



Comparação das propriedades de difusão de agentes de transparência em tecido muscular

HUGO FILIPE DIAS SILVA

outubro de 2021

Comparação das propriedades de difusão de agentes de transparência em tecido muscular

Hugo Filipe Dias Silva

Bio Engenheiro pela Universidade Católica do Porto

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

Orientador: Professor Luís Oliveira

Setembro.2021

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King

Agradecimentos

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de uma forma direta ou indireta, permitiram que esta tese se concretizasse.

Aos meus pais e irmão, pela presença e motivação constante que me deram em todo o meu percurso académico.

Aos meus melhores amigos por me ouvirem divagar durante horas e me incentivarem a nunca deixar de lutar.

Aos meus colegas de investigação por todos os momentos que me proporcionaram ao longo deste projeto, em especial à Inês Martins por toda a ajuda incondicional, pela amizade demonstrada, por todos os momentos passados.

Ao Instituto Superior de Engenharia do Porto por me ter acolhido e pelas memórias que levarei.

Ao meu orientador e mentor, professor Luís Oliveira, obrigado por ter acreditado em mim e nas minhas capacidades, obrigado por nunca ter permitido que o desalento se instalasse mesmo quando as coisas não corriam do melhor modo, obrigado por me fazer descobrir o carinho pela área, obrigado por todo o apoio, dedicação e empenho que depositou em mim.

Ao professor Alexei Bogdanov, do MIT (EUA), que teve a gentileza de nos oferecer e enviar o GadovistTM, e assim possibilitou a realização deste estudo para avaliar as propriedades de difusão deste agente no músculo.

Resumo

A aplicação de tratamentos temporários e reversíveis de transparência tem demonstrado grande aplicabilidade em vários tecidos biológicos nos últimos anos, permitindo aumentar a profundidade de penetração da luz para realizar procedimentos de diagnóstico e de tratamento de certas patologias. Dos vários agentes de transparência, a glicerina tem demonstrado grande potencial, dado que apresenta elevado índice de refração, hiperosmolaridade e capacidade de aumentar a transparência dos tecidos de forma rápida e eficaz sem efeitos secundários. Os agentes de contraste de imagem médica, como o gadovist, têm também demonstrado potencial para a criação de efeitos de transparência em tecidos biológicos, mas como se tratam de produtos comerciais, não se conhecem as suas composições internas. A avaliação das propriedades de difusão da água, da glicerina e de agentes de contraste num determinado tecido é de elevado interesse para se poderem fazer comparações quanto à eficácia dos tratamentos criados, como para caracterizar os mecanismos de desidratação do tecido e de adaptação de índices de refração que regem a transparência criada. Realizando medições de índice de refração no gadovist e em algumas soluções diluídas do mesmo, assim como estudos de transmitância colimada de tecidos em tratamento com estas soluções foi possível quantificar o conteúdo de água neste produto e identificar o gadobutrol como agente de transparência existente no gadovist. Com a estimação do índice de refração do gadobutrol, foi possível criar soluções aquosas do mesmo para se realizarem estudos de avaliação das suas propriedades de difusão em tecido muscular. Com a obtenção de um tempo de difusão mais reduzido para o gadobutrol relativamente à glicerina no músculo, podemos assumir que a molécula da glicerina, com dimensões mais reduzidas, consegue difundir-se para o interior das membranas das fibras musculares, para fazer aí uma adaptação de índices de refração, algo que o gadobutrol apenas consegue fazer no líquido intersticial do músculo. Dada a qualidade e diversidade da informação reunida neste trabalho para caracterizar os mecanismos de transparência em tecido muscular, espera-se poder realizar estudos semelhantes no futuro com outros tecidos e com outros agentes, no sentido de reunir informação que possa ser usada na planificação de procedimentos clínicos de diagnóstico e de tratamento de patologias.

Palavras-chave: transmitância colimada, transparência ótica, coeficiente de difusão, desidratação, adaptação de índices de refração.

Abstract

The application of temporary and reversible optical clearing treatments has been showing great applicability in various biological tissues in the late years, allowing the increase in light penetration depth and therefore enabling the performance of diagnostic and treatment procedures of certain pathologies. From the existing wide variety of optical clearing agents, glycerol has shown great potential, due to its high refractive index, hyperosmolarity and its capacity to create transparency quickly and effectively within biological tissues without secondary effects. Contrast agents used in medical imaging, like gadovist, have also shown great potential for the creation of transparency in biological tissues, but since they are commercial products, their internal composition is unknown. The evaluation of the diffusion properties of water, glycerol and contrast agents in tissues is of high interest, enabling comparisons between transparency treatments efficiencies, as for the characterization of the clearing mechanisms of tissue dehydration and refractive index matching. Performing refractive index measurements in gadovist and diluted solutions of this product, and collimated transmittance measurements from tissue samples under treatment with these solutions allowed for the quantification of the content of water in gadovist and to identify gadobutrol as the effective clearing agent in this product. With the estimation of the refractive index of gadobutrol, it was possible to create aqueous solutions for carrying out evaluation studies of its diffusion properties in muscular tissue. By obtaining a smaller diffusion time for gadobutrol relatively to glycerol in muscle, we can assume that the glycerol molecule, which is of smaller dimensions, manages to diffuse through the membranes of muscular fibers, performing the refractive index matching inside tissue scatterers, something that gadobutrol cannot do. We have found that gadobutrol is not able to diffuse through such membranes due to the size of its molecule, and it remains in the interstitial fluid, performing the refractive index matching there only. Due to the diverse results obtained in the present work, we expect to conduct similar studies in the future to obtain similar information for other tissues and with other optical clearing agents, with the objective of gathering useful information for the development of new clinical diagnostic and treatment procedures that use optical technologies.

Key words: collimated transmittancy, optical transparency, diffusion coefficient, dehydration, refractive index matching

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. CONTEXTUALIZAÇÃO DA PROBLEMÁTICA	3
1.2. MOTIVAÇÃO	4
1.3. OBJETIVOS.....	5
1.4. ESTRUTURA DO DOCUMENTO	6
2. ESTADO DA ARTE	9
3. MÉTODOS	18
3.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	18
3.2. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE TRATAMENTO.....	19
3.2.1. <i>Soluções de glicerina</i>	19
3.2.1. <i>Soluções de gadovist</i>	20
3.3. ESTUDOS EXPERIMENTAIS	22
3.4. MEDIÇÕES DE ESPESSURA	24
3.5. CÁLCULOS NECESSÁRIOS	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	49

Lista de Figuras

Figura 1: Preparação do tecido do músculo para corte (a) e o corte já feito (b).	19
Figura 2: Montagem experimental para a medição dos espectros de T_c	23
Figura 3: Montagem experimental para medição da espessura dos tecidos em tratamento.	25
Figura 4: Média e desvio padrão dos espectros de T_c	29
Figura 5: Dependências temporais de T_c para diferentes λ_s obtidos nos tratamentos de tecidos do músculo 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).....	32
Figura 6: Dependências temporais de T_c para diferentes λ_s obtidos nos tratamentos de tecidos do músculo com soluções de gadobutrol nas concentrações: 20% (a), 25% (b), 30% (c), 35% (d), 40% (e), 45% (f) e 50% (g).	33
Figura 7: Dependências temporais de T_c deslocadas para zero a $t=0s$ e restritas ao intervalo de tempo anterior à saturação, para diferentes λ_s obtidos nos tratamentos de tecidos do músculo 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).....	35
Figura 8: Dependências temporais de T_c deslocadas para zero a $t=0s$ e restritas ao intervalo de tempo anterior à saturação, para diferentes λ_s obtidos nos tratamentos de tecidos do músculo com soluções de gadobutrol nas concentrações: 20% (a), 25% (b), 30% (c), 35% (d), 40% (e), 45% (f) e 50% (g).	37
Figura 9: Tempos de difusão obtidos nos tratamentos em função da concentração de glicerina e de gadobutrol na solução de tratamento.....	40
Figura 10: Variação média da espessura das amostras de tecido do músculo em função do tempo para tratamento com soluções de glicerina nas concentrações de 40% e de 60%.	42
Figura 11: Variação média da espessura das amostras de tecido do músculo em função do tempo para tratamentos com a solução de gadovist com uma concentração de 40%.	42

Lista de Tabelas

Tabela 1 : Soluções de glicerina usadas nos tratamentos de transparência.	20
Tabela 2: Soluções de gadobutrol usadas nos tratamentos de transparência.	22
Tabela 3: Valores experimentais do tempo de difusão para cada tratamento com glicerina.	38
Tabela 4: Valores experimentais do tempo de difusão para cada tratamento com gadobutrol.	39

Lista de Abreviaturas

- IR – Índice de refração
- IV – Infravermelho
- NIR – Infravermelho próximo
- OCA – Agente de transparência ótico
- THz – Terahertz
- T_c – Transmitância Colimada
- UV – Ultravioleta

Lista de símbolos

- μ_a – Coeficiente de absorção
- μ_s – Coeficiente de espalhamento
- μ_t – Coeficiente de atenuação
- D – Coeficiente de difusão
- λ – Comprimento de onda
- τ – Tempo de difusão

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. Introdução

O presente trabalho, que faz parte da unidade curricular Tese do mestrado em Engenharia Biomédica do Instituto Superior de Engenharia do Porto, foi executado na sua íntegra no Centro de Investigação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI). O objetivo deste trabalho consistiu em estudar as propriedades de difusão da água, da glicerina e do Gadovist em tecido músculo-esquelético para caracterizar os mecanismos responsáveis pela criação de efeitos de transparência.

A introdução estará dividida em três partes, a primeira que apresenta a contextualização da problemática, a segunda que descreve a motivação e a terceira que indica os objetivos do trabalho realizado.

1.1. Contextualização da problemática

A aplicação de tratamentos de transparência ótica em tecidos biológicos tem sido objeto de estudo intenso nos últimos 30 anos [1]. É sabido que estes tratamentos são benéficos à prática clínica [2], pois reduzem o espalhamento da luz no interior dos tecidos, aumentando a sua transparência. Tal aumento de transparência ocorre por troca parcial (ou total) da água presente nos líquidos intersticiais dos tecidos por um agente inócuo que apresenta um índice de refração (IR) superior ao da água e mais próximo dos restantes componentes biológicos do tecido [3]. Como resultado destes tratamentos conseguem-se maiores profundidades de penetração da luz em procedimentos óticos de diagnóstico e de tratamento [1], [4], [5].

