

ESTUDO DO COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO DA LUZ EM PELE DE CAMUNDONGOS

C. R. SILVA*, D. P. AURELIANO* , L. R. DE PRETTO**, A. Z. FREITAS** e M. S. RIBEIRO*

* Laboratório de Terapia Óptica, Centro de Lasers e Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN-SP, São Paulo, Brasil

** Laboratório de Tomografia por Coerência Óptica, Centro de Lasers e Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN-SP, São Paulo, Brasil

e-mail: ramos.camilasilva@gmail.com

Resumo: Lasers de baixa potência vêm sendo utilizados como ferramenta terapêutica na cicatrização de lesões de pele, no entanto, para uma correta dosimetria da luz é importante conhecermos a óptica do tecido biológico. Neste contexto, modelos murinos são utilizados para estudo em diferentes situações, muitas delas afetando o tecido cutâneo. Assim, técnicas menos invasivas, como a tomografia por coerência óptica (OCT), estão sendo utilizadas para a obtenção de informações ópticas desse tecido, como o coeficiente de atenuação, com a vantagem de se obter imagens seccionais em tempo real. Neste trabalho foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c com 24 semanas e machos C57BL/6 com 8 semanas, nos quais foi medido o coeficiente de atenuação na pele pela técnica de OCT. Os resultados demonstraram que o coeficiente de atenuação da luz da pele de camundongos pode variar influenciado por fatores como idade, gênero e massa corpórea. Estes fatores devem ser considerados no desenho experimental de trabalhos que envolvam terapia óptica em modelos murinos.

Palavras-chave: modelo murino, tomografia por coerência óptica (OCT), BALB/c, C57BL/6

Abstract: *Low-power lasers have been used as a therapeutic tool in the healing of skin lesions, however, for a correct light dosimetry is important to know the biological tissue optics. In this context, murine models are used to study different situations, many of them affecting the skin tissue. Thus, minimally invasive techniques as Optical Coherence Tomography (OCT) are being used to obtain information of this tissue, as the optical attenuation coefficient, with the advantage of obtaining sectional images in real time. In this work, female BALB/c at 24 weeks and male C57BL/6 mice at 8 weeks were used to measure the light attenuation coefficient in skin through OCT. The results showed that the light attenuation coefficient of mice skin can be influenced by factors such as age, gender and body mass. These factors should be considered in experimental designs of studies that involve optical therapy in murine models.*

Key words: *murine model, optical coherence tomography (OCT), BALB/c, C57BL/6*

Introdução

Tratamentos clínicos com fontes de luz coerente e não coerente vem sendo aplicados como ferramentas em terapias ópticas como a terapia com luz de baixa potência (LLLT- *Low Level Light Therapy*) [1]. Essa modalidade terapêutica é aplicada em vários problemas de saúde relacionados à dermatologia, como estética e cicatrização de feridas da pele de diversas etiologias [2]. Nesse contexto, o modelo murino é utilizado em estudos experimentais devido ao fácil manuseio, aquisição e baixo custo de manutenção, já que o tecido cutâneo desses animais se destaca como importante ferramenta para avaliar o tratamento de cicatrização de lesões na pele *in vivo* [2]. Entretanto, a pele possui diferenças morfológicas devido a características como gênero, melanização, massa corpórea e idade. Diante disso, a avaliação do tecido cutâneo do modelo animal se faz necessária para compreensão de uma dosimetria adequada para a utilização da LLLT.

A clássica avaliação do tecido cutâneo é feita por técnicas histológicas para verificação das possíveis diferenças morfológicas. Essas técnicas por sua vez são invasivas e necessitam de coloração para visualização no tecido de suas estruturas, espessura e alterações. Técnicas menos invasivas como a Tomografia por Coerência Óptica (do inglês *Optical Coherence Tomography* – OCT), vem sendo empregadas para este tipo de avaliação com a vantagem de se obter parâmetros físicos importantes [3].

