para espectroscopia óptica.

Uma vez que a **BioNS** é uma spin-off do LabNS, origem de toda a tecnologia utilizada no OVL, a parceria entre as duas instituições é natural e extremamente relevante. Todo o processo de desenvolvimento e aprimoramento do OVL será realizado em conjunto pelas partes. Tal parceria será caracterizada pelo compartilhamento de know-how, infraestrutura e licenciamento de tecnologia.



A FabNS é uma spin-off da UFMG, a partir do LabNS, em processo de criação, e será uma empresa brasileira de referência nacional na produção de instrumentação científica de alta tecnologia, com produtos direcionados à caracterização de materiais em escala nanométrica. A empresa atuará de forma a colaborar com o desenvolvimento da nanotecnologia no Brasil, inicialmente por meio da produção e comercialização de um equipamento para

espectroscopia Raman aumentada por sonda (TERS, da sigla em inglês para tip-enhanced Raman spectroscopy). A FabNS atuará principalmente no mercado acadêmico, que apresenta grande potencial para compra do equipamento, por estar intimamente conectado ao desenvolvimento científico em nanotecnologia. Na cadeia de valor, a FabNS se posiciona como empresa produtora de instrumentação científica, tendo como principais clientes as universidades e institutos públicos de pesquisa. Tendo sido gerada também a partir do LabNS, há uma sinergia entre as iniciativas. Muitos de seus consultores e colaboradores atuarão em parceria com a **BioNS**, tanto para atividades constantes de P&D&I quanto para intercâmbio de colaboradores, e atividades de qualificação e educação continuada.



O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro - é uma autarquia federal, vinculada à Secretaria Especial de Produtividade, Emprego e Competitividade, do Ministério da Economia. O Instituto atua como Secretaria Executiva do Conselho Nacional de Me-

trologia, Normalização e Qualidade Industrial (Conmetro), colegiado interministerial, que é o órgão normativo do Sistema Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Sinmetro).

No âmbito de sua ampla missão institucional, o Inmetro objetiva fortalecer as empresas nacionais, aumentando sua produtividade por meio da adoção de mecanismos destinados à melhoria da qualidade e da segurança de produtos e serviços. Sua missão é: a medida certa para promover confiança à sociedade e competitividade ao setor produtivo.

Com a criação da Rede de Laboratórios Associados ao Inmetro para Inovação e Competitividade, a Rede LAIC, em 2013, o Inmetro estabeleceu uma cooperação entre laboratórios de pesquisa e laboratórios do Inmetro, destacando-se os seguintes objetivos: estimular o desenvolvimento de projetos cooperativos de PD&I entre laboratórios e empresas, apoiar o compartilhamento de custos, ampliar as atividades de PD&I em temas de interesse estratégico para o país, aumentar a produtividade e competitividade da indústria nacional e reduzir a defasagem entre a produção científica e tecnológica no país²⁰. Estes objetivos estão inteiramente alinhados aos objetivos da

20. Portaria Inmetro nº 26, de 17 de janeiro de 2014 (Portaria de criação da Rede LAIC) e Portaria Inmetro nº 425, de 5 de setembro de 2018 (Portaria de ampliação da Rede LAIC).

BioNS, tornando o órgão um parceiro potencial. De fato, o LabNS, que está na gênese da **BioNS** é um laboratório associado (o LA3IC) da Rede LAIC desde 2013, inclusive com projeto piloto.

Somado a isso, é necessário desenvolver no país materiais de referência e métodos de análise bioquímica com aplicações em medicina. Nesse sentido, a **BioNS** poderia contribuir com este desenvolvimento, tanto por meio do OVL quanto em outras questões afins. O Inmetro tem importante papel no estabelecimento de parâmetros de qualidade de novas tecnologias, e essa parceria produzirá os ajustes necessários ao produto, visando sua incorporação à pesquisa clínica e prática médica.



A Invent Vision atua no mercado de fabricação de câmeras industriais inteligentes, e é a única fabricante brasileira nesse ramo. A empresa desenvolve, comercializa e implanta tecnologia de ponta para aplicações industriais de monitoramento, inspeção e controle de qualidade, atuando em todas as fases de um projeto, da consultoria inicial à implantação e assistência técnica. A Invent

Vision iniciou o desenvolvimento de sua tecnologia em 2001, tornando-se empresa incubada na INOVA-UFMG em meados de 2003. Atualmente sua sede é localizada no BHTEC, parque tecnológico de Belo Horizonte.