Os tratamentos de transparência são criados por três mecanismos fundamentais [6]–[8], designados por “desidratação do tecido”, “adaptação de índices de refração” e “dissociação de proteínas”. O último destes mecanismos ocorre apenas se o tecido a ser tratado possuir as referidas proteínas no seu interior e se o agente de transparência a administrar tiver osmolaridade suficiente para as dissociar [6]. Quanto aos outros dois mecanismos, a sua ocorrência é universal a todos os tratamentos de transparência e estão diretamente ligados aos fluxos de água e de agente de transparência dentro do tecido [7], [8]. Estudos já realizados mostram que determinando as propriedades de difusão da água e de um agente de transparência (do Inglês, *Optical Clearing Agent* – OCA) num tecido, permite caracterizar estes fluxos e os respetivos mecanismos de transparência [9], [10]. No entanto o número de estudos deste tipo já publicados é ainda

reduzido, tendo em mente a diversidade de tecidos biológicos e de agentes de transparência existentes.

No que diz respeito aos agentes de transparência, existem vários de diferente natureza que já demonstraram potencial para criar transparência em vários tecidos [1], mas continua a faltar a avaliação das suas propriedades de difusão nesses mesmos tecidos para caracterizar os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs que regem a transparência criada no tratamento. A grande maioria dos estudos publicados com um determinado agente, tem como objetivo principal avaliar a magnitude da transparência criada [11], ou comparar os valores dessa magnitude entre as transparências criadas por diferentes agentes [12].

Em face desta falta de estudos de caracterização dos fluxos de água e de OCA e dos respectivos mecanismos de transparência, torna-se necessário realizar mais estudos para se obter essas propriedades características e até comparar propriedades de difusão de diferentes agentes num mesmo tecido. Embora tais estudos sejam necessários para vários tecidos, a disponibilidade dos mesmos condiciona qualquer estudo experimental. Para superar tal situação, torna-se necessário procurar um tipo de tecido biológico que esteja disponível em quantidade e que seja apropriado aos estudos pretendidos.

1.2. Motivação

Mediante a falta de estudos das propriedades de difusão de OCAs em tecidos biológicos e porque é também necessário comparar essas propriedades para diferentes agentes num mesmo tecido, fez-se um levantamento da literatura para avaliar que estudos foram já realizados. Tais trabalhos são escassos, verificando-se um maior número de trabalhos publicados, onde, tal como referido na secção anterior, o objetivo consiste em avaliar a magnitude da transparência criada por um ou mais OCAs em determinado tipo de tecido. São disso exemplo a dissertação de mestrado de Luís Oliveira [11] e um artigo recente do grupo de investigação da universidade de Saratov, na Rússia [12]. O primeiro trabalho faz uma comparação das magnitudes de transparência criadas em tecido músculo-esquelético por soluções aquosas de etilenoglicol, propileno glicol, glucose, glicerina e uma mistura de água com glicerina e álcool. O segundo trabalho faz a comparação da magnitude da transparência criada por agentes de contraste de imagiologia médica, como o GadovistTM, o MagnevistTM, o DotaremTM e o VisipaqueTM.

No sentido de colmatar a falta de estudos das propriedades de difusão e sua comparação para diferentes OCAs num mesmo tecido, decidiu-se realizar o presente trabalho, cujos objetivos se apresentam na secção seguinte.

1.3. Objetivos

Com o objetivo de estudar e comparar as propriedades de difusão da água e de diferentes OCAs num determinado tecido, e assim caracterizar os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs, começou-se por procurar um tipo de tecido que fosse disponibilizado em abundância e que fosse fácil de trabalhar. Dada a experiência anterior no grupo de ótica médica do CIETI em trabalhar com músculo-esquelético, optou-se por selecionar este tecido da espécie coelho. Trata-se de um animal que é fácil de adquirir e que tem uma quantidade de músculo elevada, não existindo assim problemas de fornecimento de tecidos para os estudos a realizar.

Quanto aos agentes a utilizar no estudo, fez-se um levantamento dos OCAs disponíveis dentro do laboratório do CIETI e verificou-se que estavam disponíveis a glucose, a sacarose, o etilenoglicol, a glicerina e o Gadovist™. Dado ser difícil criar soluções aquosas de glucose e de sacarose em elevada concentração, optou-se por não usar estes agentes. Quanto ao etilenoglicol, existem referências à sua toxicidade para os tecidos, em particular para o músculo [13], o que nos fez optar por não o usar. A glicerina é um OCA muito eficiente e muito utilizado em estudos de transparência. Após avaliar o IR da glicerina que se encontrava disponível verificamos que tinha 99% de pureza, o que nos permitia criar as soluções com as osmolaridades desejadas. Por outro lado, dado que o gadovist não é muito estudado e não é fácil de conseguir para estudos de investigação em Portugal, a oportunidade de o ter à nossa disposição foi excelente. É certo que, tratando-se de um produto comercial de imagiologia médica, não se conhece a sua composição. No entanto, de acordo com o fabricante (Bayer), sabe-se este produto é feito à base de gadolínio e água, numa proporção mais ou menos equitativa. Assim, a escolha da glicerina e do gadovist foi feita com o objetivo de determinar as suas propriedades de difusão em tecido muscular e também avaliar o real conteúdo de água no gadovist.

1.4. Estrutura do documento

O presente documento encontra-se organizado em 5 capítulos. O primeiro capítulo engloba o enquadramento da problemática, as motivações e os objetivos para este trabalho. O segundo capítulo, o estado de arte, faz uma revisão de métodos e estudos mencionados anteriormente bem como a evolução da ótica medica. O terceiro capítulo abrange a metodologia aplicada e utilizada nesta investigação, estando subdividido para as várias fases da investigação realizada. O quarto capítulo envolve os resultados obtidos e a sua discussão e o final capítulo, o quinto, as conclusões retiradas que evidenciam a importância dos resultados obtidos.

CAPÍTULO 2 – ESTADO DA ARTE

2. Estado da Arte

A interação da luz com os tecidos biológicos e a forma como um feixe se propaga no seu interior são condicionadas pelas propriedades óticas que estes apresentam, nomeadamente, o IR, o coeficiente de absorção (μ_a), o coeficiente de espalhamento (μ_s) e a anisotropia de espalhamento (g) [14]. É sabido que em geral, os valores de μ_s são superiores aos valores de μ_a dos tecidos biológicos na zona espectral desde o ultravioleta (UV) até ao infravermelho próximo, uma diferença que é tanto maior quanto menor for o comprimento de onda (λ) [6], [15]. Consequentemente, um feixe luminoso que seja usado para realizar diagnóstico ou tratamento num tecido irá sempre sofrer atenuações significativas devido aos valores elevados de μ_s que o tecido apresenta. Esta atenuação elevada leva a uma ineficácia das tecnologias óticas em procedimentos de diagnóstico e de tratamento, uma vez que apenas se conseguem pequenas profundidades de penetração da luz [15].

O forte espalhamento que é característico dos tecidos biológicos é criado de duas formas. Em primeiro lugar devido à colisão dos fótons com elementos biológicos (habitualmente designados por scatterers) distribuídos dentro do tecido, que redirecionam os fótons para percursos distintos do original [14]. Por outro lado, dado que tais scatterers apresentam um valor elevado de IR, comparativamente ao IR dos fluídos biológicos que os circundam e que constituem o meio de base do tecido, as diferenças localizadas de IRs no interior do tecido levam a um aumento de espalhamento dos fótons [1], [4].

Uma forma eficaz de reduzir o espalhamento característico dos tecidos consiste em aplicar tratamentos de transparência ótica, que diminuem o espalhamento por adaptação de IRs entre os fluídos e os scatterers dos tecidos. A criação destes efeitos em tecidos biológicos é uma técnica que tem sido intuitivamente usada pelo Homem desde a antiguidade. Os primeiros povos do norte da Europa utilizavam intestinos de foca desidratados para construir janelas e pele de vários animais, também desidratada, para a construção das paredes das suas habitações rudimentares em acampamentos, por forma a deixar entrar a luz [16]. No início do século XX, o anatomista Alemão Werner Spalteholz observou que amostras de tecido muscular ficavam mais transparentes após serem imersas sequencialmente em álcool e óleo de cravo (ou xileno) e depois armazenadas em bálsamo do Canadá [5], [17], [18]. A primeira evidência de aplicação

deste método para efeitos clínicos, foi indicada pelo próprio Spalteholz nas suas monografias de 1911 e 1914 [19], [20]. Nestas publicações foi já indicada evidência do mecanismo de adaptação dos índices de refração no interior dos tecidos [20] e a demonstração da existência do mecanismo de desidratação foi publicada mais tarde, em 1939 [21].

Dado que na primeira metade do século XX não existia qualquer benefício prático para a utilização deste método em procedimentos clínicos, a técnica de transparência não mereceu qualquer interesse de investigação ou desenvolvimento, tendo sido apenas usada para a preparação de amostras histológicas até ao princípio da década de 1990 [1].

Como resultado do desenvolvimento de novos instrumentos óticos na segunda metade do século XX, tal como o laser, as fibras óticas ou díodos de diferentes cores com emissão eficiente, uma nova era de aplicação da luz em biologia e em medicina emergiu na última década do século XX [1]. Com o aparecimento desta instrumentação surgiu um novo interesse em estudar a propagação da luz no interior dos tecidos e a interação de feixes com os componentes biológicos, assim como a consequente redução do espalhamento da luz, passando a técnica de transparência a ganhar um novo interesse [22].

Com o objetivo de usar esta técnica na prática clínica para se poderem estabelecer diagnósticos ou realizar tratamentos de forma não invasiva, o mecanismo de adaptação de índices de refração no interior dos tecidos foi reinventado e desde 1997, ano em que se publicou o formalismo matemático do controlo das propriedades óticas durante tratamentos de transparência [23], este método tem sido fortemente investigado em combinação com outros métodos que utilizam a luz [1]. Estes estudos mostraram um melhoramento significativo na profundidade de penetração da luz e na redução efetiva do espalhamento em vários tecidos biológicos [2], [4], [24].

Mais recentemente, foi descoberto um terceiro mecanismo de transparência, designado por dissociação de proteínas [25], mas estudos já realizados demonstraram que todos os três mecanismos de transparência são reversíveis de forma natural *in vivo* e de forma assistida *in vitro* [1], [8].

Vários agentes de transparência foram já estudados e sabe-se atualmente que existem 3 classes de agentes inócuos, capazes de criar efeitos temporários de transparência em tecidos biológicos. Tais classes são os açúcares, os álcoois e os agentes de contraste radiológico. São exemplos de agentes dessas três classes, a glucose,

a frutose ou a sacarose para os açúcares, a glicerina, o sorbitol ou o propileno glicol para os álcoois e o Trazograph™, o Hypaque™ ou o Verografin™ para os agentes de contraste radiológico [1]. Vários estudos com estes e outros agentes de transparência foram realizados em diferentes tecidos, não se tendo observado quaisquer efeitos secundários, quer na versão *in vitro*, quer na versão *in vivo*, pelo que a sua aplicação para criar transparência é considerada segura [1].

