

PROPRIEDADES ÓPTICAS DA PELE DE CAMUNDONGOS (630-905 nm): INFLUÊNCIA DA IDADE E MASSA CORPÓREA

C. P. Sabino*, A. M. Deana**, D. F. T. Silva**, C. M. França**, T. M. Yoshimura*, M. S. Ribeiro*

* Laboratório de Terapia Óptica, Centro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brasil

** Programa de Pós Graduação em Biofotônica, Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil

e-mail: caetano.sabino@usp.br

Resumo: A radiação eletromagnética visível e infravermelho próximo tem sido amplamente empregada na óptica biomédica. A pele é a barreira óptica mais comum para grande parte das técnicas não invasivas e, ocasionalmente, é o próprio tecido de interesse. Portanto, para que tais técnicas obtenham resultados otimizados, as propriedades ópticas da pele devem ser muito bem elucidadas. Neste estudo, avaliamos através do método de Kubelka-Munk as propriedades ópticas de amostras de pele dorsal de camundongos albinos (BALB/c) machos, jovens e de idade avançada, obesos e eutróficos. A condição de obesidade foi induzida por uma dieta hiperlipídica mantida por 3 meses. A análise foi focada aos comprimentos de onda 630, 660, 780, 810 e 905 nm devido à sua ampla utilização nas ciências e tecnologias biomédicas. As medidas de espectrofotometria foram realizadas em um espectrofotômetro acoplado a uma esfera integradora única. Nossos dados mostram um aumento de transmitância (~10%) em relação aos comprimentos de onda entre 630 e 905 nm. A composição e abundância dos tecidos que compõem a pele influenciam significativamente suas propriedades ópticas de absorção e espalhamento. Concluímos neste trabalho que fatores como idade e adiposidade subcutânea influenciam de maneira estatisticamente significativa as propriedades ópticas de pele de camundongos albinos.

Palavras-Chave: óptica de tecidos, luz, dosimetria, fototerapia, fotodiagnóstico.

Abstract: Visible and near-infrared radiation have been widely employed in biomedical optics. Skin is the most common optical barrier in non-invasive techniques and occasionally it is the target tissue itself. Consequently, to optimize the outcomes brought by light-based techniques, the optical properties of skin tissue must be very well elucidated. In the present study, we evaluated the optical properties of albino mice (BALB/c) dorsal skin using the Kubelka-Munk photon transport model. We evaluated samples from young mice in comparison to aged obese and eutrophic mice. Obesity condition was induced by a high fat diet maintained for 3 months. Analysis was performed for wavelengths at 630, 660, 780, 810 and 905 nm due to their prevalent use in

biomedical sciences and technologies. Spectrophotometric measurements were performed using a single integrating sphere coupled to a proper spectrophotometer. Our results show only a slight transmittance increment (~10%) as wavelengths are increased from 630 to 905 nm. The composition and abundance of skin composing tissues significantly influence its absorption and scattering optical properties. We conclude that factors such as age and subcutaneous adiposity have a statistically significant influence on albino mice skin optical properties.

Keywords: tissue optics, light, dosimetry, phototherapy, photodiagnosis.

Introdução

A radiação eletromagnética compreendida entre a luz visível e o infravermelho próximo tem sido amplamente empregada na óptica biomédica. Ainda que parte das técnicas e descobertas recentes estejam restritas ao público acadêmico, a luz já pode ser considerada uma ferramenta protagonista para aplicações terapêuticas e de diagnóstico.

A pele é a barreira óptica mais comum para grande parte das técnicas não invasivas e, ocasionalmente, é o tecido de interesse. Portanto, para que tais técnicas obtenham resultados satisfatórios e/ou otimizados, as propriedades ópticas da pele devem ser muito bem conhecidas [1, 2]. Esta se trata de um tecido altamente complexo, composto por múltiplas camadas de diferentes populações celulares e macromoléculas estruturais. Essas camadas estão sujeitas a variabilidades de espessura e composição – mesmo num único indivíduo – tornando as interações do tipo luz-pele relevantemente heterogêneas [3]. Como exemplo e enfoque deste trabalho, podemos destacar influências por variações decorrentes de envelhecimento e aumento de adiposidade.

A teoria de transporte de fótons proposta por Kubelka & Munk (KM) fornece uma solução analítica simples e bem aceita para a avaliação global de propriedades ópticas de meios túrbidos, em termos de coeficientes de absorção (A_{KM}) e espalhamento (S_{KM}) [4]. O fenômeno é descrito por duas equações diferenciais, onde suas soluções são dependentes apenas

de variáveis como a transmitância (T_D) e refletância (R_D) difusas, e a espessura da amostra (D). As probabilidades de espalhamento totalmente elástico e absorção de um fóton em meios túrbidos são diretamente proporcionais aos coeficientes S_{KM} e A_{KM} , respectivamente [1, 4].