O conhecimento e competência na fabricação de câmeras inteligentes fazem da Invent Vision uma parceira estratégica no processo de desenvolvimento do equipamento para espectroscopia intraocular, principalmente no que concerne às câmeras necessárias ao equipamento. Câmeras de alta sensibilidade e alta resolução são fundamentais na obtenção de espectros representativos e de boa qualidade, críticos para a eficácia da tecnologia da **BioNS**.



Neuroftalmica

A Neuroftalmica – Clínica Alexandre Barbosa foi aberta em 2015 e está localizada na área hospitalar de Belo Horizonte, junto à Faculdade de Medicina da UFMG. A Neuroftalmica constitui uma clínica privada para atendimento especializado de oftalmologia, com forte ênfase nas áreas de neuro-oftalmologia e retina, consultoria em

pesquisa e inovação tecnológica. Empresa consolidada no mercado, a Neuroftalmica possui cerca de 8 mil pacientes cadastrados, cerca de metade deles compondo as cartas de neuro-oftalmologia e retina. Apresenta infraestrutura para propedêutica de oftalmologia geral, neuro-oftalmologia e retina, como autorefração digital, teste de visão cromática, teste de sensibilidade ao contraste, teste de fusão/binocularidade, biomicroscopia de segmentos anterior e posterior, oftalmoscopia indireta, topografia corneana, análise de frente de onda (wavefront), medidas da qualidade da imagem retiniana (point spread function), campo visual e retinografia a cores. Apresenta ainda em sua infraestrutura recursos para incorporação de equipamentos de diagnóstico e tratamento desenvolvidos no **LabNS/BioNS/Invent Vision**. A Neuroftalmica tem como diretor clínico e responsável técnico o Dr. Alexandre Simões Barbosa, membro do **LabNS/BioNS**, doutorado em Oftalmologia/UFMG e pós-doutorado em Física/UFMG (2016). Os atendimentos na Neuroftalmica são realizados durante 30 horas semanais e os pacientes são examinados exclusivamente pelo Dr. Alexandre. Tal parceria é fundamental por possibilitar um local para a utilização da nova tecnologia e de produção de conhecimento clínico fundamental para a sua incorporação na prática médica.

4.6. PROGRAMAS DE APOIO A P, D & I



Fundado em 1952, o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) é um dos maiores bancos de desenvolvimento do mundo e, hoje, o principal instrumento do Governo Federal para o financiamento de longo prazo e investimento em todos os segmentos da economia brasileira. Por ser uma empresa pública e não um banco comercial, o BNDES avalia a concessão do apoio com foco no impacto socioambiental e econômico no Brasil. Incentivar a inovação, o desenvolvimento regional e o desenvolvimento socioambiental são prioridades para a instituição. O apoio do BNDES ocorre por meio de financiamento a investimentos, subscrição de valores mobiliários, prestação de garantia e concessão de recursos não reembolsáveis a projetos de caráter social, cultural e tecnológico.



A EMBRAPII (Associação Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial) é uma Organização Social qualificada pelo Poder Público Federal que, desde 2013, apoia instituições de pesquisa tecnológica fomentando a inovação na indústria brasileira. Ela tem por missão apoiar instituições de pesquisa tecnológica, em selecionadas áreas de competência, para que executem projetos de desenvolvimento de pesquisa tecnológica para inovação, em cooperação com empresas do setor industrial. Ela atua por meio da cooperação com instituições de pesquisa científica e tecnológica, públicas ou privadas, tendo como foco as demandas empresariais e como alvo o compartilhamento de risco na fase pré-competitiva da inovação. Ao compartilhar riscos de projetos com as empresas, tem objetivo de estimular o setor industrial a inovar mais e com maior intensidade tecnológica para, assim, potencializar a força competitiva das empresas, tanto no mercado interno como no mercado internacional.

O LabNS já tem, em seu portfólio, a execução de um projeto envolvendo duas unidades Embrapii (Embrapii-Se-

nai-Cimatec e Embrapii-DCC) para o desenvolvimento de um protótipo comercial para um nanoscópio, ou seja, um microscópio para análise e manipulação em escala nano, baseado na técnica TERS (do inglês, tip-enhanced Raman spectroscopy, ou espectroscopia Raman auxiliada por sonda). Este projeto tem o financiamento da Companhia de Desenvolvimento de Minas Gerais (Codemge). Portanto, para a proposta da **BioNS** e havendo interesse do órgão financiador, esta seria uma possibilidade de contratação para a execução das etapas de comercialização do Oftalmoscópio de Varredura a Laser.