Para compreender como é criada a transparência num tecido biológico e quais os mecanismos por trás dessa transparência, vamos considerar uma amostra de um tecido biológico que foi preparada com uma forma de fatia circular, tendo uma espessura reduzida bem definida. Tal amostra de tecido é imersa num agente de transparência, ou numa solução que contém uma certa osmolaridade desse agente para dar início ao chamado tratamento de transparência. Visto que os agentes de transparência são em geral hiperosmóticos, no início do tratamento a pressão osmótica que o agente cria sobre o tecido induz o mecanismo de desidratação do tecido, através da movimentação de água desde os fluídos intersticiais e intracelulares do tecido para o exterior. Com a perda de água por parte do tecido, os *scatterers* aproximam-se entre si, o que se traduz numa distribuição mais compacta desses componentes biológicos e que teoricamente levaria ao aumento do coeficiente de espalhamento por parte do tecido. No entanto, a perda de água do tecido leva também a uma diminuição da espessura da amostra. Se considerarmos a lei de Bouguer-Beer-Lambert (lei de BBL – Eq. (1))[1]–[4], [21], [24]–[26], a diminuição de espessura da amostra compensa o aumento temporário de espalhamento criado pela compactação dos *scatterers*, levando a um aumento global da sua transmitância do tecido.

$$T_c(\lambda) = e^{(-\mu_t(\lambda) \times d)} \quad (1)$$

Na Eq. (1), $T_c(\lambda)$ representa o espectro da transmitância colimada da amostra de tecido, $\mu_t(\lambda)$ é o coeficiente de atenuação espectral, que representa a soma do coeficiente de espalhamento ($\mu_s(\lambda)$) com o coeficiente de absorção ($\mu_a(\lambda)$) e d é a espessura da amostra de tecido [7].

Conforme a água vai saindo das localizações intersticiais e intracelulares, o agente de transparência na solução de imersão, começa a difundir-se para o interior, distribuindo-se inicialmente nos espaços intersticiais, e penetrando para o interior dos

restantes componentes biológicos do tecido se a difusão do agente se mantiver por longos períodos de tempo [7]. Como estes agentes, que são inócuos para os tecidos, apresentam um IR superior ao da água que saiu, mais aproximado ao IR dos *scatterers* no tecido, para além de um aumento na espessura do tecido, ocorre o mecanismo de adaptação de índices de refração, que está na base da redução do espalhamento da luz [3]. Para o caso de tratamentos com longa duração, a aglomeração de moléculas do agente nas localizações intersticiais e intracelulares, induz a interação com as cadeias proteicas e por conseguinte a sua dissociação, que é o terceiro mecanismo dos tratamentos de transparência [6]. Embora se desconheça o potencial de todos os agentes de transparência para dissociação de proteínas, quando ocorre, este terceiro mecanismo leva a que as proteínas se dissolvam nos fluídos do tecido, reduzindo também o espalhamento, especialmente na zona do ultravioleta, onde é mais elevado [6], [16]. Todos estes mecanismos de transparência foram já observados e estudados em alguns tecidos e a sua descrição, que aqui apresentamos pode ser consultada em alguns trabalhos de referência [1], [6]–[8].

Dada a grande diversidade de tecidos biológicos que compõe o corpo humano e também a grande variedade de agentes de transparência disponíveis, torna-se necessário realizar vários estudos para caracterizar os mecanismos de transparência em cada situação particular. A realização de tais estudos permitirá recolher informações de vital importância para a aplicação dos tratamentos de transparência em procedimentos clínicos de diagnóstico e tratamento de patologias em diversas áreas anatómicas do corpo humano. No caso particular dos tecidos musculares, estes estudos são de elevado interesse, uma vez que, um considerável número de patologias do músculo é hoje conhecido e o seu tratamento é possível. Entre tais casos patológicos, salientam-se as distrofias musculares, as miopatias congénitas e a poliomiosite [27], ou outras mais raras como a fibromialgia e a displasia fibrosa [28].

A avaliação das propriedades de difusão da água e dos OCAs que permitem a caracterização dos mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs durante a criação de transparência nos tecidos musculares é possível, através de técnicas de espectroscopia, conforme publicado previamente para o músculo e para outros tecidos [7]–[10], [29]–[31]. Em qualquer uma destas publicações é descrito que analisando a evolução temporal da T_c dos tecidos em tratamento com um OCA em solução aquosa numa determinada osmolaridade, se consegue estimar o tempo de difusão efetivo para o fluxo global médio que ocorre durante o tratamento do tecido com essa solução. Para se

fazer esta análise temporal da T_c , escolhem-se alguns comprimentos de onda discretos numa zona espectral onde o tecido não apresenta bandas de absorção, normalmente entre o visível e o infravermelho [9], [10]. Considerando a variação de T_c para um determinado λ_i ao longo do tempo ($T_c(\lambda_i, t)$), desloca-se essa evolução temporal de um determinado valor, para que no instante inicial a transmitância seja nula ($T_c(\lambda_i, t=0)=0$) [1], [9], [10], [30], [31]. Depois, normaliza-se a evolução temporal ao seu valor máximo, para que esta evolução temporal passe a variar entre 0 e 1. Por fim, faz-se o ajuste dos pontos discretos no tempo dessa evolução temporal com uma curva descrita pela Eq. (2), para se obter o tempo de difusão (τ_i) correspondente ao fluxo efetivo do tratamento aplicado [1], [9], [10], [30], [31]:

$$T_c(\lambda_i, t) \cong \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \right]. \quad (2)$$

Como se faz este estudo para diferentes comprimentos de onda λ_i , são obtidos vários valores de τ_i para o tratamento aplicado. O valor médio e o respetivo desvio padrão são calculados como parâmetros estatísticos que descrevem o tempo de difusão do fluxo médio efetivo que ocorre no tratamento em estudo [9], [10], [31].

Se esta análise for feita para tecidos em tratamento com diferentes osmolaridades do agente, então pode construir-se um gráfico com os tempos de difusão em função da concentração de agente em solução [1], [9]. Considerando tratamentos com soluções contendo concentrações do agente entre 10% (ou 20%) e 60% (em volume), tal gráfico, depois de ajustados os pontos com uma *spline*, terá um máximo para uma concentração particular [9]. Esse máximo corresponde ao valor real do tempo de difusão do OCA no tecido em estudo, uma vez que para essa solução não ocorre desidratação devido ao equilíbrio entre a água móvel do tecido e a água presente na solução de tratamento [1], [9], [10], [30], [31]. Deve notar-se que os tecidos biológicos apresentam quatro tipos de água, consoante o seu estado de ligação aos restantes componentes biológicos: fortemente ligada, firmemente ligada, fracamente ligada e livre [32], [33]. Destes quatro estados da água nos tecidos, os dois últimos são os que habitualmente se designam por água móvel, visto esses tipos de água se poderem deslocar quando estimulados osmoticamente [1]. A difusão única do OCA para o interior do tecido ocorre quando esse equilíbrio de águas se verifica [1], [10], e o

máximo obtido nesse tratamento particular corresponde ao tempo de difusão do OCA no tecido. A ocorrência desse pico máximo permite também identificar o conteúdo de água móvel no tecido em estudo e de acordo com a Ref. [30], este tipo de estudos permitiu avaliar um conteúdo de água móvel superior em 5% em tecidos com cancro relativamente aos tecidos saudáveis da mucosa colorectal humana.

Se o tecido for tratado com uma concentração de OCA mais elevada, cerca de 20% superior à concentração usada para obter o fluxo único do OCA no tecido [9], [10], [29]–[31], então a pressão osmótica criada sobre o tecido pelas moléculas do agente na solução irá estimular o fluxo único da água móvel no tecido para o exterior nos primeiros 2 minutos de tratamento. Para esse tratamento, o valor médio e o desvio padrão obtidos para τ , numa análise como a descrita acima, corresponde ao tempo de difusão da água no tecido.

Após se determinarem os tempos de difusão para o OCA e para a água no tecido, é possível calcular os coeficientes de difusão correspondentes. Para isso, basta realizar estudos de variação de espessura com amostras do mesmo tecido em tratamento com as soluções que correspondem às osmolaridades do OCA que induzem os fluxos únicos da água e do agente. Das variações temporais de espessura obtidas nessas medições, retiram-se os valores de espessura do tecido obtidos nos instantes de tempo que correspondem aos valores de τ obtidos das variações temporais de T_c para os tratamentos que correspondem aos fluxos únicos de OCA e de água no tecido. Usando os valores de espessura (d) e de τ obtidos para cada um dos tratamentos na Eq. (3), calculam-se os valores dos coeficientes de difusão (D) da água e do OCA usado no tecido em estudo [1], [9].

$$D = \frac{d^2}{\pi^2\tau} \quad (3)$$

Uma vez calculados os valores de τ e de D para a água e para o OCA usado no tratamento, ficam caracterizados os fluxos destes fluídos no tecido e também os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs [1], [9].

Relativamente ao mecanismo de dissociação de proteínas, este não está ainda inteiramente estudado e explicado e depende do conteúdo de proteínas no tecido em estudo. Isto porque, inicialmente, tal mecanismo apenas foi observado na pele por

técnicas de imagem ótica, como a *Second Harmonic Generation* (SHG), a microscopia de multi-fotões ou a microscopia de polarização [25]. Neste estudo, apenas se observou a ocorrência da dissociação de proteínas de colagénio e a sua reconstrução após o término do tratamento de transparência, não se conseguindo obter parâmetros que caracterizassem o mecanismo. Mais recentemente, estudos de espectroscopia feitos no ISEP com tecidos normais e com cancro da mucosa coloretal humana e outros estudos feitos na Rússia com gengiva normal humana permitiram confirmar a dissociação de proteínas durante tratamentos com glicerina em elevadas concentrações e estimar uma taxa de dissociação, que é diferenciada entre tecidos normais e com patologia [6]. O que os autores da Ref. [6] fizeram foi medir espectros de T_c entre 200 e 1000 nm durante os tratamentos dos tecidos e calcular a variação temporal da eficiência do tratamento, usando a Eq. (4):

$$OC_{eff}(\lambda, t) = \frac{T_c(\lambda, t) - T_c(\lambda, t=0)}{T_c(\lambda, t=0)} \times 100\%, \quad (4)$$

em que $T_c(\lambda, t=0)$ representa o espectro de transmitância colimada do tecido natural, antes de começar o tratamento e $T_c(\lambda, t)$ representa o espectro de transmitância colimada medido do tecido no instante t do tratamento.