Neste estudo, avaliamos através do método de KM as propriedades ópticas de amostras de pele dorsal de camundongos BALB/c machos, jovens ou idosos, eutróficos ou obesos. A análise foi focada a comprimentos de onda na faixa espectral compreendida entre o vermelho e o infravermelho próximo devido à sua ampla utilização em terapia e diagnóstico óptico.

Materiais e Métodos

Animais de experimentação e amostras – Os animais foram criados e mantidos nas instalações do biotério do IPEN-CNEN/SP e os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com normas internacionais de cuidados de manuseio, com aprovação do comitê de ética do instituto (protocolo 047/09).

Utilizamos amostras de 5 animais em cada uma das condições testadas: BALB/c machos eutróficos com idades entre 4 e 6 semanas e eutróficos ou obesos com idade de 36 semanas. A condição de obesidade foi induzida durante 3 meses por uma dieta hiperlipídica fornecendo 42 % de calorias provenientes de gorduras. Os animais eutróficos foram alimentados com ração comercial normocalórica (Nuvilab CR-1, Nuvital, Brasil), com contribuição calórica de 10 % de fontes lipídicas.

Eutanasiámos os animais por deslocamento cervical, previamente anestesiados com coquetel de xilazina-cetamina. O dorso dos animais foi depilado com creme à base de tioglicolato (Veet Cream®, Reckitt Benckiser, Brasil), após tricotomia com tosquiadeira elétrica. Coletamos cuidadosamente amostras de 2x2 cm, preservando a espessura completa do tecido cutâneo.

Avaliação por espectrofotometria – Rapidamente após a excisão, as amostras foram dispostas entre duas lâminas de microscópio para um posicionamento padronizado frente ao feixe amostral. Tomamos o cuidado de mantê-las fracamente pressionadas entre as lâminas para que sua compressão influenciasse minimamente às medidas adquiridas.

As medidas de T_D e R_D , nos comprimentos de onda 630, 660, 780, 810 e 905 nm, foram realizadas em um espectrofotômetro (Agilent Cary 5000, Melbourne, Austrália) acoplado a uma esfera integradora única (Internal DRA-900 (PMT), Melbourne, Austrália) recoberta internamente por sulfato de bário.

O feixe sempre incidiu sobre a porção central das amostras e seu caminho óptico as percorreu no sentido epiderme-derme. Os dados obtidos em respeito à R_D foram coletados com as amostras no orifício posterior da esfera, e os em respeito à T_D com as amostras na posição anterior, sendo o orifício posterior devidamente fechado com material recoberto por sulfato de bário. O equipamento foi calibrado levando em conta a reflexão

de Fresnell decorrente das lâminas de microscópio utilizadas para o posicionamento das amostras.

Os coeficientes ópticos A_{KM} e S_{KM} foram calculados conforme as equações abaixo [1, 4]:

$$A_{KM} = (x - 1)S_{KM} \quad (1)$$

$$S_{KM} = \frac{1}{yD} \ln \frac{1 - R_D(x - y)}{T_D} \quad (2)$$

Onde D [cm] corresponde à espessura da amostra e os parâmetros x e y são dados pelas igualdades expressas em 3 e 4:

$$x = \frac{1 + R_D^2 - T_D^2}{2R_D} \quad (3)$$

$$y = \sqrt{x^2 - 1} \quad (4)$$

Análise histológica – Após análise espectrofotométrica, as amostras foram fixadas em formalina tamponada a 4 % e processadas para coloração histológica de hematoxilina e eosina. As fotomicrografias foram capturadas por microscopia óptica comum (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e um patologista experiente as avaliou sem conhecimento prévio sobre o experimento. A quantificação das espessuras de cada camada tecidual foi feita a partir de ferramentas do software ImageJ (NIH, Bethesda, EUA).

Análise estatística – A análise estatística dos dados coletados por espectrofotometria foi realizada pelo teste ANOVA (*two-way*) com pós-teste Tukey. Anteriormente, análises de normalidade e homogeneidade foram feitas com os testes de Levene e Shapiro-Wilks. Consideramos a significância estatística quando $p < 0,05$.

Resultados

A dieta hiperlipídica induziu com sucesso um aumento de massa corporal e adiposidade subcutânea dos camundongos. Os camundongos jovens e eutróficos apresentavam 19(1) g de massa corpórea, enquanto os animais de idade mais avançada eutróficos apresentavam 32(1) g e os submetidos à dieta hiperlipídica 48(2) g.

A análise histológica (Figs. 1 e 2) revela grande hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo subcutâneo e moderada do tecido conjuntivo frouxo submuscular dos animais que receberam dieta hiperlipídica. Este grupo ainda apresenta redução significativa da espessura da derme em relação aos demais grupos experimentais.