A Financiadora de Estudos e Projetos é uma empresa pública que tem como missão promover o desenvolvimento econômico e social do Brasil por meio do fomento público à Ciência, Tecnologia e Inovação em empresas, universidades, institutos tecnológicos e outras instituições públicas ou privadas. Ela atua em toda a cadeia da inovação, com foco em ações estratégicas, estruturantes e de impacto para o desenvolvimento sustentável do Brasil.

Alguns produtos do Portfolio de financiamento da Finep se aplicam à **BioNS**:

FinepStartup: tem por objetivo apoiar a inovação em empresas nascentes intensivas em conhecimento, cobrindo o gap de apoio e financiamento existente entre aportes feitos por programas de aceleração, investidores-anjo e ferramentas de financiamento coletivo (crowdfunding) e aportes feitos por fundos de Seed Money e Venture Capital.

Tecnova: recursos de subvenção econômica à inovação são repassados às empresas pelos parceiros estaduais, que contam com apoio da Finep para realizar todas as atividades operacionais inerentes ao processo, incluindo fomento, análise e seleção das propostas, contratação, liberação dos recursos, acompanhamento físico e financeiro com a prestação de contas, assegurando o foco nos projetos de inovação e desenvolvimento tecnológico. O desenvolvimento da nova metodologia faz a convergência de inovação e ação estratégica, estruturantes e de impacto para a pesquisa em nosso país.



O Parque Tecnológico de Belo Horizonte (BH-TEC) abriga empresas que se dedicam a investigar e produzir novas tecnologias e centros públicos e privados de P&D. É um ambiente para atrair pessoas de espírito empreendedor, talento qualificado, negócios e investimentos intensivos em conhecimento. A interação com esses atores acontece por meio de estratégias e mecanismos inovadores em prestação de serviços em gestão, networking, acesso a financiamento, suporte legal, e outros. Isso é possível graças à parceria entre seus cinco sócio-fundadores: UFMG, Governo do Estado de MG, Prefeitura de Belo Horizonte, Sebrae-MG e Fiemg. A atuação sinérgica entre essas instituições no BH-TEC contribui para o desenvolvimento científico, tecnológico, econômico e social; para a estruturação de um ambiente capaz de potencializar atividades de pesquisa científica e tecnológica; e para a introdução de inovações e a transferência de tecnologia; consolidação de empreendimentos de classe mundial no desenvolvimento de novas tecnologias, produtos e pro-

cessos. As empresas que fazem parte do BH-TEC, sejam residentes ou não, recebem apoio no desenvolvimento dos negócios pautados na inovação de produtos e serviços.



A Fundepar é uma Gestora de Fundos de Investimento especializada no desenvolvimento de negócios inovadores de alto impacto. Apoia empresas emergentes por meio do aporte de capital empreendedor e do suporte à gestão, com ênfase na transformação de tecnologias em produtos e serviços de alto valor agregado.

Seu principal produto é o fundo Seed4Science direcionado a empresas nascentes, intensivas em tecnologia, inovadoras e com alto potencial de crescimento. O Fundo se torna sócio da empresa investida, apoiando sua estruturação e crescimento por meio da Fundepar. Após alguns anos, sua participação na empresa investida é vendida a outras empresas ou aos próprios empreendedores, retornando o capital para os investidores. A **BioNS** se encaixa no perfil prioritário de empresas para investimento, uma vez que pertence ao ramo “saúde e bem estar”. Outros perfis prioritários são: agronegócio, indústria e varejo.



Criado em 2018, o BiotechTown é um hub de inovação em biotecnologia e ciências da vida construído por meio do investimento da Fundep e da Codemge, com os propósitos de desenvolver produtos e negócios em biotecnologia e ciências da vida, fortalecer este ecossistema por meio da inovação e gerar soluções que impactam a sociedade, promovendo maior qualidade de vida.

O BiotechTown entende que mercados ancorados nas áreas de Biotecnologia e Ciências da Vida têm características específicas e precisam de apoio especializado para seu desenvolvimento. Sua principal proposta de valor está fundamentada no conhecimento profundo do segmento: o BiotechTown promove conexões de empresas com potenciais clientes, investidores e especialistas que são capazes de gerar negócios de impacto e soluções inovadoras para o mercado.