Sabendo-se que as proteínas apresentam uma banda de absorção sensivelmente entre os 200 e os 230 nm [6], [34], os autores da Ref. [6] criaram um mapeamento 3D com o cálculo resultante da Eq. (4) para cada um dos tecidos da mucosa coloretal, por forma a observarem onde ocorria um máximo para OC_{eff} entre os 200 e os 230 nm. Tanto para a mucosa normal como para a mucosa com cancro, tal máximo ocorre precisamente a 200 nm [6], [35]. Estes autores isolaram a curva de OC_{eff} para este λ para ver o seu comportamento, verificando que tinha 3 regimes: um exponencial fortemente crescente nos primeiros 2-3 min de tratamento, um linear crescente entre 3 e 10 min e outro linear com crescimento menos intenso entre 10 e 30 min do tratamento [6], [35]. Com o objetivo de vir a desenvolver no futuro novas técnicas rápidas de diagnóstico, estes autores estimaram a equação da reta para o regime linear intermédio e verificaram que o declive da reta aumentava cerca de $2.9\times$ do tecido normal para o tecido com cancro. Tal discriminação da taxa de dissociação de proteínas permite o estabelecimento de um diagnóstico do cancro. Por outro lado, é também de interesse estudar a dependência entre a taxa de dissociação de proteínas e a osmolaridade do

agente na solução usada nos tratamentos. A glicerina é um bom agente para se realizar tal estudo, visto que é um agente que apresenta hiperosmolaridade e pode ser facilmente diluído em solução aquosa, tem absorção nula e um índice de refração elevado em toda a banda espectral acima dos 155 nm até ao infravermelho. É também um agente capaz de aumentar a transparência dos tecidos de forma rápida e eficaz sem efeitos secundários [1].

As proteínas podem ter diversa natureza e utilidade, mas algumas delas são utilizadas no metabolismo celular, na replicação do ADN, no transporte de moléculas e outras funções biológicas dos tecidos [36], [37]. É certo que alguns tecidos têm um maior conteúdo de proteínas do que outros, sendo, no entanto, comum encontrar a actina, a miosina ou o colagénio na maioria dos tecidos biológicos. No caso do músculo esquelético, o conteúdo de actina e miosina é elevado, mas o estudo do mecanismo de dissociação de proteínas cai fora dos objetivos do presente trabalho.

Como resultado do levantamento do estado da arte e tal como indicado nos objetivos, no capítulo 1, o presente trabalho concentra-se na avaliação das propriedades de difusão da glicerina e do gadovist, para se poder caracterizar e comparar os mecanismos de transparência criados por estes agentes no músculo esquelético. Para além de pretender obter tais resultados comparativos e permitir a sua utilização em futuros procedimentos clínicos de diagnóstico ou de tratamento de patologias musculares, o presente estudo pretende também caracterizar o gadovist por determinação do seu conteúdo de água e de gadolínio e do respetivo IR. Para realizar este estudo serão utilizadas soluções aquosas, quer de glicerina, quer de gadovist para tratar amostras de tecido músculo-esquelético do coelho. De acordo com a descrição apresentada no capítulo seguinte, será utilizada a técnica de medição de espectros de T_c durante os tratamentos com cada uma das soluções dos referidos OCAs para avaliar os respetivos tempos de difusão no tecido muscular.

CAPÍTULO 3 – MÉTODOS

3. Métodos

O presente trabalho experimental envolveu várias fases desde a preparação das amostras de tecido até à realização dos cálculos para obter as propriedades de difusão dos OCAs selecionados para o estudo. Em cada uma dessas fases foi adotado um procedimento próprio, pelo que usaremos as subsecções seguintes para descrever cada um desses procedimentos em detalhe.

3.1. Preparação das amostras

Como foi já referido, o tipo de tecido que escolhemos usar no presente trabalho foi o músculo-esquelético do coelho. Para recolhermos as amostras necessárias aos estudos experimentais, foram adquiridos 5 coelhos adultos a pessoas familiares e/ou conhecidas que fazem a sua criação para consumo. Sempre que se pretendia realizar um estudo, um coelho era sacrificado com um dia de antecedência e uma perna inteira era congelada por um período entre 12 a 24 horas. O restante do coelho sacrificado era aproveitado para consumo próprio.

No dia da realização do estudo, a perna de coelho era transportada para o laboratório do CIETI pela manhã. Ao chegar ao laboratório, e ainda com a perna de coelho congelada, era cortado um fragmento de músculo com dimensões consideráveis (cerca de 1×2 cm de área) para se poderem preparar as amostras. A perna de onde se retirou o fragmento era de imediato congelada para evitar que se deteriorasse.

O fragmento de músculo era colocado numa mesa de corte de um crióstato (modelo CM1860 UV da marca Leica, Alemanha) para preparar as amostras individuais – ver Fig. 1(a). Este crióstato permite fazer cortes com espessuras entre 1 e 100 μm . Assim, e calibrando o avanço de corte para 10 μm eram feitos avanços da faca para que esta começasse a cortar tecido da parte superior do fragmento. Foram feitos alguns cortes de desbaste para se conseguir uma superfície perfeitamente plana em toda a extensão do fragmento. Depois de se conseguir essa superfície plana, deram-se 10 incrementos de 50 μm para se obter a primeira amostra com 500 μm de espessura. A segunda amostra era cortada com um novo avanço de 500 μm . Este processo de corte das amostras era feito até não ser possível retirar mais amostras do fragmento. A Fig. 1(b) apresenta uma dessas amostras colocada sobre uma lamela de microscópio. Todos

os cortes eram colocados nestas lamelas, onde eram imersos em soro fisiológico por 10 min para conseguir uma hidratação semelhante à dos tecidos *in vivo*.

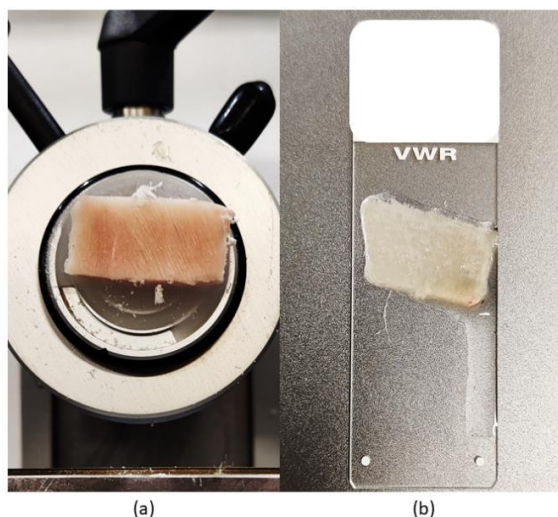


Figura 1: Preparação do tecido do músculo para corte (a) e o corte já feito (b).

Sempre que fossem necessárias mais amostras de músculo para novos estudos, o procedimento de corte e preparação acima descrito era repetido com outros fragmentos.

3.2. Preparação das soluções de tratamento

Para se poderem realizar os estudos dos tratamentos do músculo com soluções aquosas de glicerina e de gadovist, foi necessário preparar essas soluções primeiro. No caso da glicerina foi uma tarefa fácil, mas no caso do gadovist foi mais complicado, visto não se conhecer o seu conteúdo. Assim, adotaram-se duas metodologias para a preparação destas soluções, que passamos a descrever.

3.2.1. Soluções de glicerina

Os valores de IR das soluções aquosas de glicerina, com concentrações de 1% a 100%, são conhecidos à temperatura de 20 °C [38]. Assim, tanto para a preparação das soluções como para realizar os estudos experimentais durante os tratamentos dos tecidos, a temperatura do laboratório foi mantida em valores de 20 ± 1 °C. As soluções de glicerina foram preparadas, misturando glicerina quase pura (99% de pureza) com água

destilada. Para controlar a preparação destas soluções com as concentrações de glicerina pretendidas (soluções com concentrações equi-espaciaadas de 5%, entre 20 e 60%), foi usado um refratômetro de Abbe (modelo ORT-1, da Kern, Alemanha). Para cada solução, assim que o valor de IR medido no refratômetro igualava o valor tabelado na Ref. [38], considerávamos a solução preparada. A tabela 1 apresenta as soluções de glicerina preparadas com os respectivos valores de IR medidos a 20 °C [38].

Tabela 1 : Soluções de glicerina usadas nos tratamentos de transparência.

Concentração de glicerina (%)	IR (589.6 nm, 20 °C)
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

3.2.1. Soluções de gadovist

Dado que se desconhece a composição interna do produto gadovist, consultamos a página do fabricante (Bayer) para tentar recolher informação a esse respeito [39]. Nesta página percebemos que o ingrediente ativo do gadovist é o gadobutrol, que contém gadolínio. Esta página indica também que o gadovist é um produto de contraste para utilização em imagem médica por ressonância magnética. O gadobutrol tem a formula química $C_{18}H_{31}GdN_4O_9$ e uma massa molar de $604.72 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [40]. Não foi encontrada informação de que o gadovist seja viscoso, tal como acontece com a glicerina, pelo que a sua difusão no tecido muscular, apesar de apresentar uma massa molar elevada, deve ser mais rápida do que a da glicerina, que apresenta uma massa molar de $92.094 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, mas tem uma viscosidade de $1.412 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ [41].

Para procedermos à preparação das soluções de gadovist, começamos por fazer um pequeno estudo preliminar para avaliar o conteúdo de água neste produto comercial. Assim, o IR do gadovist puro foi medido com o refratômetro de Abbe, tendo-se obtido o valor de 1.4260 (solução A). De seguida prepararam-se duas novas soluções em que as frações em volume de gadovist e água eram respetivamente de 0.8/0.2 (solução B) e

0.6/0.4 (solução C). O IR destas soluções foi medido com o refratômetro de Abbe, obtendo-se os valores de 1.4074 para a solução B e de 1.3888 para a solução C. Fizeram-se três tratamentos de amostras de músculo com cada uma das três soluções para estimar os tempos de difusão. Foram obtidos os valores médios de τ de 91.8s, 198.3s e 78.9s nos tratamentos com as soluções A, B e C, respetivamente. Destes resultados, claramente se observa que a solução B, por gerar um valor de τ muito mais elevado que as outras duas soluções, deve apresentar o mesmo conteúdo (ou muito próximo) de água que a água móvel no músculo. De acordo com estudos anteriores [29], sabe-se que o conteúdo de água móvel no músculo-esquelético é de aproximadamente 60%, pelo que dos valores médios de τ obtidos nestes estudos preliminares, podemos considerar que a solução B tem o mesmo conteúdo de 60% de água e por conseguinte um conteúdo de 40% de gadobutrol. Partindo deste pressuposto, e considerando a forma como preparamos as soluções A, B e C, o gadovist na sua forma comercial (solução A) deve ter um conteúdo de água na ordem de 50%, o que implica que o conteúdo de gadobutrol seja também de 50%. É de salientar que esta estimação do conteúdo de água no gadovist comercial não é exata, mas o valor estimado não deve ser muito diferente do valor real. De qualquer forma, esta estimação preliminar, dá-nos uma base de trabalho confiável para preparar novas soluções a usar em tratamento e os resultados produzidos nesses estudos irão confirmar se os nossos pressupostos estão corretos ou errados.