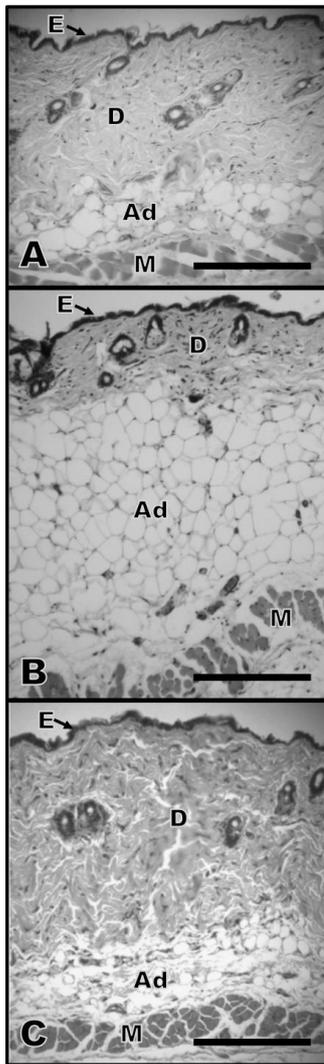


Figura 1: Painel de fotomicrografias de peles de camundongos coradas com hematoxilina e eosina, sob ampliação de 80x. Note a variação de espessura, celularidade e organização das camadas teciduais. **A**: camundongos jovens e eutróficos; **B**: de idade avançada e obesos; **C**: de idade avançada e eutróficos. **E** aponta a epiderme, **D** a derme, **Ad** o tec. adiposo e **M** a camada muscular. A barra de escala corresponde à 100 μm .

Os camundongos eutróficos apresentam espessuras de tecidos semelhantes (Fig. 2), entretanto, sua organização estrutural é notavelmente divergente (Fig. 1). Conforme ilustrado pelas fotomicrografias (Fig. 1), tanto a derme, quanto o tecido adiposo subcutâneo dos camundongos eutróficos de idade avançada apresentam aspecto mais denso e desorganizado.

Dados relativos à transmitância difusa e aos coeficientes ópticos obtidos para cada grupo nos diferentes comprimentos de onda avaliados são apresentados na figura 3.

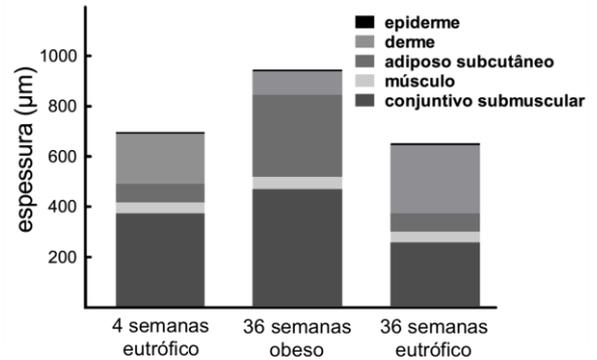


Figura 2: Espessuras médias de cada camada tecidual da pele dos grupos experimentais.

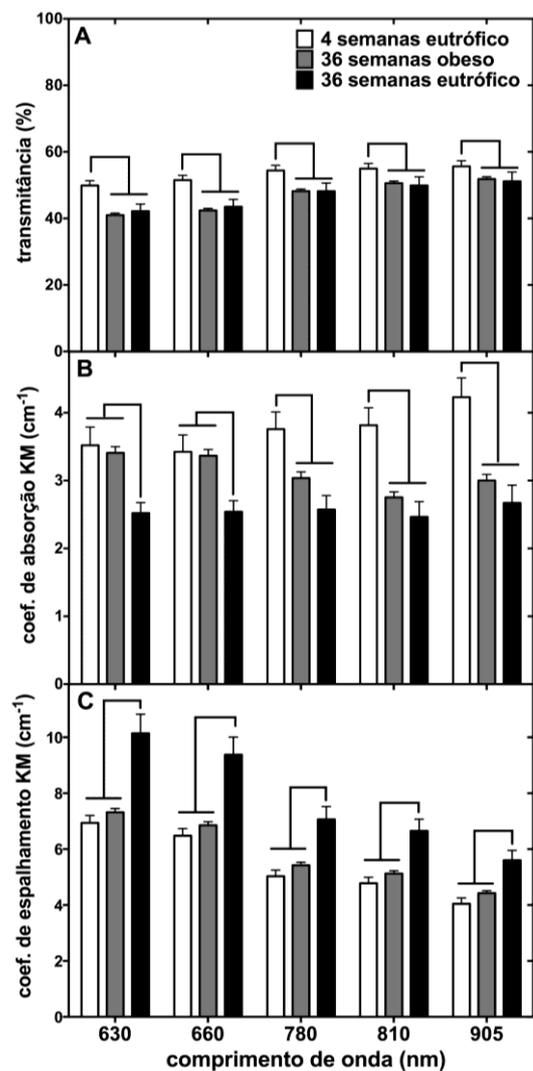


Figura 3: Dados relativos à (A) transmitância difusa e de coeficientes de absorção (B) e espalhamento (C) de Kubelka-Munk nos comprimentos de onda analisados. As barras de erro representam desvios padrão das médias e as chaves indicam diferenças estatísticas significativas.