O BiotechTown está concluindo, em 2019, uma estrutura de CMO (Contract Manufacturing Organization), de 495m² de área certificada, que oferecerá estrutura de pro-

dução para empresas que necessitam de apoio e área licenciada e certificada no desenvolvimento de lotes-piloto e lotes comerciais, minimizando custos e permitindo maior agilidade para levar produtos ao mercado. O CMO foi projetado para produção de alta performance, oferecendo serviços de forma exclusiva e customizada, com padrões estabelecidos de segurança da informação e de propriedade intelectual.

OCMO contará com infraestrutura de prestação de serviços e processo produtivo, direcionada a empresas de todos os portes, voltado a produtos para saúde, assim definidos pela Anvisa: equipamento, aparelho, material, artigo, sistema de uso, aplicação médica, odontológica ou laboratorial, destinado a prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação ou anticoncepção e que não utiliza meio farmacológico, imunológico ou metabólico para realizar sua principal função em seres humanos, podendo, entretanto, ser auxiliado em suas funções por tais meios. Com linha de produção completa operada pela equipe do BiotechTown e locada sob demanda, o CMO respeitará os critérios de confidencialidade, boas práticas e gestão da qualidade.

Um contrato com o CMO seria uma alternativa para que a **BioNS** possa produzir seus primeiros lotes do equipamento e comece a faturar, enquanto solicita seu próprio licenciamento junto à Anvisa.

4.7. ENCOMENDA TECNOLÓGICA

Cabe aqui uma nota sobre essa modalidade de compra governamental. A encomenda tecnológica (ETEC)²¹ é um instrumento criado em 2004 e recentemente aprimorado pelo Decreto que regulamentou o Marco Legal de Ciência, Tecnologia e Inovação²². A ETEC dá tratamento adequado ao risco tecnológico inerente aos investimentos em ciência e tecnologia. Ela permite que a administração pública adquira o esforço de desenvolvimento de soluções que ainda não existem, que os fornecedores sejam remunerados por meio de contratos de reembolso e custos, dentre outros. Se não há solução disponível no mercado, a administração pública federal pode comprar o esforço exato e necessário para atingir um entregável claro e preciso, mesmo que ele nunca tenha sido feito.

21. RAUEN, A. T.; BARBOSA, C. M. M. Encomendas tecnológicas no Brasil: guia geral de boas práticas. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - Ipea, 2019.

22. Art. 20 da Lei 10.973 de 2004 (Lei da Inovação), Marco Legal de Ciência, Tecnologia e Inovação (Lei nº 13.243, de 11 de janeiro de 2016) e Decreto nº 9.283, de 7 de fevereiro de 2018 (seção V).

A encomenda tecnológica emprega o esforço tecnológico em prol de uma demanda clara e real da sociedade, pois é um instrumento que “empurra” o conhecimento científico e tecnológico na direção exata das demandas dos contribuintes. Portanto, por tratar-se de uma solução com apelo social, a plataforma da **BioNS** poderia desenvolver soluções valendo-se desse processo de encomenda tecnológica pelo governo.

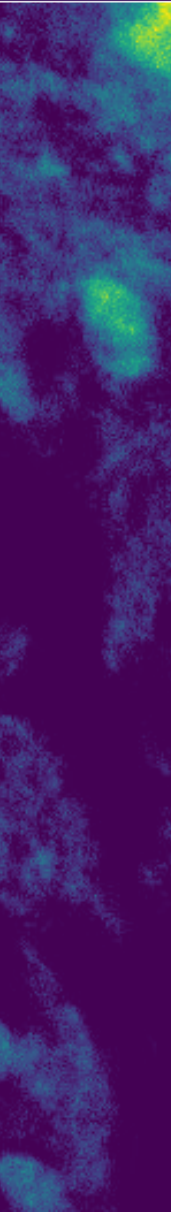


Imagem de espectroscopia Raman onde é possível identificar placa amiloide (vermelho) e região de neurodegeneração (verde/amarelo) ao redor da placa em hipocampo de camundongo (*ex vivo*).

Fonte: equipe BioNS.



