



Determinação das propriedades óticas de tecidos e caracterização de tratamentos de transparência em rim humano normal e patológico

ANA RITA TEIXEIRA BOTELHO

Novembro de 2021

Determinação das propriedades óticas de tecidos e caracterização de tratamentos de transparência em rim humano normal e patológico

Ana Rita Teixeira Botelho

Licenciada em Engenharia Biomédica pelo Instituto Superior de Engenharia do Porto

“Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto para a obtenção
de grau de Mestre em Engenharia Biomédica”

Orientador: Luís Manuel Couto Oliveira

Outubro, 2021

Agradecimentos

Ao meu namorado, por me ter sempre apoiado incondicionalmente, e por ter acreditado em mim.

Aos meus pais e irmã, por todo o auxílio que prestaram e pela motivação que me deram para terminar esta etapa.

Aos meus amigos, que todos os dias me fizeram acreditar que conseguia conciliar o trabalho com a tese.

Ao IPO-Porto, por ter fornecido amostras prontamente, sempre que requisitadas, contribuindo para o sucesso deste trabalho.

Aos meus colegas Inês Martins e Hugo Silva, pelos momentos partilhados no laboratório e por toda a ajuda e acompanhamento que me deram, durante todo o trabalho de investigação. Sem a sua ajuda, este trabalho não seria possível.

Ao meu orientador, o professor Luís Oliveira, por toda a orientação que me deu e por todo o empenho, esforço e tempo que disponibilizou. Sem ele, não conseguiria concluir esta etapa.

A todos os professores e colegas do mestrado, que contribuíram para um crescimento pessoal e profissional, e por me terem dado memórias que não esquecerei.

Muito obrigada.

Resumo

O rim é um órgão excretor que tem como função principal filtrar produtos metabólicos presentes na corrente sanguínea para os expelir com água para o exterior, na forma de urina. O rim é assim um órgão de vital importância ao funcionamento do corpo humano, e ao qual estão associadas algumas patologias, nomeadamente alguns tipos de cancro. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, dos vários tipos de cancro que se conhecem no rim, o carcinoma de células renais cromóforo é um dos mais raros, representando cerca de 5 a 7% dos casos reportados anualmente. Dada a disponibilidade de tecidos deste tipo de cancro para a realização do presente trabalho, decidiu-se executar um estudo comparativo para avaliar as propriedades óticas espectrais de tecidos de rim normal e com este tipo de cancro, assim como estudar as propriedades de difusão da glicerina e da água nesses tecidos, propriedades essas que são características de dois mecanismos fundamentais para a criação de efeitos de transparência. Para obter a dispersão dos dois tipos de tecido foi usado o método da reflexão interna total, com diferentes lasers a emitirem comprimentos de onda desde o ultravioleta até ao infravermelho. O ajuste dos valores discretos do índice de refração obtidos com esses lasers foi feito com a equação de Cornu, mostrando que o tecido com cancro apresenta uma dispersão com valores superiores à obtida para o rim normal, assim como um maior conteúdo de lípidos. Usando métodos de espectroscopia, foram medidos diferentes tipos de espectros à transmissão e à reflexão, que permitiram calcular as propriedades óticas fundamentais dos dois tecidos entre 200 e 1000 nm. Verificou-se que estas propriedades óticas espectrais apresentam dependências no comprimento de onda semelhantes às observadas para outros tecidos biológicos, tendo-se observado no entanto, diferenças entre o rim normal e o rim patológico. A diferença mais significativa foi verificada entre os espectros do coeficiente de absorção dos dois tecidos. Uma análise mais cuidadosa desses espectros mostrou a presença de melanina e de lipofuscina em ambos os tecidos, mas com conteúdos distintos. Comparando tais valores, verificou-se que cerca de 83% da melanina presente no rim normal se converte em lipofuscina no tecido com cancro. Esta descoberta é inovadora, mas faz todo o sentido, uma vez que ao contrário da melanina, a lipofuscina contém lípidos e proteínas, dois nutrientes dos quais o cancro necessita para se desenvolver. Para determinar as propriedades de difusão da glicerina e da água nos dois tecidos foram feitos tratamentos de transparência em várias amostras que foram imersas em soluções aquosas de glicerina contendo diferentes osmolaridades. Medindo-

se a evolução temporal da transmitância colimada dos tecidos durante estes tratamentos, foi possível determinar os tempos de difusão efetivos para cada tratamento. Representando estes tempos de difusão em função da concentração de glicerina usada em cada solução, conseguiu-se identificar o tempo de difusão característico da glicerina e o da água nos tecidos do rim, verificando-se também que o rim patológico apresenta um conteúdo de água móvel superior em cerca de 5% ao obtido para o rim normal. Completando este estudo com medições da variação da espessura das amostras de tecidos do rim durante certos tratamentos, calculou-se os coeficientes de difusão da glicerina e da água, obtendo-se novamente valores discriminados nos dois tecidos: $D_{gl}=4.851 \times 10^{-7}$ cm²/s e $D_{H_2O}=2.105 \times 10^{-6}$ cm²/s (para o rim normal) e $D_{gl}=3.156 \times 10^{-7}$ cm²/s e $D_{H_2O}=1.531 \times 10^{-6}$ cm²/s (para o rim patológico). Todos os dados diferenciados para o rim normal e para o rim patológico que foram obtidos no presente trabalho são de elevado valor para o desenvolvimento de novos procedimentos de diagnóstico do cancro do rim, em particular para o carcinoma de células renais cromóforo. Espera-se que tais procedimentos sejam desenvolvidos em breve e que com a aplicação de métodos óticos permita diagnosticar o cancro do rim em fases de desenvolvimento ainda precoces para proceder a tratamentos eficazes em tempo útil.

Palavras-chave: Rim humano; cancro do rim; reflexão interna total; índice de refração; dispersão de tecidos; espectroscopia; coeficiente de absorção; coeficiente de espalhamento; anisotropia; deteção de pigmentos; marcadores óticos do cancro; transparência ótica; desidratação de tecidos; adaptação de índices de refração; propriedades de difusão de agentes em tecidos.

Abstract

The kidney is an excreting organ in the human body, whose main function is to filter metabolic products in the blood stream to expel them with water to the outside, in the form of urine. Consequently, it is an organ with vital importance, but it is associated with certain pathologies, including some forms of cancer. According to the World Health Organization, one of the rarest types of kidney cancer is the chromophobe renal cell carcinoma, which represents a worldwide annual incidence of 5 to 7%. Due to the availability of biological tissues containing this type of cancer, it was decided to conduct the present research work to perform a comparative study to evaluate the spectral optical properties of human kidney, both in normal state and in chromophobe renal cell carcinoma state. The present work also includes the evaluation of the diffusion properties of glycerol and water in these tissues with the purpose to characterize two fundamental optical clearing mechanisms in kidney tissues. The total internal reflection method was used to obtain the optical dispersion of both tissues. The experimental measurements obtained with this method were acquired with different lasers, emitting at various wavelengths between the ultraviolet and the infrared. The fitting of the discrete data obtained with those measurements was made using the Cornu equation, showing that the kidney cancer tissues have higher dispersion values and higher lipid content than the normal tissues. Using spectroscopy methods, different types of spectra were measured, both in transmission and in reflection modes, which allowed to calculate the fundamental optical properties of both tissues between 200 and 1000 nm. It was observed that these optical properties present similar wavelength dependencies to the ones obtained for other biological tissues. Some differences were observed between the optical properties of the normal and cancer tissues. The most significant of these differences was obtained in the spectral absorption coefficient, and a further analysis of these spectra showed the presence of melanin and lipofuscin in both tissues, but with differentiated contents. Comparing these pigment contents in both tissues, it was verified that about 83% of the melanin in the normal kidney is converted into lipofuscin in the cancer kidney. Such discovery is innovative, but it makes perfect sense, since in opposition to melanin, lipofuscin contains both lipids and proteins, which are two of the main nutrients for cancer cell development. To determine the diffusion properties of glycerol and water in the kidney tissues, several optical clearing treatments with solutions containing different glycerol osmolarities were made on various kidney samples. By measuring the time dependence of tissues'

collimated transmittance during the treatments, it was possible to obtain the effective net diffusion time values for each treatment. By representing these values as a function of the glycerol concentration in the treatment solutions, it was possible to identify the characteristic diffusion time for glycerol and the one for water in both types of kidney tissues. Such representation also showed that the pathological kidney has a free water content about 5% higher than in the normal kidney. Completing this study with time dependent thickness measurements from tissues under treatment with some particular solutions, the characteristic diffusion coefficients were calculated both for water and for glycerol in the two kidney tissues. These values were also different for the two types of kidney tissues: $D_{gl}=4.851\times 10^{-7}$ cm²/s and $D_{H_2O}=2.105\times 10^{-6}$ cm²/s (for the normal kidney) and $D_{gl}=3.156\times 10^{-7}$ cm²/s and $D_{H_2O}=1.531\times 10^{-6}$ cm²/s (for the pathological kidney). All the differentiated data obtained for the normal and cancer kidney tissues that were obtained in the present study are of high importance for the development of new diagnostic procedures to detect kidney cancer, in particular the chromophobe renal cell carcinoma. It is expected that such procedures will be developed soon and with the application of optical technologies, they can be used to diagnose kidney cancer in early stages of development. When such procedures become available, effective treatments can be applied as curative measures in early-stages of kidney cancer development to save the patients.

Key words: Human kidney; total internal reflection; refractive index; tissue dispersion; spectroscopy; absorption coefficient; scattering coefficient; anisotropy; pigment detection; optical cancer biomarkers; optical transparency; tissue dehydration; refractive index matching; agent diffusion properties in tissues.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
ÍNDICE.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XV
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. MOTIVAÇÃO	3
1.2. OBJETIVOS.....	5
1.3. ESTRUTURA DO DOCUMENTO	6
2. ESTADO DE ARTE	9
2.1. RIM E CANCRO DO RIM	9
2.2. TECNOLOGIAS ÓTICAS EM MEDICINA	10
2.3. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ÓTICAS DE TECIDOS BIOLÓGICOS	14
2.3.1. <i>Índice de Refração</i>	15
2.3.2. <i>Coefficiente de absorção e coeficiente de espalhamento</i>	17
2.3.3. <i>Coefficiente de espalhamento reduzido</i>	19
2.3.4. <i>Fator de anisotropia e profundidade de penetração da luz</i>	20
2.4. EFEITOS DE TRANSPARÊNCIA E SEUS MECANISMOS	21
3. METODOLOGIA	25
3.1. ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	25
3.1.1. <i>Amostras de tecido</i>	25
3.1.2. <i>Lasers utilizados</i>	26
3.1.3. <i>Procedimento de medição</i>	26
3.1.4. <i>Cálculos para obter os valores do índice de refração</i>	28
3.2. ESTUDO DAS PROPRIEDADES ÓTICAS ESPETRAIS	30
3.2.1. <i>Preparação de amostras de tecidos</i>	30
3.2.2. <i>Procedimento de medição de espectros</i>	32
3.2.3. <i>Cálculos para a obtenção das propriedades óticas</i>	34
3.3. ESTIMAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE DIFUSÃO	36

3.3.1. Procedimento experimental	36
3.3.2. Cálculos para obter as propriedades de difusão	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. ÍNDICE DE REFRAÇÃO	43
4.2. PROPRIEDADES ÓTICAS	52
4.3. ESTUDO DAS PROPRIEDADES DE DIFUSÃO EM TECIDOS DE RIM	62
5. CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	83

Lista de Figuras

- Figura 1 – Montagem experimental para as medições de IR com o método de reflexão interna total. 26
- Figura 2 – IR do prisma de dispersão (vidro SCHOTT N-SF11) em função do comprimento de onda (λ). 27
- Figura 3 – Amostras de rim saudável (“normal” à esquerda) e patológico (“tumor” à direita) provenientes do IPO-Porto. 31
- Figura 4 – Montagens experimentais para a aquisição dos espectros de T_t (a), de R_t (b) e de T_c (c). 32
- Figura 5 – Fluxograma de cálculo para obtenção das propriedades óticas espectrais. 35
- Figura 6 – Montagem experimental para medir a espessura de tecidos em tratamento. 37
- Figura 7 – Curvas de reflectância obtidas para rim normal com os lasers: 401.4 nm (a), 534.6 nm (b), 626.6 nm (c), 782.1 nm (d), 820.8 nm (e) e 850.7 nm (f). 44
- Figura 8 – Curvas de reflectância obtidas para rim patológico com os lasers: 401.4 nm (a), 534.6 nm (b), 626.6 nm (c), 782.1 nm (d), 820.8 nm (e) e 850.7 nm (f). 45
- Figura 9 – Curvas da primeira derivada da reflectância obtidas para rim saudável com os lasers: 401.4 nm (a), 534.6 nm (b), 626.6 nm (c), 782.1 nm (d), 820.8 nm (e) e 850.7 nm (f). 46
- Figura 10 – Curvas da primeira derivada da reflectância obtidas para rim patológico com os lasers: 401.4 nm (a), 534.6 nm (b), 626.6 nm (c), 782.1 nm (d), 820.8 nm (e) e 850.7 nm (f). 47
- Figura 11 – Curvas de dispersão e valores discretos experimentais de IR para os dois tecidos de rim: tecido saudável (a), tecido patológico (b) e ambos os tecidos (c). 50
- Figura 12 – Média e desvio padrão para $T_t(\lambda)$ (a) e (b), $R_t(\lambda)$ (c) e (d) e $T_c(\lambda)$ (e) e (f) medidos de rim saudável e de rim patológico. 53
- Figura 13 – Média e desvio padrão para o espectro de μ_a para o rim saudável (a) e patológico (b). 54
- Figura 14 – Dispersão calculada pelas relações K-K, dispersão calculada pela equação de Cornu e medições experimentais discretas de IR para: rim saudável (a) e rim patológico (b). 55

Figura 15 – Espectros médios e desvio padrão de μ_s e de μ'_s para os tecidos de rim saudável (a) e de rim patológico (b).	56
Figura 16 – Espectros médios e desvio padrão de g para os tecidos de rim saudável (a) e de rim patológico (b).	57
Figura 17 – Média e desvio padrão para os espectros da profundidade de penetração da luz nos tecidos de rim saudável (a) e de rim patológico (b).	58
Figura 18 – Espectro de μ_a para a melanina (azul) e para a lipofuscina (laranja).	60
Figura 19 – Espectros originais de μ_a e após a subtração da absorção dos pigmentos para os tecidos de rim saudável (a) e de rim patológico (b).	61
Figura 20 – Dependências temporais de T_c para diferentes comprimentos de onda obtidos nos tratamentos de tecidos de rim saudável com soluções de glicerina nas concentrações: 20% (a), 25% (b), 30% (c), 35% (d), 40% (e), 45% (f), 50% (g), 55% (h) e 60% (i).	65
Figura 21 – Dependências temporais de T_c para diferentes comprimentos de onda obtidos nos tratamentos de tecidos de rim patológico com soluções de glicerina nas concentrações: 10% (a), 15% (b), 20% (c), 25% (d), 30% (e), 35% (f), 40% (g), 45% (h), 50% (i), 55% (j) e 60% (k).	67
Figura 22 – Dependências temporais de T_c deslocadas para zero a $t=0s$ e restritas ao intervalo de tempo anterior à saturação, para diferentes comprimentos de onda obtidos nos tratamentos de tecidos do rim saudável com soluções de glicerina nas concentrações: 20% (a), 25% (b), 30% (c), 35% (d), 40% (e), 45% (f), 50% (g), 55% (h) e 60% (i).	70
Figura 23 – Dependências temporais de T_c deslocadas para zero a $t=0s$ e restritas ao intervalo de tempo anterior à saturação, para diferentes comprimentos de onda obtidos nos tratamentos de tecidos do rim patológico com soluções de glicerina nas concentrações: 10% (a), 15% (b), 20% (c), 25% (d), 30% (e), 35% (f), 40% (g), 45% (h), 50% (i), 55% (j) e 60% (k).	72
Figura 24 – Tempos médios de difusão dos fluxos efetivos em cada tratamento em função da concentração de glicerina na solução usada.	75
Figura 25 – Variação da espessura média em função do tempo para: tecidos de rim saudável em tratamento com soluções aquosas contendo 40% e 60% de glicerina (a) e tecidos de rim patológico em tratamento com soluções aquosas contendo 35% e 60% de glicerina (b).	76

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Valores de θ_c obtidos para rim saudável.	48
Tabela 2 – Valores de θ_c obtidos para rim patológico.	48
Tabela 3 – Valores de n_{tecido} para rim saudável.	49
Tabela 4 – Valores de n_{tecido} para rim patológico.	49
Tabela 5 – IR para cada concentração de glicerina das soluções preparadas.	63
Tabela 6 – Valores de τ estimados experimentalmente para cada tratamento dos tecidos de rim saudável.	73
Tabela 7 – Valores de τ estimados experimentalmente para cada tratamento dos tecidos de rim patológico.	73
Tabela 8 – Propriedades de difusão da glicerina e da água em tecidos de rim saudável e patológico.	78

Lista de Abreviaturas

g – Anisotropia

IR – Índice de refração

IV – Infravermelho

R_t – Refletância total

THZ – Terahertz

T_c – Transmitância colimada

T_t – Transmitância total

UV – Ultravioleta

UA – Unidades arbitrárias

Lista de Símbolos

μ_a – Coeficiente de absorção

μ_s – Coeficiente de espalhamento

μ'_s – Coeficiente de espalhamento reduzido

λ – Comprimento de onda

δ – Profundidade de penetração da luz

τ – Tempo de difusão

D – Coeficiente de difusão

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. Introdução

O presente trabalho de investigação surge no âmbito da unidade curricular Tese/Dissertação, pertencente ao mestrado em Engenharia Biomédica do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).

A investigação necessária para a realização do presente trabalho decorreu no Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI) e teve como objetivos estudar as propriedades óticas espectrais de tecidos de rim saudável e de rim patológico (cancro do tipo carcinoma de células renais cromóforo), assim como avaliar as propriedades de difusão da glicerina e da água nesses tecidos, com a finalidade de caracterizar dois dos mecanismos inerentes à criação de efeitos de transparência ótica.

Os tecidos utilizados nos estudos experimentais intrínsecos a esta investigação, constituem amostras excedentárias que foram retiradas de espécimes cirúrgicos, recolhidos de doentes em tratamento no Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-Porto).

1.1. Motivação

O rim é um órgão essencial no corpo humano, sendo responsável pelo desempenho de funções de filtração, excretoras e reguladoras de produtos biológicos e metabólicos, no organismo e na corrente sanguínea. Estas funções contribuem para a manutenção da homeostasia. Para além da filtração, da excreção de substâncias tóxicas oriundas do metabolismo e da excreção de excessos de medicamentos presentes no sangue, os rins eliminam também líquidos em excesso, regulam o equilíbrio ácido-base e o pH do sangue, assim como o de eletrólitos como o sódio, potássio ou fósforo.

Existem vários tipos de cancro do rim, sendo o carcinoma de células renais o mais comum, apresentando diversas variantes [1]. Considerando todos os cancros do rim como um só, este encontra-se classificado como o 13º cancro mais comum no mundo, afetando anualmente, aproximadamente 330 mil pessoas [2] e sendo responsável por mais de 100 mil mortes [3].

Considerando qualquer tipo de cancro, sabe-se que a sua deteção numa fase de desenvolvimento precoce, permite uma eficácia significativa dos tratamentos a aplicar, o

que resulta numa maior esperança de vida para o doente. O desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico não invasivos ou minimamente invasivos permite a realização de um diagnóstico mais rápido e um maior conforto para o doente, evitando a necessidade de biopsias ou cirurgias para recolha de tecidos a analisar em laboratório e reduzindo o tempo entre o procedimento interventivo e o estabelecimento do diagnóstico.

O desenvolvimento de métodos de diagnóstico com as características mencionadas e que possam ser utilizados em exames de rastreio do cancro, com o objetivo de fornecer diagnósticos rápidos em fases iniciais de desenvolvimento dos tumores, requer a utilização de técnicas óticas. A aplicação da luz permite procedimentos não invasivos ou minimamente invasivos de diagnóstico, e quando combinada com métodos computacionais, em especial recorrendo a técnicas de *machine learning* [4], permite uma rápida diferenciação entre tecidos saudáveis e tecidos patológicos [5, 6]. Tal como é descrito em publicações recentes [7–10], a deteção ótica de parâmetros que diferenciam o cancro é feita de forma rápida e eficaz com métodos óticos e pode inclusivamente ser feita de forma não invasiva ou minimamente invasiva. Dada a investigação intensa que tem sido feita na área da ótica médica por grupos de investigadores na Rússia, na Itália, no Reino Unido, nos Estados Unidos, no Japão, na Finlândia, no ISEP em Portugal e em outros países, a construção de novos equipamentos e a criação de procedimentos óticos de diagnóstico específicos para o cancro e outras patologias estão próximos de se tornar uma realidade a curto-prazo.

No caso específico dos rins, uma vez que estes se encontram no interior da cavidade abdominal, afastados do exterior, as técnicas de diagnóstico utilizadas atualmente produzem imagens com baixo contraste e resolução. Por este motivo, existe a necessidade de desenvolver novos métodos não invasivos ou minimamente invasivos, que sejam fidedignos na realização de um diagnóstico preciso.

Para se criarem métodos óticos de diagnóstico de patologias do rim, nomeadamente patologias de foro oncológico, torna-se necessário em primeiro lugar estudar a dependência no comprimento de onda das propriedades óticas de tecidos do rim saudável e do rim com patologia. Tal estudo poderá permitir a identificação de características diferenciadoras dos dois tipos de tecido, que possam ser utilizadas num procedimento de diagnóstico. O estudo de efeitos de transparência e dos mecanismos associados a estes efeitos é também de elevada importância, pois apenas se poderá estabelecer um diagnóstico que revele a formação de células cancerígenas no interior de

um rim, se tais tratamentos forem aplicados para eliminar ou reduzir significativamente o espalhamento nas camadas mais exteriores deste órgão.

Esta dissertação surge no sentido de apresentar os resultados obtidos no estudo das propriedades óticas de tecidos saudáveis e patológicos do rim, numa banda desde o ultravioleta (UV) profundo e o infravermelho (IV), e indicar as diferenças nessas propriedades que permitam a realização de um diagnóstico. De forma a caracterizar os mecanismos de transparência nos tecidos do rim, este trabalho contém também um estudo para avaliar as propriedades de difusão da glicerina e da água no interior desses tecidos.

1.2. Objetivos

O presente trabalho de investigação teve como principais objetivos estudar as propriedades óticas de tecidos de normais e patológicos de rim humano, assim como as propriedades de difusão da água e da glicerina nesses tecidos que caracterizam dois dos três mecanismos para criar efeitos de transparência.

Assim, durante a execução do presente trabalho, pretendeu-se concretizar os seguintes estudos:

- Medição dos índices de refração dos tecidos a diferentes comprimentos de onda, estimando as curvas de dispersão entre o UV e o IV;
- Calcular as propriedades óticas dos tecidos em função do comprimento de onda, desde o UV até ao IV, a partir de medições espectrais realizadas de amostras de rim normal e patológico *ex vivo*;
- Estudar os mecanismos de transparência nos tecidos de rim, nomeadamente o de desidratação de tecidos e o de adaptação de índices de refração, durante tratamentos com soluções de glicerina;
- Encontrar diferenças significativas entre os resultados obtidos para rim normal e rim patológico, que possam ser utilizadas em futuros procedimentos minimamente invasivos de diagnóstico do cancro do rim.

1.3. Estrutura do Documento

O presente documento descreve em detalhe todo o trabalho experimental e de cálculo que foi realizado, encontrando-se dividido em cinco partes.

No capítulo 1, é feita uma introdução ao trabalho de investigação, sendo abordados os objetivos a atingir e as motivações envolvidas.

No capítulo 2, é apresentado o estado de arte relacionado com a investigação a desenvolver, onde são mencionados e explicados os conceitos teóricos e os métodos necessários para a execução deste trabalho, sendo também abordados alguns pontos importantes sobre a ótica médica, como os seus avanços e o seu potencial.

No capítulo 3, é descrita toda a metodologia, encontrando-se organizada em 3 subtópicos, referentes ao índice de refração, propriedades óticas e propriedades de difusão.

No capítulo 4, são apresentados os resultados obtidos no presente trabalho, assim como a sua discussão. Nesta discussão, para além da interpretação dos resultados obtidos, é feita uma análise para identificar diferenças entre os resultados do rim saudável e do rim patológico.

Finalmente, no capítulo 5, são apresentadas as conclusões finais de todo o trabalho de investigação, fazendo um balanço dos objetivos que foram atingidos e que contributos este trabalho trouxe para o futuro da ótica médica. Este último capítulo apresenta também as perspetivas futuras de investigação que decorrem dos resultados obtidos no presente trabalho.

CAPÍTULO 2 – ESTADO DE ARTE

2. Estado de Arte

2.1. Rim e cancro do rim

O rim é um órgão que desempenha funções essenciais para a manutenção da homeostasia no corpo humano. Esta é mantida através da realização de funções como a regulação da osmolaridade, do pH e dos eletrólitos, e também pela excreção de toxinas e fluidos [11]. Os rins filtram cerca de 180 litros de sangue diariamente, removendo desta forma os produtos metabólicos residuais. Para além disso, os rins regulam a pressão sanguínea, a produção de eritrócitos e a circulação de cálcio [12]. A realização destas funções de forma incorreta, pode resultar num excesso de fluidos e metabólitos, e pode perturbar os processos de regulação [11].

A grande maioria das variantes de cancro que ocorrem no rim, tomam globalmente a designação de carcinoma de células renais, sendo este tipo de cancro o 13º mais comum mundialmente, com 330 mil incidências anuais [2] e sendo responsável por mais de 100 mil mortes [3]. A sobrevivência a esta doença maligna, que tem origem no revestimento do túbulo contorcido proximal, é dependente de fatores como o envolvimento regional dos nódulos, a contenção das metástases e a avaliação do estado em que o tumor se encontra quando é feito o diagnóstico. Atualmente, o diagnóstico ocorre mais comumente no estado I da doença, o que se traduz num potencial de curabilidade em 70% dos tumores, pois, neste estado, os tumores possuem dimensões bastante pequenas, permanecendo confinados aos órgãos, sem ocorrer disseminação de células tumorais para a corrente sanguínea. Para além disso, 97% dos pacientes que são diagnosticados neste estado, têm uma esperança de sobrevivência de 5 anos. No entanto, quando o diagnóstico é feito posteriormente, em estados mais avançados do cancro, verifica-se a ocorrência de metástases, sendo o prognóstico bastante desfavorável [13].

Dado que a deteção precoce dos tumores renais possibilita maiores taxas de sobrevivência, torna-se evidente a importância de desenvolver métodos minimamente invasivos que sejam capazes de detetar este tipo de cancro nas fases iniciais do seu desenvolvimento. Um dos métodos utilizados para o diagnóstico do cancro renal é a tomografia computadorizada, onde as imagens pré-contraste auxiliam na identificação de calcificações, hemorragias e gorduras, permitindo a caracterização de massas renais, e as imagens pós-contraste ajudam na deteção da massa renal e determinação da vascularização [14]. Outro método de diagnóstico usado neste tipo de cancro é a

ressonância magnética abdominal, que é utilizada para criar imagens da veia cava inferior, podendo servir como alternativa à tomografia computadorizada na detecção de massas renais, quando o paciente possui alergia ao material de contraste ou quando tem insuficiência renal [15].

Dado que os rins se encontram no interior da cavidade abdominal, estas técnicas produzem imagens com baixo contraste e resolução. A necessidade de desenvolvimento de novos métodos não invasivos ou minimamente invasivos e que permitam o estabelecimento de um diagnóstico fidedigno sem recurso a radiação ionizante é grande.

2.2. Tecnologias óticas em medicina

A utilização de tecnologias óticas para criar novos procedimentos de diagnóstico constitui uma alternativa muito promissora e que tem sido objeto de investigação intensa nos últimos 30 anos. As tecnologias óticas têm como benefícios o facto de não utilizarem radiação ionizante e de permitirem aproximações não invasivas ou minimamente invasivas para diagnosticar de forma rápida e eficaz patologias como o cancro.

Os tecidos biológicos apresentam diferentes propriedades óticas e sabe-se que quando se desenvolvem patologias como o cancro ou a diabetes, tais propriedades sofrem alterações, tanto em magnitude como na sua dependência no comprimento de onda [9–11]. Desta forma, a avaliação das propriedades óticas espectrais permite obter características diferenciadas entre tecidos saudáveis e com patologia, características essas que podem ser usadas na criação de um diagnóstico.

Atualmente, a avaliação das propriedades óticas de tecidos biológicos ainda requer medições feitas de forma invasiva, ou com tecidos na sua forma *ex vivo* [16]. Por outro lado, os métodos mais fidedignos para avaliação dessas propriedades óticas, são o de Monte Carlo inverso ou o de Adding-Doubling inverso [17]. Para além de necessitarem de medições feitas de tecidos *ex vivo*, estas simulações apenas estimam as propriedades óticas para um único comprimento de onda de cada vez [5]. Uma abordagem mais rápida para calcular de imediato os espectros das propriedades óticas de tecidos (pelo menos as mais fundamentais) foi recentemente proposto [9, 11]. No entanto, a necessidade de se mapear as propriedades óticas de tecidos biológicos (normais e patológicos) é grande, mesmo recorrendo a medições invasivas. A comparação entre tais propriedades de tecidos

normais e patológicos permite avaliar diferenças que podem permitir um diagnóstico. Um exemplo disto foi publicado recentemente pelo grupo de ótica médica do CIETI, em que uma análise do coeficiente de absorção espectral de tecidos da mucosa colorectal humana permitiu mostrar que os tecidos patológicos apresentam um conteúdo superior de lipofuscina quando comparados com tecidos saudáveis [4–7]. Uma observação de características distintas foi também observada no coeficiente de absorção espectral de tecidos saudáveis e com cancro do fígado humano [18]. Uma outra propriedade ótica dos tecidos que permite estabelecer um diagnóstico e que pode ser medida de forma minimamente invasiva, ou até de forma não invasiva, é o índice de refração (IR) espectral (habitualmente designado por dispersão) de um tecido. Tal medição já demonstrou que os tecidos com cancro apresentam maior conteúdo de lípidos, quando comparados com os tecidos saudáveis correspondentes [10, 19].