Após termos feito esta avaliação preliminar, decidimos preparar as soluções de gadobutrol (por diluição de gadovist) para realizar os tratamentos. Considerando os resultados dos estudos preliminares obtidos, começamos por considerar que o gadovist não diluído contém 50% de água e 50% de gadobutrol. Partindo deste pressuposto, usamos a equação de Gladstone e Dale para estimar o IR do gadobutrol [4], [42]–[46]:

$$n_{Gadovist} = f_{H_2O} \times n_{H_2O} + f_{Gadobutrol} \times n_{Gadobutrol}, \quad (5)$$

em que $n_{Gadovist}$ representa o valor de IR que medimos como 1.4260 para o gadovist puro, f_{H_2O} e $f_{Gadobutrol}$ representam as frações volúmicas da água e do gadobutrol respetivamente (50% cada), n_{H_2O} representa o IR da água a 589.6 nm e 20 °C (1.333

[47]) e $n_{\text{Gadobutrol}}$ representa o IR do gadobutrol a determinar. Com este cálculo, obteve-se o IR do gadobutrol como 1.5190.

De seguida calculamos os valores de IR para as soluções aquosas de gadobutrol a preparar com as concentrações de 20, 25, 30, 35, 40 e 45%. Para fazer esses cálculos, usamos uma nova versão da equação 5:

$$n_{\text{sol}} = f_{\text{H}_2\text{O}} \times n_{\text{H}_2\text{O}} + f_{\text{Gadobutrol}} \times n_{\text{Gadobutrol}}, \quad (6)$$

em que n_{sol} representa o IR da solução a calcular e onde se usaram os valores de 1.333 para $n_{\text{H}_2\text{O}}$ e 1.5190 para $n_{\text{Gadobutrol}}$. As frações em volume do gadobutrol foram as indicadas no parágrafo anterior e as frações de água foram as complementares ($n_{\text{H}_2\text{O}}=1-n_{\text{Gadobutrol}}$), tal como é habitual. Os valores resultantes destes cálculos encontram-se representados na Tabela 2.

Tabela 2: Soluções de gadobutrol usadas nos tratamentos de transparência.

Concentração de gadobutrol (%)	IR (589.6 nm, 20 °C)
20	1.3702
25	1.3795
30	1.3888
35	1.3981
40	1.4074
45	1.4167
50	1.4260

Com estes valores calculados, passamos a preparar estas soluções aquosas de gadobutrol, usando o refratómetro de Abbe para controlar o IR de cada solução.

3.3. Estudos experimentais

Os estudos experimentais realizados, consistiram na medição de espectros de T_c durante os tratamentos das amostras de músculo durante os tratamentos realizados em cada amostra com cada solução de glicerina ou de gadobutrol em particular. É de referir que estes tratamentos foram também feitos com uma temperatura de 20 ± 1 °C no laboratório.

Considerando cada concentração dos OCAs utilizados foram realizados 3 estudos experimentais para se poderem obter variações temporais médias dos espectros em cada tratamento. Todos os espectros foram medidos numa banda entre 200 e 1000 nm, embora para os cálculos a realizar para obter os tempos de difusão, se tenham considerado apenas comprimentos de onda individuais entre 600 e 800 nm. A montagem experimental usada para medir os espectros durante os tratamentos encontra-se representada na Fig. 2.

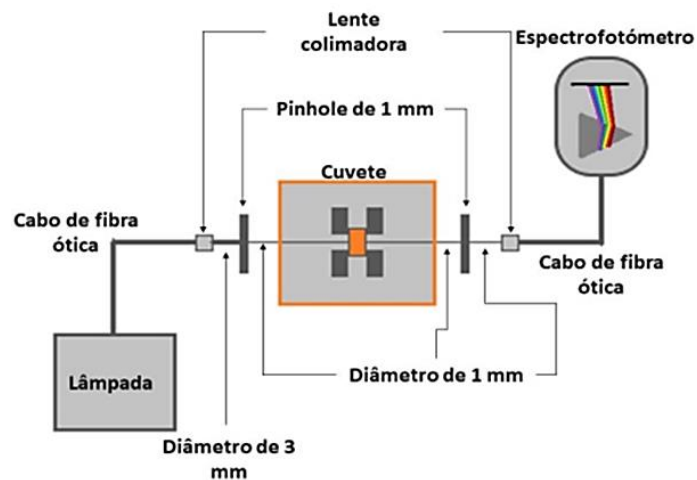


Figura 2: Montagem experimental para a medição dos espectros de T_c .

Considerando a montagem experimental representada na Fig. 2, a luz proveniente de uma lâmpada de deutério-halogénio passa por um cabo de fibra ótica e uma lente colimadora para formar um feixe de 3 mm de diâmetro. Antes de chegar à cuvette que contém a amostra de tecido, o feixe passa por um *pinhole* para reduzir o seu diâmetro para 1 mm. A cuvette tem no percurso do feixe duas janelas de vidro (UQG Optics, RU) com transmitância de 100% entre 170 e 2500 nm. O feixe colimado que atravessa a amostra passa por outro *pinhole* para garantir que apenas a luz colimada de diâmetro 1 mm é coletada por outra lente e outro cabo de fibra ótica para enviar ao espectrofotómetro.

Considerando qualquer dos tratamentos realizados, o procedimento experimental adotado foi o seguinte:

- 1) Fez-se a medição do espectro de referência da lâmpada com a montagem da Fig. 2, mas sem o tecido colocado na cuvette.

- 2) Mediu-se o espectro de ruído com a lâmpada desligada.
- 3) Colocou-se o tecido na cuvette, fixando-o mecanicamente, para que não saia da sua posição durante o tratamento. As barras pretas dentro da cuvette na Fig. 2 representam o sistema de fixação da amostra.
- 4) Colocou-se o espectrofotómetro no modo de medição em transmissão e ligou-se a lâmpada.
- 5) Mediu-se o espectro de transmitância da amostra no seu estado natural.
- 6) Através de uma abertura na parte superior da cuvette (não representada na Fig. 2), introduziu-se a solução de tratamento, de forma que preenchesse toda a cuvette.
- 7) Fechou-se a abertura da cuvette de imediato e iniciou-se a aquisição de espectros de forma automática, sendo medidos espectros a cada segundo num período de 30 minutos.

Este procedimento foi repetido para cada tratamento individual. Após se terminarem todos os estudos experimentais, foram realizados cálculos para se obterem as propriedades de difusão da água, da glicerina e do gadobutrol. Tais cálculos estão descritos na secção 3.5.

3.4. Medições de espessura

Para se determinar os coeficientes de difusão dos OCAs e da água no músculo é necessário realizar medições de variação de espessura das amostras durante tratamentos com determinadas soluções. Tais soluções apenas podem ser identificadas após se obterem os valores de τ que corresponde à difusão única da glicerina, do gadobutrol e da água, pelo que apenas as iremos indicar no capítulo IV. Os cálculos desses coeficientes de difusão estão explicados no final da próxima secção, mas vamos aqui descrever o processo de medição da espessura de um tecido em tratamento com uma solução genérica. Esse procedimento é válido para qualquer caso que tenhamos que estudar.

A montagem usada para se obterem as variações de espessura das amostras encontra-se representada na Fig. 3.

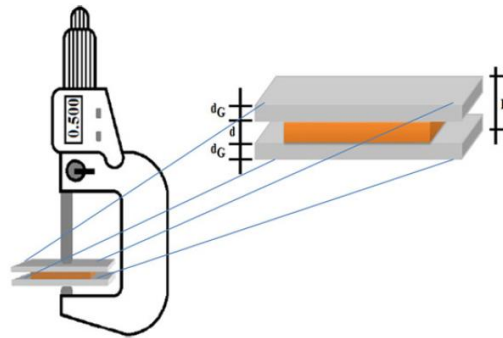


Figura 3: Montagem experimental para medição da espessura dos tecidos em tratamento.

Para se realizarem as medições de espessura para um determinado tratamento, começa-se por colocar o tecido entre duas lamelas de vidro com espessura fixa ($d=1$ mm cada). Tal como mostra a Fig. 3, esta montagem do tecido entre lamelas de vidro é colocada entre as pontas de medição de um micrômetro, que mede a espessura global D . Injeta-se a solução desejada e inicia-se as medições. Durante os primeiros dois minutos, em que é esperado que a espessura do tecido diminua de forma rápida [9], [29], [30], fazem-se as medições a cada 15 s. Para além dos 2 min de tratamento, como o tecido já se encontra a aumentar de espessura e esse processo é sabido ser mais lento [9], [29], [30], fazem-se medições a cada minuto.

No fim de cada tratamento, calculam-se as espessuras da amostra (d) para cada instante de tempo como a diferença entre os valores medidos (D) e as duas espessuras das lamelas de vidro ($2 \times d_G$):

$$d = D - 2 \times d_G. \quad (7)$$

3.5. Cálculos necessários

Para cada tratamento estudado, começou-se por calcular os espectros médios de T_c para cada instante de tempo. A partir desses espectros médios e sabendo que o músculo esquelético apresenta uma transmitância colimada linearmente crescente entre 600 e 800 nm, sem bandas de absorção nessa zona (ver espectro médio de T_c do

músculo natural na Fig. 4, no capítulo IV), escolheram-se comprimentos de onda discretos a cada 20 nm dentro desta banda para obter as variações temporais.

Considerando cada uma das variações temporais obtida para cada um dos comprimentos de onda selecionados, e de acordo com a literatura [4], [10], [29], fez-se um deslocamento vertical para que o valor de T_c seja nulo a $t = 0s$ (tecido natural). Tais variações temporais deslocadas, foram posteriormente normalizadas ao seu valor máximo, que ocorre no início da saturação do tratamento. Tal saturação é identificada visualmente na evolução temporal de T_c e corresponde ao instante de tempo em que termina o crescimento exponencial suave inicial. Este início de saturação pode ocorrer a instantes de tempo bem distintos, dependendo da concentração de OCA usada. Para os tratamentos em que a saturação ocorre antes de se atingirem os 30 min que escolhemos como duração dos estudos, despreza-se a evolução temporal de T_c para além do instante que corresponde ao início da saturação [10], [29]. No capítulo 4, aquando da apresentação dos resultados, veremos cada caso em particular. Após se ter deslocado e normalizado cada evolução temporal de T_c , até ao instante do início da saturação, tal evolução pode ser ajustada por uma curva descrita pela Eq. (2), obtendo-se o valor de τ correspondente. Este ajuste com a Eq. (2) foi feito para todos os comprimentos de onda selecionados, para se poder calcular o valor médio de τ e do seu desvio padrão para o tratamento em causa.