A OCT caracteriza-se por ser uma técnica não invasiva, aplicada *in vivo*, com variações de profundidade de 1 a 3 mm para tecidos biológicos, que fornece imagens seccionais de alta resolução de estruturas espalhadoras de luz, em tempo real, baseada no interferômetro de Michelson. A OCT utiliza comprimento de onda próximo ao infravermelho, por ser a região do espectro que sofre menor absorção pelos tecidos biológicos. Fornece informações sobre o retroespalhamento da luz e, assim, podem-se obter dados como o coeficiente de atenuação da luz (α) [4].

A literatura reporta que diferentes linhagens de camundongo mostram comportamento diferente frente ao processo de cicatrização usando lasers de baixa potência [5]. Diante dessa questão, conhecer a atenuação da luz no tecido é de importância para

escolha dos melhores parâmetros de dosimetria em terapia óptica.

Neste estudo foram utilizados os modelos murinos BALB/c e C57BL/6, respectivamente fêmeas de 24 semanas e machos de 8 semanas, para avaliar o α proveniente das medidas da derme do tecido cutâneo incluindo como variáveis a idade e massa dos animais.

Materiais e métodos

Animais- Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas com 24 semanas ($n = 8$) e C57BL/6 machos com 8 semanas ($n = 8$). Os animais receberam alimentação e água *ad libitum* e foram mantidos em ambiente controlado no biotério do IPEN-CNEN/SP. Os princípios estabelecidos pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN foram seguidos (Projeto nº047/09 CEPA-IPEN/SP). Os animais foram anestesiados via intraperitoneal, com a associação de hidróclorido de ketamina (0,32 mL/Kg) e Xilazina (0,2mL/Kg), em seguida tricotomizados e depilados na região abdominal do quadrante inferior e suas massas aferidas com balança (Precisa BJ 610C, $\pm 0,01g$).

Tomografia por Coerência Óptica- O equipamento de OCT (OCP 930RS THORLABS- INC) disponível no laboratório de Tomografia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN/CNEN-SP possui comprimento de onda central de 930 nm, 2 mW de potência, resolução espacial lateral e axial de 6 μm e largura de meia altura de 100 nm. Os animais foram posicionados em um suporte com a região abdominal do quadrante inferior voltada para a câmera de OCT. Foi realizado um *stream* (sequência de imagens de uma mesma região) da área abdominal de cada animal.

Coefficiente de Atenuação da Luz-- Para calcular o coeficiente de atenuação da luz, foi utilizado o programa *V10_desmineralizacao_media_fit_stream*, adotando 1,44 para o índice de refração da pele de camundongos [6]. A seleção da área adotada para todas as medidas foi na faixa de 1000 a 2000 μm (Fig. 1A). Para o ajuste de sinal foi adotado a região da derme e tecido subcutâneo dos camundongos, área exponencial, entre o primeiro pico (referente à epiderme) e o segundo pico (referente ao tecido muscular) (Fig. 1B).

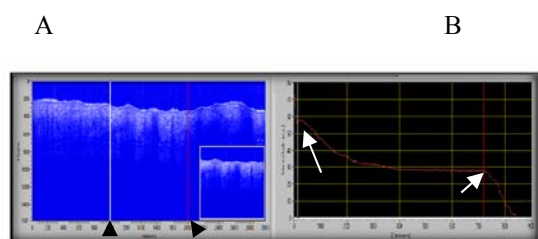


Figura 1- A: Imagem por OCT da pele de camundongo. As linhas verticais delimitam a região de interesse analisada. B: As setas apontam para a curva exponencial que foi varrida pelo software utilizado.

Após a realização da OCT, as medidas obtidas pelo software para cada animal foram analisadas. Para o cálculo do coeficiente de atenuação da luz foi utilizado

um modelo simples de decaimento exponencial da intensidade da luz detectada (retroespalhada), de acordo com a equação:

$$I(Z) = I_0 \cdot e^{-2\alpha z} + C \quad (1)$$

onde I representa o valor da intensidade detectada, I_0 é o valor da intensidade da fonte luminosa, α é o coeficiente de atenuação total, z é a profundidade analisada e C é uma constante utilizada em decorrência do ruído de fundo do sinal [7].