A grande dificuldade na aplicação das tecnologias óticas para se estabelecer um diagnóstico é o forte espalhamento que os tecidos apresentam na sua forma natural e que limita fortemente a profundidade de penetração da luz de um feixe colimado [16]. Devido a este forte espalhamento, as técnicas de imagem ou de espectroscopia ótica não conseguem recolher informação a grandes profundidades dentro dos tecidos ou órgãos biológicos para se estabelecer um diagnóstico. Para resolver este problema, torna-se necessária a aplicação de métodos complementares que permitam a redução do espalhamento dentro dos tecidos, levando a um aumento da profundidade de penetração da luz, o que permite conseguir aumentar o contraste e a resolução nas imagens ou o sinal dos espectros medidos a profundidades consideráveis [8, 12]. Existem alguns métodos para reduzir o espalhamento nos tecidos e que podem ser consultados na literatura [12, 16]. De todos esses métodos para criar efeitos de transparência nos tecidos, o método de imersão ótica é o que tem apresentado melhores resultados, uma vez que permite criar transparências de elevada magnitude, sem criar efeitos secundários indesejáveis, é perfeitamente reversível quer em tecidos *in vivo*, quer em tecidos *ex vivo* e pode ser ajustado para intervalos de tempo reduzidos, se tal for necessário [8, 12]. Estes tratamentos reduzem o espalhamento nos tecidos por substituição parcial ou total da água do tecido por um agente inócuo e hiperosmótico, com um IR mais elevado do que o da água e mais próximo do IR dos restantes componentes do tecido [16]. Medições óticas feitas durante estes tratamentos podem também ser usadas para diagnóstico [21], por avaliação discriminada das propriedades de difusão da água e do agente de transparência

no tecido [22], ou até para quantificar a quantidade de água móvel, que já se mostrou diferenciada entre tecido normal e com patologia [23]. Estudos feitos durante a aplicação de tratamentos deste tipo permitiram obter dados discriminatórios para o diagnóstico da diabetes [18, 19] e do cancro colorectal [26]. Cálculos feitos a partir de medições da transmitância colimada (T_c) de tecidos colorectais humanos, levaram às variações do IR durante os tratamentos aplicados. Tais variações mostraram-se também distintas entre tecidos saudáveis e com cancro [27].

Os tratamentos de transparência têm sido aplicados pelo Homem de forma inadvertida desde a antiguidade [16]. A primeira evidência científica do aumento de transparência de tecidos foi publicada em 1911 e 1914 pelo anatomista alemão Werner Spalteholz, onde refere pela primeira vez o mecanismo de adaptação de índices de refração [28, 29]. Evidência do mecanismo de desidratação dos tecidos foi reportada mais tarde, em 1939 [30]. Estes são os dois mecanismos fundamentais que criam transparência nos tecidos biológicos, quando imerso num agente com forte osmolaridade. Quando uma amostra de um tecido biológico é imersa numa solução com elevada concentração de um agente de transparência, como a glicerina, a pressão osmótica criada pela glicerina sobre o tecido, força a saída de água dos espaços intersticiais do tecido, dando origem a uma rápida desidratação, que ocorre nos primeiros minutos do tratamento. Com a saída da água dos interstícios do tecido, os restantes componentes biológicos aproximam-se entre si, levando a uma diminuição da amostra em estudo. Após esta diminuição rápida de espessura do tecido por perda de água para o exterior, a glicerina no exterior passa a dominar as operações de criação de transparência, com uma difusão contínua e homogénea para o interior do tecido, indo ocupar os espaços intersticiais que anteriormente estavam preenchidos pela água. Esta difusão de glicerina para os espaços intersticiais cria o mecanismo de adaptação de índices de refração, uma vez que o IR da glicerina é significativamente superior ao da água que lá se encontrava, em estado natural e mais aproximado ao IR dos restantes componentes biológicos do tecido. A substituição da água pela glicerina e a consequente adaptação de índices de refração está na base da redução do espalhamento da luz [16]. A medição de parâmetros que caracterizem os fluxos de água para o exterior e de glicerina (ou de outro agente de transparência) para o interior do tecido permitem caracterizar os mecanismos de desidratação e de adaptação de índices de refração [10, 29].

Um terceiro mecanismo foi descoberto mais recentemente, em tratamentos aplicados a tecidos da pele. Este mecanismo de transparência, designado por dissociação de proteínas [32], não ocorre sempre, visto que depende da capacidade do agente de transparência em dissociar as proteínas e também do conteúdo de proteínas que o tecido a tratar possui [16]. A sua deteção requer o uso de técnicas de imagem sofisticadas, como a técnica de *imagem de segundo harmónico* [33], ou de espectroscopia de UV profundo, na zona dos 200 nm, onde as bandas de absorção das proteínas ocorrem [21].

Nos últimos 30 anos, têm sido realizados muitos estudos para avaliar a transparência criada pelo método de imersão ótica. Foram feitos estudos para avaliar a magnitude da transparência criada em função da osmolaridade do agente de transparência na solução de tratamento [34], ou para avaliar o potencial de misturas com mais do que um agente de transparência em solução aquosa [35]. Outros estudos foram feitos para avaliar diferentes tipos de agentes de transparência [16]. Os agentes que se utilizam atualmente para criar efeitos de transparência em tecidos biológicos são de variada natureza, mas estão agrupados em 4 grupos essenciais: açúcares, álcoois, soluções eletrolíticas e óleos naturais. Podemos encontrar a frutose ou a glucose no grupo dos açúcares, a glicerina ou o propileno glicol no grupo dos álcoois e no grupo das soluções eletrolíticas o Trazograph™, o Gadovist™, ou o Verographin™, que são produtos comerciais vendidos para a realização de exames médicos de radiologia por imagem [16]. O grupo dos óleos e géis naturais constitui um conjunto de produtos comerciais usados em dermatologia e em culinária, que se encontram ainda pouco explorados como agentes de transparência. Fazem parte deste grupo o óleo de rícino, o gel da planta de aloé vera, o óleo de cravo ou o bálsamo do Canadá. Todos estes produtos aqui mencionados são inócuos para os tecidos e já demonstraram características favoráveis à criação de transparência em tecidos biológicos [16]. Outros potenciais agentes de transparência, nomeadamente, alguns produtos naturais e óleos de produtos naturais, ainda não foram estudados. Assim, existe uma necessidade de realizar estudos para avaliar a magnitude da transparência criada por estes produtos, a sua capacidade de dissociação de proteínas, efeitos adversos criados e outros parâmetros de importância para que possam ser usados em futuros procedimentos de diagnóstico ou de tratamento *in vivo*, onde a criação de transparência seja necessária.

Dado que o presente trabalho se foca na avaliação de parâmetros óticos que discriminem o cancro do rim, foram usadas técnicas experimentais para avaliar as

propriedades óticas de tecidos de rim saudável e com cancro. Foram também feitos estudos de transparência ótica por imersão com o mesmo objetivo e também para caracterizar os mecanismos de desidratação e de adaptação de índices de refração, nos dois tipos de tecido em estudo. As próximas secções serão utilizadas para descrever o estado da arte relativo aos métodos experimentais aplicados neste trabalho.

2.3. Avaliação das propriedades óticas de tecidos biológicos

O estudo das propriedades óticas dos tecidos iniciou-se na década de 1950, tendo-se intensificado desde a década de 1990 devido ao surgimento de novos equipamentos óticos que permitam a aplicação em medicina e que levaram ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de tecnologias óticas, que podem ser utilizadas para a realização de diagnósticos, terapia e cirurgia não invasiva ou minimamente invasiva [1, 2]. Com a crescente investigação e a aplicação de técnicas óticas em diferentes procedimentos, verificou-se que a luz de vários comprimentos de onda é útil nesta área. Atualmente, estão a ser feitos estudos com técnicas que utilizam luz desde a zona do UV profundo até à gama de frequências dos THz [8].

Qualquer tecido biológico apresenta várias propriedades óticas, sendo as mais fundamentais o IR, o coeficiente de absorção (μ_a), o coeficiente de espalhamento (μ_s) e o fator de anisotropia (g) [12, 14]. O IR de um tecido é uma propriedade média que considera as contribuições de todos os componentes do tecido em estudo. Para além de quantificar a velocidade de propagação da luz no interior dos tecidos, por ser uma combinação de valores de IR baixos dos fluidos com valores significativamente elevados dos restantes componentes (vulgarmente designados por *scatterers*), o IR é também uma medida do espalhamento que ocorre no interior. O μ_a é uma propriedade que quantifica quantos fótons são absorvidos por unidade de comprimento no percurso do feixe dentro do tecido. Ao contrário do IR que é uma grandeza adimensional, o μ_a é em geral representado em unidades de cm^{-1} (ou de mm^{-1}). Da mesma forma, μ_s é representado nas mesmas unidades e é uma propriedade que quantifica quantos fótons são espalhados por unidade de comprimento no percurso de um feixe dentro do tecido. A medição da direccionalidade desse espalhamento é quantificada em g , que pode variar entre -1 (reflexão total) e +1 (transmissão colimada total) [12, 14]. Estas propriedades fundamentais podem ser usadas para calcular outras, que também são úteis. São disso

exemplo o coeficiente de espalhamento reduzido (μ'_s), que quantifica em simultâneo o espalhamento e a direccionalidade desse espalhamento, e a profundidade de penetração da luz (δ), que é habitualmente medida em mm [5].

Para avaliar estas propriedades óticas podem ser utilizadas diferentes técnicas, como a espectroscopia ou técnicas de imagem como a microscopia confocal e a tomografia ótica coerente [16]. A espectroscopia é uma opção muito útil quando pretendemos obter as propriedades óticas espectrais de um determinado tecido. Para além de ser um método que envolve instrumentação de baixos custos, permite obter todas as propriedades óticas fundamentais com cálculos simples, tal como descrito em publicações recentes [5, 15, 28]. Dado que foi este método que usamos no presente trabalho, as subsecções 2.3.1 a 2.3.4 descrevem a teoria que permite o cálculo das propriedades óticas fundamentais dos tecidos a partir de medições espectrais, assim como obter μ'_s e δ .

2.3.1. Índice de Refração

Tal como referido anteriormente, o IR é uma propriedade ótica que quantifica a velocidade de propagação da luz no interior de um tecido e que pode ser medida diretamente [38]. O conhecimento dos valores de IR a certos comprimentos de onda é deveras importante, pois permite otimizar procedimentos de diagnóstico ou de cirurgia laser. Se, por outro lado, se obtiver a dispersão de um determinado tecido numa banda espectral alargada, consegue-se não só a informação necessária para otimizar tais procedimentos clínicos, como se pode retirar informação de diagnóstico diretamente da dispersão obtida [5, 10]. Artigos recentes mostram que a obtenção da dispersão continua de tecidos entre o UV profundo e o IV permite avaliar o conteúdo de sangue e de lípidos e que por vezes esses conteúdos são discriminados entre tecidos saudáveis e com patologia [4, 5, 28].

A instrumentação atualmente existente para obter o IR ou a dispersão de um determinado tecido está mais focada na realização de medições discretas de IR a comprimentos de onda específicos. Existem os refratómetros de Abbe, que podem ser usados para medir o IR de líquidos e outros materiais sólidos, como tecidos finos, mas o valor medido está referido a 589.6 nm. Existem atualmente dois modelos da empresa ATAGO (Japão) que permitem medir o IR de amostras a vários comprimentos de onda desde o UV até ao IV [39]. O método de reflexão interna total constitui uma alternativa

barata para medir o IR, com a vantagem de permitir a utilização de lasers com comprimentos de onda distintos para medir o IR dos tecidos a esses comprimentos de onda [40]. Uma versão melhorada deste método foi divulgada recentemente, apresentando a possibilidade de usar uma lâmpada de xénon e um espectrofotómetro para medir espectros a vários ângulos de reflexão e assim permitir obter a dispersão de forma mais ou menos imediata [41].

Uma alternativa para se obter a dispersão de um tecido baseia-se na aplicação das relações de Kramers-Kronig (K-K) [33, 34]. Este método é muito vantajoso se o espectro de μ_a ($\mu_a(\lambda)$) estiver disponível. O primeiro passo consiste em aplicar a primeira relação de K-K para calcular a parte imaginária do IR ($\kappa(\lambda)$) do tecido [33, 34]:

$$\kappa(\lambda) = \frac{\lambda}{4\pi} \mu_a(\lambda). \quad (1)$$

Depois de calculado $\kappa(\lambda)$, pode calcular-se a parte real do IR do tecido ($n(\lambda)$) com a segunda relação de K-K [33, 34]:

$$n(\lambda) = 1 + \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{\lambda}{\Lambda} \times \frac{\lambda}{\Lambda^2 - \lambda^2} \kappa(\lambda) d\Lambda, \quad (2)$$

em que Λ representa a variável de integração e λ é um comprimento de onda fixo que pode ser ajustado para melhorar o ajuste da dispersão calculada a valores conhecidos. Este método, e em particular o ajuste aqui descrito para a dispersão, pode ser otimizado, se por exemplo, tivermos valores de IR discretos que foram medidos experimentalmente. Uma boa opção para obter tais valores consiste em utilizar o método de reflexão interna total para obter os valores de IR do tecido para comprimentos de onda distintos (com diferentes lasers) numa banda espectral alargada [40]. Este procedimento foi já usado em vários estudos recentes [5, 28, 31], começando-se por medir os valores de IR do tecido com lasers a comprimentos de onda entre o UV e o IV. Os valores médios obtidos com os diferentes lasers são ajustados com curvas típicas para calcular a dispersão de tecidos biológicos. Tais curvas são descritas por equações como a equação de Cauchy (Eq. (3)), a de Conrady (Eq. (4)), ou a de Cornu (Eq. (5)) [16].

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \quad (3)$$

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda} + \frac{C}{\lambda^{3.5}} \quad (4)$$

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{(\lambda - c)} \quad (5)$$

Relativamente às três equações anteriores, os parâmetros A, B e C são estimados durante o ajuste dos valores de IR discretos obtidos com o método de reflexão interna total com as equações (3), (4) ou (5). Tais curvas podem ser testadas para ajustar os valores de IR do tecido e a escolha recai na curva cuja equação produzir um melhor ajuste, ou seja, aquela que produzir um valor de R^2 mais elevado. A curva de dispersão escolhida durante esse ajuste servirá como referência para posteriormente se obter a real curva de dispersão contínua que é obtida a partir de μ_a pelas relações de K-K descritas pelas equações (1) e (2).

No que diz respeito ao rim, existem alguns valores de IR publicados para certos comprimentos de onda. Considerando o comprimento de onda de 628.3 nm, *Bolin et al.* mediram o valor de 1.417 para o rim humano saudável à temperatura ambiente com um refratômetro de fibra ótica [44]. No presente ano, um grupo grego publicou um artigo [45], com valores de IR para vários tecidos a diferentes comprimentos de onda. Neste artigo são apresentados os seguintes valores para o rim saudável à temperatura de 25 °C: 1.519 (450 nm), 1.513 (532 nm), 1.500 (633 nm) e 1.493 (964 nm) [46]. Este estudo foi realizado usando o método de reflexão interna total e as medições foram feitas à temperatura ambiente. Um outro estudo recente que também utilizou o método de reflexão interna total, mas com tecidos saudáveis e patológicos da mucosa colorretal humana mostrou que o tecido patológico contém mais lípidos e apresenta valores de IR superiores aos observados para o tecido saudável [47].

2.3.2. Coeficiente de absorção e coeficiente de espalhamento

Em oposição ao IR, as restantes propriedades óticas dos tecidos biológicos não podem ser medidas diretamente. A forma de as obter passa pelo uso de formalismos matemáticos descritos na teoria do transporte da radiação em tecidos biológicos [17].

Considerando, em primeira análise, duas dessas propriedades óticas que são fundamentais (μ_a e μ_s), os seus valores podem ser determinados por cálculo, usando medições feitas a partir de amostras dos tecidos em estudo. Os primeiros estudos que fizeram uso desses formalismos utilizaram medições discretas de transmitância total (T_t), de refletância total (R_t) e de transmitância colimada (T_c), que foram obtidas com lasers cuja emissão ocorre a um comprimento de onda único. No entanto, estudos mais recentes que fazendo uso de fontes de espectro alargado, como lâmpadas de tungstênio-halogênio ou de xénon e espectrofotômetros, permitiram aplicar os mesmos formalismos para obter de forma rápida os espectros de μ_a e de μ_s a partir dos espectros de T_t , de R_t e de T_c [4, 5, 28]. Tal formalismo de cálculo é muito simples e rápido de implementar.

Considerando os espectros de T_t e de R_t medidos de uma amostra de tecido com espessura uniforme, o espectro de absorvância (A_b) do tecido pode ser calculado como [37]:

$$A_b(\lambda) = 1 - \left(\frac{T_t(\lambda) + R_t(\lambda)}{100} \right). \quad (6)$$

Na Eq. (6) os espectros de T_t e de R_t são normalizados por um fator de 100 e o espectro de A_b calculado representa toda a luz que é absorvida pelo volume da amostra de tecido em estudo. Para calcular o espectro de μ_a do tecido, basta dividir o espectro obtido pela Eq. (7) pela espessura do tecido, d [5]:

$$\mu_a(\lambda) = \frac{A_b(\lambda)}{d}. \quad (7)$$

Uma vez obtido o espectro de μ_a do tecido, vários cálculos podem ser realizados para obter os espectros de outras propriedades óticas. Um desses cálculos foi já descrito na subsecção anterior para obter a dispersão do tecido pelas relações K-K, representadas nas Eqs. (1) e (2). Outro cálculo que pode ser feito usando o espectro de μ_a serve para obter o espectro de μ_s . Tal cálculo é feito com a equação de Bouguer-Beer-Lambert [10, 11, 13]:

$$\mu_s(\lambda) = -\frac{\ln[T_c(\lambda)]}{d} - \mu_a(\lambda), \quad (8)$$

onde se utiliza o espectro de T_c medido da amostra de tecido em estudo, assim como a sua espessura, d .

2.3.3. Coeficiente de espalhamento reduzido

Enquanto o formalismo do transporte da radiação em tecidos biológicos permite calcular diretamente os espectros de μ_a e de μ_s , no caso de μ'_s não existe nenhuma equação que permita o seu cálculo a partir de medições feitas do tecido. Para se obter esta propriedade temos que forçosamente recorrer a simulações computacionais. Os métodos tradicionais mais fiáveis de simulação para obter as propriedades óticas de tecidos biológicos são o de Monte Carlo inverso [48] e o de Adding-Doubling inverso [49]. Quer se use um método ou o outro, os códigos disponíveis apenas permitem realizar simulações para comprimentos de onda individuais de cada vez [50]. Analisando estes códigos, o de Monte Carlo inverso permite gerar em simultâneo μ_a , μ_s e g , desde que se utilizem nessas simulações os valores de T_t , de R_t e de T_c para um determinado comprimento de onda. O código de Monte Carlo inverso não está disponível, mas como indicado pelos seus autores, pode ser construído a partir do código de simulação direta que está disponibilizado online [50]. Dado que a construção de códigos de simulação não era um dos objetivos do presente trabalho, e como o código de Adding-Doubling inverso disponível gera diretamente μ'_s com grande fiabilidade e precisão [5], iremos considerar tal código para estimar os valores de μ'_s dos tecidos do rim humano. Para se realizarem estas simulações são necessários como input de simulação os valores de IR , de T_t , de R_t e de T_c do tecido a um determinado comprimento de onda. Embora na literatura não esteja indicado nenhum formalismo de cálculo para obter o espectro de μ'_s , existe uma equação que descreve o comportamento desta propriedade em função do comprimento de onda [51]. De acordo com *Steven Jacques*, os tecidos biológicos apresentam uma combinação de dois regimes de espalhamento da luz – o regime de Mie e o regime de Rayleigh, regime global esse que é bem descrito pela Eq. (9) [51]:

$$\mu'_s(\lambda) = \alpha' \left(f_{Ray} \left(\frac{\lambda}{500 \text{ nm}} \right)^{-4} + (1 - f_{Ray}) \times \left(\frac{\lambda}{500 \text{ nm}} \right)^{-b_{Mie}} \right), \quad (9)$$

onde f_{Ray} representa a fração de espalhamento de Rayleigh e b_{Mie} representa a dimensão média das partículas que criam o espalhamento de Mie [5, 15]. Uma vez que o espectro de μ'_s é bem descrito pela Eq. (9), torna-se possível realizar as simulações de Adding-Doubling inverso para um número reduzido de comprimentos de onda e depois ajustar os valores de μ'_s gerados com esta equação em toda a banda espectral considerada no estudo.

2.3.4. Fator de anisotropia e profundidade de penetração da luz

As duas últimas propriedades óticas que vamos estudar nos tecidos de rim são g e δ . Apesar de g ser também uma das propriedades óticas fundamentais e de δ ser calculado a partir de outras, estas duas propriedades são muito úteis para caracterizar a interação de um feixe de luz com os tecidos biológicos. Considerando novamente o formalismo da teoria de transporte da radiação em tecidos biológicos, estas duas propriedades não podem ser obtidas diretamente de medições recolhidas dos tecidos. No entanto, tal formalismo contém equações que relacionam estas propriedades com outras que já descrevemos nas subsecções anteriores.

Relativamente a g , e tal como foi já referido, trata-se de uma propriedade ótica que quantifica a direccionalidade do espalhamento que ocorre dentro dos tecidos biológicos. Considerando um elevado número de fótons num feixe colimado que atravessa uma amostra de tecido com uma espessura bem definida, o espalhamento que ocorre no interior faz com que os fótons espalhados tomem várias direções distintas e diferentes da sua direção original. Considerando o ângulo entre a nova direção de um fóton espalhado e a sua direção de propagação original, g corresponde à média do cosseno desse ângulo depois de obtido para todas as direções de fótons espalhados [52]. Os valores que g pode tomar variam entre -1 e 1, tal como referido anteriormente, e um caso de particular interesse é o do espalhamento isotrópico, que ocorre quando $g=0$ [12, 43]. Existe uma relação entre g , μ_s e μ'_s , que nos permite calcular o espectro de g após se terem determinado os espectros de μ_s e de μ'_s [5].

$$g(\lambda) = 1 - \frac{\mu'_s(\lambda)}{\mu_s(\lambda)}. \quad (10)$$

Considerando o espectro de g para tecidos biológicos, é normal que cresça desde o ultravioleta até ao infravermelho [5, 15, 28]. Estudos recentes mostram que tal crescimento é bastante acentuado na zona do ultravioleta, começando com valores muito próximos de 0 a 200 nm e atingindo valores acima de 0.8 no início da banda espectral do visível. Entre o visível e o infravermelho próximo (até 1000 nm) os valores de g tem uma tendência de se manterem mais ou menos constantes ou com um crescimento linear muito pouco significativo [5, 15, 28].

Considerando o espectro de δ , verifica-se também um crescimento dos seus valores desde os 200 até aos 1000 nm, mas enquanto g não é sensível às bandas de absorção dos componentes dos tecidos biológicos, δ é bastante sensível a essas bandas, podendo-se identificar a presença de sangue, de lípidos e de água com facilidade no seu espectro [37]. Tal sensibilidade do espectro de δ à presença dos componentes biológicos nos tecidos é criada pela forte contribuição de μ_a no cálculo de δ [12, 44]:

$$\delta(\lambda) = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a(\lambda)(\mu_a(\lambda) + \mu'_s(\lambda))}}. \quad (11)$$

O procedimento de cálculo das várias propriedades óticas que foi sendo descrito nas subseções anteriores e na presente, constitui uma forma rápida de obtenção de várias propriedades de um tecido na forma espectral e que apenas recorre a algumas simulações de Adding-Doubling inverso para obter um conjunto minimamente significativo de valores de μ'_s . Tal procedimento pode ser aplicado a qualquer banda espectral, desde que as medições espectrais dos tecidos em estudo estejam disponíveis para a banda desejada. No caso de existirem vários espectros medidos de cada tipo, torna-se possível calcular os espectros médios e respetivos desvios padrão para cada uma das propriedades óticas em estudo.

2.4. Efeitos de transparência e seus mecanismos

O forte espalhamento que é característico dos tecidos biológicos constitui uma grande limitação à plena aplicação das tecnologias óticas em procedimentos de diagnóstico e curativos, uma vez que limita a profundidade e a colimação de um feixe ótico em tecidos biológicos [16, 27, 28]. Para vencer tal forte espalhamento e melhorar o desempenho das tecnologias óticas nestes procedimentos clínicos, tem sido feito um

esforço intenso de investigação nos últimos 30 anos para que a criação de efeitos de transparência reversíveis e temporários nos tecidos permita proceder a diagnósticos e tratamentos com a luz a profundidades mais significativas [16]. A técnica de transparência ótica por imersão dos tecidos em agentes de transparência mostrou ser a mais promissora e tem dominado a investigação neste campo da ótica médica.

Vários estudos foram feitos desde meados da década de 1990, no sentido de investigar que mecanismos governam a criação da transparência em tecidos biológicos [10], assim como avaliar a magnitude e a duração desses efeitos em diferentes tipos de tecidos [12, 16]. Tais estudos têm produzido outros resultados de interesse clínico, uma vez que a aplicação dos tratamentos de transparência gera variações temporais de certos parâmetros nos tecidos que contém informação sobre a fisiologia e a patologia interna dos tecidos em tratamento. Considerando como exemplo estudos realizados com tecidos saudáveis e patológicos da mucosa colorectal em tratamento de transparência, conseguiu-se avaliar que o tecido patológico tem um conteúdo de água móvel que é cerca de 5% superior ao obtido no tecido saudável [6]. A água móvel constitui a fração de água nos fluídos intersticiais que é capaz de se mover para transportar nutrientes para as células. Um outro estudo realizado com espectroscopia na zona do ultravioleta mostrou a criação de janelas de transparência em tecidos gengivais e coloreticais com eficiências muito elevadas, sugerindo que para esses comprimentos de onda, os tecidos se tornam quase totalmente transparentes [21]. Este estudo mostrou também que a glicerina é capaz de dissociar proteínas em tecidos da mucosa colorectal, e que a taxa de dissociação é cerca de 3× superior na mucosa patológica, quando comparada com a taxa obtida na mucosa saudável. Este resultado é muito importante clinicamente, uma vez que se sabe que o conteúdo de proteínas nos tecidos com cancro é muito superior aos tecidos saudáveis [54], e a verificação de que ocorre uma dissociação forte de proteínas durante a criação de transparência abre portas à aplicação destes tratamentos para travar o avanço do cancro.

A avaliação da taxa de dissociação de proteínas constitui um método de caracterizar esse mecanismo de transparência, mas a sua avaliação não é fácil, pois depende do conteúdo de proteínas no tecido em estudo e da capacidade do agente de transparência em criar essa dissociação. Quanto aos outros dois mecanismos de transparência, nomeadamente a desidratação dos tecidos e a adaptação de índices de refração, tem-se verificado que ocorrem sempre e em qualquer tecido em tratamento com qualquer agente [10, 16, 29]. Para caracterizar estes dois mecanismos universais dos

efeitos de transparência, e uma vez que eles estão diretamente ligados aos fluxos de água para o exterior e de agente para o interior, basta avaliar as propriedades de difusão da água e do agente no tecido, nomeadamente o tempo e o coeficiente de difusão. Tais parâmetros caracterizam não só os fluxos da água e do agente, mas também os mecanismos de transparência associados a esses fluxos [6]. A realização de um estudo completo de tratamentos de transparência em tecidos saudáveis e patológicos de um determinado tipo possibilita avaliar a variação das propriedades óticas desses tecidos [55] e permite eventualmente obter informação discriminatória da patologia, tal como foi já demonstrado para a mucosa coloretal humana [23].

Dado que os objetivos do presente trabalho consistem na avaliação das propriedades óticas espectrais de tecidos do rim saudável e patológico e estudar as propriedades de difusão de água e de um agente de transparência nos dois tecidos para obter informação discriminada, o capítulo 3 do presente documento descreve os procedimentos adotados na investigação desenvolvida. Os resultados obtidos nesta investigação e a respetiva discussão encontram-se apresentados no capítulo 4.

CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA

3. Metodologia

Uma vez que no presente trabalho foram feitos diferentes tipos de estudos para obter as propriedades óticas espectrais dos tecidos do rim e as propriedades de difusão da glicerina e da água nesses tecidos, torna-se necessário descrever cada um dos procedimentos experimentais usados. Para o fazer, descrevem-se na secção 3.1 os procedimentos experimentais de medição e de cálculo para obter os valores discretos de IR dos tecidos do rim, sendo a secção 3.2 usada para descrever os estudos de espectroscopia para obter as propriedades óticas espectrais e a secção 3.3 para descrever os estudos que levaram à estimação das propriedades de difusão da glicerina e da água nestes tecidos.