Este procedimento foi realizado para todos os tratamentos estudados, obtendo-se, assim, um valor médio de τ (e respetivo desvio padrão) para cada tratamento realizado com uma osmolaridade distinta de glicerina ou de gadobutrol. No fim, representaram-se os valores médios de τ em função da concentração destes agentes em solução aquosa. Cada conjunto de valores de τ que corresponde aos tratamentos com glicerina ou com gadobutrol foi ajustado com uma *spline* [9], para obter a dependência e retirar resultados. Da curva resultante para cada agente, verifica-se a ocorrência de um valor máximo, valor esse que corresponde ao real tempo de difusão da glicerina ou do gadobutrol no músculo [1], [9], [10], [29], [31]. Este valor de τ obtido para o máximo de cada curva do gráfico, corresponde à difusão única do OCA correspondente para o interior do músculo pois, a água móvel do tecido encontra-se em equilíbrio com a água na solução de tratamento [29], [30]. Por outro lado, para o tratamento com a maior osmolaridade (concentração de 60% de glicerina em solução), apenas ocorre o fluxo de água para o exterior do tecido, nos instantes iniciais, devido à forte pressão osmótica do agente na solução. O valor de τ obtido para esta concentração de glicerina, corresponde ao tempo de difusão característico do mecanismo de desidratação do tecido [29], [30]. Dado que para o caso do gadobutrol esperamos obter uma

solução com concentração máxima de 50%, não podemos realizar estes cálculos para os tratamentos com esse OCA.

Por fim, e após serem obtidos os valores de τ para a água, para a glicerina e para o gadobutrol, podemos passar ao cálculo dos coeficientes de difusão (D) correspondentes. Para se fazer esses cálculos, é necessário realizar medições de espessura durante os tratamentos que correspondem aos valores de τ obtidos para a água e para cada um dos OCAs. Assim, selecionando as soluções com as concentrações de glicerina e de gadobutrol que deram origem aos tempos de difusão destes agentes no músculo, assim como a solução com concentração de 60% de glicerina que dá origem ao τ da água, realizam-se medições de variação temporal de espessura de novas amostras de tecido muscular em tratamento com estas soluções, de acordo com o que foi descrito na secção anterior.

Uma vez obtidas tais variações temporais de espessura, seleciona-se de cada uma o valor de espessura do tecido no instante de tempo que iguala o valor de τ obtido para esse tratamento e calcula-se o coeficiente de difusão através da Eq. (3). Depois de retirados do gráfico os valores de τ e calculados os valores de D , correspondentes à difusão única de glicerina, de água e de gadobutrol no músculo, ficam caracterizados os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs dos tratamentos de transparência.

O próximo capítulo apresenta os resultados experimentais e calculados obtidos neste trabalho.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

Seguindo o procedimento experimental descrito no capítulo anterior, foram realizados estudos experimentais para se medirem espectros e espessuras de amostras de tecido músculo-esquelético durante tratamentos com soluções aquosas contendo diferentes osmolaridades de glicerina e de gadobutrol. Tais estudos experimentais foram realizados com o objetivo de se determinarem os parâmetros característicos dos mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs neste tecido.

Vamos agora apresentar os resultados, tanto os experimentais como os calculados, que foram obtidos no presente trabalho. Numa primeira fase, e com o objetivo de identificar a zona do espectro onde se devem escolher os comprimentos de onda para calcular as variações temporais de T_c que permitirão obter os valores de τ para cada tratamento estudado, apresentamos na Fig. 4, o espectro médio de T_c do músculo em estado natural. Este espectro resulta de 10 medições, das muitas que realizamos neste trabalho.

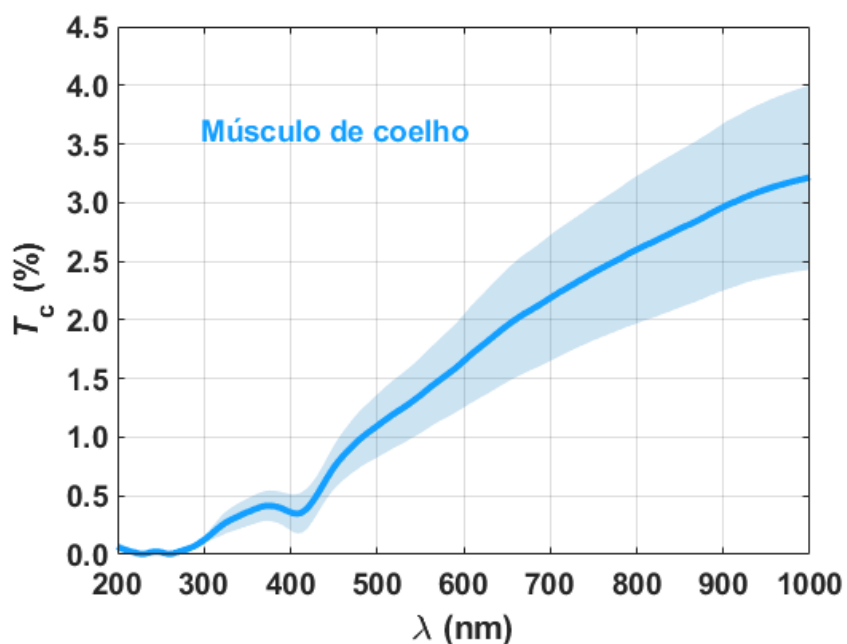


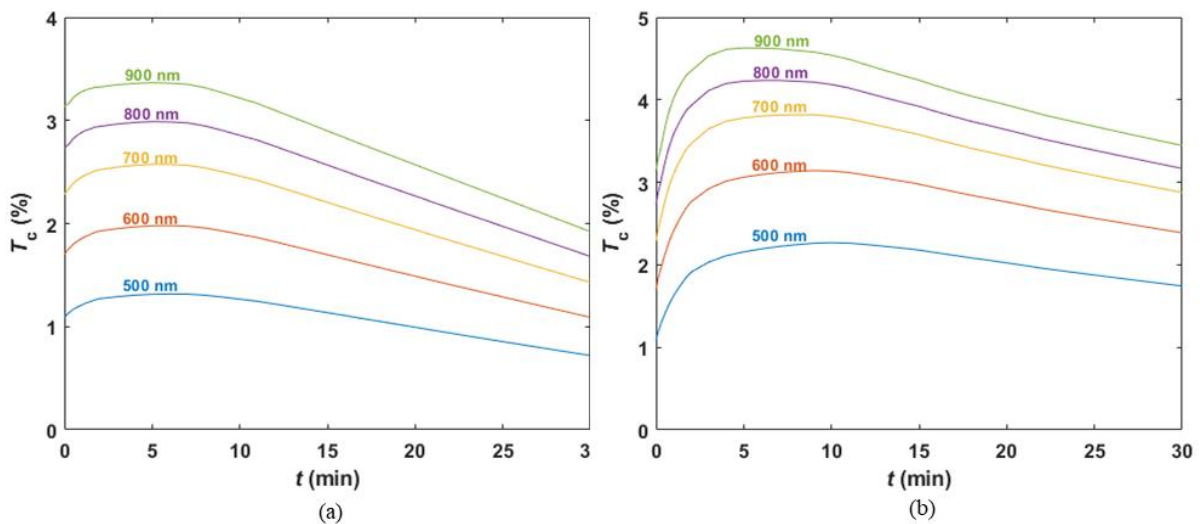
Figura 4: Média e desvio padrão dos espectros de T_c .

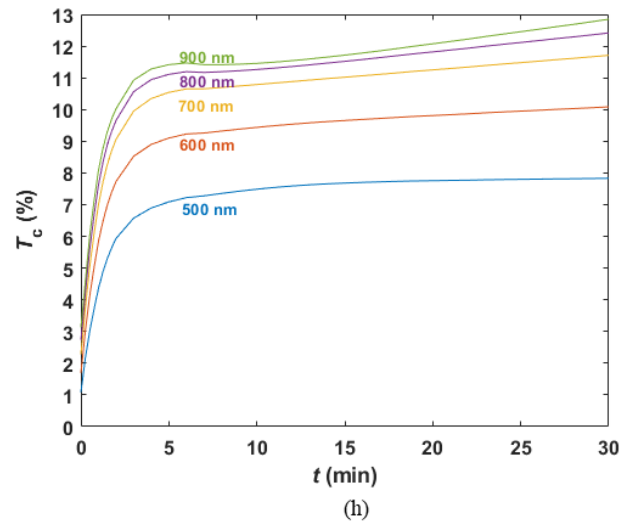
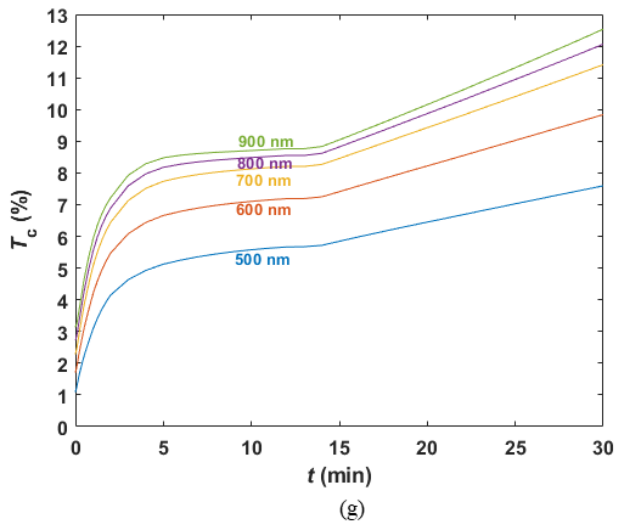
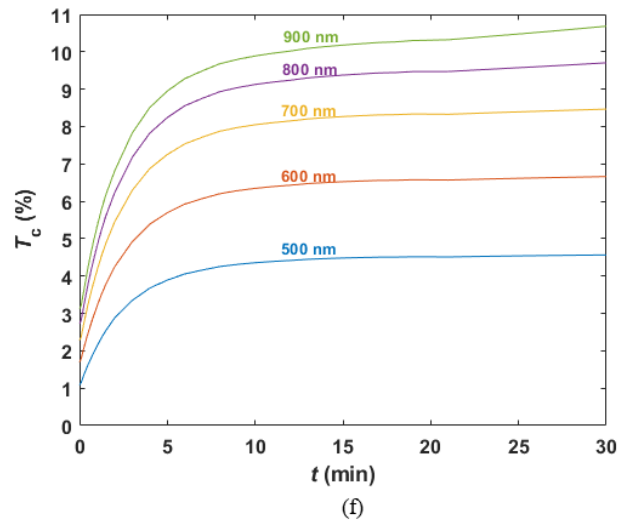
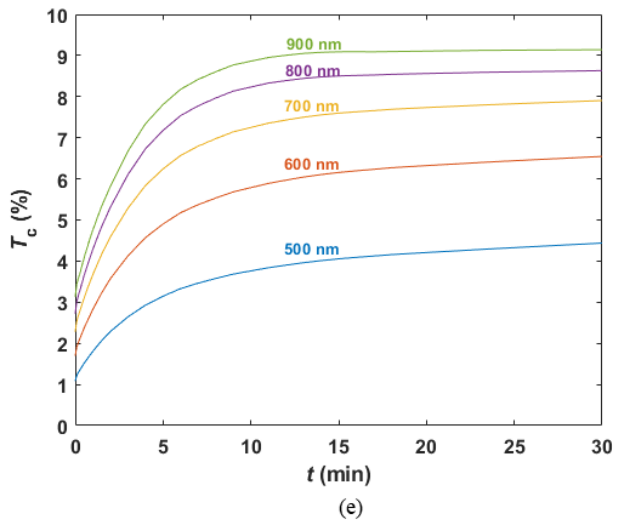
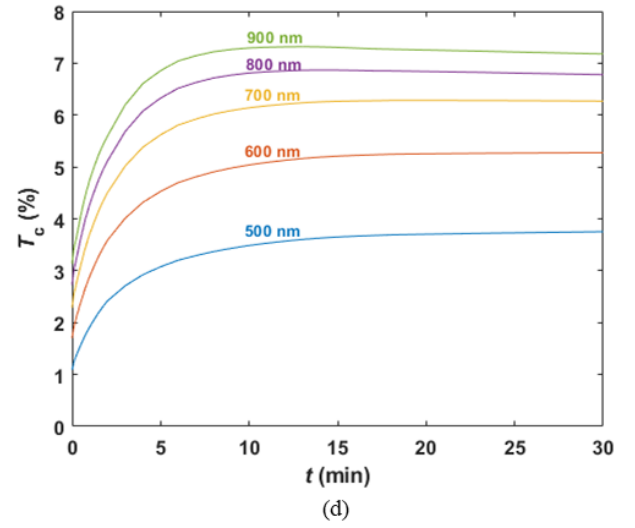
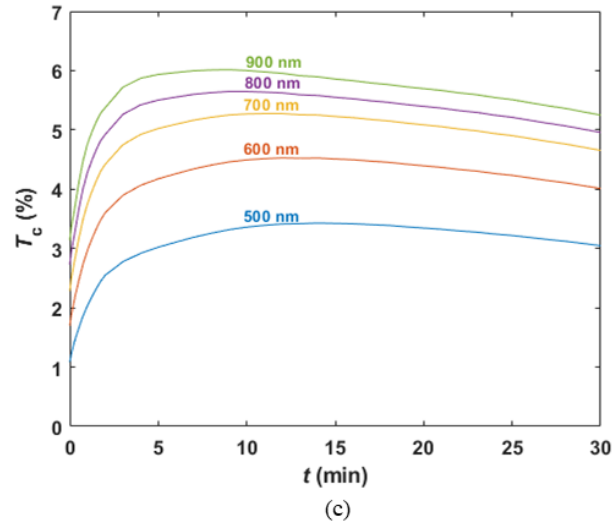
Conforme podemos ver pela Fig. 4, o desvio padrão obtido das 10 medições é reduzido no ultravioleta e vai crescendo com o comprimento de onda até ao