Discussão

Desde o início da década de 80, as propriedades ópticas da pele humana têm sido investigadas, possibilitando o desenvolvimento e aperfeiçoamento de diversos sistemas ópticos para aplicações biológicas [1]. No contexto das terapias ópticas, por exemplo, parâmetros de iluminação precisos podem representar o ponto de divergência entre resultados insatisfatórios e altamente efetivos [2, 5].

Apesar de a literatura enfatizar o uso de comprimentos de onda na região do infravermelho para otimizar a transmissão de luz em tecidos biológicos, nossos dados mostram que a transmitância na pele apresenta apenas uma leve tendência de aumento para os maiores comprimentos de onda. Não mais que cerca de 10 % de incremento na transmitância pôde ser observado entre os comprimentos de onda de 630 a 905 nm, sendo esta a mesma variância observada entre os grupos experimentais, no mesmo comprimento de onda (Fig. 3A). Portanto, a capacidade de transmitância da luz em pele de camundongos depende do comprimento de onda e da composição dos tecidos presentes nos grupos experimentais, em magnitude semelhante.

Proteínas fibrosas, como o colágeno e queratina, apresentam intenso espalhamento e baixa absorção para a faixa espectral avaliada, sendo sua quantidade e organização nos tecidos diretamente relacionadas ao resultante coeficiente de espalhamento [6]. Os camundongos jovens sempre apresentaram transmitância significativamente superior aos demais grupos (Fig. 3A), possivelmente devido à sua disposição de fibras colágenas mais finas e organizadas (portanto isotrópica) aliada à ausência de tecidos hipertróficos e/ou hiperplásicos. Ainda, as divergências de absorção abaixo de 780 nm devem ocorrer devido à presença de cromóforos celulares incluindo citocromos e ácidos graxos, enquanto que acima de 900 nm a água passa a ser o principal cromóforo [7]. Provavelmente devido a estes fatos, os camundongos obesos apresentam coeficientes de absorção decrescentes, os de idade avançada e eutróficos são constantes e os jovens eutróficos são crescentes por sua conhecida maior hidratação cutânea (Fig. 3B).

Paralelamente, a redução de espessura de derme nos camundongos obesos poderia ser responsável por sua transmitância próxima aos demais grupos, apesar da espessura total da pele ser muito superior. Estas afirmações podem ser corroboradas pela divergência estatisticamente significativa de coeficientes de espalhamento observada entre os animais eutróficos envelhecidos e os demais (Fig. 3C).

Neste estudo observamos as propriedades ópticas da pele de camundongos em alguns comprimentos de onda de interesse técnico-científico, em casos pontuais de variação de adiposidade subcutânea e de idade. Esta é uma limitação importante deste trabalho, e portanto faz-se relevante o desenvolvimento de novos estudos com acompanhamento discreto e progressivo de cada

variável e as propriedades ópticas particulares de cada tecido contido na pele deste e de outros animais de experimentação.

Conclusão

Concluimos neste trabalho que fatores como comprimento de onda, idade e adiposidade subcutânea influenciam de maneira estatisticamente significativa às propriedades ópticas absolutas e relativas avaliadas em pele de camundongos albinos.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos apoios financeiros fornecidos pela CAPES, FAPESP e CNPq.

Referências

- [1] Anderson RR and Parrish JA. The optics of human skin. *J Invest Dermatol.* 1981; 77(1): 13-9.
- [2] Jacques SL. How tissue optics affect dosimetry of photodynamic therapy. *J Biomed Opt.* 2010; 15(5): 051608.
- [3] Curtis A, Calabro K, Galarneau JR, Bigio J and Krucker T. Temporal variations of skin pigmentation in C57BL/6 mice affect optical bioluminescence quantitation. *Mol Imaging Biol.* 2011; 13(6): 1114-23.
- [4] Kubelka P and Munk F. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. *Z Technikse Physik.* 1931; 12: 593-601.
- [5] Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD and Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012; 40(2): 516-33.
- [6] Millington KR. Diffuse reflectance spectroscopy of fibrous proteins. *Amino Acids.* 2012; 43(3): 1277-85.
- [7] Tsai CL, Chen JC and Wang WJ. Near-infrared absorption property of biological soft tissues constituents. *J Med Biol Eng.* 2001; 21(1): 7-14.