3.1. Índice de refração

Para medir os valores discretos de IR dos tecidos do rim humano, que servem para calcular a sua dispersão, foi utilizado o método de reflexão interna total [33, 40, 49].

3.1.1. Amostras de tecido

As amostras de tecidos de rim humano foram recolhidas de espécimes cirúrgicos de doentes em tratamento no Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-Porto). Estes doentes assinaram uma declaração, autorizando o uso de tecidos recolhidos cirurgicamente para fins de diagnóstico e de investigação. Os espécimes cirúrgicos recolhidos foram preservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Serviço de Anatomia Patológica do IPO-Porto por um período de cerca de 15 h para serem preparados e utilizados no dia seguinte. Após este período de preservação, no dia seguinte pela manhã, os tecidos foram cortados com um crióstato (modelo CM1850 UV da LeicaTM, Wetzlar, Alemanha) para produzir amostras de estudo com uma superfície plana homogénea para aderir a uma face do prisma usado nas medições sem criar bolhas de ar. Estas amostras tinham uma forma mais ou menos retangular, com $1\text{ cm} \times 1,5\text{ cm}$ e espessura de mais ou menos 3 mm. Foram preparadas 3 amostras saudáveis e 3 com patologia (carcinoma de células renais cromóforo), provenientes de doentes distintos para usar nas medições de IR com o método de reflexão interna total. Todas as amostras foram submetidas a medição com diferentes lasers para obter o valor de IR a diferentes comprimentos de onda. Antes de serem usadas nas medições e entre medições, as amostras de tecido foram mantidas

imersas em soro fisiológico para manter a hidratação natural, tendo-se limpo o soro no exterior das amostras de cada vez que eram submetidas a um conjunto de medições.

3.1.2. Lasers utilizados

Para obter o IR de cada tipo de tecido do rim, cada uma das amostras a usar neste estudo foi sujeita a medições com diferentes lasers, com emissão a diferentes comprimentos de onda, entre o ultravioleta e o infravermelho: 401.4, 534.6, 626.6, 782.1, 820.8 e 850.7 nm. Estes comprimentos de onda de emissão dos lasers foram verificados com recurso a um espectrofotómetro da marca AvantesTM (Holanda). Os lasers com emissão a 534.6 e a 626.6 nm são das marcas Kvant (Eslováquia) e PASCO (EUA), respetivamente. Os restantes são lasers díodo comprados à Edmund Optics. Todos os lasers apresentam uma potência de emissão de 5 mW, ou ligeiramente inferior.

3.1.3. Procedimento de medição

Considerando um estudo para obter o IR de um dos tecidos do rim no comprimento de onda de um dos lasers usados, o procedimento de medição foi o seguinte. A amostra de tecido foi colocada em contacto perfeito com a base do prisma, como representado na montagem experimental apresentada na Fig. 1.

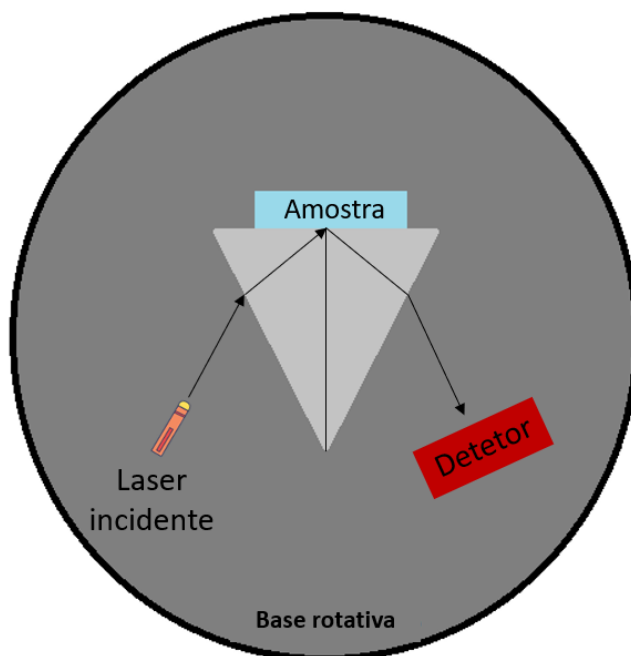


Figura 1 – Montagem experimental para as medições de IR com o método de reflexão interna total.

O prisma usado nestas medições é um prisma equilátero, construído com vidro do tipo SCHOTT N-SF11, que foi adquirido à Edmund Optics. A dispersão deste tipo de vidro encontra-se representada na Fig. 2 [56].

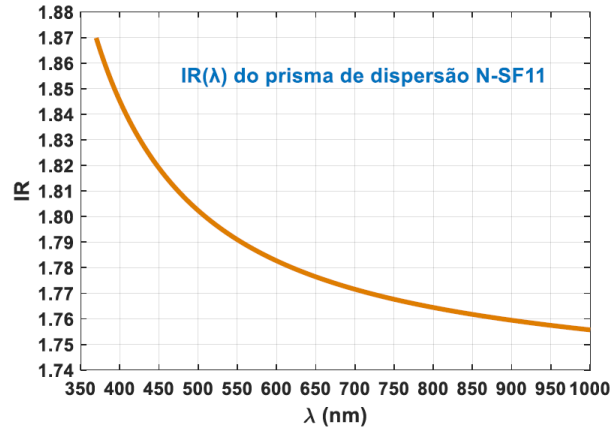


Figura 2 – IR do prisma de dispersão (vidro SCHOTT N-SF11) em função do comprimento de onda (λ).

A curva de dispersão representada na Fig. 2 é descrita pela equação de Sellmeier a 20 °C [56]:

$$n^2 - 1 = \frac{K_1\lambda^2}{\lambda^2 - L_1} + \frac{K_2\lambda^2}{\lambda^2 - L_2} + \frac{K_3\lambda^2}{\lambda^2 - L_3}, \quad (12)$$

sendo os coeficientes de Sellmeier para o vidro N-SF11 dados pelos seguintes valores: $K_1=1.7376$, $K_2=0.3137$, $K_3=1.8988$, $L_1=0.0132$, $L_2=0.0623$ e $L_3=155.2363$. Uma vez que λ é usado em μm na Eq. (12), K_1 , K_2 e K_3 são coeficientes sem dimensão e L_1 , L_2 e L_3 são representados em μm^2 .

Na montagem experimental representada na Fig. 1, o feixe laser entra no prisma por uma das suas faces laterais onde, por refração, é redirecionado para a interface prisma/tecido. A reflexão interna total ocorre nessa interface, sendo o feixe refletido direcionado para sair do prisma pela outra face lateral. Um detetor (sensor de potência ótica da Coherent – EUA) com banda de aquisição entre 0.5 e 11 μm é posicionado para recolher o feixe refletido após a sua saída do prisma. O sinal recolhido por este detetor é medido por um voltímetro da marca Wavetek Meterman (França).

Dado que o prisma se encontra sobre uma base rotativa (ver Fig. 1), foi possível fazer incidência com o laser a vários ângulos, o que permitiu medir a luz refletida em função do ângulo de incidência. Tal variação angular do feixe incidente no prisma obriga a rodar o detetor para que fique bem alinhado para recolher a luz refletida pela montagem.

A montagem apresentada na Fig. 1 foi usada para realizar três conjuntos de medições com cada laser e com cada amostra de tecido. A temperatura do laboratório foi mantida constante a 20 °C durante as medições realizadas com o procedimento seguinte:

1. Colocação da amostra de tecido em contacto com a base do prisma.
2. Iluminação da montagem com o feixe laser através de uma das faces laterais do prisma.
3. Leitura do potencial elétrico com voltímetro que corresponde ao feixe refletido que é detetado após sair pela outra face do prisma.
4. Repetição do procedimento para diferentes ângulos de incidência do feixe laser. A resolução angular para estas medições foi de 1°.

Após terminar cada conjunto de medições com um determinado laser, os valores medidos foram submetidos a cálculos para obter o valor de IR correspondente. Este procedimento foi realizado para todas as amostras de tecidos de rim e com todos os lasers disponíveis.

3.1.4. Cálculos para obter os valores do índice de refração

Considerando a montagem experimental apresentada na Fig. 1, e dado que os ângulos que o feixe incidente e refletido fazem com a normal às interfaces do prisma apenas podem ser medidos fora do prisma, nas interfaces prisma/ar, foi utilizada a equação de Snell-Descartes, representada na Eq. (13), para converter o ângulo do feixe incidente (ou refletido), medido fora do prisma (α), para o ângulo incidente (ou refletido) na interface prisma/tecido (θ) [57]:

$$\theta = \beta - \arcsin \left[\frac{1}{n_{prisma}} \times \sin (\alpha) \right], \quad (13)$$

onde β corresponde ao ângulo interno do prisma, ou seja, 60° , e n_{prisma} representa o IR que o prisma apresenta para o comprimento de onda do laser utilizado, que pode ser obtido através do gráfico da Fig. 2.

Considerando as medições do potencial elétrico e os ângulos correspondentes na interface prisma/tecido, calculou-se a curva de refletância da seguinte forma [58]:

$$R(\theta) = \frac{V(\theta) - V_{\text{ruído}}}{V_{\text{laser}} - V_{\text{ruído}}}, \quad (14)$$

onde $V(\theta)$ representa o potencial elétrico medido no ângulo θ , $V_{\text{ruído}}$ representa o potencial elétrico que é provocado pela luz ambiente, sem o laser estar ligado e V_{laser} corresponde ao potencial elétrico medido diretamente do laser em utilização.

Uma vez calculada a curva de reflectância, torna-se possível identificar o ângulo crítico de reflexão (θ_c). Para tal, calculou-se a primeira derivada da curva de reflectância com a Eq. (15) [40]:

$$\text{deriv}(\theta) = \frac{\text{Ref}(\theta_i) - \text{Ref}(\theta_{i-1})}{\theta_i - \theta_{i-1}}, \quad (15)$$

onde $\text{Ref}(\theta_i)$ representa a reflectância medida no ângulo θ_i , e $\text{Ref}(\theta_{i-1})$ representa a reflectância medida no ângulo θ_{i-1} . Estudos anteriores mostraram que as derivadas calculadas pela Eq. (15) apresentam um forte pico, que está centrado no ângulo crítico de reflexão do tecido - θ_c [33, 40, 49].

Depois de obtido o valor de θ_c para cada estudo realizado, esse valor foi usado na Eq. (16) para calcular o IR do tecido ao comprimento de onda do laser usado [59]:

$$n_{\text{tecido}}(\lambda) = n_{\text{prisma}}(\lambda) \times \sin(\theta_c). \quad (16)$$

Uma vez que foram feitos três estudos com cada laser para o rim saudável e para o rim patológico, foram calculados os valores médios e o desvio padrão para o IR de cada tipo de tecido a cada comprimento de onda. Desta forma podemos avaliar a distribuição de dados em torno da média em cada caso estudado.

Considerando os valores médios de IR obtidos a cada comprimento de onda para cada tipo de tecido do rim, fez-se uma tentativa de ajuste com as curvas de dispersão de Cauchy, de Conrady e de Cornu – Eqs. (3-5), tendo-se verificado que o melhor ajuste é obtido com a equação de Cornu (Eq. (5)) nos dois casos. Estas tentativas de ajuste foram feitas com a ferramenta *Curve Fitting Tool* do MATLABTM e quando se obteve o ajuste melhor, os parâmetros A, B e C da Eq. (5) foram estimados para os dois tecidos. Tais resultados e respectivas equações de dispersão obtidas para os tecidos de rim saudável e patológico encontram-se representados no capítulo 4.

3.2. Estudo das propriedades óticas espectrais

Dado que as curvas de dispersão que foram obtidas com o procedimento descrito na seção anterior não apresentam as assinaturas espectrais correspondentes aos componentes biológicos presentes nos tecidos de rim em estudo, tais curvas serão apenas usadas para servirem de referência na estimação de outras pelas relações de K-K (Eqs. (1-2)). As curvas de dispersão a calcular pelas Eqs. (1-2) são obtidas apenas depois de se calcular $\mu_a(\lambda)$, que será obtido por cálculo direto dos espectros medidos. O procedimento de cálculo para obter essas dispersões encontra-se descrito na subseção 3.2.3. Uma vez que tais curvas de dispersão e as restantes propriedades óticas espectrais vão resultar diretamente da medição de espectros dos tecidos, o seu cálculo irá resultar em propriedades que correspondem à mesma banda das medições espectrais realizadas – entre 200 e 1000 nm.

Vamos usar as próximas subseções para descrever como foram preparadas as amostras de tecidos a usar nas medições espectrais e como se realizaram tais medições.

3.2.1. Preparação de amostras de tecidos

As amostras de tecido de rim a usar nas medições espectrais foram preparadas no Serviço de Anatomia Patológica do IPO-Porto. Tal como as amostras que foram usadas nas medições de IR (ver subseção 3.1.1), as amostras para os estudos espectrais foram também preparadas com o crióstato (modelo CM1850 UV da LeicaTM, Wetzlar, Alemanha). Neste caso, e como se pretende usar amostras em forma de fatia, com uma

espessura bem definida, as amostras foram preparadas com uma área superficial aproximadamente quadrada com 1 cm de lado (ver Fig. 3) e espessura de 0.5 mm.

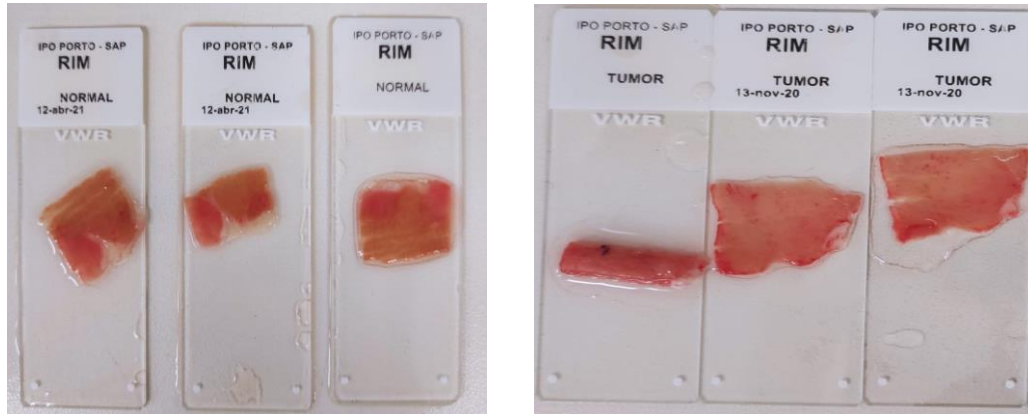


Figura 3 – Amostras de rim saudável (“normal” à esquerda) e patológico (“tumor” à direita) provenientes do IPO-Porto.

Como podemos ver nas fotografias da Fig. 3, as amostras de rim saudável (à esquerda) tem uma forma quase quadrada, enquanto as amostras de rim patológico (à direita) apresentam uma forma mais retangular. Uma das amostras de rim patológico encontra-se enrolada sobre si própria, parecendo ter uma área superficial menor.

Foram preparadas 10 amostras de cada tipo de tecido do rim para usar nas medições espectrais a realizar. No dia da realização destas medições para obter as propriedades óticas espectrais dos tecidos de rim, recolhemos os cortes pela manhã no IPO-Porto e ao chegar ao laboratório do CIETI, estas foram todas imersas em soro fisiológico (como se vê na Fig. 3) para manter a sua hidratação. Antes de se submeter cada amostra a medições, o soro foi retirado com papel absorvente. Neste estudo, foram feitas medições de espectros de T_t , de R_t e de T_c de cada uma das 20 amostras de tecido para se obterem resultados estatísticos no cálculo dos espectros das propriedades óticas do rim saudável e do rim patológico. Na próxima subsecção estão descritas as montagens usadas para a medição de cada um destes espectros.

3.2.2. Procedimento de medição de espectros

Para se medirem os espectros de T_t , de R_t e de T_c de cada amostra de tecidos de rim, entre os 200 e os 1000 nm, utilizaram-se diferentes montagens experimentais. Como se pode ver na Fig. 4, os espectros de T_t e de R_t foram medidos usando uma esfera integradora, enquanto os espectros de T_c foram medidos com uma montagem que permite a aquisição do feixe colimado que atravessa a amostra.

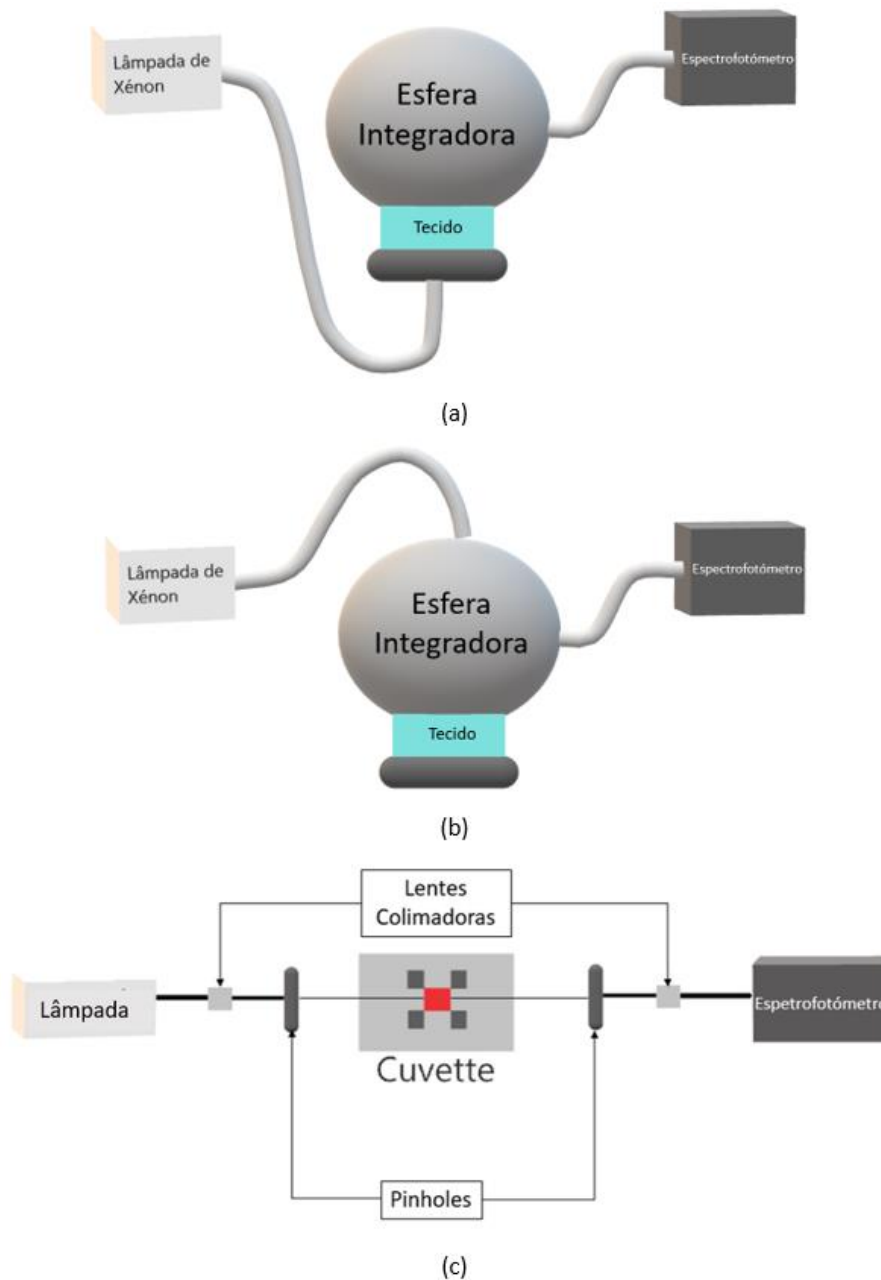


Figura 4 – Montagens experimentais para a aquisição dos espectros de T_t (a), de R_t (b) e de T_c (c).

Considerando a montagem experimental para medir os espectros de T_t (Fig. 4(a)), utilizou-se uma lâmpada de xénon pulsada de banda larga para iluminar a amostra. Um cabo de fibra ótica leva o feixe dessa lâmpada à montagem para o fazer incidir por baixo do tecido, que se encontra posicionado na porta da amostra da esfera integradora. Na extremidade oposta do cabo de fibra ótica, uma lente colimadora limita o feixe que atravessa a amostra a um diâmetro de 6 mm. Este feixe, que é transmitido pela amostra de tecido para o interior da esfera integradora, sofre reflexões sucessivas na parede interna da esfera (processo de integração), antes de ser entregue ao espectrofotómetro por intermédio de outro cabo de fibra ótica.

Considerando a montagem experimental para medir os espectros de R_t (Fig. 4(b)), utilizaram-se os mesmos equipamentos que foram usados na montagem de T_t (Fig. 4(a)), mas agora numa configuração diferente. O feixe proveniente da lâmpada de xénon, entra agora pela parte de cima da esfera integradora, com uma inclinação de 8° em relação à normal do tecido para que o feixe a integrar dentro da esfera seja o feixe que é refletido pela amostra, que se encontra novamente na porta da amostra da esfera integradora.

Para se medirem os espectros de T_c (ver Fig. 4(c)), uma lâmpada de deutério-halogénio foi utilizada. O feixe desta lâmpada é entregue na montagem pelo lado esquerdo, através de um cabo de fibra ótica e lente colimadora. Uma vez que o feixe à saída da lâmpada tem 6 mm de diâmetro, um *pinhole* de 1 mm de diâmetro é colocado à frente da lente para limitar o diâmetro do feixe incidente. Este feixe entra na cuvette que contém a amostra de tecido através de um vidro que apresenta transmitância constante e superior a 90% entre 170 e 2500 nm (UV fused silica window, UQG OPTICS, Reino Unido). A amostra está fixa no centro da cuvette por intermédio de um sistema mecânico, representado pelos quatro quadrados escuros no interior da cuvette na Fig. 4(c). Do lado direito, o feixe transmitido atravessa um outro vidro semelhante, antes de atravessar outro *pinhole* de 1 mm que limita o feixe que entra no cabo de fibra ótica pela lente colimadora, para ser enviado ao espectrofotómetro. Esta mesma montagem foi usada também para realizar as medições dos espectros de T_c durante os tratamentos de transparência. Se no caso dos espectros para obter as propriedades óticas espetrais, a cuvette da amostra contém ar no seu interior, nas medições durante os tratamentos, a amostra do tecido está imersa na solução de tratamento.

Em todas as medições realizadas com as diferentes montagens, os espectros de T_t , de R_t e de T_c foram medidos após se terem registados os respetivos espectros de referência

e de ruído para cada montagem. No caso dos espectros de R_t , o espectro de referência foi medido com um branco padrão, da AvantesTM (Holanda).

3.2.3. Cálculos para a obtenção das propriedades óticas

Após terem sido medidos 10 espectros com cada uma das montagens experimentais do mesmo número de amostras do rim saudável e outros tantos de amostras do rim patológico, foram iniciados cálculos para se obterem as propriedades óticas espectrais desses tecidos. O procedimento usado nestes cálculos foi o mesmo para o rim saudável e para o rim patológico.

Considerando o rim saudável como exemplo, começou-se por calcular a absorvância para dada uma das amostras de tecido usadas nas medições. Para isso, usaram-se os espectros de T_t e de R_t medidos de cada amostra na Eq. (6). Depois de obtidos os 10 espectros de absorvância, usou-se a Eq. (7) para calcular os espectros de μ_a . A espessura usada nos cálculos com a Eq. (7) foi $d=0.5$ mm. Com os resultados obtidos através da Eq. (7), procedeu-se ao cálculo do espectro médio e respetivo desvio padrão para μ_a .

De seguida, usando os 10 espectros de μ_a obtidos nas equações de K-K (Eqs. (1 e 2)), obteve-se 10 espectros contínuos de dispersão, com otimização no ajuste às curvas de dispersão calculadas a partir das medições discretas de IR. Foi também calculada a dispersão média e respetivo desvio padrão com as 10 dispersões obtidas pelas relações de K-K.

De seguida, e com o objetivo de se calcular o espectro de μ_s , usou-se a Lei de Bouguer-Beer-Lambert (Eq. (8)). Este cálculo foi feito 10 vezes, usando os espectros de T_c medidos das amostras e os espectros de μ_a calculados pela Eq. (7). Uma vez que a Eq. (9) é usada para descrever a dependência no comprimento de onda de μ_s e de μ'_s [51], usamos essa equação para determinar os seus parâmetros em cada espectro de μ_s calculado pela Eq. (8), e assim se obter equações bem definidas para cada um desses espectros.

O passo seguinte consistiu na determinação do espectro de μ'_s . Para tal começou-se por realizar simulações de Adding-Doubling inverso para cada um dos comprimentos de onda separados de 50 nm, entre 200 e 1000 nm. Este conjunto de simulações foi feito com dados retirados dos espectros medidos de cada uma das amostras estudadas. Os valores de μ'_s obtidos por simulação para os diferentes comprimentos de onda que

correspondem a cada uma das amostras foram ajustados também com a Eq. (9), para se obter a equação que descreve a dependência entre μ'_s e o comprimento de onda. Foram obtidas 10 equações deste tipo, uma para cada amostra estudada, o que permitiu calcular o espectro médio e respectivo desvio padrão para μ'_s .

Para calcular o espectro do fator de anisotropia, usou-se a Eq. (10). Este cálculo foi também realizado 10 vezes, usando os pares de espectros de μ_s e de μ'_s obtidos nos passos anteriores de cálculo. Com os 10 espectros do fator- g , calculou-se o espectro médio e o desvio padrão correspondente.

Finalmente, e usando a Eq. (11), calcularam-se 10 espectros de δ com os pares de espectros de μ_a e μ'_s obtidos nos cálculos descritos acima. Mais uma vez, foram obtidos o espectro médio e o desvio padrão para esta propriedade ótica.

Todos estes cálculos foram também feitos para o tecido de rim patológico e os respectivos espectros médios e desvios padrão para cada uma das propriedades óticas dos dois tipos de tecidos do rim humano encontram-se representados no capítulo 4. O procedimento para calcular as propriedades óticas espectrais aqui descrito é bastante simples e rápido de realizar, desde que se tenham recolhidos os espectros de T_t , de R_t e de T_c das amostras em estudo. Lembrando que todas as propriedades óticas são obtidas com cálculos diretos, com a exceção de μ'_s , que recorre a um conjunto reduzido de simulações de Adding-Doubling inverso, apresenta-se na Fig. 5 um fluxograma que resume de forma esquemática o procedimento usado para as obter.

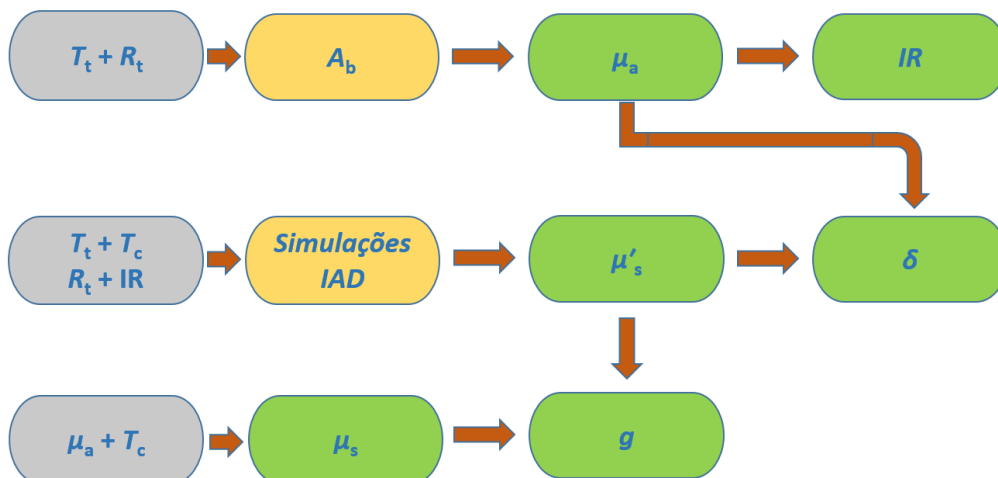


Figura 5 – Fluxograma de cálculo para obtenção das propriedades óticas espectrais.

3.3. Estimação das propriedades de difusão

Após terminar o estudo das propriedades óticas espectrais do rim normal e do rim patológico, deu-se início aos estudos para avaliar as propriedades que caracterizam os fluxos de água e de glicerina associados aos mecanismos de desidratação e de adaptação de índices de refração dos efeitos de transparência criados nos tecidos de rim. Estes estudos consistiram na realização de medições de espectros de T_c de amostras de tecidos de rim durante os tratamentos com soluções aquosas que continham diferentes osmolaridades de glicerina. Para cada um desses tratamentos, os espectros foram medidos de forma sequencial, ao longo do tratamento usando a montagem que está representada na Fig. 4 (c), mas agora com a amostra de tecido imersa numa determinada solução, dentro da cuvette.

A preparação das soluções a usar nestes tratamentos foi feita misturando glicerina (99% de pureza) com água destilada para obter osmolaridades distintas que correspondem às concentrações de glicerina na solução aquosa entre 10 e 60%, a cada 5%. A preparação de cada uma destas soluções foi feita controlando o IR da solução com um refratômetro de Abbe (KERN, modelo ORT-1) a 20 °C e comparando com valores tabelados [60].