infravermelho. Isto mostra que apesar de as diferentes amostras que foram usadas para obter estas medições terem diferentes transmitâncias no visível e no infravermelho, devido à existência de várias bandas de absorção na zona do ultravioleta (proteínas, ADN/ARN e hemoglobina/mioglobina) [6], tanto a transmitância, como o desvio padrão são muito reduzidos nessa zona.

Olhando para a forma do espectro apresentado na Fig. 4, verificamos que entre 600 e 800 nm, T_c cresce de forma quase linear sem apresentar bandas de absorção, pelo que essa banda espectral é adequada para se estudarem as variações temporais de T_c com o objetivo de se obterem os valores de τ para cada tratamento estudado.

Conforme foi referido no capítulo anterior, foram feitos 3 estudos para cada tratamento com soluções aquosas de glicerina e de gadobutrol, em diferentes osmolaridades. Tais soluções foram preparadas de acordo com o procedimento descrito nas secções 3.2.1 e 3.2.2. Após se calcularem as médias dos espectros em cada instante de tempo para cada tratamento, criaram-se as evoluções temporais para comprimentos de onda a cada 100 nm entre 500 e 900 nm para mostrar o comportamento ao longo do tempo. As Fig. 5 e 6 mostram tais comportamentos para os tratamentos com soluções de glicerina e de gadobutrol.





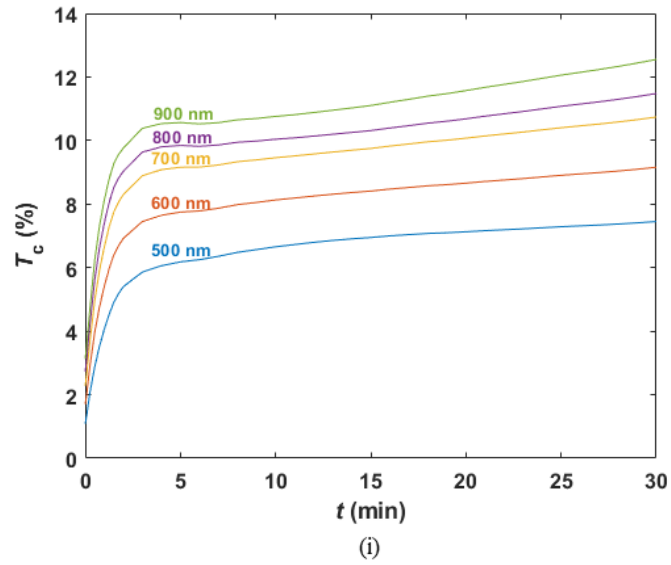
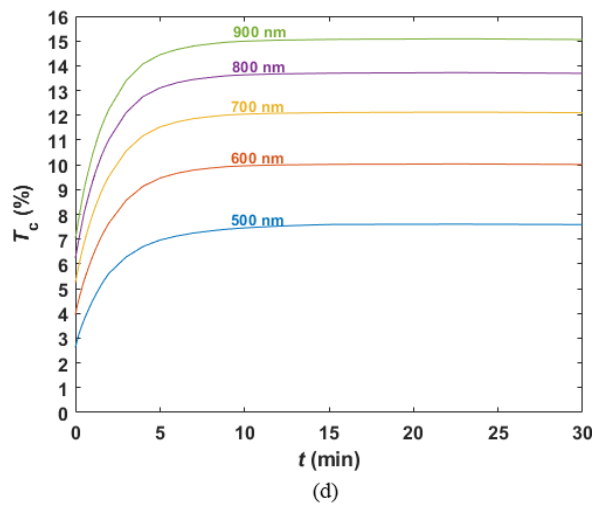
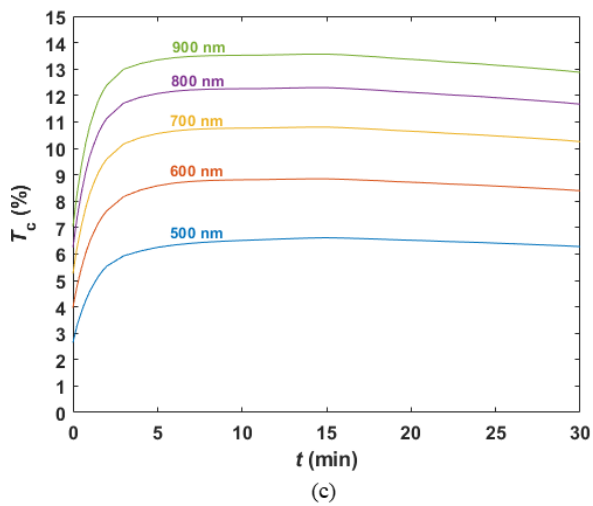
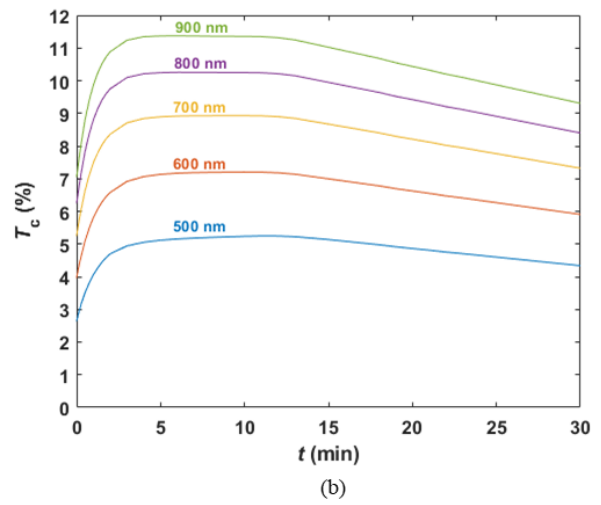
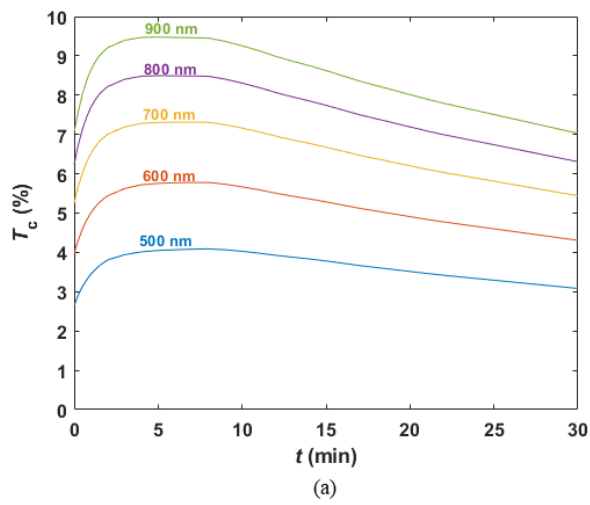


Figura 5: Dependências temporais de T_c para diferentes λ s obtidos nos tratamentos de tecidos do músculo com soluções de glicerina nas concentrações: 20% (a), 25% (b), 30% (c), 35% (d), 40% (e), 45% (f), 50% (g), 55% (h) e 60% (i).