20 μ m

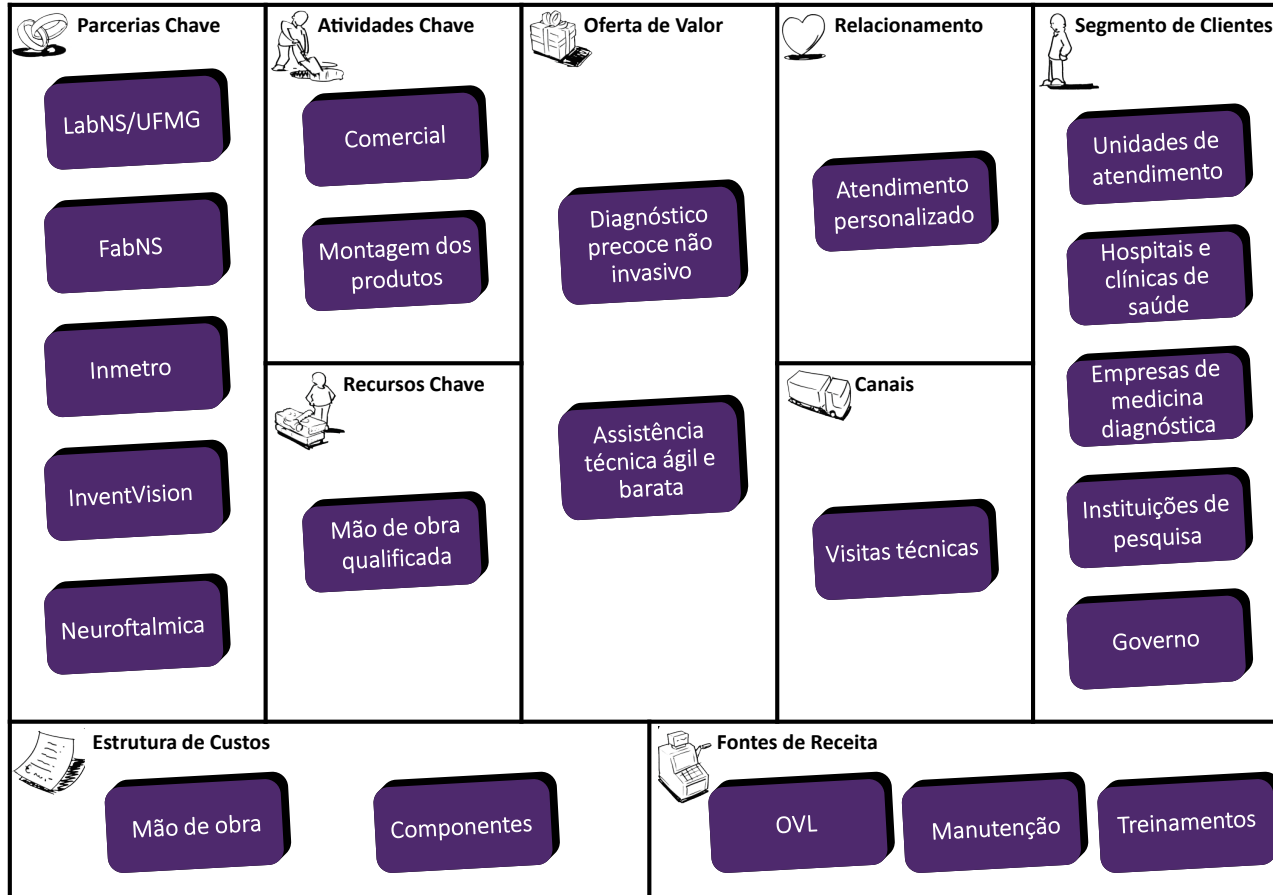


Figura X8 – Modelo de Negócios.

Fonte: equipe BioNS.

5. ANÁLISE DO NEGÓCIO

A **BioNS** se relacionará com seus clientes por meio da comercialização dos equipamentos OVL pesquisa e diagnóstico, e serviços relacionados a eles (manutenção e treinamento) além de educação continuada para a interpretação de resultados e relevância clínica. Estes produtos e serviços serão ofertados a ICTs (universidades, centros de pesquisa, laboratórios de pesquisa), clínicas de diagnóstico, e serviços ambulatoriais e hospitalares de neurologia, oftalmologia e neuro-oftalmologia, e profissionais dessas áreas.

5.1. MODELO DE NEGÓCIOS

A Figura X8 apresenta o modelo de negócios da **BioNS**, explicitando como a organização irá criar, entregar e capturar valor.