Como o objetivo destes estudos consistiu em determinar variações temporais dos espectros de T_c , foram feitos 3 conjuntos de medições durante tratamentos individuais de um determinado tecido com a mesma solução. No caso dos tecidos de rim patológico, as soluções usadas nos tratamentos foram as que continham as concentrações de glicerina acima indicadas, entre 10 e 60%, mas nos tratamentos dos tecidos de rim saudável foram usadas soluções nos tratamentos com as concentrações entre 20 e 60%. Todos estes estudos foram feitos à temperatura de 20 °C.

As duas subseções seguintes descrevem o procedimento experimental usado para a realização destes estudos, assim como os cálculos realizados para obter as propriedades de difusão da água e da glicerina nos tecidos do rim.

3.3.1. Procedimento experimental

Tal como foi já referido, a montagem experimental usada nestes estudos é a que se encontra representada na Fig. 4(c). Em cada estudo, começou-se por medir o espectro de T_c referente ao tecido em estado natural, usando-o como referência para avaliar a

evolução temporal ao longo do tratamento. Depois de medir esse espectro, colocaram-se 4 mL da solução a usar dentro da cuvette, por forma a preencher toda a cuvette e garantir que o tecido ficava totalmente imerso na solução. O tratamento inicia imediatamente no instante em que se imerge o tecido na solução, instante no qual se deu início à aquisição de espectros de T_c . Estes espectros foram registados de forma automática a cada segundo, durante 30 minutos. Este procedimento foi adotado para todos os tratamentos realizados com amostras dos dois tipos de tecidos do rim.

Dado que para este estudo serão necessárias também medições de variação de espessura das amostras de rim em tratamento com algumas soluções particulares, foi necessário implementar uma montagem para realizar essas medições. De acordo com o que foi descrito em estudos anteriores [19, 54, 55], a medição da variação da espessura das amostras de tecido em tratamento é feita com uma montagem experimental como a apresentada na Fig. 6.

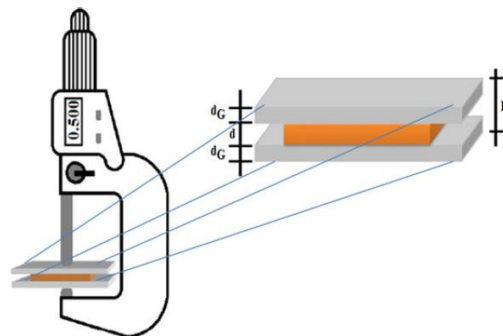


Figura 6 – Montagem experimental para medir a espessura de tecidos em tratamento.

Nesta montagem, a amostra de tecido, que foi cortada com uma espessura uniforme de 0.5 mm, é inserida entre duas lamelas de vidro com espessuras uniformes e iguais (d_G na Fig. 6). Um micrómetro de precisão é colocado em posição para medir a espessura global das lamelas com o tecido no interior. Uma seringa com a solução de tratamento desejada é usada para injetar essa solução entre as lamelas de vidro, dando início ao tratamento. As medições iniciam, rodando-se o parafuso do micrómetro para medir a espessura global a cada 15s nos primeiros 2 minutos de tratamento e a cada minuto entre os 2 e os 30 minutos de tratamento. No final, aos valores medidos é retirada a espessura dos dois vidros, para se obter a variação temporal da espessura da amostra de

tecido em tratamento. Dado tratar-se de um método mecânico, com pouca precisão, realizam-se 3 estudos para cada caso a estudar. Por outro lado, e para evitar um excesso de pressão na lamela superior, esta tem uma menor dimensão superficial do que a lamela inferior. Para este tipo de montagem é usual ocorrerem medições menos precisas nos primeiros 2 minutos de tratamento, período no qual a espessura da amostra diminui fortemente. Durante esse período, quando se está a apertar o parafuso do micrómetro recomenda-se que tal operação se faça com um mínimo de força para garantir que o próprio instrumento não está a comprimir o tecido a mais do que a compressão que se espera do tratamento [23]. No capítulo 4 serão indicados os tratamentos para os quais se realizaram estas medições e serão apresentados os resultados obtidos. No final da próxima seção será explicado como se utilizam os valores de espessura medidos para o cálculo dos coeficientes de difusão.

3.3.2. Cálculos para obter as propriedades de difusão

Para cada um dos tratamentos estudados, começou-se por agrupar os espectros sequenciais de T_c numa matriz para permitir o fácil acesso às variações temporais de comprimentos de onda individuais. Dessas variações temporais, selecionaram-se as que correspondem aos comprimentos de onda discretos entre 600 e 800 nm, uma banda espectral onde os tecidos de rim não apresentam bandas de absorção e onde o espectro de T_c é aproximadamente linear. Os comprimentos de onda escolhidos nesta banda distam entre si 20 nm.

Considerando cada variação temporal de T_c obtida para um comprimento de onda individual, seguiu-se o procedimento descrito na literatura [15, 37, 38], que consiste num deslocamento vertical de toda a variação para que esta tenha um valor nulo de T_c quando $t = 0$ s (tecido natural). Depois de efetuado este deslocamento, normalizou-se a variação temporal ao seu valor máximo, que corresponde ao início da saturação do tratamento e ocorre a um determinado instante de tempo. Caso este instante, onde o máximo ocorre, não coincida com o fim do tempo de tratamento (30 min), a variação temporal deve ser cortada nesse instante, para se considerar apenas o intervalo de tempo que corresponde a uma difusão efetiva de fluxos entre a solução e o tecido. Toda a variação de T_c para além do instante de tempo onde o máximo ocorre deve ser desprezada [37, 38]. Dependendo da osmolaridade da glicerina em solução, o início da saturação do tratamento pode ocorrer

a instantes de tempo bem distintos. Veremos no capítulo 4 para que instantes se verifica a ocorrência do máximo em cada tratamento dos dois tipos de tecido do rim.

Após se ter feito o corte e a normalização das variações temporais de T_c para os comprimentos de onda escolhidos, fez-se o ajuste da variação temporal entre $t=0$ e t correspondente ao valor final de tempo considerado com uma curva descrita pela Eq. (17) [15, 37, 38]:

$$T_c(\lambda_i, t) \cong \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \right], \quad (17)$$

em que τ_i representa o tempo de difusão característico para o fluxo efetivo no tratamento em estudo, ao comprimento de onda λ_i [12, 18, 22, 56, 57]. Note-se que para um tratamento qualquer, o fluxo efetivo pode corresponder a 3 situações distintas: apenas agente a difundir-se para o interior do tecido (a), agente a difundir-se para o interior e água a difundir-se para o exterior (b), ou apenas água a difundir-se para o exterior (c) [16].

Este processo de ajuste com a Eq. (17) foi feito para todas as variações de T_c que correspondem aos comprimentos de onda selecionados, tendo-se no final calculado o valor médio de τ e o respetivo desvio padrão para o tratamento em causa. O mesmo procedimento foi feito para todos os tratamentos realizados com os dois tipos de tecido de rim, obtendo-se no final um conjunto de valores médios de τ (e o respetivo desvio padrão) para cada tratamento realizado com uma osmolaridade particular de glicerina. No final fez-se uma representação para cada tipo de tecido com os valores médios de τ em função da concentração de glicerina na solução de tratamento, ajustando-se os dados correspondentes a cada tecido com uma spline [22], para se obter a dependência e retirar resultados. Em cada uma das curvas resultantes (uma para cada tipo de tecido), verifica-se que ocorre um máximo para uma concentração de glicerina particular de valor intermédio. Tal máximo indica que a essa concentração ocorre apenas a difusão de glicerina no tecido e que o valor de τ observado para esse pico da curva corresponde ao real tempo de difusão da glicerina no tecido de rim correspondente [12, 18, 22, 56, 57]. Tal difusão única de glicerina para a concentração à qual se observa o pico na curva, seja uma das concentrações de glicerina usadas nos tratamentos realizados ou não, ocorre devido a um equilíbrio entre a água móvel no tecido e a água na solução [19, 57]. Esta

informação é importante pois indica-nos qual o conteúdo de água móvel no tecido em estudo e também o valor do tempo de difusão que caracteriza o fluxo único de glicerina e o mecanismo de adaptação de índices de refração [22]. Um estudo anterior, realizado com tecidos saudáveis e com cancro da mucosa colorectal humana, mostrou a existência de um conteúdo de água móvel de cerca de 5% superior no tecido patológico [23]. Por outro lado, para o tratamento com a solução usada com maior osmolaridade (60% de glicerina em solução) ocorre apenas o fluxo de água para o exterior do tecido, fluxo esse que está restringido aos primeiros 2 minutos de tratamento devido à forte pressão osmótica do agente na solução. O valor de τ obtido para esse tratamento corresponde ao tempo de difusão característico do mecanismo de desidratação no tecido [19, 57].

Após se obterem os tempos de difusão da água e da glicerina nos dois tipos de tecidos do rim humano, ficam por calcular os coeficientes de difusão (D) correspondentes. O cálculo desses coeficientes é feito a partir dos valores de τ correspondentes que foram obtidos no gráfico descrito anteriormente. Esse cálculo, para cada uma das quatro situações estudadas (fluxo individual de glicerina ou de água no rim normal e no rim patológico), é feito pela Eq. (18) [12, 50]:

$$D = \frac{d^2}{\pi^2 \tau}, \quad (18)$$

onde d representa a espessura do tecido no mesmo instante de tempo que corresponde a τ , para o tratamento com a mesma concentração de glicerina na solução. Com o cálculo dos respectivos valores de D para cada situação correspondente aos valores de τ obtidos ficam caracterizados os fluxos únicos de glicerina e de água nos dois tipos de rim, assim como os mecanismos de desidratação dos tecidos e de adaptação de índices de refração que geram a transparência criada [16].

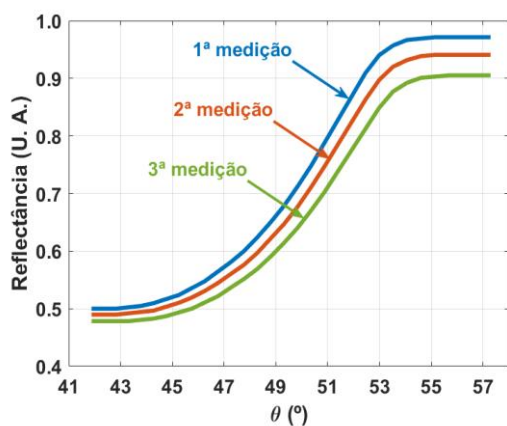
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

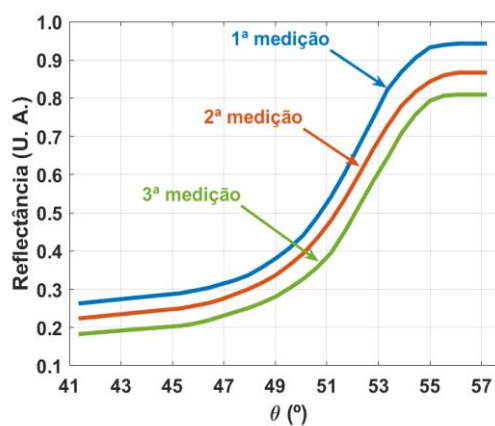
Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos na investigação realizada, assim como a sua discussão. Tal como no capítulo anterior, aquando da descrição da metodologia, a apresentação de resultados será também dividida por 3 secções. Na primeira dessas secções serão apresentados os resultados dos estudos de IR e cálculos das dispersões dos tecidos de rim. As medições e resultados de cálculos para obter as propriedades óticas espectrais são apresentadas na segunda secção, enquanto os resultados do estudo das propriedades de difusão são apresentados na terceira.

4.1. Índice de Refração

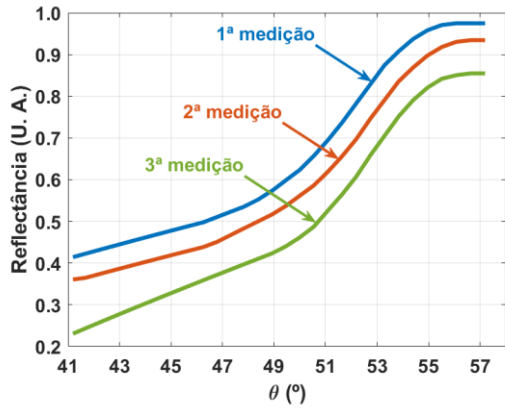
Depois de proceder à recolha dos dados experimentais com a montagem de reflexão interna total (ver Fig.1), realizou-se o cálculo das curvas de reflectância, através da Eq. (14). Tais curvas encontram-se representadas na Fig. 7 para o rim saudável e na Fig. 8 para o rim patológico. Em cada gráfico nestas duas figuras estão representadas as curvas respeitantes a três conjuntos de medições realizados com cada laser.



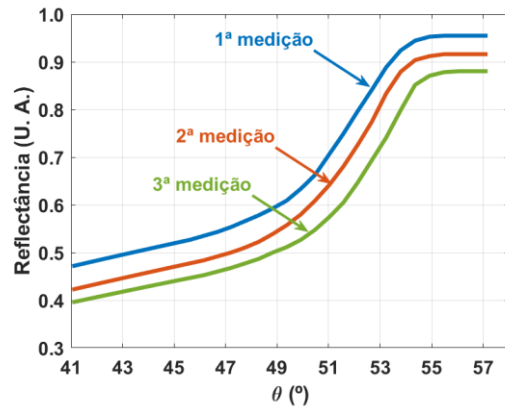
(a)



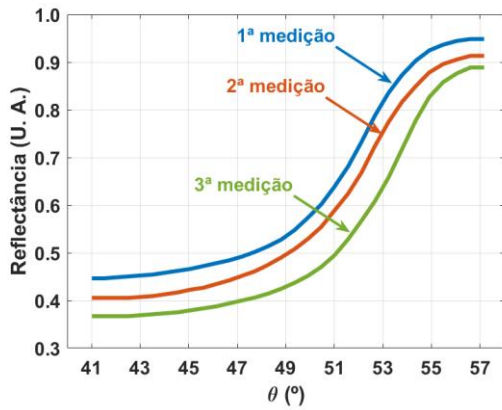
(b)



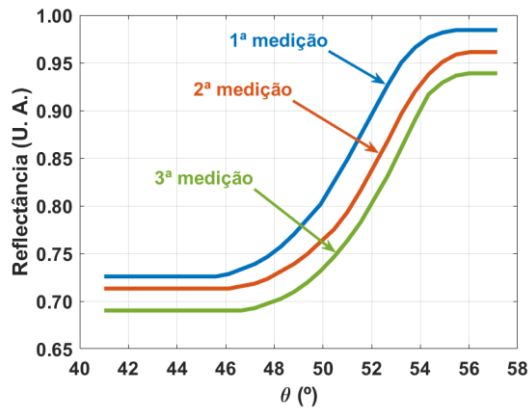
(c)



(d)

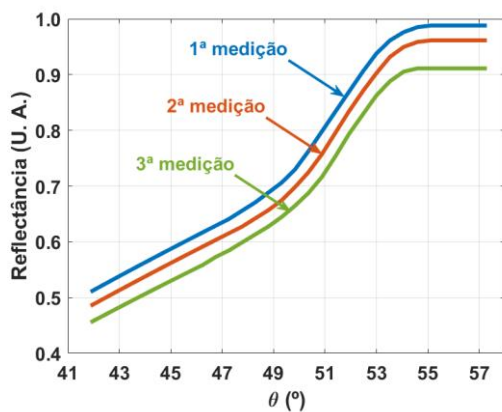


(e)

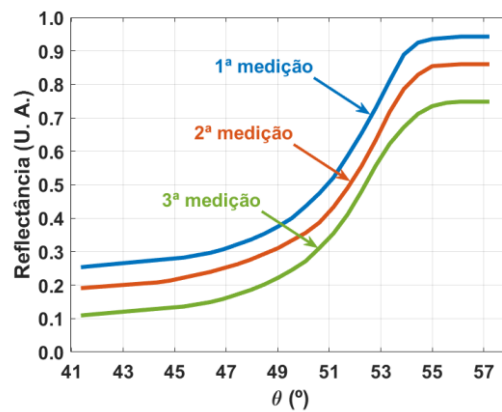


(f)

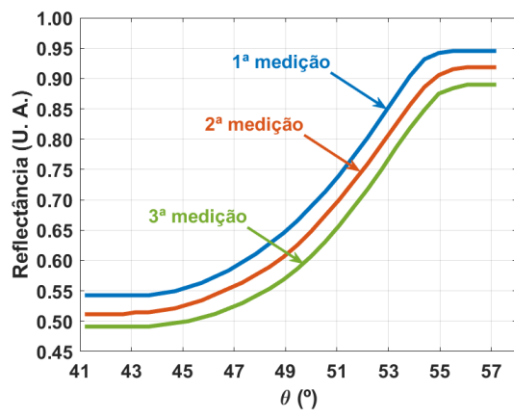
Figura 7 – Curvas de reflectância obtidas para rim normal com os lasers: 401.4 nm (a), 534.6 nm (b), 626.6 nm (c), 782.1 nm (d), 820.8 nm (e) e 850.7 nm (f).



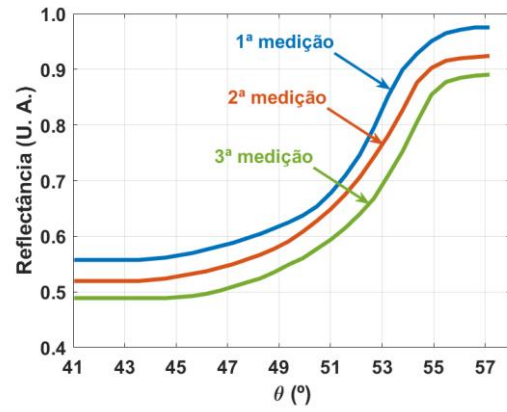
(a)



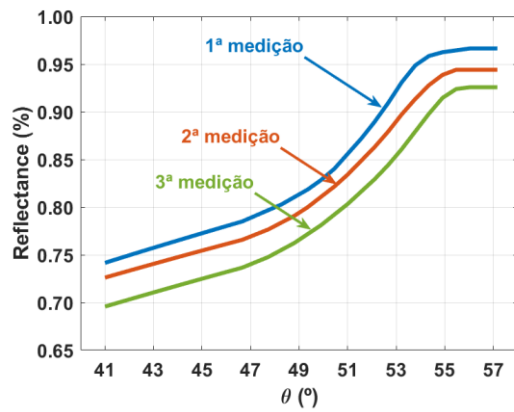
(b)



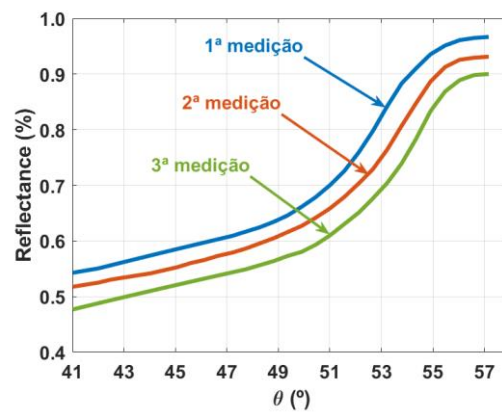
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 8 – Curvas de refletância obtidas para rim patológico com os lasers: 401.4 nm (a), 534.6 nm (b), 626.6 nm (c), 782.1 nm (d), 820.8 nm (e) e 850.7 nm (f).

Com o objetivo de se obterem os valores do ângulo crítico de reflexão na interface prisma/tecido, foram calculadas as derivadas as curvas representadas nas Figs. 7 e 8. Tais derivadas foram obtidas com a Eq. (15) e encontram-se representadas na Fig. 9 para o rim normal e na Fig. 10 para o rim patológico.

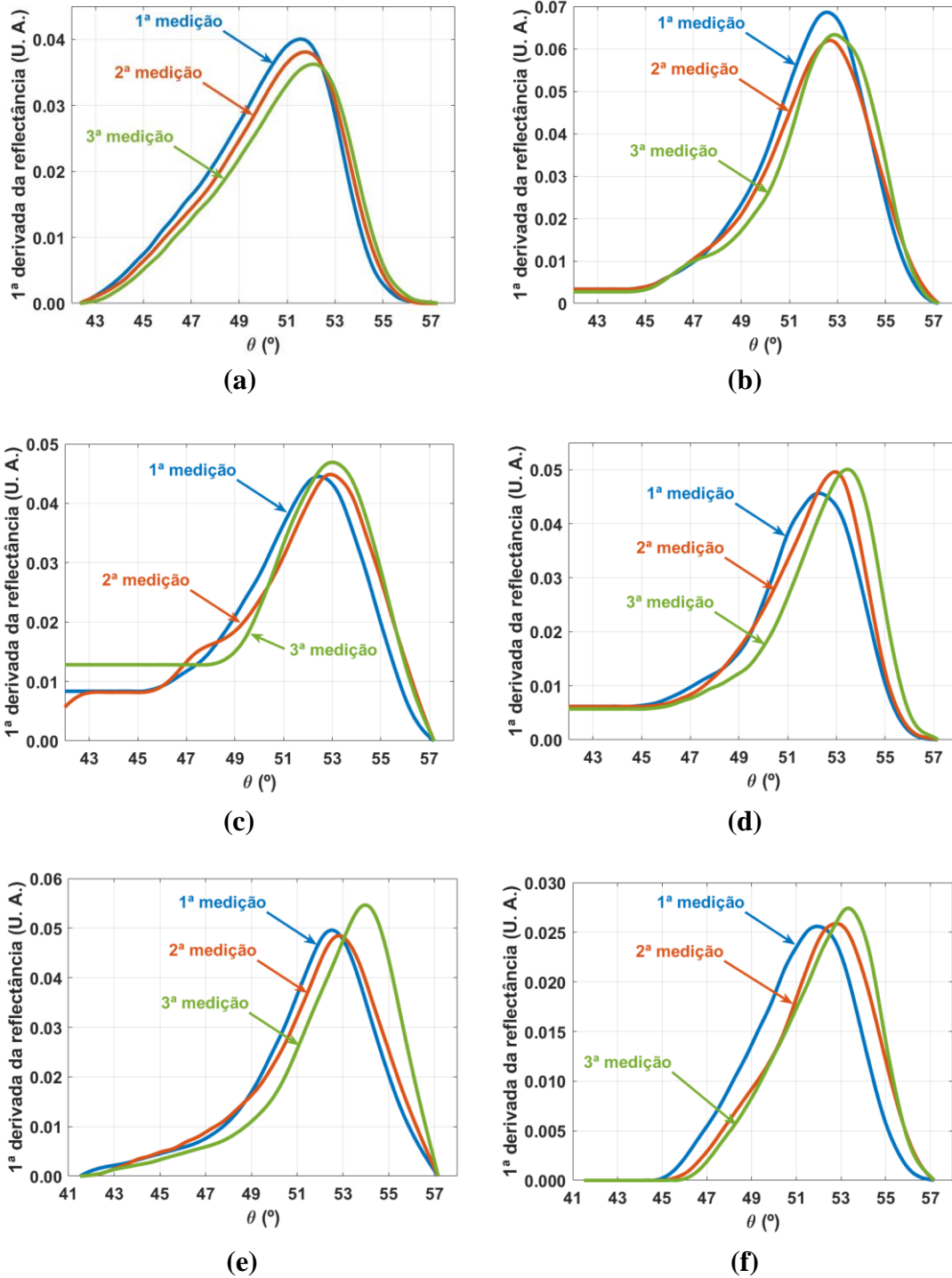
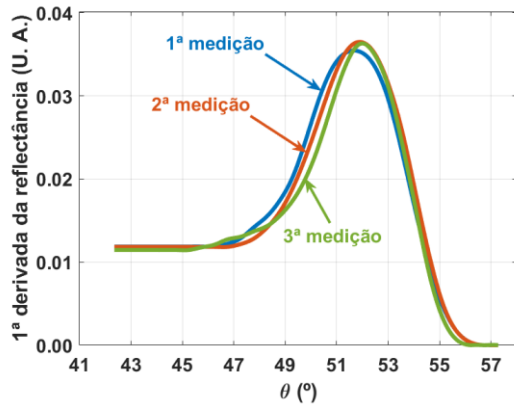
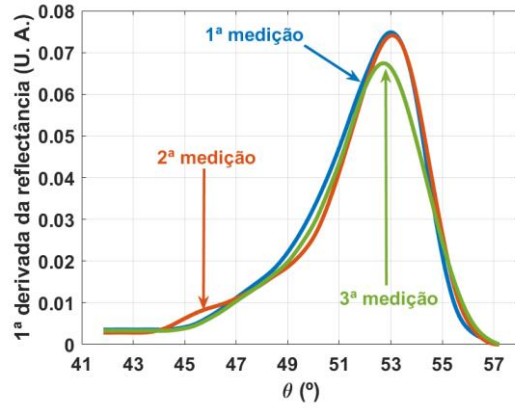


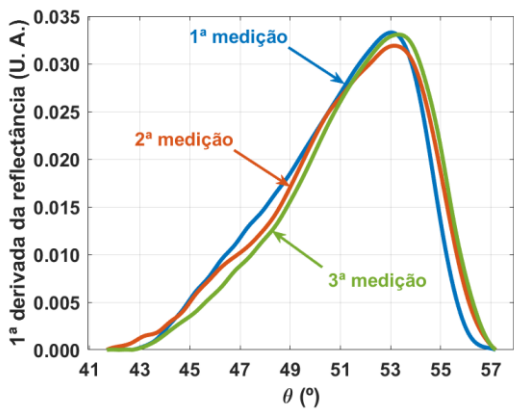
Figura 9 – Curvas da primeira derivada da reflectância obtidas para rim saudável com os lasers: 401.4 nm (a), 534.6 nm (b), 626.6 nm (c), 782.1 nm (d), 820.8 nm (e) e 850.7 nm (f).



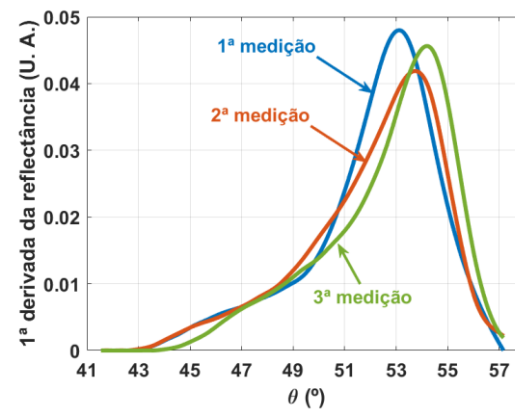
(a)



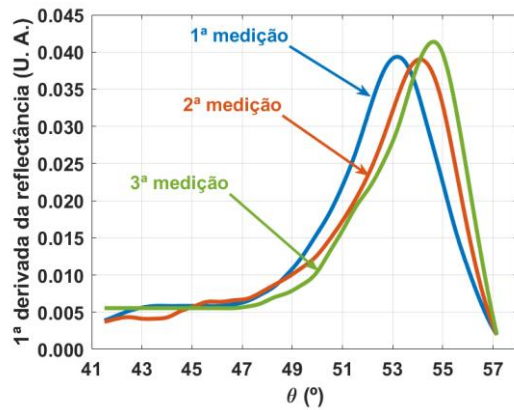
(b)



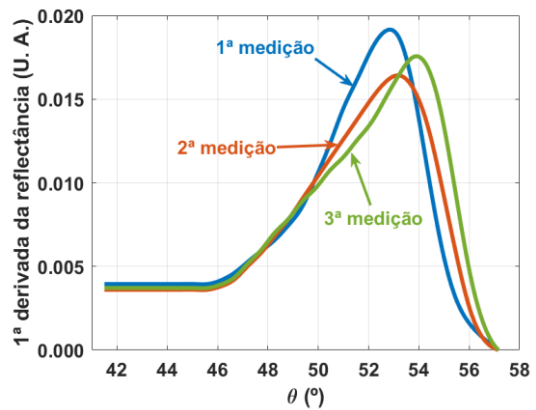
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 10 – Curvas da primeira derivada da reflectância obtidas para rim patológico com os lasers: 401.4 nm (a), 534.6 nm (b), 626.6 nm (c), 782.1 nm (d), 820.8 nm (e) e 850.7 nm (f).

Os valores de θ_c para a reflexão na interface prisma/tecido correspondentes a cada estudo realizado são os ângulos para os quais ocorrem os picos em cada curva

representada nas Figs. 9 e 10. Desta forma, analisando todos os gráficos representados nestas figuras, recolheram-se os valores de θ_c que se encontram representados na tabela 1 para o rim saudável e na tabela 2 para o rim patológico.

Tabela 1 – Valores de θ_c obtidos para rim saudável.

Laser (λ)	1ª Medição	2ª Medição	3ª Medição
401.4 nm	51.6	51.7	52.1
534.6 nm	52.6	52.7	52.9
626.2 nm	52.5	52.9	53.0
782.1 nm	52.3	52.9	53.4
820.8 nm	52.5	52.8	54.0
850.7 nm	51.9	52.8	53.3

Tabela 2 – Valores de θ_c obtidos para rim patológico.

Laser (λ)	1ª Medição	2ª Medição	3ª Medição
401.4 nm	51.7	51.9	52.0
534.6 nm	53.0	53.1	52.7
626.2 nm	53.0	53.2	53.3
782.1 nm	53.1	53.7	54.2
820.8 nm	53.2	54.1	54.6
850.7 nm	52.8	53.2	53.9

Após a obtenção dos ângulos críticos, procedeu-se ao cálculo do IR de cada tecido a cada comprimento de onda estudado, usando-se a Eq. (16). A tabela 3 contém os valores de IR calculados para o rim saudável, a sua média e desvio padrão.

Tabela 3 – Valores de n_{tecido} para rim saudável.