Resultados

A figura 2 mostra a média do valor do coeficiente de atenuação para os dois grupos de animais utilizados. Observa-se que camundongos BALB/c apresentam um valor médio para o coeficiente de atenuação da luz maior que os camundongos C57BL/6.

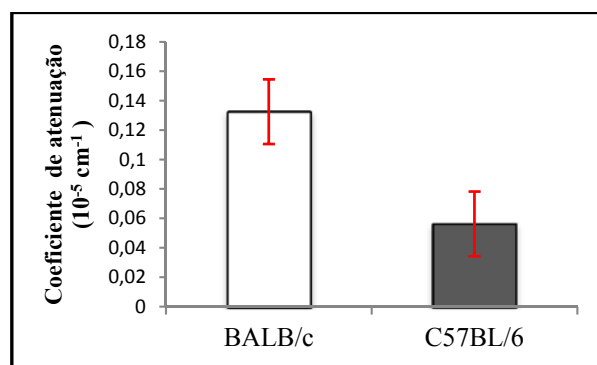


Figura 2- Valores médios dos coeficientes de atenuação de camundongos BALB/c e C57BL/6. A barra representa o erro padrão da média (EPM).

Também foi aferida a massa de cada camundongo de ambos os grupos de animais pertencentes ao estudo e calculada a média dessas massas (Fig. 3). Nota-se que a massa corpórea de camundongos BALB/c é significativamente maior que a de camundongos C57BL/6.

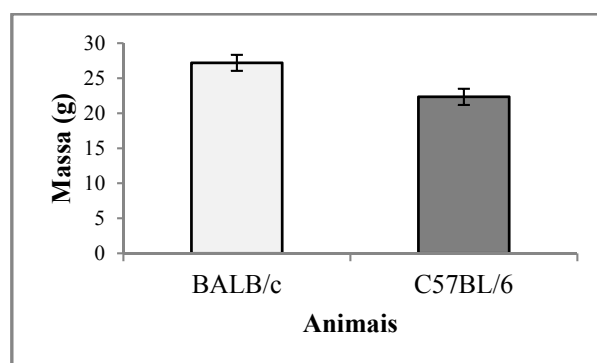


Figura 3- Valores médios \pm EPM da massa de camundongos BALB/c e C57BL/6.

Discussão

A utilização de lasers de baixa potência como ferramenta para tratamento de lesões de pele é bem estabelecido, e modelos em camundongos e ratos são bastante utilizados para estudo dos mecanismos da luz no processo de reparo cutâneo [5,8]. Em grande parte desses estudos, a dosimetria da luz é administrada na pele varrendo-se diferentes parâmetros e nem sempre a óptica da pele é considerada. De fato, centros espalhadores e absorvedores do tecido biológico podem influenciar a propagação da luz no tecido [9]. Assim, conhecer como a luz atenua em diferentes modelos animais é de suma importância para o uso correto dos parâmetros da luz e efeitos da LLLT *in vivo*.

Neste trabalho, utilizamos a técnica de OCT para obtenção de imagens seccionais em tempo real para medir o coeficiente de atenuação da luz em pele de camundongos (α). De acordo com a Eq. 1, o coeficiente de atenuação da luz pode ser estimado a partir da alteração da intensidade da luz quando ela interage com o tecido biológico. Portanto, através dessa grandeza, podemos avaliar diferenças entre gênero, melanização, massa e idade dos animais [10].

Nossos resultados mostram que o α para camundongos BALB/c é maior quando comparado aos camundongos C57BL/6. Alguns fatores podem explicar este resultado. Neste estudo utilizamos camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, que mostraram maior média da massa corpórea e idade mais avançada. Estes animais foram avaliados com 24 semanas, fase adulta de seu ciclo de vida, o que se traduz em ganho de tecido adiposo e muscular [10-11]. Além disso, fêmeas também apresentam maior quantidade de tecido subcutâneo conforme observado em trabalhos de nosso grupo e interferem nos coeficientes de absorção e espalhamento da luz na pele [12].