5.2. MATRIZ SWOT

A Figura X9 apresenta a análise SWOT do empreendimento, fundamentada no exame dos ambientes interno e externo da empresa para auxiliar na definição do posicionamento estratégico da organização.

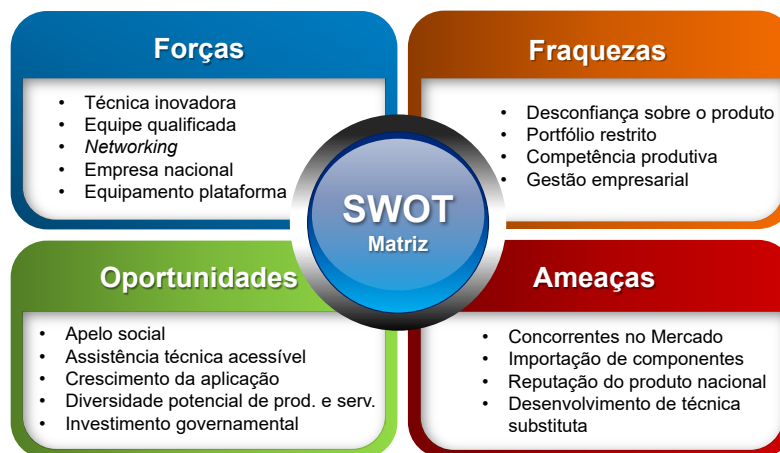


Figura X9 – Matriz SWOT – **BioNS**. Fonte: equipe **BioNS**²³.

23. Slidemodel.com. Data de acesso: 11 nov. 2019.

FORÇAS

Técnica inovadora

A aplicação da espectroscopia Raman ainda está se desenvolvendo a partir das demandas específicas. E isso tem ocorrido de forma intensa para aplicações biológicas, que estão ainda majoritariamente inexploradas. No momento, não há produtos desenvolvidos para o diagnóstico precoce do beta amiloide que utilize tecnologia semelhante à da **BioNS**. A tecnologia da **BioNS** representa a possibilidade de um diagnóstico precoce não invasivo de alta sensibilidade para DA.

Equipe qualificada e renomada

A equipe multidisciplinar de empreendedores conta com profissionais altamente qualificados e reconhecidos pela sua atuação no campo da espectroscopia, tendo autoria em pedidos de patentes, capítulos de livros e artigos científicos. A equipe da **BioNS** e seus parceiros têm qualificação para executar todas as fases do processo, desde o desenvolvimento tecnológico até o acompanhamento de sua incorporação no mercado e formação continuada.

Networking

Os empreendedores mantêm grande rede de contatos em universidades e centros de pesquisa, bem como em hospitais e clínicas oftalmológicas e neurológicas e pesquisadores dessa área. A **BioNS** se constitui em um hub para a investigação de doenças neurodegenerativas por meio da espectroscopia Raman e suas técnicas.

Empresa nacional

O fato de a empresa ser nacional facilita a oferta de serviços de manutenção e assistência técnica por um preço menor e com maior agilidade para os clientes nacionais. Além de uma interface maior de interlocução com os usuários. Tal interlocução constitui uma lacuna no mercado de alta tecnologia e justifica a insegurança na aquisição de equipamentos. Ademais, isso pode contribuir também para a criação de massa crítica de usuários que auxiliarão no desenvolvimento contínuo dos produtos da **BioNS**.

Equipamento plataforma

O foco inicial da empresa é o produto para a realização de espectroscopia intraocular para detecção precoce de marcador biológico para doença de Alzheimer, com possibilidade de adaptação para detecção de marcadores de outras doenças, tanto neurológicas quanto retinianas.

Neste desenvolvimento, várias outras regiões oculares podem ser potencialmente estudadas e outras soluções em novos dispositivos são possíveis. De fato, o produto completo contempla outros módulos ópticos para realização de técnicas complementares e foco em outras estruturas oculares.

FRAQUEZAS

Desconfiança sobre o produto

O fato de a solução técnica estar na fronteira do conhecimento – dado o recente esforço de novas empresas na solução do mesmo problema – e de a empresa ser uma spin-off nacional podem gerar desconfiança nos possíveis clientes a respeito da qualidade do produto, uma vez que o Brasil não tem tradição em desenvolvimento de instrumentação biomédica de alta tecnologia.

Portfólio restrito de produtos e serviços

Em princípio, a **BioNS** iniciará suas atividades com dois produtos em seu portfólio. Isso pode gerar vulnerabilidade às mudanças do mercado, apesar de a presença de uma das versões poder gerar demanda para a outra versão.