Laser (λ)	1ª Medição	2ª Medição	3ª Medição	Média	Desvio Padrão
401.4 nm	1.4450	1.4486	1.4553	1.4496	0.0052
534.6 nm	1.4245	1.4272	1.4304	1.4274	0.0030
626.2 nm	1.4106	1.4195	1.4210	1.4170	0.0056
782.1 nm	1.3967	1.4093	1.4185	1.4082	0.0109
820.8 nm	1.3990	1.4046	1.4259	1.4098	0.0142
850.7 nm	1.3874	1.4035	1.4133	1.4014	0.0131

Os valores de IR calculados para o rim patológico, a sua média e desvio padrão encontram-se representados na tabela 4.

Tabela 4 – Valores de n_{tecido} para rim patológico.

Laser (λ)	1ª Medição	2ª Medição	3ª Medição	Média	Desvio Padrão
401.4 nm	1.4470	1.4513	1.4533	1.4505	0.0032
534.6 nm	1.4330	1.4341	1.4277	1.4316	0.0034
626.2 nm	1.4215	1.4238	1.4267	1.4240	0.0026
782.1 nm	1.4124	1.4238	1.4321	1.4228	0.0099
820.8 nm	1.4115	1.4281	1.4376	1.4257	0.0132
850.7 nm	1.4046	1.4106	1.4239	1.4130	0.0099

Usando o *Curve Fitting Tool* do MATLAB™, testou-se o ajuste com as curvas de dispersão de Cauchy (Eq. 3), de Conrady (Eq. 4) e de Cornu (Eq. 5) para os dois conjuntos de valores médios de IR calculados para os tecidos de rim. Verificou-se que a equação de Cornu (Eq. 5) produz um melhor ajuste dos pontos experimentais de IR dos dois tecidos, tendo-se obtido valores de R^2 superiores a 0.99 para os dois tecidos. A Fig. 11 apresenta

os resultados finais do estudo de IR para os dois tecidos do rim, incluindo os valores médios e desvios padrão indicados nas tabelas 3 e 4, assim como as curvas de dispersão calculadas para cada caso.

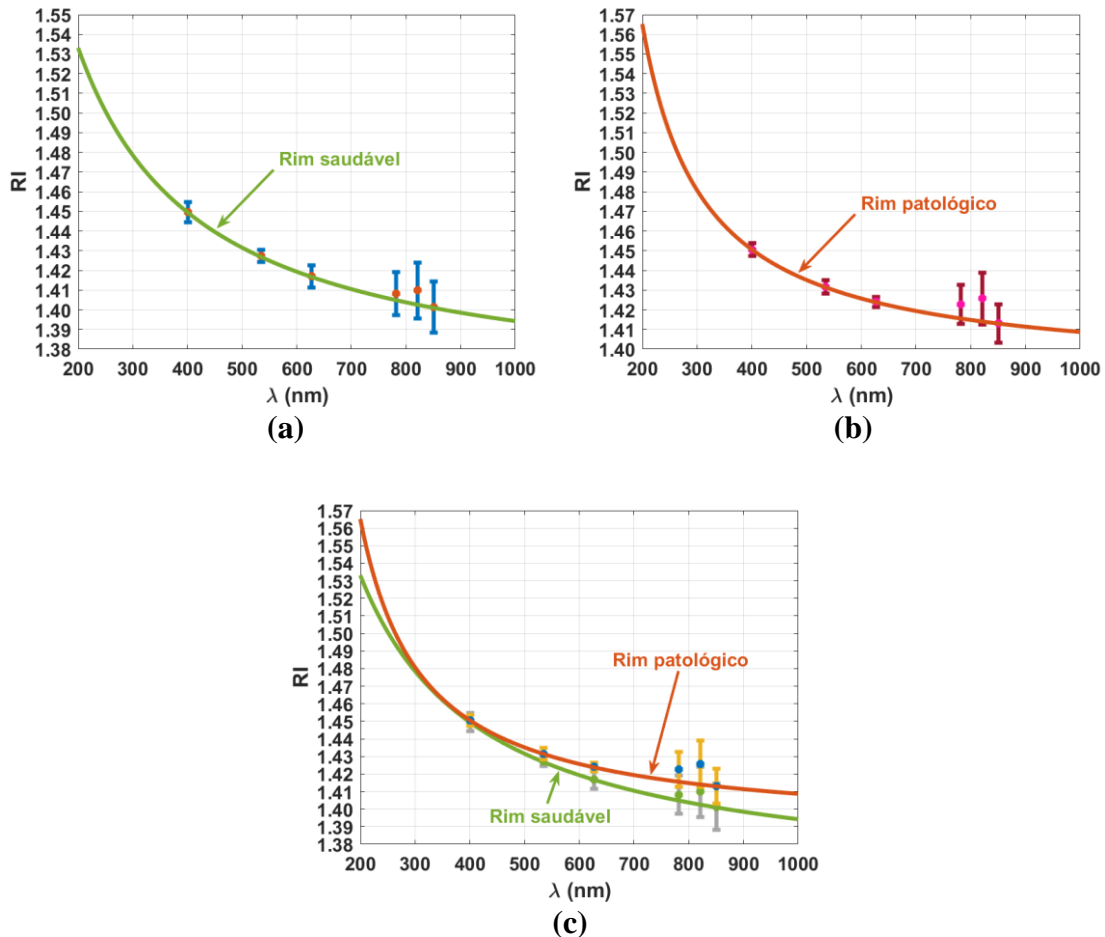


Figura 11 – Curvas de dispersão e valores discretos experimentais de IR para os dois tecidos de rim: tecido saudável (a), tecido patológico (b) e ambos os tecidos (c).

Considerando os valores discretos de IR em cada tecido que estão representados nos gráficos da Fig. 11, ao fazer o ajuste com as curvas descritas pela equação de Cornu, os valores obtidos com os lasers de 782.1 nm e de 820.8 nm foram desprezados. Quer para o tecido de rim saudável, quer para o tecido de rim patológico, o facto de esses valores experimentais estarem acima da curva que foi ajustada é evidência da presença de lípidos nos tecidos. Num estudo semelhante, que foi realizado anteriormente com tecidos da mucosa colrectal humana, verificou-se também a presença de lípidos nas medições de IR [47]. Tal como nesse estudo, também aqui, os dados representados na

Fig. 11 mostram que os valores de IR obtidos com esses dois lasers se afastam mais da curva ajustada para o caso do tecido patológico, indicando um maior conteúdo de lípidos nos tecidos com cancro.

Os gráficos da Fig. 11 mostram outra semelhança com os resultados obtidos na Ref. [47], pois a curva ajustada para o rim patológico apresenta sempre valores superiores à curva que foi ajustada para o rim saudável. Pelo gráfico da Fig. 11(c), observa-se uma aproximação entre as duas curvas na zona entre os 300 e os 400 nm, mas a curva do rim patológico é sempre superior. Estas curvas são descritas pela Eq. (19) para o rim saudável e pela Eq. (20) para o rim patológico.

$$n = 1.355 + \frac{40.29}{(\lambda+26.17)}, \quad (19)$$

$$n = 1.387 + \frac{19.79}{(\lambda-88.96)}. \quad (20)$$

Ao serem criadas as representações gráficas para a Fig. 11, assumiu-se que as curvas descritas pelas Eqs. (19) e (20) são válidas para uma zona espectral mais ampla do que aquela que corresponde às medições discretas de IR realizadas. O objetivo de estender estas curvas para fora da banda onde se realizaram as medições prende-se com o facto de as medições espectrais que serão apresentadas nas próximas seções terem sido adquiridas entre 200 e 1000 nm.

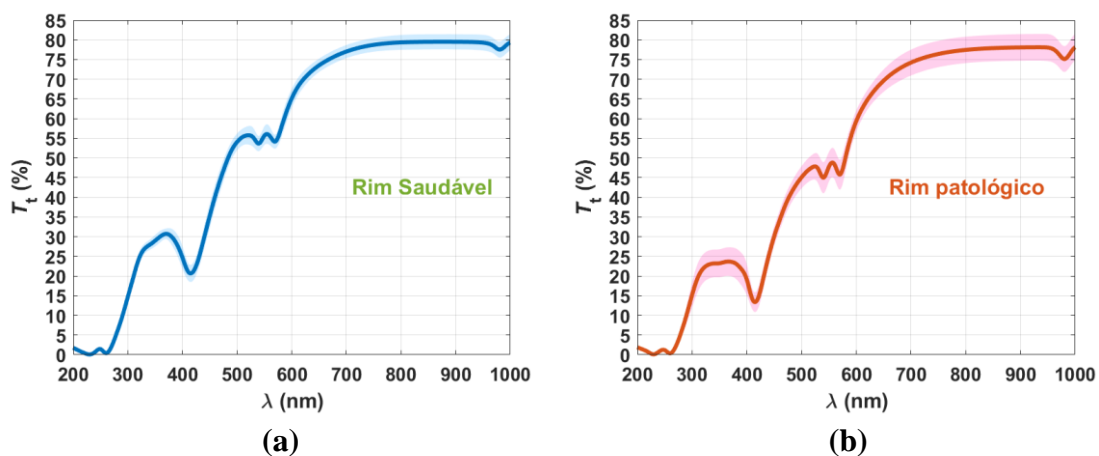
No sentido de comparar e validar os dados do presente estudo, fez-se uma pesquisa na literatura e embora não existam muitos dados para o IR do rim, encontraram-se alguns que podem ser usados como referência. O artigo da Ref. [46], apresenta o valor do IR do rim de porco a 632.8 nm – 1.3721. Neste estudo foi usado também o método da reflexão interna total, mas não é indicada a temperatura a que foram realizadas as medições. Considerando que os estudos do presente trabalho foram feitos a uma temperatura de 20 °C, o valor que obtivemos pela curva de dispersão do rim saudável a 632.8 nm é de 1.416, pelo que a diferença entre este resultado e o que é apresentado na Ref. [46] pode dever-se não só a diferenças entre a fisiologia do rim humano e a do rim de porco, como também à diferença de temperaturas durante as medições. Um outro estudo [44], que apresenta os valores de IR de vários tecidos, foi feito com um refratómetro de fibra ótica e refere-se também a 632.8 nm, sem indicação da temperatura a que foram feitas as medições. Um

dos tecidos que foi usado neste estudo foi o rim humano saudável, que apresenta um IR de 1.417, um valor muito próximo do que foi obtido no presente estudo. Um terceiro estudo com medições feitas a 25 °C [45], apresenta os valores de IR do rim saudável (e de outros tecidos) a vários comprimentos de onda discretos desde 450 nm a 1551 nm. Comparando os valores do IR deste estudo com os obtidos no presente trabalho, verifica-se que os valores apresentados na Ref. [45] são sempre superiores. Tal facto é justificado com a diferença de temperaturas usadas nos dois estudos, pois com o aumento da temperatura, ocorre alguma evaporação de água intersticial nos tecidos, o que leva a um aumento do valor global do IR do tecido em estudo [65].

Embora, os resultados apresentados nos gráficos da Fig. 11 contenham informação considerável e até discriminatória entre o rim saudável e o rim patológico, serão calculadas na próxima seção outras curvas de dispersão mais realistas para estes tecidos.

4.2. Propriedades Óticas

O estudo para avaliar as propriedades óticas espectrais dos tecidos de rim iniciou com a medição dos espectros de T_t , de R_t e de T_c . Tal como descrito no procedimento para este estudo (subsecção 3.2.2), foram medidos 10 espectros de cada tecido com cada uma das montagens experimentais representadas na Fig. 4. A Figura 12 apresenta os espectros médios de cada uma dessas medições para os dois tecidos de rim.



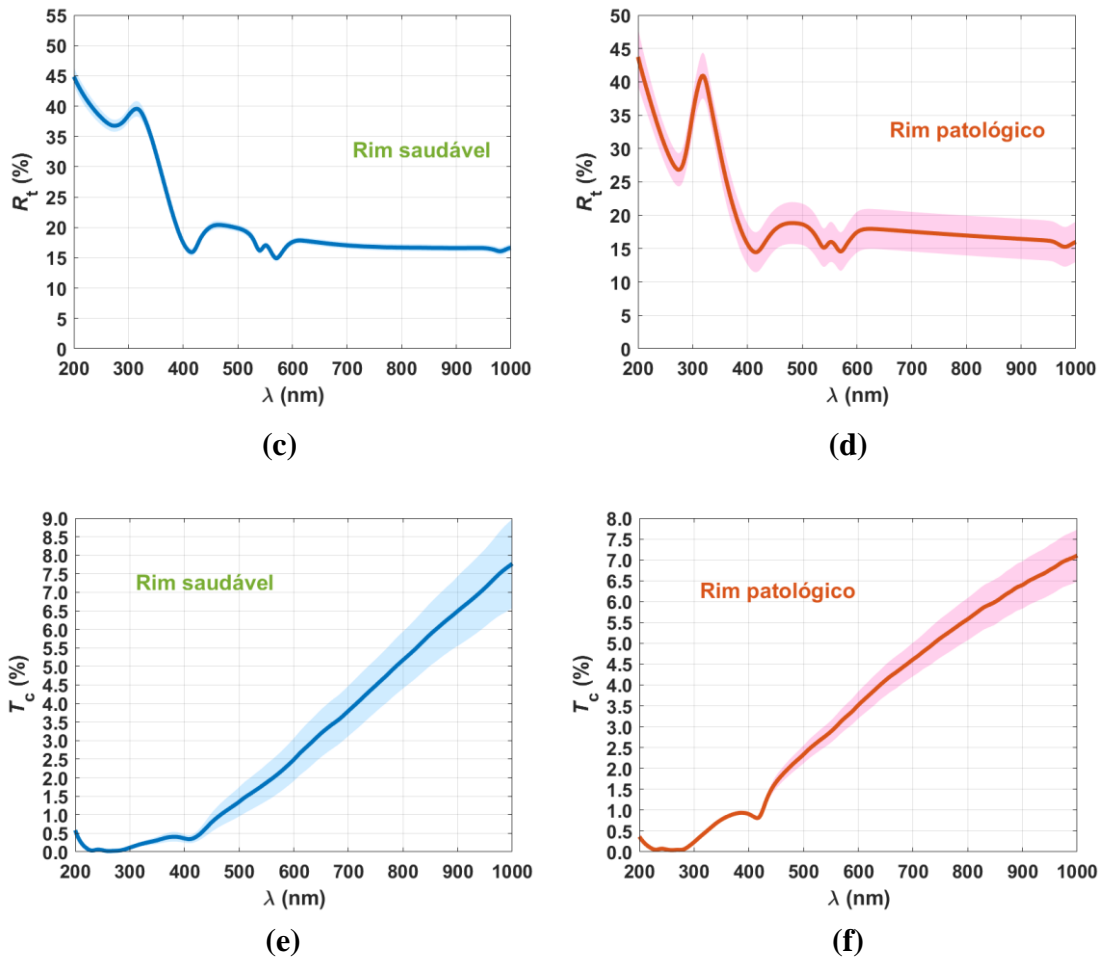


Figura 12 – Média e desvio padrão para $T_t(\lambda)$ (a) e (b), $R_t(\lambda)$ (c) e (d) e $T_c(\lambda)$ (e) e (f) medidos de rim saudável e de rim patológico.

Considerando os pares de espectros representados na Fig. 12, observa-se a ocorrência de pequenas diferenças entre os dois tipos de tecido, nomeadamente um maior conteúdo de sangue no tecido patológico. No entanto, qualquer espectro representado nessa figura tem uma dependência no comprimento de onda semelhante às observadas anteriormente para outros tecidos [37].

Um aspeto que se observa nos gráficos da Fig. 12 é que se verifica um baixo desvio padrão para a maioria dos espectros, sendo os espectros de T_t e de R_t do rim patológico uma exceção. Tal comportamento está relacionado com o facto de que a medição desses espectros teve de ser repetida algumas vezes, usando tecidos de doentes distintos. Considerando o desvio padrão para todos os espectros representados, com a exceção do espectro de R_t do rim patológico, na zona do ultravioleta observa-se um desvio entre tecidos estudados que é praticamente nulo. Este desvio muito reduzido está relacionado

com a combinação de um forte espalhamento da luz nessa zona do espectro com a forte absorção por parte das proteínas (200-230 nm), do ADN/ARN (260 nm) e da hemoglobina (274 nm) [30, 59].

Considerando os espectros de T_t dos dois tecidos, verificamos a ocorrência das bandas de absorção das proteínas a 230 nm, do ADN a 260 nm, da hemoglobina a 415, 540 e 570 nm e da água a 980 nm [66]. Nos espectros de R_t , observam-se apenas as bandas de absorção da hemoglobina a 274, 415, 540 e 570 nm e a da água a 980 nm [66]. Nestes espectros a banda das proteínas não é visível e a banda do ADN está camuflada pela forte banda de absorção da hemoglobina a 274 nm. No caso dos espectros de T_c , observam-se novamente as bandas de absorção das proteínas (230 nm), de uma combinação do ADN/ARN com a hemoglobina (entre 260 e 274 nm) e as bandas de Soret (415 nm), que tem maior magnitude no tecido patológico.

No sentido de se calcularem as propriedades óticas espectrais, e seguindo o procedimento indicado no capítulo anterior, começou-se por calcular o espectro de A_b . Este cálculo foi feito 10 vezes para cada tecido, usando pares de espectros de T_t e de R_t na Eq. (6). Considerando os espectros de A_b calculados, dividiu-se pela espessura das amostras de tecido ($d=0.5$ mm) para obter 10 espectros de μ_a para cada tipo de tecido. A Fig. 13 apresenta os espectros médios de μ_a e respetivo desvio padrão para os tecidos de rim saudável e com patologia que resultam deste cálculo.

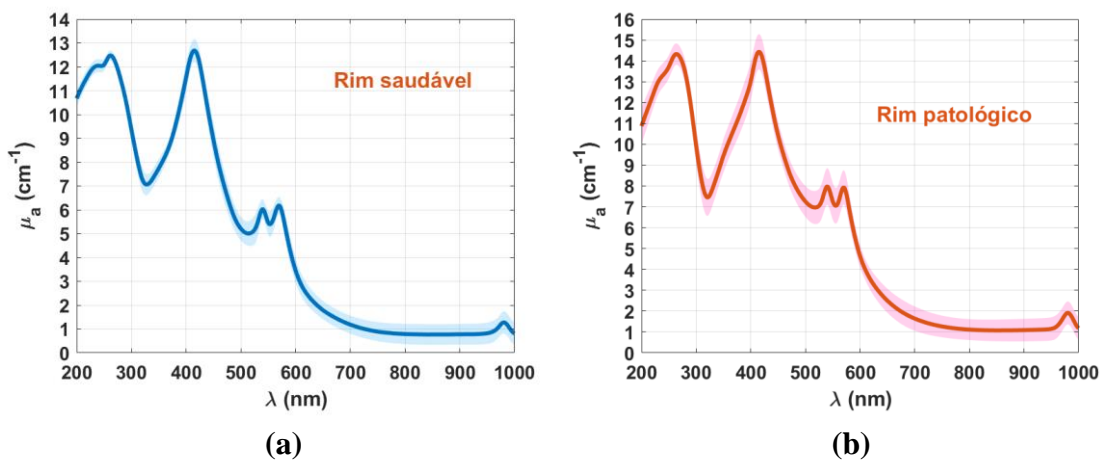


Figura 13 – Média e desvio padrão para o espectro de μ_a para o rim saudável (a) e patológico (b).

Conforme se pode verificar pelos espectros representados na Fig. 13, as bandas de absorção das proteínas, do ADN/ARN, da hemoglobina e da água estão bem identificadas. Note-se que ambos os espectros apresentam uma *baseline* horizontal com valores mais ou menos iguais na zona do IV. Considerando essa *baseline* como referência, observa-se que os picos de absorção referentes às proteínas, ADN/ARN e hemoglobina apresentam uma magnitude superior para o tecido patológico. Esta diferença é evidência que o cancro necessita de proteínas, ADN/ARN e de sangue para se desenvolver.

De seguida, serão apresentados os resultados dos cálculos para obter as restantes propriedades óticas. No entanto, no final deste capítulo voltaremos aos espectros representados na Fig. 13, para fazermos uma análise mais aprofundada e retirar outro tipo de informação que servirá para o diagnóstico do cancro do rim.

O próximo passo de cálculo das propriedades óticas espectrais (ver Fig. 5) consistiu na aplicação das relações de K-K aos espectros representados na Fig. 13 para obter a dispersão espectral dos tecidos. Neste cálculo, foram usadas as Eqs. (1) e (2) para obter a dispersão de cada tipo de tecido 10 vezes, a partir dos 10 espectros de μ_a . A Fig. 14 apresenta as dispersões médias e desvio padrão correspondente para cada tipo de tecido, assim como os valores discretos experimentais de IR e a dispersão de Cornu para cada tecido.

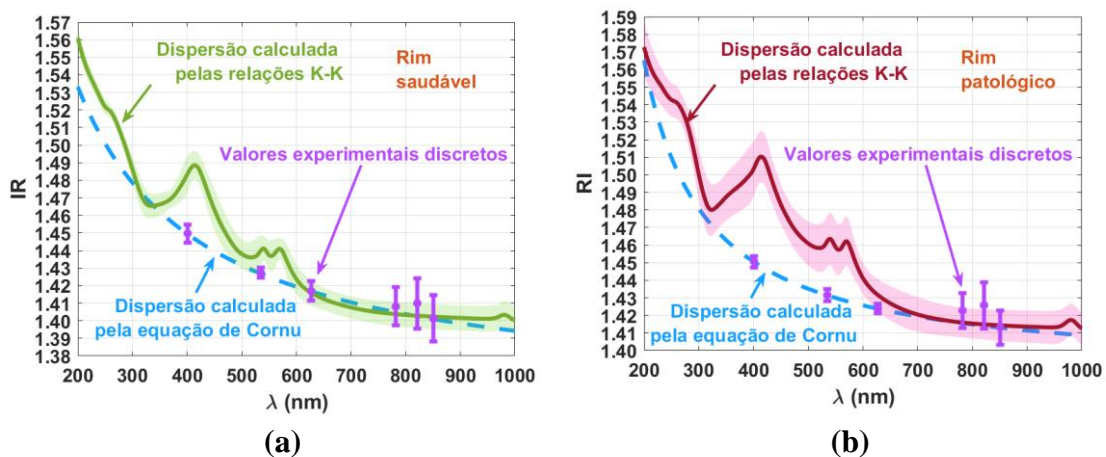


Figura 14 – Dispersão calculada pelas relações K-K, dispersão calculada pela equação de Cornu e medições experimentais discretas de IR para: rim saudável (a) e rim patológico (b).

Os resultados apresentados na Fig. 14 mostram que a aplicação das relações de K-K para calcular a dispersão dos tecidos proporciona muito mais informação do que a equação de Cornu, nomeadamente a ocorrência das assinaturas espectrais dos componentes do tecido. Este tipo de informação não é possível de adquirir com medições de IR discreto nem com o ajuste desses dados discretos com curvas de dispersão suaves. Comparando entre os dois gráficos da Fig. 14 observamos que o conteúdo de sangue é superior no tecido patológico, pois as bandas de hemoglobina têm maior magnitude neste tecido acima da *baseline* criada pela curva de Cornu. Tal resultado encontra-se descrito na literatura e era espectável no presente estudo [6, 10].

O passo seguinte consistiu na determinação dos coeficientes de espalhamento. Em primeiro lugar foi calculado o espectro de μ_s através da equação BBL (Eq. 8), usando os espectros de T_c e de μ_a . Este cálculo foi realizado 10× para cada tecido e o espectro médio obtido, assim como o respetivo desvio padrão encontram-se representados nos gráficos da Fig. 15. Por outro lado, usando dados das medições espectrais, foram realizadas simulações inversas de Adding-Doubling para estimar os valores de μ'_s a cada 50 nm entre 200 e 1000 nm. Estas simulações foram feitas também 10× para cada comprimento de onda e para cada um dos dois tecidos de rim. Depois de obtidos os valores discretos de μ'_s , fez-se um ajuste dos mesmos com a Eq. (9) para obter a dependência deste parâmetro no comprimento de onda entre 200 e 1000 nm. Este ajuste foi feito para os dois tecidos de rim. O espectro médio de μ'_s e o respetivo desvio padrão encontram-se também representados nos gráficos da Fig. 15.

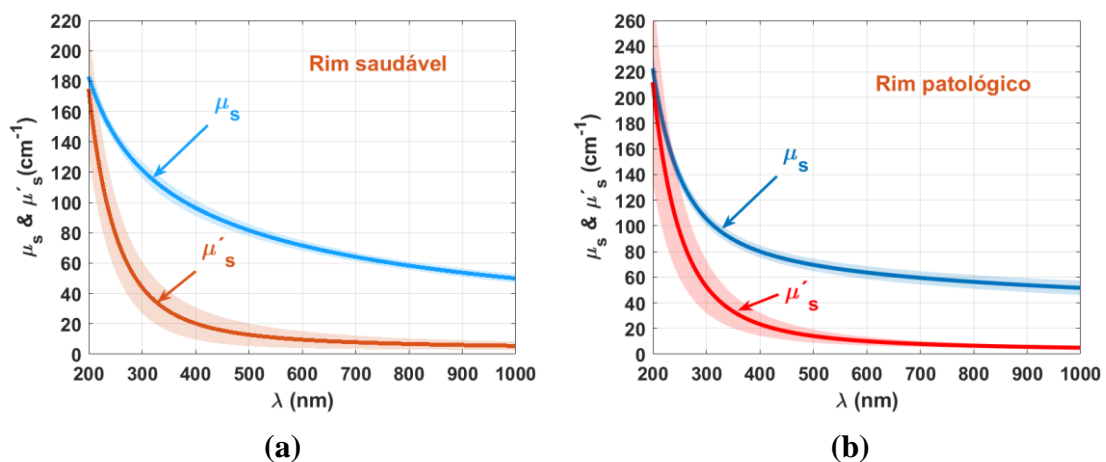


Figura 15 – Espectros médios e desvio padrão de μ_s e de μ'_s para os tecidos de rim saudável (a) e de rim patológico (b).

Conforme mostram os vários espectros médios na Fig. 15, tanto μ_s como μ'_s tem uma dependência exponencial decrescente no comprimento de onda. Este comportamento resulta da combinação dos regimes de espalhamento de Rayleigh e de Mie [51]. Tal como foi já observado noutros estudos [5, 15, 54], os valores de μ_s e de μ'_s tendem a coincidir a comprimentos de onda no ultravioleta profundo, mas afastam-se à medida que o comprimento de onda aumenta. Em termos de desvio padrão, ambos os gráficos mostram que μ'_s tem um desvio maior entre resultados do que μ_s . Esta diferença mostra que tanto os espectros de T_c e de μ_a usados no cálculo de μ_s são muito semelhantes entre si e que as simulações inversas de Adding-Doubling geram resultados de μ'_s mais dispersos.

Considerando cada tecido, usaram-se os espectros de μ_s e de μ'_s para calcular o fator de anisotropia. Novamente, como se dispunham de 10 espectros de cada um dos coeficientes, foram calculados com a Eq. (10) 10 espectros de g para cada tecido. O espectro médio e o desvio padrão resultantes destes cálculos encontram-se representados na Fig. 16.

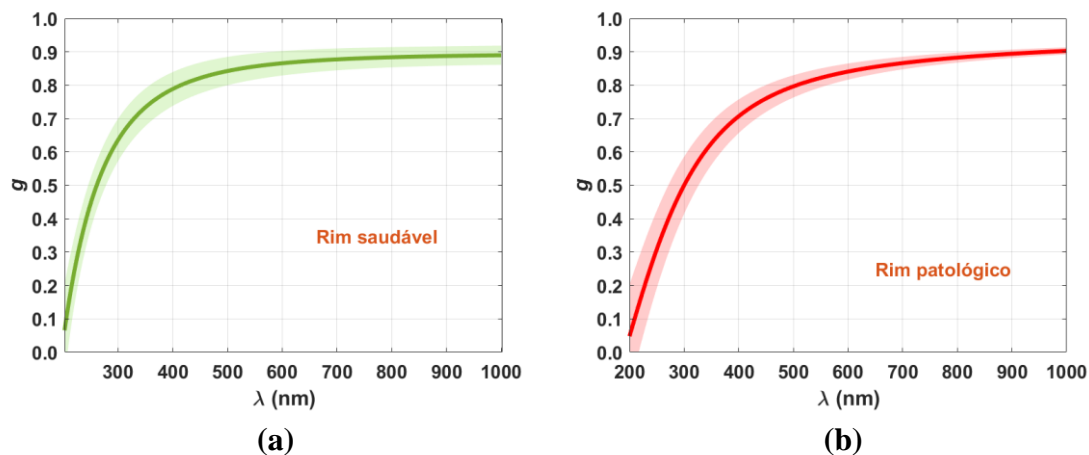


Figura 16 – Espectros médios e desvio padrão de g para os tecidos de rim saudável (a) e de rim patológico (b).

A dependência de g no comprimento de onda que ambos os tecidos de rim apresentam está de acordo com a literatura e outros estudos anteriores [5, 15, 54, 60] – g cresce de forma exponencial com o comprimento de onda, tendo valores quase nulos a 200 nm e aproximando-se da unidade na transição entre o visível e o infravermelho. O desvio padrão representado para os dois tecidos mostra maior magnitude na zona do UV,

o que está de acordo com os dados mais dispersos de μ'_s que foram gerados em simulação. No caso do rim saudável, tal magnitude diminui perto de 250 nm, mostrando que nesse comprimento de onda não ocorreu grande dispersão nos resultados gerados por simulação.