Quando analisamos a média da massa e do α do grupo C57BL/6 encontramos uma relação inversamente proporcional à descrita no grupo BALB/c. Os camundongos dessa linhagem apresentam menor média de massa corpórea e menor α . Isso pode ser esclarecido considerando que o grupo avaliado estava com 8 semanas, fase jovem de seu ciclo de vida. A literatura reporta que camundongos apresentam menor massa corpórea nessa fase de suas vidas [11].

Apesar de camundongos C57L/6 possuírem melanina em seu tecido cutâneo, a melanina encontra-se confinada na primeira camada da pele, na região da epiderme, que não foi avaliada neste trabalho. Assim, não podemos inferir que a melanina tenha tido influência para o cálculo de α .

O espalhamento na pele é atribuído principalmente às fibras colágenas e capilares da derme [13]. Neste estudo, verificamos que quanto maior a massa corpórea, maior a atenuação da luz no tecido. Estes resultados sugerem que o espalhamento da luz por células adiposas também pode contribuir para atenuação da luz na pele de camundongos. No entanto, mais trabalhos devem ser realizados para validação de nossa hipótese.

Conclusão

Diante do exposto, concluímos que o coeficiente de atenuação da luz na pele de modelo murino pode variar influenciado por fatores como idade, gênero e massa corpórea sendo, portanto, um fator a ser considerado na dosimetria da luz empregada para realizar tratamentos com terapia óptica.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPQ, CNEN e FAPESP pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

Referências

- [1] Huang Y-Y, Chen ACH, Carroll JD, *et. al.* Biphasic dose response in low level light therapy. International Dose-Response Society. 2009; 7:358-383.
- [2] Posten W, Wrone DA, Dover JS, *et. al.* Low level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. Dermatologic Surgery. 2005; 31:334-340.
- [3] Welzel J. Optical coherence tomography in dermatology: a review. Skin Research and Technology. 2001; 7:1-9
- [4] Freitas AZ, Amaral MM, Raelle MP. In: Dr. F.J. Duarte, editor. Optical Coherence Tomography: Developmente and Applications. Laser pulse phenomena and applications. Intech; 2010. p. 409-432.
- [5] Demidova-Rice TN, Salomatina EV, Yaroslavsky, *et. al.* Low level light stimulates excisional wound healing in mice. Lasers in Surgery and Medicine. 2007; 39: 706-715.
- [6] Bashkatov NA, Genina EA, Tuchin VV. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review. Journal of Innovative Optical Health Sciences. 2011; 4:9-38.
- [7] De Cara ACB. Avaliação do processo de desenvolvimento de desmineralização em esmalte dental humano utilizando a técnica de tomografia por coerência óptica. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2012.
- [8] Núñez SC, França CM, Silva DF, *et. al.* The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. Lasers in Medical Science. 2013; 28:633-641.
- [9] Kienle A, Forster FK, Hibst R. Anisotropy of light propagation in biological tissue. Optics Letters. 2004; 29:2617-2619.
- [10] Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2009; 28:11-23.
- [11] Neves SMP. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP2013. [Internet]. 2013 [cited 2014 July 21]; 216:15-42. Available from:

http://www3.icb.usp.br/corpoeditorial/ARQUIVO_S/bioterio/Manual_Cuidados_e_Procedimentos.pdf

- [12] Yoshimura TM, Kato IT, Deana AM, Ribeiro MS. Treating metabolic syndromes metaflammation with low level light therapy: Preliminary results. In: Proceedings SPIE Conference- Mechanisms for Low-Light Therapy IX; 2014; San Francisco, California, United States. 2014. Vol. 8932.
- [13] Michel AP, Liakat S, Bors K, Gmachl CF. In vivo measurement of mid-infrared light scattering from human skin. *Biomedical Optics Express*. 2013; 4:520-530.