Competência produtiva

Neste momento, ainda não há clareza sobre os processos e a infraestrutura para a produção das duas versões de equipamento. Mesmo porque não se sabe se as duas modalidades serão lançadas simultaneamente.

Gestão empresarial

Apesar de contar com profissionais de perfil empreendedor, a equipe é pouco experiente em criação de novos negócios. Um professor está em processo de criação da primeira spin-off, já tendo coordenado projetos de desenvolvimento de produto. Outro membro é dono de clínica de neuro-oftalmologia. A equipe tem a percepção de que se faz necessário agregar competências de gestão à empresa.

OPORTUNIDADES

Apelo social

A tecnologia de equipamento biomédico a ser comercializada tem forte apelo social dado o envelhecimento da população e a necessidade de se entender cada vez mais os problemas de saúde relacionados à idade. Constatou-se uma prevalência crescente da DA numa população em franco processo de envelhecimento, que produz quadro de demência incapacitante. O diagnóstico precoce, os ensaios clínicos em fase anterior às manifestações da neurodegeneração possibilitarão testar intervenções para limitar a progressão. O diagnóstico precoce não invasivo permitirá intervenções precoces por meio da validação de ensaios clínicos e mudança na progressão da neurodegeneração. Desde 2014 têm sido reconhecidos marcadores com potencial para o diagnóstico de certeza da DA. A partir de então, uma intensa busca por marcadores precoces da DA tem sido realizada.

Assistência técnica acessível

Os produtos hoje disponíveis no mercado, similares em complexidade tecnológica e área de aplicação, são todos de empresas estrangeiras. Com isso, a assistência técnica é custosa financeiramente, com efeitos negativos

no progresso de muitas pesquisas científicas que demandem desse tipo de equipamento. Uma empresa nacional como a **BioNS** oferecerá uma solução mais barata e ágil de assistência técnica de seus produtos.

Crescimento da aplicação

Por tratar-se de tecnologia de fronteira, com aplicações ainda não exploradas – por exemplo, análise de outras estruturas oculares – a demanda tende a ser crescente. Projeções indicam um grande crescimento das demandas relativas ao tratamento da DA no Brasil e no mundo. Nas próximas décadas uma parte significativa do PIB deverá ser destinada à cuidados da população mais idosa, sobretudo aqueles com demência por Alzheimer. Além disso, dados obtidos pelo grupo da **BioNS** fornecem mais informações sobre a formação da placa que outras opções disponíveis no mercado. A tecnologia da **BioNS** é eficaz não só na caracterização do núcleo central de agregação beta-amiloide, mas também das formações periféricas da placa, que exibem padrões que permitem a identificação dos principais eventos na fisiopatologia da neurodegeneração, como a ativação inflamatória e a degradação da parede celular e bainha de mielina.

Diversidade potencial de produtos e serviços

Essa oportunidade se relaciona à expansão do portfólio de produtos a partir da comercialização de outras versões customizadas do equipamento, e variações do equipamento utilizando as várias técnicas ópticas possíveis. Na medida em que consolidarmos as assinaturas vibracionais no espectro Raman para o beta amiloide e demais substância alvo específicas, serão desenvolvidos softwares específicos para situações clínicas distintas. Embora a finalidade da metodologia seja a DA por meio da identificação do beta amiloide na retina, tanto a substância que constitui o objeto da investigação quanto o tecido a ser pesquisado podem ser outros. Por exemplo, a espectroscopia Raman pode ser usada para a identificação de marcadores naturais de isquemia retiniano. Ou, de forma mais ampla, o núcleo da tecnologia pode ser expandido para diversos outros diagnósticos não relacionados ao sistema de visão, como diagnóstico e estadiamento de lesões de pele e identificação de margens de segurança na ressecção de tumores em outras partes do corpo, inclusive como método auxiliar em cirurgias de extração de tumores.

Investimento governamental em saúde

Apesar de considerado abaixo do ideal, e mediano em relação ao resto do mundo²⁴, o investimento em saúde no Brasil apresenta tendência de crescimento, pressionado pelo envelhecimento da população. A pandemia do Covid 19 veio reforçar a necessidade de um sistema de saúde robusto para a estabilidade do país.