A última propriedade ótica que foi calculada foi δ . Para se proceder a este cálculo, seguiu-se o procedimento de cálculo indicado na subsecção 3.2.3, usando os espectros de μ_a e de μ'_s na Eq. (11). Este cálculo foi feito 10× para cada tecido e os resultados obtidos encontram-se apresentados na Fig. 17.

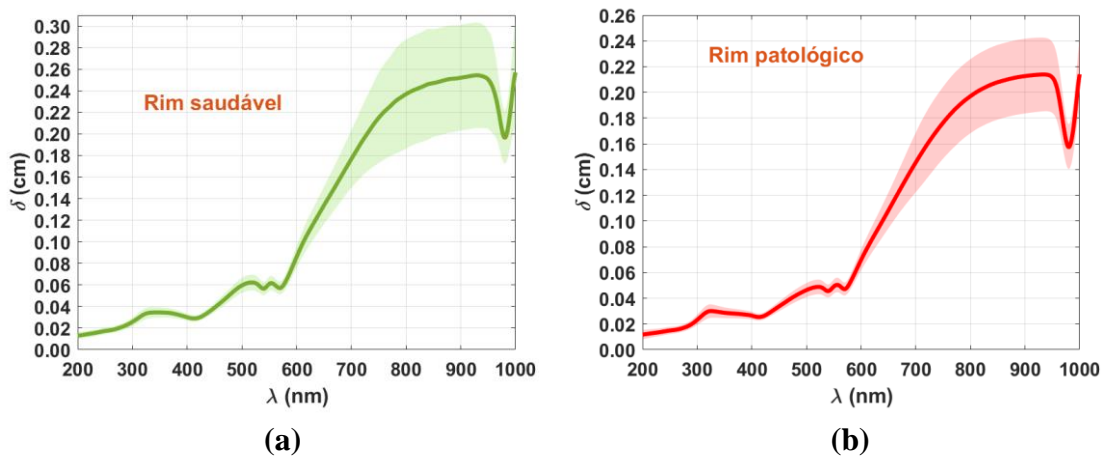


Figura 17 – Média e desvio padrão para os espectros da profundidade de penetração da luz nos tecidos de rim saudável (a) e de rim patológico (b).

Ambos os gráficos da Fig. 17 mostram que δ toma valores baixos no UV e que vai crescendo com o comprimento de onda, um comportamento já observado para outros tecidos biológicos [30, 54]. O desvio padrão mostra um comportamento semelhante, verificando-se que é muito reduzido no UV e que apresenta valores crescentes com o comprimento de onda. Estes gráficos mostram também que esta propriedade, para além de mostrar que a luz de maior comprimento de onda penetra mais fundo dentro dos tecidos, é também sensível às bandas de absorção da hemoglobina e da água. No caso da água, a banda de absorção é bastante acentuada em ambos os tecidos, mostrando que se devem evitar esses comprimentos de onda para aplicações de diagnóstico. No caso de aplicações cirúrgicas, a forte absorção da água pode ser um benefício para cortar tecidos com laser cirúrgico, como descrito na literatura [52].

Os dois gráficos apresentados na Fig. 17 mostram um dado adicional muito importante que conjugado com outros dados obtidos nos tratamentos de difusão nos mostram que há alterações nos estados de ligação da água no interior dos tecidos durante o desenvolvimento do cancro. Voltaremos a falar neste assunto na próxima secção, quando apresentarmos os estudos de difusão nos tecidos do rim. Para já e observando as bandas de absorção da água nos dois gráficos da Fig. 17, verificamos que apresentam a mesma magnitude, o que mostra um conteúdo total de água igual nos dois tipos de tecido do rim.

Após terem sido calculadas todas as propriedades óticas espectrais para os dois tecidos do rim humano, vamos voltar a analisar os espectros de μ_a que estão representados na Fig. 13. Olhando para esses espectros, verifica-se que ambos têm uma *baseline* com decaimento exponencial com o crescimento do comprimento de onda. Há semelhança de outros estudos já publicados [4, 5, 54], a ocorrência deste comportamento em todo o espectro de μ_a é evidência de que os tecidos de rim estudados contém pigmentos, nomeadamente melanina e lipofuscina. A literatura indica-nos que a acumulação destes pigmentos nos tecidos está associada com o processo de envelhecimento dos mesmos [61–63] e que a acumulação de lipofuscina é superior nos tecidos com patologias oncológicas [4–6], uma vez que contribui para a degeneração das células [61, 62].

Supondo que estes dois pigmentos se encontram nos tecidos do rim estudados e que são responsáveis pelo decaimento exponencial da *baseline* observada nos dois gráficos da Fig. 13, procurou-se na literatura os espectros de absorção da melanina e da lipofuscina entre 200 e 1000 nm. No caso da melanina, foi encontrado o seu espectro de absorção nesta zona do espectro e verificou-se que apresenta um decaimento exponencial em toda a extensão entre os 200 e 1000 nm [71]. No caso da lipofuscina, foi encontrado também o seu espectro de absorção, que apesar de também decrescer com o aumento do comprimento de onda entre 200 e 1000 nm, tem um decréscimo mais acentuado entre os 300 e os 500 nm, passando a valores praticamente nulos para comprimentos de onda superiores [72]. Recolhendo valores numéricos da absorção da melanina e da lipofuscina nos gráficos apresentados nas Refs. [71] e [72], respetivamente, os espectros de μ_a para estes pigmentos foram reconstruídos e encontram-se representados na Fig. 18.

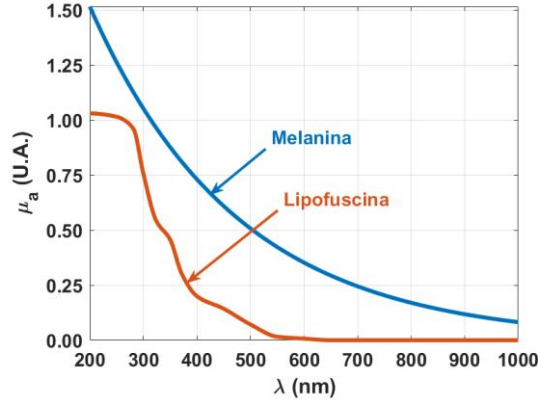


Figura 18 – Espectro de μ_a para a melanina (azul) e para a lipofuscina (laranja).

Utilizando os espectros representados na Fig. 18, fizeram-se tentativas de combinação de ambos para subtrair aos espectros de μ_a dos tecidos de rim de forma a eliminar a *baseline* com exponencial decrescente que apresentam na Fig. 13. Uma situação ótima dessa combinação foi obtida para ambos os tecidos de rim, que apresentamos nas Eqs. (21) e (22):

$$\mu_{a-ps}(\lambda) = 0.60 \times \mu_{a-mel}(\lambda) + 8.81 \times \mu_{a-lipo}(\lambda), \quad (21)$$

$$\mu_{a-pp}(\lambda) = 0.10 \times \mu_{a-mel}(\lambda) + 9.37 \times \mu_{a-lipo}(\lambda), \quad (22)$$

onde $\mu_{a-mel}(\lambda)$ e $\mu_{a-lipo}(\lambda)$ representam respectivamente os espectros de absorção da melanina e da lipofuscina que estão representados na Fig. 18 e $\mu_{a-ps}(\lambda)$ e $\mu_{a-pp}(\lambda)$ representam a combinação de conteúdos dos dois pigmentos nos tecidos de rim saudável e de rim patológico, respectivamente. Após se realizarem as subtrações destas combinações de pigmentos aos espectros apresentados na Fig. 13, foram obtidos os resultados apresentados na Fig. 19.

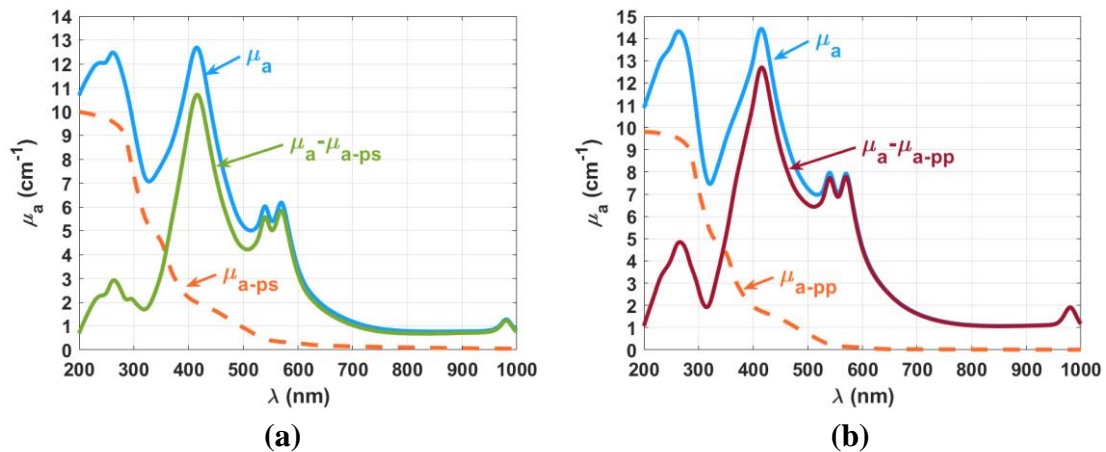


Figura 19 – Espectros originais de μ_a e após a subtração da absorção dos pigmentos para os tecidos de rim saudável (a) e de rim patológico (b).

Conforme se pode verificar pelos resultados para os dois tecidos de rim representados na Fig. 19, após se subtrair a absorção dos pigmentos aos espectros originais de μ_a , estes passam a ter uma *baseline* horizontal em todo o espectro considerado. Com esta subtração passamos a poder obter informação discriminatória entre os tecidos de rim saudável e patológico.

Em primeiro lugar, e olhando para os fatores multiplicativos nas Eqs. (21) e (22), verificamos que o acréscimo de lipofuscina, quando passamos do rim saudável para o rim patológico, é superior ao que se perdeu de melanina. Estes valores sugerem que durante o desenvolvimento do cancro, o tecido de rim perdeu a sua melanina quase na totalidade (83,3%) e que o conteúdo de lipofuscina cresceu não só por conversão da melanina, mas também por outros mecanismos como, por exemplo, a oxidação de proteínas [73], ou pela dissociação da hemoglobina no sangue (que é também uma proteína) [74], para se obterem os blocos elementares para construir as proteínas que compõe a lipofuscina. Note-se que o mecanismo pelo qual a melanina é convertida em lipofuscina não foi ainda descrito nem comprovado, mas estudos anteriores [67, 68] já levantaram a suspeita de que tal conversão acontece e os nossos resultados parecem ser evidência disso.

Um segundo resultado a retirar dos espectros de μ_a corrigidos na Fig. 19, é que após se ter obtido uma *baseline* horizontal para os dois tecidos por subtração dos pigmentos, se verifica que a magnitude quer da banda de Soret (a 415 nm), quer das bandas Q (540 e 570 nm) é superior no tecido patológico. Isto mostra que o conteúdo de sangue neste

tecido de rim é superior ao obtido para o rim saudável, um facto que está de acordo com os resultados obtidos em outros estudos realizados com tecidos de cancro [4–6].

4.3. Estudo das propriedades de difusão em tecidos de rim

Vamos agora apresentar os resultados e cálculos realizados no último estudo que diz respeito à avaliação das propriedades de difusão da água e de um agente de transparência nos tecidos do rim saudável e patológico. O agente selecionado para este estudo foi a glicerina, uma vez que havia disponibilidade desse agente com uma pureza de 99%, o que permitiu preparar soluções com diferentes osmolaridades para realizar os tratamentos dos tecidos de rim.

Tal como foi referido nos capítulos 1 e 2 do presente documento, o objetivo de se realizarem estudos de difusão em tecidos consiste em avaliar as propriedades de difusão, nomeadamente o tempo e o coeficiente de difusão, que são característicos dos fluxos de agente para o interior do tecido e da água para o exterior. Estes dois fluxos estão associados aos mecanismos de desidratação e de adaptação de índices de refração no tecido em estudo durante a criação de transparência e com a obtenção desses parâmetros, tais mecanismos ficam caracterizados. No presente estudo, dado que estudamos tecidos saudáveis e com patologia do rim humano, espera-se que tais parâmetros a obter sejam discriminados entre os dois tecidos e assim permitam recolher informação que possa no futuro vir a ser usada no estabelecimento de diagnósticos.

Os estudos de transparência que foram realizados nesta fase final do trabalho consistiram na medição de espectros de T_c dos tecidos durante os tratamentos aplicados a amostras de ambos os tecidos de rim para se obterem as variações temporais dessa transmitância ao longo de cada tratamento. Tais variações, quando avaliadas para certos comprimentos de onda, são adequadas para se obterem os tempos de difusão da glicerina e da água [63, 64].

Assim, numa primeira fase, as diferentes soluções a usar nos tratamentos foram preparadas, diluindo glicerina com 99% de pureza em água destilada e medindo o IR de cada solução com um refratómetro de Abbe para comparar com valores tabelados à temperatura de 20 °C [60]. Cada solução considerou-se preparada quando o valor tabelado foi medido no refratómetro. As soluções que foram usadas para tratar amostras de rim

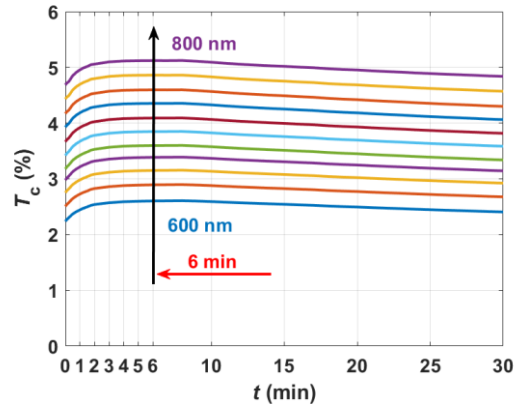
saudável tinham concentrações de glicerina entre 20 e 60% e as que foram usadas para tratar as amostras de rim patológico tinham concentrações de glicerina entre 10 e 60%. Os valores de IR de cada uma das soluções encontram-se representados na tabela 5.

Tabela 5 – IR para cada concentração de glicerina das soluções preparadas.

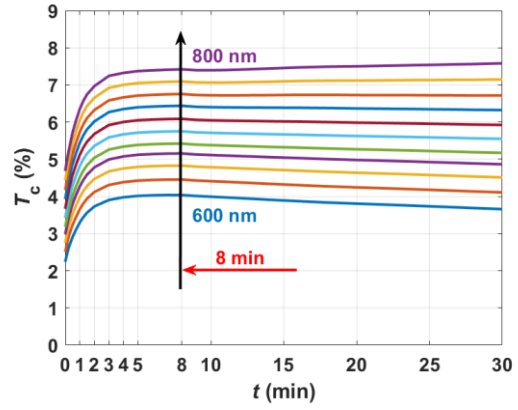
Concentração de Glicerina	Índice de Refração
10	1.3448
15	1.3511
20	1.3575
25	1.3640
30	1.3707
35	1.3774
40	1.3841
45	1.3909
50	1.3981
55	1.4055
60	1.4130

Como se pode verificar pelos valores na tabela 5, o IR sobe com a concentração de glicerina na solução aquosa. Para cada tratamento com estas soluções foram feitos 3 estudos para se obterem resultados estatísticos das variações temporárias de T_c em cada caso. Considerando os espectros médios de T_c dos dois tipos de tecido de rim que estão representados na Fig. 12, verificamos que não existem bandas de absorção entre 600 e 800 nm. Desta forma, foram selecionados comprimentos de onda a cada 20 nm nesta banda espectral para se estudarem as variações temporais de T_c nos tratamentos aplicados. A Fig. 20 apresenta as variações médias (de 3 estudos) por comprimento de onda para cada tratamento aplicado aos tecidos de rim saudável e a Fig. 21 apresenta as variações médias por comprimento de onda obtidas nos tratamentos de tecidos de rim patológico. Em cada painel destas figuras foi inserida uma seta vertical para indicar que há um crescimento de comprimento de onda (com intervalos de 20 nm) entre a curva mais baixa, que corresponde a 600 nm, e a curva mais elevada, que corresponde a 800 nm. Foi também indicada uma outra seta horizontal para indicar o instante onde ocorre o início de

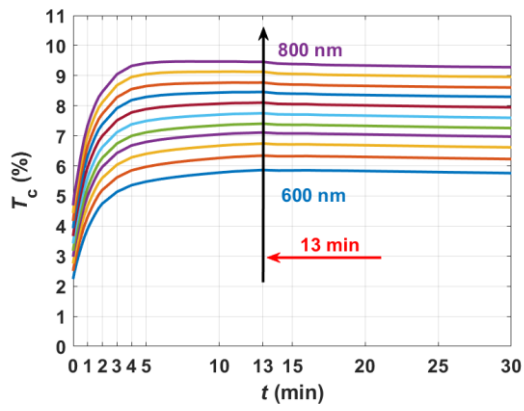
saturação após o crescimento exponencial inicial e que corresponde ao instante onde se fez o corte das evoluções para processamentos futuros.



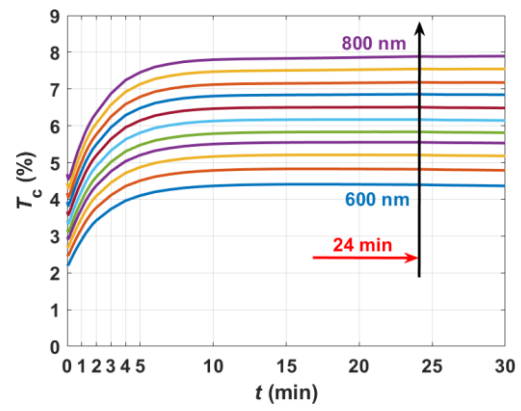
(a)



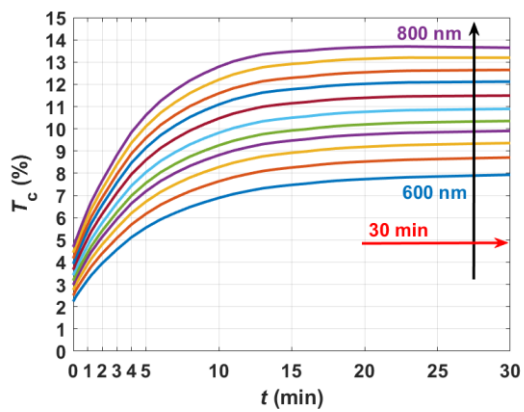
(b)



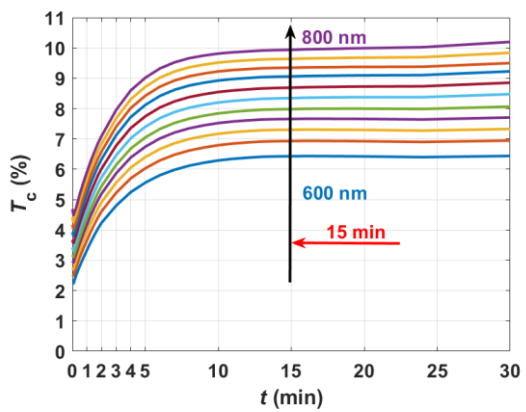
(c)



(d)



(e)



(f)

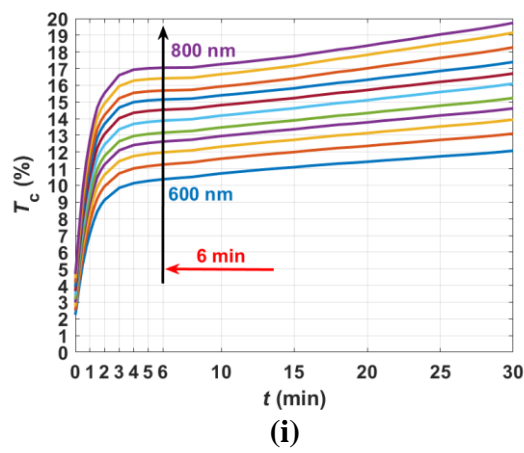
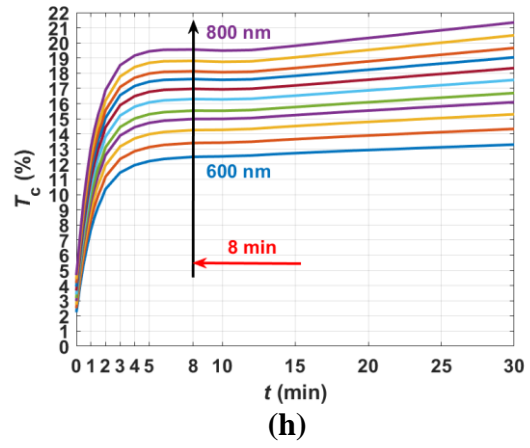
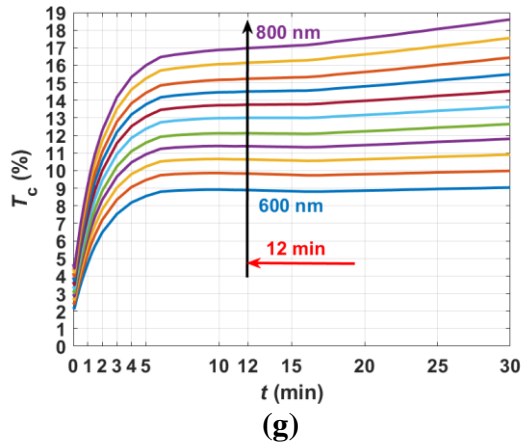
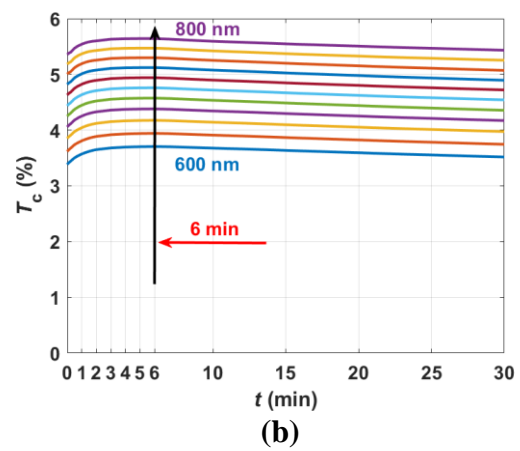
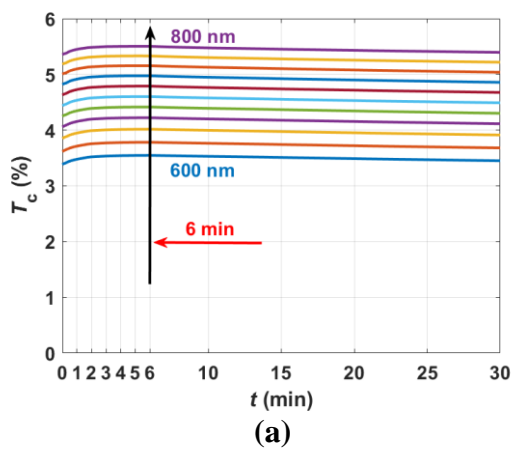
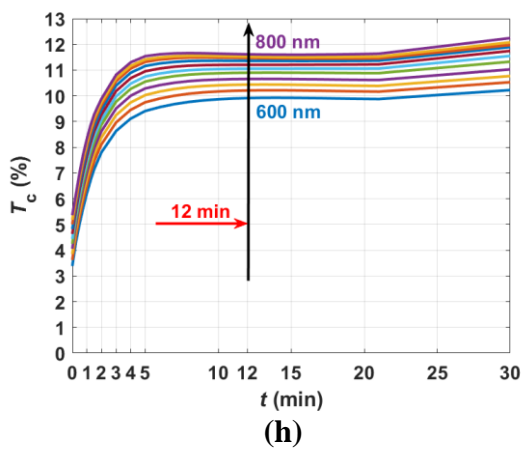
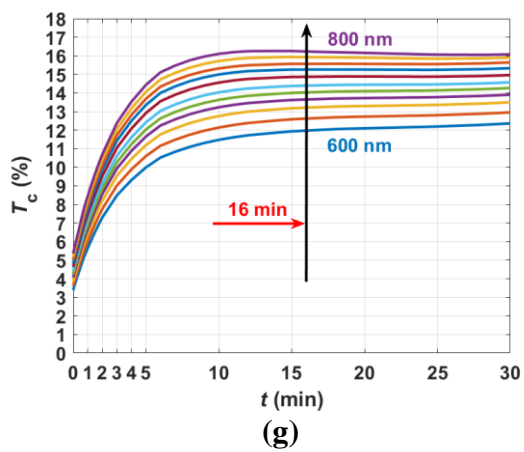
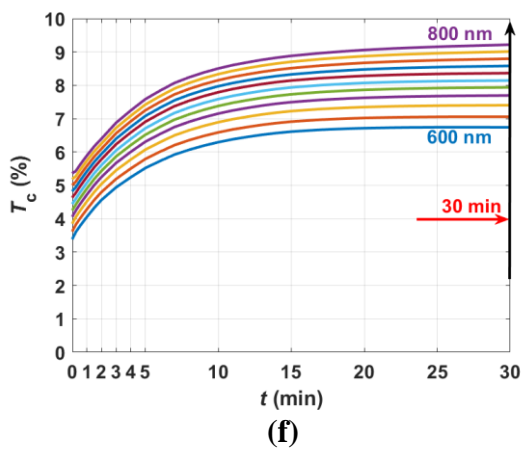
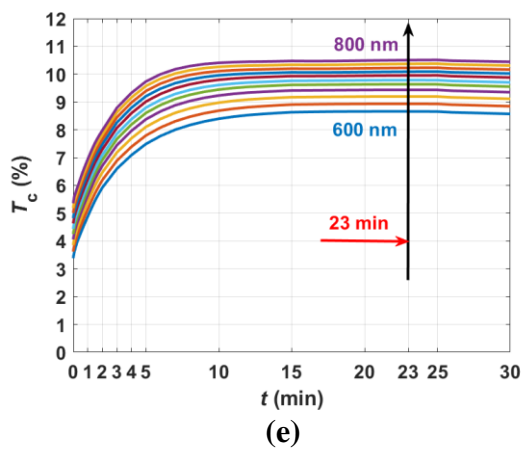
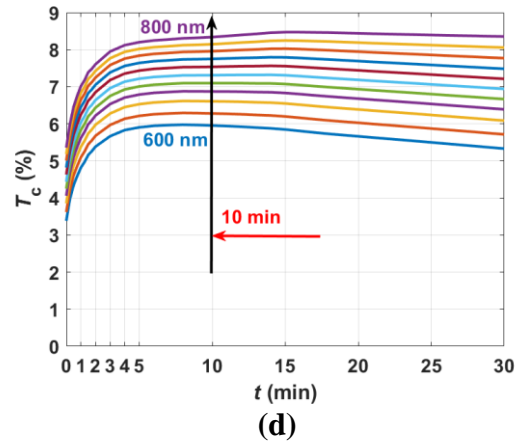
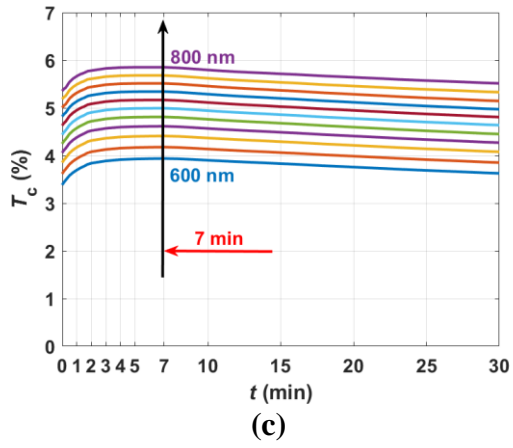


Figura 20 – Dependências temporais de T_c para diferentes comprimentos de onda obtidos nos tratamentos de tecidos de rim saudável com soluções de glicerina nas concentrações: 20% (a), 25% (b), 30% (c), 35% (d), 40% (e), 45% (f), 50% (g), 55% (h) e 60% (i).