AMEAÇAS

Concorrentes no mercado

Estão surgindo, no mercado mundial, start-ups de alta tecnologia que exploram esse novo campo da espectroscopia intraocular. A velocidade das pesquisas nessa área é grande e a **BioNS** precisa ser ágil para lançar seu produto.

Importação de componentes

Diversos dos componentes ópticos do OVL e, possivelmente, dos outros futuros produtos da **BioNS** são fornecidos por empresas internacionais. Fornecedores alternativos são mapeados constantemente pela equipe, para se realizar um monitoramento visando blindar as fragilida-

24. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2018-11/brasil-gasta-38-do-pib-em-saude-publica>. Data de acesso: 25 out 2019.

des da cadeia de fornecimento. Considerando a **BioNS** um hub, pode haver, por outro lado, um estímulo à produção nacional de tais componentes, seja internamente, seja por meio de uma rede de fornecedores.

Reputação do produto nacional

Como não há tradição de produção nacional de equipamentos biomédicos de alta tecnologia, com raras exceções, há ainda desconfiança sobre a qualidade e o desempenho de produtos nacionais dessa complexidade. Por outro lado, produtos como o que estamos desenvolvendo, sem outros externos similares no mercado, tendem a aumentar a confiança da população quanto ao produto nacional.

Desenvolvimento de técnica substituta

A espectroscopia intraocular também pode ser realizada pela detecção de vários tipos de sinais ou interações da luz com o tecido biológico. As pesquisas nesse campo estão progredindo significativamente na atualidade.

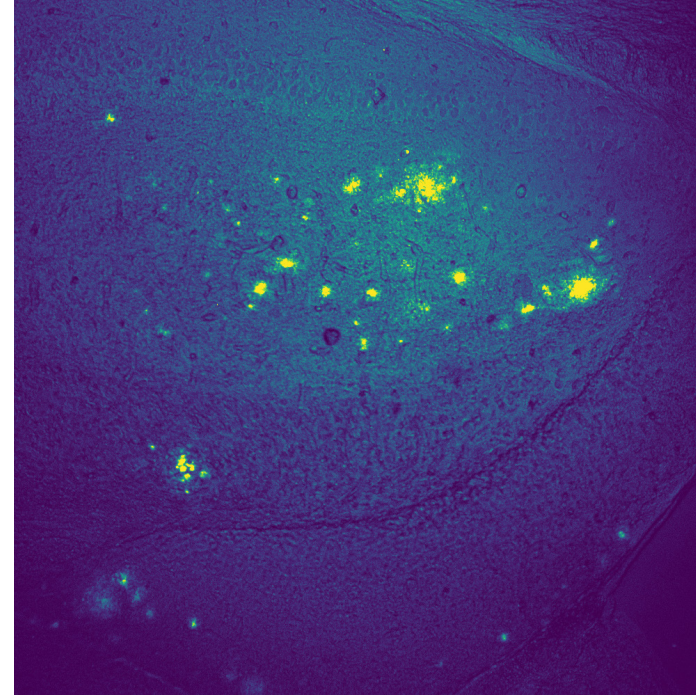


Imagem por espectroscopia Raman de placas de amiloides distribuídas em hipocampo de camundongo transgênico para Alzheimer.

Fonte: equipe **BioNS**.

6. PLANO DE OPERACIONALIZAÇÃO

A operação plena do empreendimento terá início após a implantação completa de sua infraestrutura e alocação da equipe. Além das atividades apresentadas na Figura X10, outras serão realizadas continuamente e são fundamentais para a operacionalização da **BioNS**. Dentre elas, destacam-se:

- Vendas e prospecção de clientes: ocorrerão por meio da participação e exposição da empresa em eventos de neuro-oftalmologia, oftalmologia e neurologia e visitas técnicas a clínicas e laboratórios de análises para demonstração do(s) produto(s) e suas funcionalidades.
- Gestão de parcerias e prospecção de novas: as parcerias podem ocorrer com outras empresas ou órgãos públicos e teriam como objetivos a introdução da empresa em novos mercados, acesso a novas tecnologias e desenvolvimento de tecnologia em conjunto.
- Atividades administrativas e gerenciais: gestão de compras, pagamento a fornecedores e funcionários, controle de recursos financeiros, organização de documentos, emissão de notas fiscais, entre outros.
- Captação de recursos: submissão de projetos da empresa a editais de órgãos públicos destinados a pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias ou assuntos relacionados.

Figura X10 – Plano de operacionalização da **BioNS**.

Fonte: equipe **BioNS**