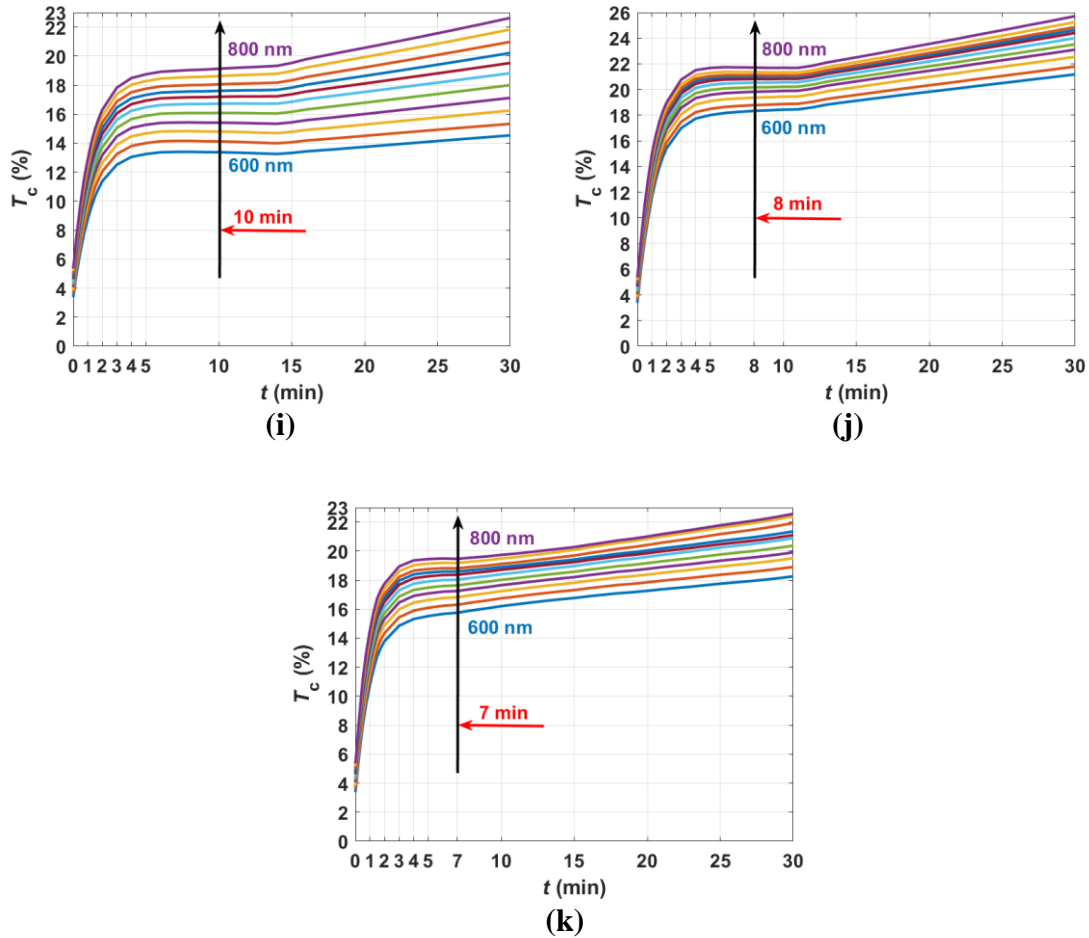


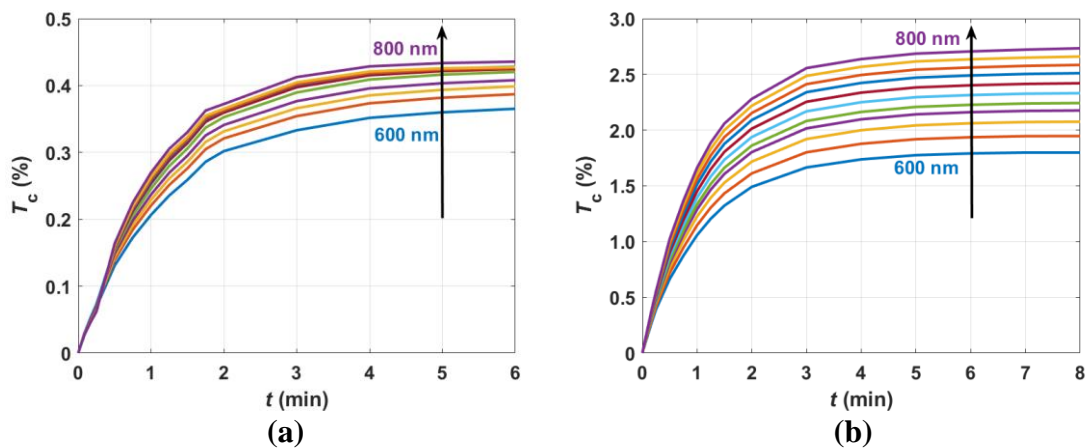
Figura 21 – Dependências temporais de T_c para diferentes comprimentos de onda obtidos nos tratamentos de tecidos de rim patológico com soluções de glicerina nas concentrações: 10% (a), 15% (b), 20% (c), 25% (d), 30% (e), 35% (f), 40% (g), 45% (h), 50% (i), 55% (j) e 60% (k).

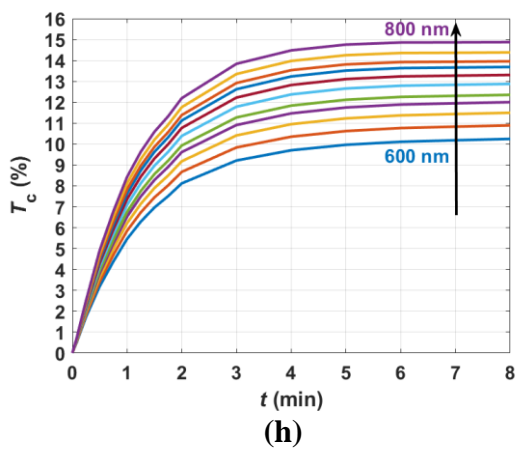
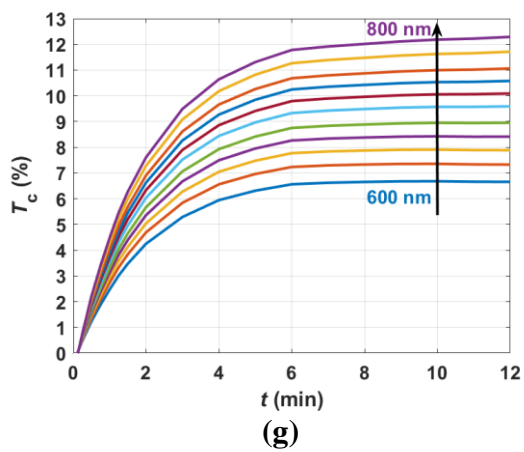
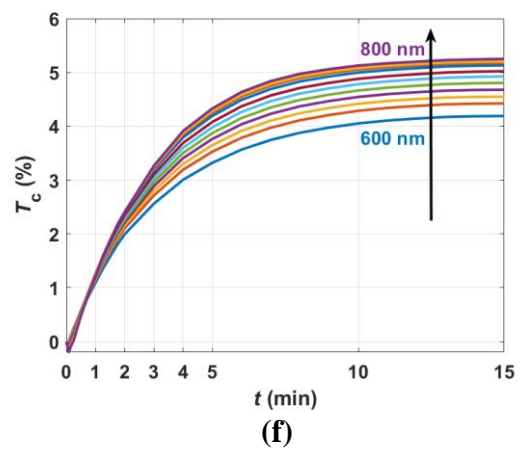
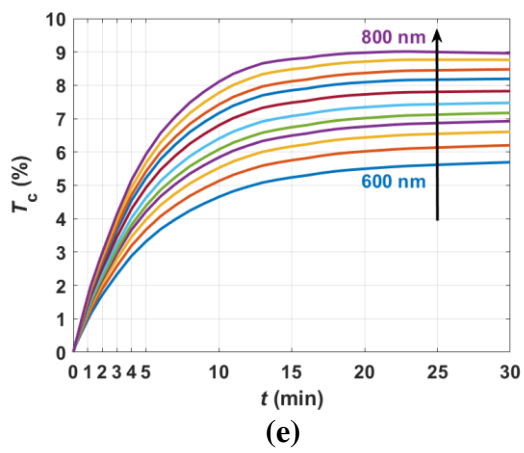
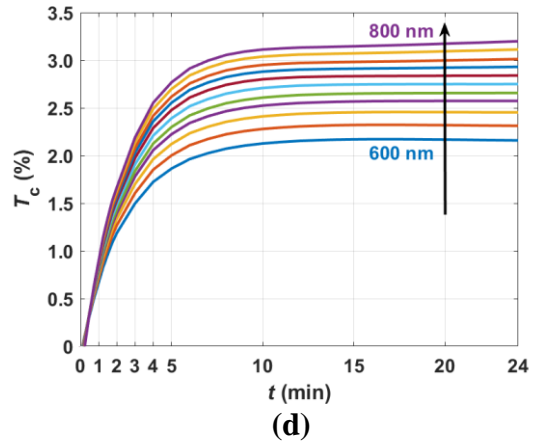
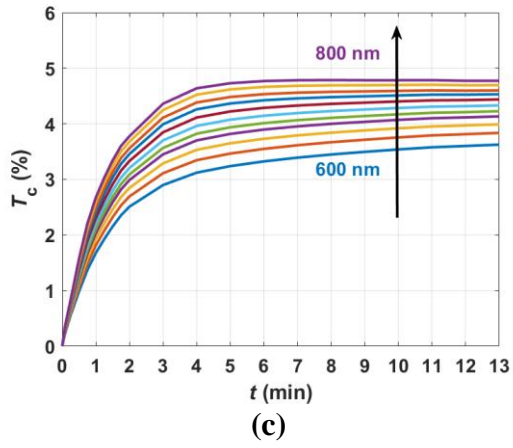
Considerando a sequência de gráficos apresentados para o rim saudável na Fig. 20 (e para o rim patológico na Fig. 21), verificamos pelas setas a vermelho que o limite de crescimento exponencial (início da saturação) ocorre a instantes de tempo crescentes com o aumento da concentração de glicerina até um valor de concentração particular. No caso do rim saudável, essa máxima extensão de tempo ocorre ao fim dos 30 minutos de tratamento para uma concentração de 40% na solução de tratamento. No caso do rim patológico, a mesma extensão de crescimento exponencial ao fim dos 30 minutos de tratamento é observada para o tratamento com a solução que contém 35% de glicerina. Para soluções com concentrações mais elevadas do que estas que agora referimos, ocorre

um comportamento inverso, com a diminuição do tempo limite para o crescimento exponencial inicial em função do aumento de concentração de glicerina na solução.

Deve notar-se que em alguns casos representados nas Figs. 20 e 21, o regime de crescimento exponencial inicial termina a instantes de tempo distintos para as diferentes curvas representadas. Nesses tratamentos, o limite de crescimento escolhido para desprezar as variações temporais posteriores para os cálculos seguintes (a colocação da seta preta) foi estabelecido num ponto intermédio dos diferentes limites observados para as diferentes curvas.

Após se delimitarem no tempo os crescimentos iniciais exponenciais das curvas de cada tratamento, passou-se ao passo seguinte, que consistiu em deslocar cada uma das variações temporais por forma a terem $T_c=0$ no instante de tempo inicial. Cada uma dessas variações temporais foi posteriormente normalizada ao seu valor máximo, para serem ajustadas por uma curva como a descrita pela Eq. (17). As Figs. (22) e (23) apresentam as variações temporais de cada tratamento após serem delimitadas no tempo e deslocadas verticalmente, mas sem o cálculo de normalização para melhor percepção. Os gráficos da Fig. 22 referem-se aos tratamentos de tecidos de rim saudável e os gráficos da Fig. 23 referem-se aos tratamentos de tecidos do rim patológico.





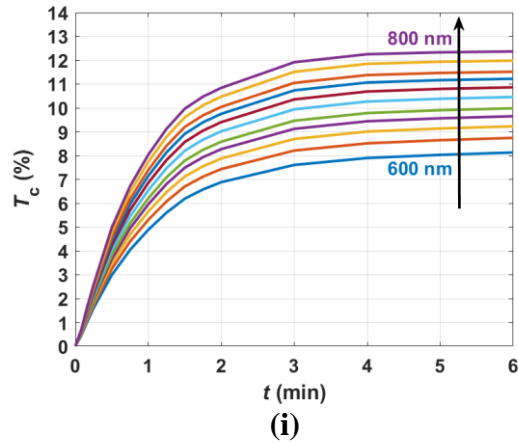
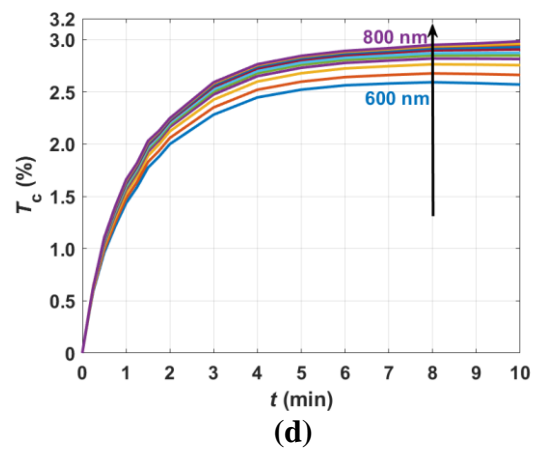
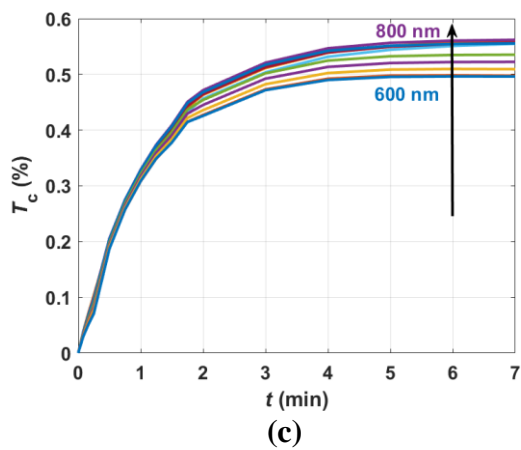
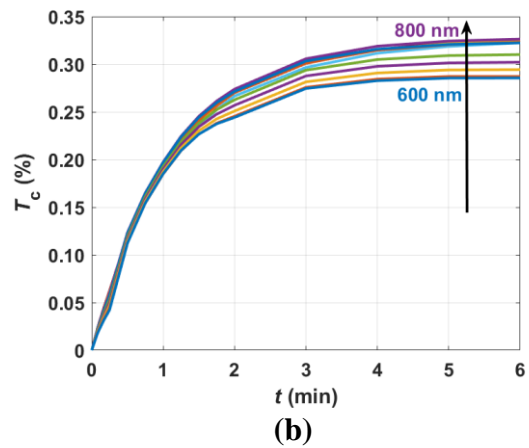
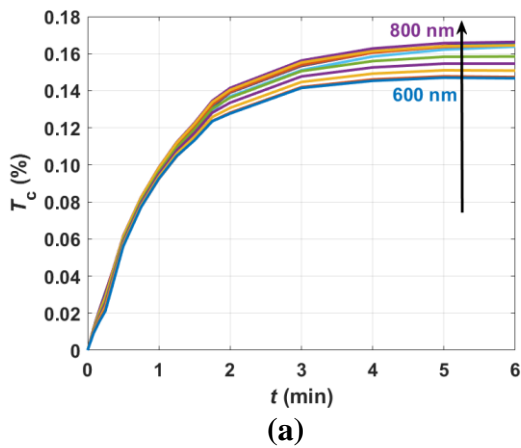
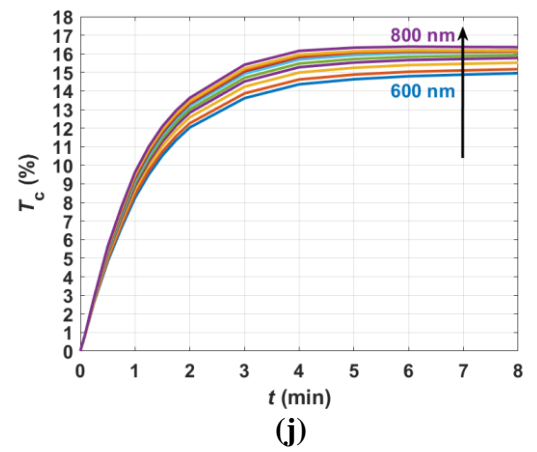
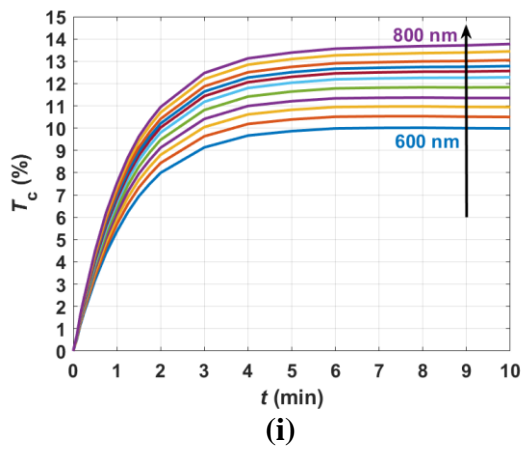
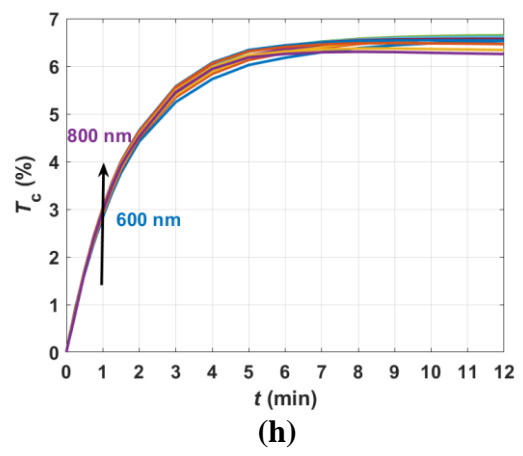
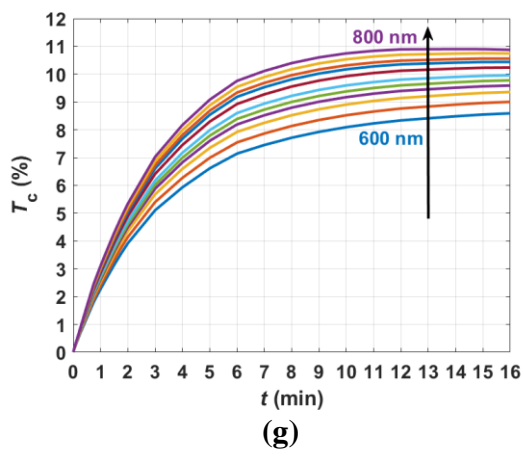
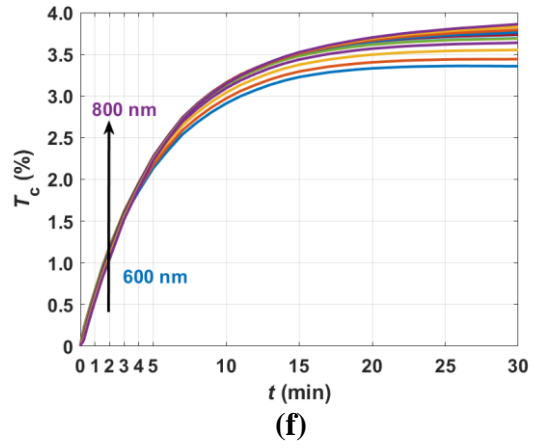
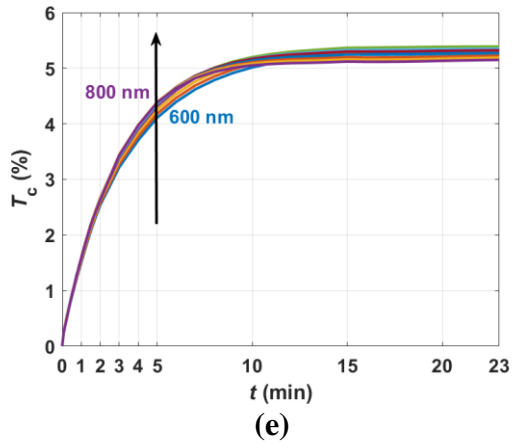


Figura 22 – Dependências temporais de T_c deslocadas para zero a $t=0s$ e restritas ao intervalo de tempo anterior à saturação, para diferentes comprimentos de onda obtidos nos tratamentos de tecidos do rim saudável com soluções de glicerina nas concentrações: 20% (a), 25% (b), 30% (c), 35% (d), 40% (e), 45% (f), 50% (g), 55% (h) e 60% (i).





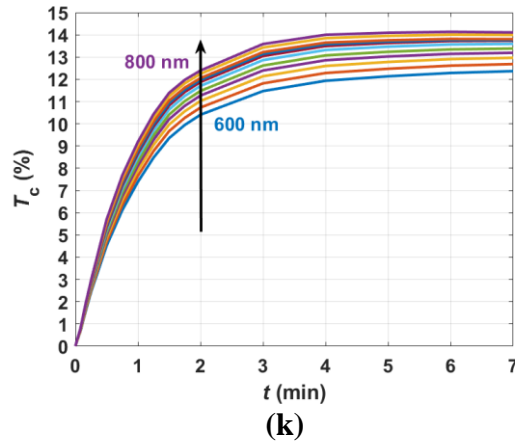


Figura 23 – Dependências temporais de T_c deslocadas para zero a $t=0s$ e restritas ao intervalo de tempo anterior à saturação, para diferentes comprimentos de onda obtidos nos tratamentos de tecidos do rim patológico com soluções de glicerina nas concentrações: 10% (a), 15% (b), 20% (c), 25% (d), 30% (e), 35% (f), 40% (g), 45% (h), 50% (i), 55% (j) e 60% (k).

Como se pode verificar pelos vários gráficos representados nas Figs. 22 e 23, todas as curvas de dependência temporal de T_c se encontram delimitadas no seu intervalo de tempo de crescimento exponencial. Verifica-se em alguns casos representados na Fig. 23 que as curvas representadas de diferentes comprimentos de onda num mesmo tratamento se cruzam a um dado instante de tempo dentro do intervalo considerado. Tal facto deve-se a que os espectros de T_c das amostras de tecido usadas eram mais horizontais na zona de comprimentos de onda considerados e também devido à influência da banda de absorção da água (que ocorre acima de 900 nm) nas curvas de maior comprimento de onda. Apesar destes comportamentos, todas as curvas representadas em ambas as figuras têm um crescimento exponencial nos intervalos de tempo representados e podem por isso ser ajustadas pela Eq. (17). Note-se, por fim, que os dados em todos os gráficos das Figs. 22 e 23 foram representados como curvas, mas na realidade consistem em pontos discretos medidos a cada 5 segundos nos primeiros 15 segundos de tratamento, a cada 15 segundos depois disso e até atingir os 2 minutos e a cada minuto após o segundo minuto de tratamento.

Considerando os pontos discretos em cada curva representada nos diversos painéis da Fig. 22 e da Fig. 23, fez-se o ajuste com a curva descrita pela Eq. (17), para se obter o valor de τ correspondente. Tais ajustes foram feitos com a ferramenta *Curve Fitting Tool*

do MATLABTM e os valores obtidos nesses ajustes encontram-se representados na tabela 6 para os tratamentos de tecidos de rim saudável e na tabela 7 para os tratamentos de tecidos de rim patológico.

Tabela 6 – Valores de τ estimados experimentalmente para cada tratamento dos tecidos de rim saudável.

Solução (%)		Comprimento de onda (nm)										
		600	620	640	660	680	700	720	740	760	780	800
20	τ (s)	68.77	68.32	69.47	68.52	66.66	67.10	65.68	64.71	63.63	62.61	63.68
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	66.29 \pm 2.38										
25	τ (s)	67.33	67.39	67.33	67.05	66.65	66.27	66.01	65.78	65.54	65.23	65.13
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	66.34 \pm 0.86										
30	τ (s)	95.21	91.98	88.53	85.86	83.62	81.05	78.76	77.24	76.09	75.08	74.14
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	82.51 \pm 7.14										
35	τ (s)	156.7	156.3	156.6	157.3	157.9	157.4	157.4	159.2	161.3	163.4	165.3
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	158.98 \pm 3.03										
40	τ (s)	345.3	335.6	326.3	320.2	317.3	309.9	299.3	194.4	293.7	285.6	277.1
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	300.43 \pm 40.91										
45	τ (s)	190.3	189.4	188.6	188.9	190.3	191.8	192.8	191.7	190.1	193.4	197.1
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	191.30 \pm 2.47										
50	τ (s)	104.2	103.2	104.1	105.4	107.4	110.8	112.7	114.3	116.2	118.4	120.3
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	110.64 \pm 6.16										
55	τ (s)	80.77	79.64	78.90	77.94	76.89	75.97	75.08	74.30	73.56	73.03	72.62
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	76.25 \pm 2.80										
60	τ (s)	67.20	66.02	64.81	63.79	62.88	62.00	60.98	59.82	58.90	58.39	57.53
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	62.03 \pm 3.22										

Tabela 7 – Valores de τ estimados experimentalmente para cada tratamento dos tecidos de rim patológico.

Solução (%)		Comprimento de onda (nm)										
		600	620	640	660	680	700	720	740	760	780	800
10	τ (s)	66.42	66.03	65.48	64.56	63.95	63.48	62.58	62.00	61.73	61.49	61.33
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	63.55 \pm 1.87										
15	τ (s)	68.49	67.68	66.92	65.74	64.96	64.18	62.83	61.84	61.06	60.21	59.80
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	63.97 \pm 3.05										
20	τ (s)	71.53	70.65	69.94	68.53	67.69	66.90	65.61	64.72	64.02	63.31	63.02

	$\langle \tau \rangle \pm dp$	66.74 ± 3.12										
25	τ (s)	75.87	76.22	76.38	76.27	76.09	76.70	77.91	79.32	81.02	82.83	85.19
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	78.53 ± 3.19										
30	τ (s)	189.4	186.1	181.9	178.6	176.6	174.3	171.2	167.9	165.4	163.4	162.3
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	174.28 ± 9.17										
35	τ (s)	289.7	294.7	302.9	309.9	314.1	315.8	320.9	331.7	342.0	351.1	360.9
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	321.25 ± 22.91										
40	τ (s)	214.5	208.1	201.2	196.1	193.7	188.9	182.9	178.8	177.0	175.7	172.8
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	189.97 ± 13.97										
45	τ (s)	107.5	105.3	103.1	101.6	100.5	99.29	97.83	95.77	94.63	93.77	93.12
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	99.31 ± 4.79										
50	τ (s)	76.75	76.13	75.66	75.43	75.68	76.29	76.39	76.44	76.85	77.69	78.33
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	76.51 ± 0.88										
55	τ (s)	73.89	73.04	72.39	71.59	70.51	69.27	68.02	66.70	65.45	64.92	64.49
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	69.12 ± 3.41										
60	τ (s)	65.72	64.67	63.61	62.71	61.90	61.11	60.22	59.20	58.42	57.96	57.35
	$\langle \tau \rangle \pm dp$	61.17 ± 2.81										

Considerando os valores médios e respectivos desvios padrão de τ representados nas tabelas 6 e 7, fez-se uma representação desses valores em função da concentração de glicerina na solução de tratamento para verificar o tipo de dependência. Tal representação, para os tratamentos dos dois tipos de tecidos do rim encontra-se na Fig. 24, onde os pontos discretos respeitantes a cada tecido foram ajustados por *splines*.

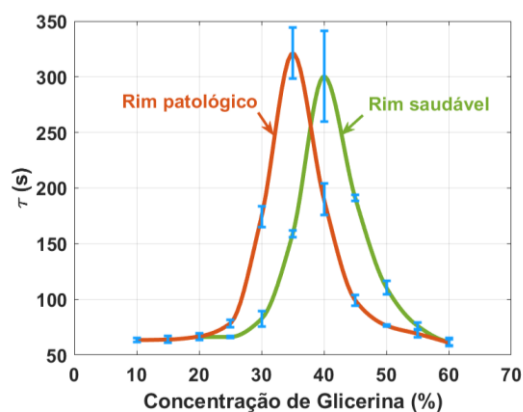


Figura 24 – Tempos médios de difusão dos fluxos efetivos em cada tratamento em função da concentração de glicerina na solução usada.

O gráfico representado na Fig. 24 contém muita informação. A primeira informação que podemos retirar deste gráfico consiste na avaliação dos valores de τ que correspondem aos fluxos únicos de glicerina e de água nos dois tecidos. No caso do fluxo da glicerina, a sua difusão única ocorre quando existe um equilíbrio entre a água na solução e a água móvel dentro do tecido [22, 61–64]. Este equilíbrio é obtido para o valor máximo verificado para cada uma das *splines* [10, 16, 22, 26]. Assim e a partir do gráfico da Fig. 24, o tempo de difusão da glicerina nos dois tecidos é dado por: $\tau_{\text{glic-rs}}=300.04\text{s}$ no rim saudável e $\tau_{\text{glic-rp}}=320.54\text{s}$ no rim patológico. Esta diferença de valores mostra que a glicerina leva mais tempo a se difundir para o interior do tecido patológico. Tal facto pode estar relacionado com um maior efeito da viscosidade da glicerina nessa difusão através das células cancerígenas. Por outro lado, os picos das *splines*, de onde se retiraram estes valores de τ mostram-nos qual a concentração de água móvel nos dois tecidos. No caso do rim saudável, o pico ocorre a uma concentração de glicerina de 40.2%, o que significa que o conteúdo de água móvel no tecido é de 59.8%. Estes valores mostram um conteúdo de água móvel no rim que é idêntico ao obtido para outros tecidos [22, 23, 61–64]. No caso do rim patológico, o pico ocorre a uma concentração de glicerina de 35.0%, o que significa que o conteúdo de água móvel nesse tecido é de 65%, 5.2% superior ao observado para o rim saudável. Esta diferença de cerca de 5% a mais no rim patológico é idêntica à que foi observada num estudo anterior com tecidos da mucosa colorectal [23]. A obtenção de um conteúdo de água móvel diferenciado nos dois tecidos, que já tinha sido observado para outro tipo de cancro e dado que o conteúdo de água total nos dois tecidos do rim é o mesmo (ver Fig. 17 e texto no segundo parágrafo da página 57), leva-nos à conclusão de que o desenvolvimento do cancro aciona a conversão entre estados de ligação da água no interior. De acordo com as Refs. [77] e [78], existem quatro estados de ligação da água aos restantes componentes biológicos no interior dos tecidos: fortemente ligada, firmemente ligada, fracamente ligada e livre. Conforme é descrito por outros autores [16], quando um tecido é sujeito a tratamentos de transparência, a água livre e a fracamente ligada podem mover-se para o exterior devido à pressão osmótica criada pelo agente de transparência. Por essa razão estes dois estados de água se designam por água móvel. Em face dos resultados apresentados na Fig. 24 e dos que são

apresentados na Ref. [23] para tecidos colorettais, podemos concluir que ocorre conversão de água firmemente ligada e eventualmente de água fortemente ligada em água móvel com o desenvolvimento do cancro.

À semelhança do procedimento adotado noutros estudos anteriores [10, 16, 22, 26, 61, 62], o tempo de difusão característico para o fluxo de água para o exterior é obtido da Fig. 24, a partir do valor de τ observado para os tratamentos com 60% de glicerina. Assim, considerando esses tratamentos, os valores obtidos foram os seguintes: $\tau_{H_2O-rs}=62.03s$ no rim saudável e $\tau_{H_2O-rp}=61.17s$ no rim patológico.

Tendo-se obtido os tempos característicos dos fluxos de glicerina e de água nos dois tipos de tecidos de rim humano, resta agora calcular os coeficientes de difusão correspondentes para caracterizar os mecanismos de desidratação e de adaptação de índices de refração nestes tecidos. Para efetuar esses cálculos com a Eq. (18) são necessárias medições de espessura dos tecidos durante os tratamentos que deram origem à obtenção dos valores de τ . Tais medições foram realizadas usando a montagem experimental representada na Fig. 6 e seguindo o procedimento descrito na subseção 3.3.1. Foram realizados três estudos deste tipo para rim saudável em tratamento com soluções aquosas contendo 40% e 60% de glicerina e para rim patológico em tratamento com soluções contendo 35% e 60% de glicerina. Os resultados médios destes estudos encontram-se representados na Fig. 25 para os dois tipos de rim.

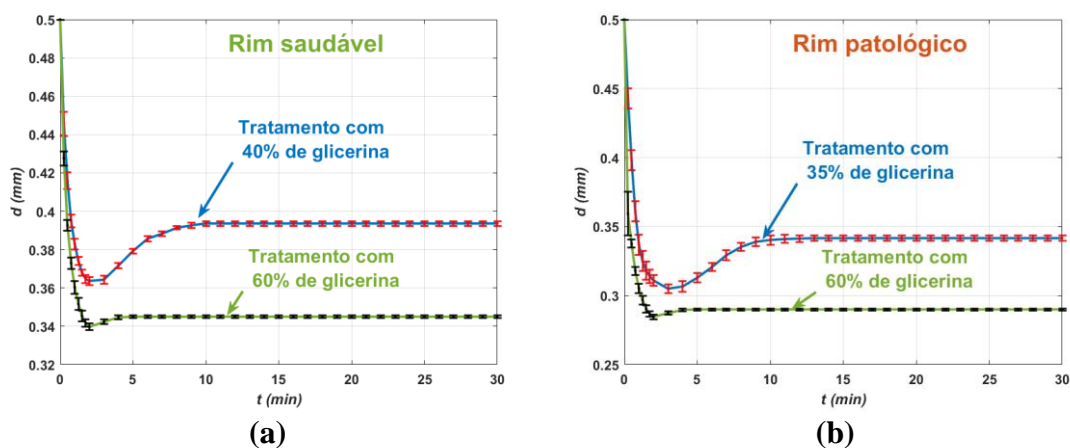


Figura 25 – Variação da espessura média em função do tempo para: tecidos de rim saudável em tratamento com soluções aquosas contendo 40% e 60% de glicerina (a) e tecidos de rim patológico em tratamento com soluções aquosas contendo 35% e 60% de glicerina (b).

Como se pode verificar em todas as variações de espessura representadas nos gráficos da Fig. 25, os tecidos em tratamento apresentam uma diminuição brusca de espessura nos primeiros dois minutos de tratamento. Tal diminuição rápida da espessura é devida ao mecanismo de desidratação, que é rápido (τ da ordem de 1 minuto). Após esta diminuição rápida de espessura, verifica-se um aumento gradual da mesma até se atingir um valor constante. Este segundo comportamento mostra a difusão do agente para o interior do tecido. Outro aspeto a notar das variações apresentadas na Fig. 25 é que para os tratamentos com 60% de glicerina, o aumento de espessura dos tecidos após a desidratação inicial é praticamente nulo. Isto mostra que a escolha desse tratamento para avaliar o valor de τ para a água é adequado.

Considerando os valores de τ obtidos do gráfico na Fig. 24, foram recolhidos da Fig. 25 os valores de espessura do tecido que correspondem a esses instantes em cada tratamento. Assim, a espessura média do rim saudável no instante que corresponde a $\tau_{\text{glic-rs}}$ (no tratamento com 40% de glicerina) é de 0.379 mm, enquanto para o instante que corresponde a $\tau_{\text{H2O-rs}}$ (no tratamento com 60% de glicerina) é de 0.359 mm. No caso do rim patológico, a espessura média no instante que corresponde a $\tau_{\text{glic-rp}}$ (no tratamento com 35% de glicerina) é de 0.316 mm, enquanto para o instante que corresponde a $\tau_{\text{H2O-rp}}$ (no tratamento com 60% de glicerina) é de 0.304 mm. Estes valores de espessura foram convertidos para cm e usados na Eq. (18) para obter os valores dos coeficientes de difusão para a glicerina e para a água nos dois tecidos. Tais cálculos estão representados nas Eqs. (23) e (24) para o rim saudável e nas Eqs. (25) e (26) para o rim patológico.

$$D_{\text{glic-rs}} = \frac{0.0379^2}{\pi^2 \times 300.04} = 4.851 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}, \quad (23)$$

$$D_{\text{H2O-rs}} = \frac{0.0359^2}{\pi^2 \times 62.03} = 2.105 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}, \quad (24)$$

$$D_{\text{glic-rp}} = \frac{0.0316^2}{\pi^2 \times 320.54} = 3.156 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}, \quad (25)$$

$$D_{\text{H2O-rp}} = \frac{0.0304^2}{\pi^2 \times 61.17} = 1.531 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}, \quad (26)$$

Considerando os valores obtidos nestes cálculos, a tabela 8 apresenta de forma resumida as propriedades de difusão da glicerina e da água nos dois tecidos de rim.

Tabela 8 – Propriedades de difusão da glicerina e da água em tecidos de rim saudável e patológico.

	Rim saudável		Rim patológico	
	τ (s)	D (cm ² /s)	τ (s)	D (cm ² /s)
Glicerina	300.04	4.851×10^{-7}	320.54	3.156×10^{-7}
Água	62.03	2.105×10^{-6}	61.17	1.531×10^{-6}

Os valores apresentados na tabela 8 são semelhantes aos obtidos para outros tecidos biológicos [22]. O coeficiente de difusão da glicerina obtido para tecidos do rim é da mesma ordem de grandeza dos que foram obtidos também para a glicerina noutros tecidos como o pâncreas [61], o musculo esquelético [62], o fígado ou tecidos colorettais humanos saudáveis e com cancro [22]. No caso da água, os coeficientes obtidos para o rim são também semelhantes aos obtidos para outros tecidos, uma vez que todos andam na ordem de grandeza de 10^{-6} a 10^{-5} cm²/s [22].

A obtenção de valores discriminados para as duas propriedades de difusão da glicerina e da água nos tecidos de rim humano saudável e patológico é suficiente para caracterizar tanto os fluxos de glicerina e de água nesses tecidos como os mecanismos de transparência designados por desidratação do tecido e adaptação de índices de refração. A diferenciação entre parâmetros para os dois tipos de tecidos do rim pode ser utilizada no desenvolvimento de procedimentos óticos de diagnóstico e de tratamento do cancro do rim, em que o recurso a tratamentos de transparência seja uma mais valia.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO

5. Conclusão

O presente trabalho consistiu na aplicação de técnicas óticas para avaliar propriedades e parâmetros discriminatórios em tecidos de rim humano saudável e patológico. A possibilidade de estudar tecidos na sua versão saudável e patológica, em especial com um tipo particular de cancro, é sempre interessante e permite recolher informação discriminada.

Na primeira fase do trabalho, utilizando o método de reflexão interna total, foi possível obter valores distintos de IR a alguns comprimentos de onda, o que permitiu calcular as curvas de dispersão para os dois tipos de tecido. Tais curvas mostram que o rim patológico apresenta uma dispersão superior à do rim saudável, tal como já tinha sido verificado para o caso de tecidos da mucosa colorectal. Com a aplicação das relações de K-K ao coeficiente de absorção espectral que foi calculado para cada tecido, conseguiu-se recriar dispersões mais realistas para os dois tecidos. Tais dispersões espectrais mostraram a existência de assinaturas da hemoglobina e da água, evidenciando um maior conteúdo de sangue no tecido patológico, tal como observado em outros estudos.

O cálculo das propriedades óticas espectrais dos dois tecidos à custa de espectros medidos diretamente de amostras *ex vivo*, possibilitou também a recolha de variada informação discriminatória. Para além de todas as propriedades calculadas para ambos os tecidos apresentarem dependências no comprimento de onda semelhantes às observadas para outros tecidos, a profundidade de penetração da luz mostra que o conteúdo total de água em ambos os tecidos é o mesmo. Relativamente ao coeficiente de absorção, verificou-se a existência de pigmentos nos dois tipos de tecido. Os pigmentos detetados foram a melanina e a lipofuscina, tendo-se verificado que quando passamos do rim saudável para o rim patológico, cerca de 83% de melanina é convertida em lipofuscina. Lembrando que outros estudos identificaram a melanina como o pigmento relacionado com o processo de envelhecimento dos tecidos e a lipofuscina como o pigmento ligado ao cancro, este resultado mostra que o desenvolvimento do cancro induz por algum meio este processo de conversão de pigmentos.

Na última fase do trabalho, aquando do estudo da difusão de glicerina nos tecidos, verificou-se que o rim patológico apresenta um conteúdo de água livre cerca de 5% superior ao rim saudável, uma diferença que tinha já sido detetada para o cancro colorectal. Dado que com o estudo das propriedades óticas espectrais dos tecidos se

verificou que o conteúdo total de água era idêntico, este resultado sugere que com o desenvolvimento do cancro ocorre uma conversão da água firmemente ligada em água livre. Tal acréscimo de água móvel nos espaços intersticiais do tecido com cancro pode ser justificado com a possibilidade de essa água extra transportar mais nutrientes necessários às células cancerígenas e ao seu desenvolvimento. Nesta fase final foram também obtidas as propriedades de difusão da glicerina e da água nos dois tipos de tecido do rim humano, propriedades que caracterizam os mecanismos de desidratação e de adaptação de índices de refração durante a criação de transparência. Sendo estas propriedades discriminadas, espera-se que os seus valores possam ser usados na otimização de tratamentos que tenham de ser aplicados em procedimentos de diagnóstico e de tratamento do cancro do rim.

Considerando toda a informação inovadora e discriminada que foi recolhida no presente trabalho para os dois tipos de tecido estudados, espera-se que possa ser usada no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico do cancro do rim. A aplicação das técnicas usadas no presente trabalho a tecidos *ex vivo* pode ser usada para realizar estudos semelhantes em tecidos relativos a outros tipos de cancro. No entanto, com os avanços recentes da ótica médica, o grande objetivo consiste em reformular os métodos usados para que possam recolher o mesmo tipo de informação de tecidos *in vivo*, sem recurso a cirurgia.

Referências

- [1] “Types of kidney cancer,” 2019. [Online]. Available: <https://www.cancercenter.com/cancer-types/leukemia/types>. [Accessed: 10-Aug-2021].
- [2] G. Scelo and T. L. Larose, “Epidemiology and risk factors for kidney cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, no. 36, pp. 3574–3581, 2018, doi: 10.1200/JCO.2018.79.1905.
- [3] W. M. Linehan *et al.*, “The metabolic basis of kidney cancer,” *Cancer Discov.*, vol. 9, no. 8, pp. 1006–1021, 2019, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1354.
- [4] L. Fernandes *et al.*, “Diffuse reflectance and machine learning techniques to differentiate colorectal cancer ex vivo,” *Chaos*, vol. 31, no. 5, 2021, doi: 10.1063/5.0052088.
- [5] S. Carvalho, I. Carneiro, R. Henrique, V. Tuchin, and L. Oliveira, “Lipofuscin-type pigment as a marker of colorectal cancer,” *Electron.*, vol. 9, no. 11, pp. 1–14, 2020, doi: 10.3390/electronics9111805.
- [6] L. Fernandes *et al.*, “Tissue Spectroscopy and Optical Clearing of Colorectal Mucosa in the Pursuit of New Cancer Diagnostic Approaches,” vol. 7, no. 4, pp. 1–16, 2021, doi: 10.18287/JBPE21.07.040302.
- [7] V. V. Tuchin and L. Oliveira, “Recent progress in tissue enhanced spectroscopy for cancer detection,” *Asian J. Physic*, vol. 1, no. 3, pp. 427–444, 2021.
- [8] L. M. Oliveira, K. Zaytsev, and V. V. Tuchin, “Improved biomedical imaging over a wide spectral range from UV to THz towards multimodality,” vol. 1158503, no. October, p. 20, 2020, doi: 10.1117/12.2584999.
- [9] N. M. Gomes, V. V. Tuchin, and L. M. Oliveira, “Refractive Index Matching Efficiency in Colorectal Mucosa Treated with Glycerol,” *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 27, no. 4, 2021, doi: 10.1109/JSTQE.2021.3050208.
- [10] V. V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina, *Handbook of Tissue Optical Clearing - New Prospects in Optical Imaging*, 1st ed. 2022.
- [11] P. Vart and M. E. Grams, “Measuring and Assessing Kidney Function,” *Semin. Nephrol.*, vol. 36, no. 4, pp. 262–272, 2016, doi:

- 10.1016/j.semnephrol.2016.05.003.
- [12] A. P. McMahon, *Development of the Mammalian Kidney*, 1st ed., vol. 117. Elsevier Inc., 2016.
- [13] S. B. Hancock and C. S. Georgiades, “Kidney Cancer,” *Cancer J. (United States)*, vol. 22, no. 6, pp. 387–392, 2016, doi: 10.1097/PPO.0000000000000225.
- [14] A. Diaz de Leon and I. Pedrosa, “Imaging and Screening of Kidney Cancer,” *Radiol. Clin. North Am.*, vol. 55, no. 6, pp. 1235–1250, 2017, doi: 10.1016/j.rcl.2017.06.007.
- [15] E. Cho, P. Lindblad, and H. O. Adami, “Kidney Cancer,” *Textb. Cancer Epidemiol.*, vol. 7, no. 6, pp. 618–630, 2009, doi: 10.1093/acprof:oso/9780195311174.003.0023.
- [16] L. M. C. Oliveira and V. V. Tuchin, *The Optical Clearing Method - A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering*. Springer: Cham, Switzerland, 2019.
- [17] V. Tuchin, *Tissue Optics*, Third Edit. Spie Press, 2015.
- [18] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, “Measurement of optical properties of normal and pathological human liver tissue from deep-UV to NIR,” no. April, p. 16, 2020, doi: 10.1117/12.2554877.
- [19] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, and V. Tuchin, “Water Content and Scatterers Dispersion Evaluation in Colorectal Tissues,” *J. Biomed. Photonics Eng.*, vol. 3, no. 4, p. 040301, 2017, doi: 10.18287/jbpe17.03.040301.
- [20] V. Tuchin, *Optical Clearing of Tissues and Blood*. Spie Press, 2006.
- [21] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, A. Selifonov, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, “Enhanced Ultraviolet Spectroscopy by Optical Clearing for Biomedical Applications,” *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 27, no. 4, 2021, doi: 10.1109/JSTQE.2020.3012350.
- [22] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. M. Oliveira, and V. V. Tuchin, “A robust ex vivo method to evaluate the diffusion properties of agents in biological tissues,” *J. Biophotonics*, vol. 12, no. 4, 2019, doi: 10.1002/jbio.201800333.
- [23] S. Carvalho, N. Gueiral, E. Nogueira, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin,

- “Glucose diffusion in colorectal mucosa—a comparative study between normal and cancer tissues,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 22, no. 9, p. 091506, 2017, doi: 10.1117/1.jbo.22.9.091506.
- [24] D. K. Tuchina *et al.*, “Ex vivo optical measurements of glucose diffusion kinetics in native and diabetic mouse skin,” *J. Biophotonics*, vol. 8, no. 4, pp. 332–346, 2015, doi: 10.1002/jbio.201400138.
- [25] L. M. Oliveira *et al.*, “Tissue optical clearing as a diagnostic tool for tissue pathology differentiation,” *Proc. - Int. Conf. Laser Opt. 2018, ICLO 2018*, p. 508, 2018, doi: 10.1109/LO.2018.8435385.
- [26] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, Y. P. Sinichkin, I. Y. Yanina, and V. V. Tuchin, “Optical clearing of biological tissues: prospects of application in medical diagnostics and phototherapy,” *J. Biomed. Photonics Eng.*, vol. 1, no. 1, pp. 22–58, 2015, doi: 10.18287/jbpe-2015-1-1-22.
- [27] N. Gomes, V. V. Tuchin, and L. M. Oliveira, “Uv-nir efficiency of the refractive index matching mechanism on colorectal muscle during treatment with different glycerol osmolarities,” *J. Biomed. Photonics Eng.*, vol. 6, no. 2, pp. 1–13, 2020, doi: 10.18287/JBPE20.06.020307.
- [28] W. Spalteholz, “Über das Durchsichtigmachen von menschlichen unde tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang: Über Knochenfärbung,” 1911.
- [29] W. Spalteholz, “Über das Durchsichtigmachen von menschlichen unde tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang: Über Knochenfärbung,” 1914.
- [30] R. W. Cumley, J. F. Crow, and A. B. Griffen, “Clearing specimens for the demonstration of bone,” *Biotech. Histochem.*, vol. 14, no. 1, pp. 7–11, 1939, doi: 10.3109/10520293909110285.
- [31] L. Oliveira, M. I. Carvalho, E. Nogueira, and V. V. Tuchin, “Optical clearing mechanisms characterization in muscle,” *J. Innov. Opt. Health Sci.*, vol. 9, no. 5, pp. 1–19, 2016, doi: 10.1142/S1793545816500358.
- [32] A. T. Yeh, B. Choi, J. S. Nelson, and B. J. Tromberg, “Reversible Dissociation of Collagen in Tissues,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 121, no. 6, pp. 1332–1335, 2003,

doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12634.x.

- [33] J. Hirshburg, B. Choi, J. S. Nelson, and A. T. Yeh, “Collagen solubility correlates with skin optical clearing,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 11, no. 4, p. 040501, 2006, doi: 10.1117/1.2220527.
- [34] L. Oliveira, A. Lage, M. Pais Clemente, and V. Tuchin, “Concentration dependence of the optical clearing effect created in muscle immersed in glycerol and ethylene glycol,” vol. 6535, no. 2007, pp. 653511-653511–12, 2007, doi: 10.1117/12.740972.
- [35] L. Oliveira, A. Lage, M. P. Clemente, and V. V. Tuchin, “A simple mixture to enhance muscle transmittance,” vol. 6791, no. 2008, pp. 67910J-67910J–11, 2008, doi: 10.1117/12.803978.
- [36] A. N. Bashkatov *et al.*, “Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, no. 9, 2018, doi: 10.1117/1.
- [37] T. M. Gonçalves, I. S. Martins, H. F. Silva, V. V. Tuchin, and L. M. Oliveira, “Spectral Optical Properties of Rabbit Brain Cortex between 200 and 1000 nm,” *Photochem*, vol. 1, no. 2, pp. 190–208, 2021, doi: 10.3390/photochem1020011.
- [38] Y. L. Jin, J. Y. Chen, L. Xu, and P. N. Wang, “Refractive index measurement for biomaterial samples by total internal reflection,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 51, no. 20, 2006, doi: 10.1088/0031-9155/51/20/N02.
- [39] I. Y. Yanina, E. N. Lazareva, and V. V. Tuchin, “Refractive index of adipose tissue and lipid droplet measured in wide spectral and temperature ranges,” *Appl. Opt.*, vol. 57, no. 17, p. 4839, 2018, doi: 10.1364/ao.57.004839.
- [40] I. Martins, H. Silva, V. V. Tuchin, and L. Oliveira, “Estimation of rabbit pancreas dispersion between 400 and 1000 nm,” *J. Biomed. Photonics Eng.*, vol. 7, no. 2, pp. 1–10, 2021, doi: 10.18287/JBPE21.07.020303.
- [41] J. Wang *et al.*, “Measurement of the refractive index of hemoglobin solutions for a continuous spectral region,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 7, p. 2536, 2015, doi: 10.1364/boe.6.002536.
- [42] O. Sydoruk, O. Zhernovaya, V. Tuchin, and A. Douplik, “Refractive index of solutions of human hemoglobin from the near-infrared to the ultraviolet range: Kramers-Kronig analysis,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 11, p. 115002, 2012, doi:

10.1117/1.jbo.17.11.115002.

- [43] J. Gienger, H. Gross, J. Neukammer, and M. Bär, “Determining the refractive index of human hemoglobin solutions by kramers-kronig relations with an improved absorption model,” *arXiv*, vol. 55, no. 31, 2017, doi: 10.1364/ao.55.008951.
- [44] F. P. Bolin, L. E. Preuss, R. C. Taylor, and R. J. Ference, “Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method,” vol. 28, no. 12, pp. 2297–2303, 1989.
- [45] M. Matiatou, P. Giannios, S. Koutsoumpos, K. G. Toutouzas, G. C. Zografos, and K. Moutzouris, “Data on the refractive index of freshly-excised human tissues in the visible and near-infrared spectral range,” *Results Phys.*, vol. 22, p. 103833, 2021, doi: 10.1016/j.rinp.2021.103833.
- [46] J. Lai, Z. Li, C. Wang, and A. He, “Experimental measurement of the refractive index of biological tissues by total internal reflection,” *Appl. Opt.*, vol. 44, no. 10, pp. 1845–1849, 2005, doi: 10.1364/AO.44.001845.
- [47] S. Carvalho, N. Gueiral, E. Nogueira, R. Henrique, L. Oliveira, and V. Tuchin, “Wavelength dependence of the refractive index of human colorectal tissues: comparison between healthy mucosa and cancer,” *J. Biomed. Photonics Eng.*, vol. 2, no. 4, p. 040307, 2016, doi: 10.18287/jbpe16.02.040307.
- [48] S. L. Jacques and L. Wang, “Monte Carlo Modeling of Light Transport in Tissues,” *Opt. Response Laser-Irradiated Tissue*, vol. 2607, no. 713, pp. 73–100, 1995, doi: 10.1007/978-1-4757-6092-7_4.
- [49] S. A. Prahl, M. J. C. van Gemert, and A. J. Welch, “Determining the optical properties of turbid media by using the adding–doubling method,” *Appl. Opt.*, vol. 32, no. 4, p. 559, 1993, doi: 10.1364/ao.32.000559.
- [50] “Optics Software.” [Online]. Available: <https://omlc.org/software/index.html>. [Accessed: 15-Sep-2021].
- [51] S. L. Jacques, “Optical properties of biological tissues: A review,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 58, no. 14, pp. 5007–5008, 2013, doi: 10.1088/0031-9155/58/14/5007.
- [52] T. Vo-Dinh, *Biomedical photonics handbook: Fundamentals, devices, and techniques*. 2014.

- [53] A. N. Bashkatov, É. A. Genina, V. I. Kochubey, and V. V. Tuchin, “Optical properties of the subcutaneous adipose tissue in the spectral range 400-2500 nm,” *Opt. Spectrosc. (English Transl. Opt. i Spektrosk.)*, vol. 99, no. 5, pp. 836–842, 2005, doi: 10.1134/1.2135863.
- [54] S. Peña-Llopis and J. Brugarolas, “Simultaneous isolation of high-quality DNA, RNA, miRNA and proteins from tissues for genomic applications,” *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 11, pp. 2240–2255, 2013, doi: 10.1038/nprot.2013.141.
- [55] I. Carneiro, S. Carvalho, V. Silva, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, “Kinetics of optical properties of human colorectal tissues during optical clearing: a comparative study between normal and pathological tissues,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, no. 12, p. 1, 2018, doi: 10.1117/1.jbo.23.12.121620.
- [56] “RefractiveIndex.INFO - Refractive index database.” [Online]. Available: <http://refractiveindex.info/?shelf=main&book=Cu&page=Rakic%5Cnhttp://refractiveindex.info/?shelf=main&book=Cu&page=Rakic>. [Accessed: 13-Sep-2021].
- [57] Q. W. Song, C.-Y. Ku, C. Zhang, and R. Michalak, “Modified critical angle method for measuring the refractive index of bio-optical materials and its application to bacteriorhodopsin,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 12, no. 5, p. 797, 1995, doi: 10.1364/josab.12.000797.
- [58] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, and V. V. Tuchin, “Simple multimodal optical technique for evaluation of free/bound water and dispersion of human liver tissue,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 22, no. 12, p. 1, 2017, doi: 10.1117/1.jbo.22.12.125002.
- [59] E. N. Lazareva et al., “Refractive index measurements of tissue and blood and OCAS in a wide spectral range,” *Tissue Opt. Clear. new Prospect. Opt. imaging*.
- [60] L. F. Hoyt, “Refractive Index of Glycerine-Water Solutions at 20 ° C (69 ° F),” *Ind. Eng. Chem.*, vol. 26, pp. 329–332, 1934.
- [61] I. S. Martins, “Caracterização das propriedades óticas do pâncreas e estudo da difusão da glicerina no seu interior,” 2021.
- [62] H. Filipe and D. Silva, “Comparação das propriedades de difusão de agentes de transparência em tecido muscular,” no. October, 2021.
- [63] L. M. Oliveira, M. I. Carvalho, E. M. Nogueira, and V. V. Tuchin, “Diffusion

- characteristics of ethylene glycol in skeletal muscle,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 20, no. 5, p. 059801, 2015, doi: 10.1117/1.jbo.20.5.059801.
- [64] L. M. Oliveira, M. I. Carvalho, E. M. Nogueira, and V. V. Tuchin, “The characteristic time of glucose diffusion measured for muscle tissue at optical clearing,” *Laser Phys.*, vol. 23, no. 7, 2013, doi: 10.1088/1054-660X/23/7/075606.
- [65] L. Oliveira, M. I. Carvalho, E. Nogueira, and V. V. Tuchin, “Skeletal muscle dispersion (400 – 1000 nm) and kinetics at optical clearing,” *J. Organ. Behav.*, vol. 28, no. 3, pp. 303–325, 2007, doi: 10.1002/j.
- [66] Y. Zhou, J. Yao, and L. V. Wang, “Tutorial on photoacoustic tomography,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 21, no. 6, p. 061007, 2016, doi: 10.1117/1.jbo.21.6.061007.
- [67] S. L. Jacques, “Origins of tissue optical properties in the UVA, visible, and NIR regions,” *OSA TOPS Adv. Opt. Imaging Phot. Migr.*, no. January 1996, pp. 364–371, 1996.
- [68] J. J. Hunter, J. I. W. Morgan, W. H. Merigan, D. H. Sliney, J. R. Sparrow, and D. R. Williams, “The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light,” *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2012, doi: 10.1016/j.preteyeres.2011.11.001.The.
- [69] M. E. Gosnell, A. G. Anwer, J. C. Cassano, C. M. Sue, and E. M. Goldys, “Functional hyperspectral imaging captures subtle details of cell metabolism in olfactory neurosphere cells, disease-specific models of neurodegenerative disorders,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1863, no. 1, pp. 56–63, 2016, doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.030.
- [70] L. Feeney-Burns, E. S. Hilderbrand, and S. Eldridge, “Aging human RPE: Morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 25, no. 2, pp. 195–200, 1984.
- [71] G. Zonios, A. Dimou, I. Bassukas, D. Galaris, A. Tsolakidis, and E. Kaxiras, “Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 1, p. 014017, 2008, doi: 10.1117/1.2844710.
- [72] M. B. Rózanowska, A. Pawlak, and B. Rózanowski, “Products of docosahexaenoate oxidation as contributors to photosensitising properties of

- retinal lipofuscin,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 7, 2021, doi: 10.3390/ijms22073525.
- [73] A. Höhn and T. Grune, “Lipofuscin: Formation, effects and role of macroautophagy,” *Redox Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 140–144, 2013, doi: 10.1016/j.redox.2013.01.006.
- [74] L. Zhang *et al.*, “Label-free imaging of hemoglobin degradation and hemosiderin formation in brain tissues with femtosecond pump-probe microscopy,” *Theranostics*, vol. 8, no. 15, pp. 4129–4140, 2018, doi: 10.7150/thno.26946.
- [75] H. Skoczynska, A., Budzisz, E., Trznadel-Grodzka, E., and Rotsztein, “Melanin and lipofuscin as hallmarks of skin aging,” *Adv. dermatology Allergol.*, vol. 34 (2), p. 1, 2017.
- [76] J. H. Kim and M.-M. Kim, “The relationship between melanin production and lipofuscin formation in Tyrosinase gene knockout melanocytes using CRISPR/Cas9 system,” *Life Sci.*, vol. 284, p. 119915, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.lfs.2021.119915.
- [77] A. Y. Sdobnov, M. E. Darvin, J. Schleusener, J. Lademann, and V. V. Tuchin, “Hydrogen bound water profiles in the skin influenced by optical clearing molecular agents—Quantitative analysis using confocal Raman microscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 12, no. 5, 2019, doi: 10.1002/jbio.201800283.
- [78] C. Choe, J. Lademann, and M. E. Darvin, “Depth profiles of hydrogen bound water molecule types and their relation to lipid and protein interaction in the human stratum corneum: In vivo,” *Analyst*, vol. 141, no. 22, pp. 6329–6337, 2016, doi: 10.1039/c6an01717g.