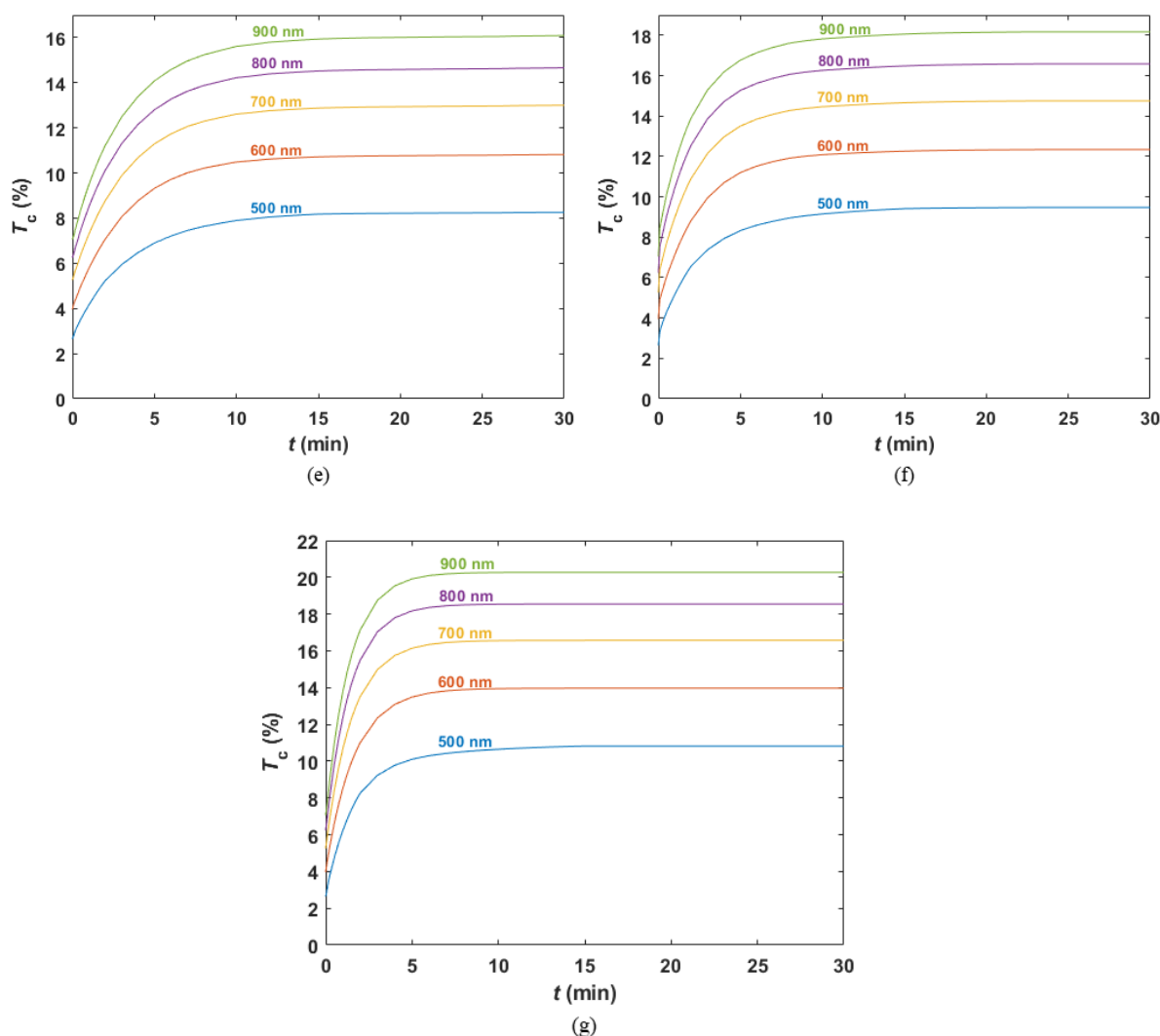


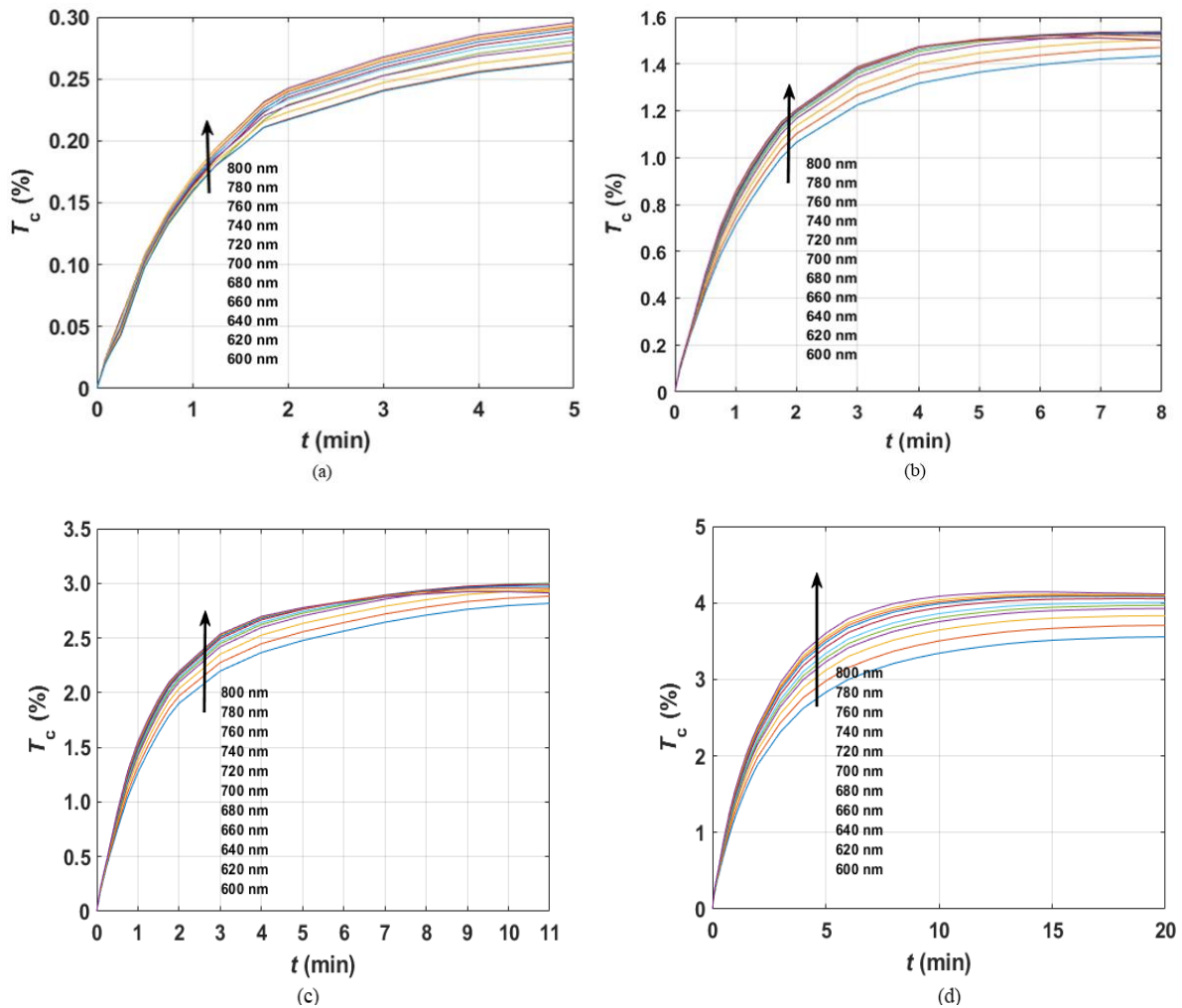
Figura 6: Dependências temporais de T_c para diferentes λ s obtidos nos tratamentos de tecidos do músculo com soluções de gadobutrol nas concentrações: 20% (a), 25% (b), 30% (c), 35% (d), 40% (e), 45% (f) e 50% (g).

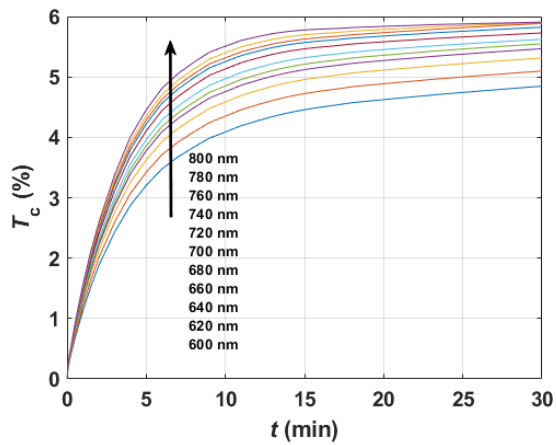
Apesar de os dois OCAs criarem comportamentos distintos para T_c ao longo de cada tratamento, podemos observar que os tratamentos com 40% do agente em solução apenas atingem a saturação ao fim dos 30 min de tratamento. Para tratamentos com concentrações inferiores a 40%, a saturação ocorre mais cedo e é seguida de um decréscimo de T_c no tempo restante de tratamento. Para tratamentos com concentrações superiores a 40%, a saturação ocorre também para instantes de tempo intermédios, a partir dos quais T_c permanece praticamente inalterado. Para os tratamentos com concentrações baixas do OCA, o decréscimo de T_c observado no final do tratamento deve-se a um possível fluxo de água para o interior do tecido, uma vez que a solução

tem água em excesso. Para os tratamentos com concentrações elevadas do OCA, tal fluxo tardio de água para o interior não acontece, visto que o conteúdo de água na solução é pequeno [10].

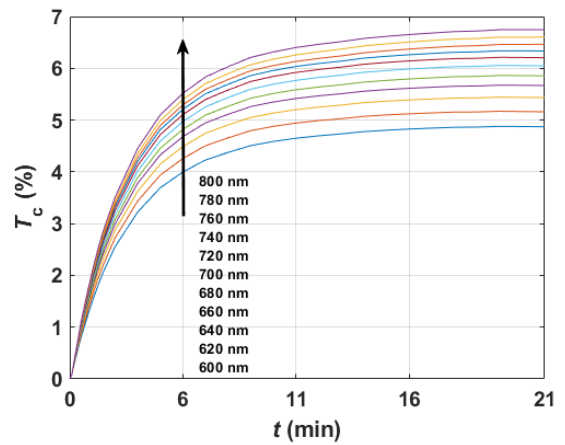
Após se identificarem os instantes de tempo onde a saturação se inicia em cada tratamento, passamos ao passo seguinte para determinar os valores de τ para cada caso. Assim, para todos os tratamentos, com a exceção dos que foram feitos com 40% de concentração de agente, cortam-se as evoluções temporais no instante em que se inicia a saturação. Por outro lado, e de acordo com a análise da Fig. 4, passamos a usar as evoluções temporais para comprimentos de onda entre 600 e 800 nm apenas.

As Fig. 7 e 8 apresentam tais evoluções de T_c , já restritas ao intervalo de tempo anterior ao início da saturação e também deslocadas na vertical para terem $T_c = 0$ no início do tratamento, tal como descrito no procedimento de cálculo, na secção 3.5.

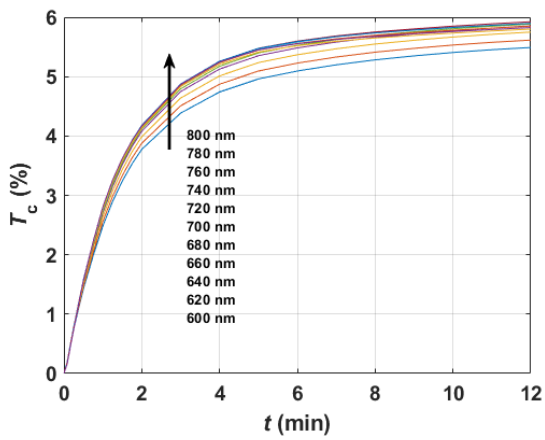




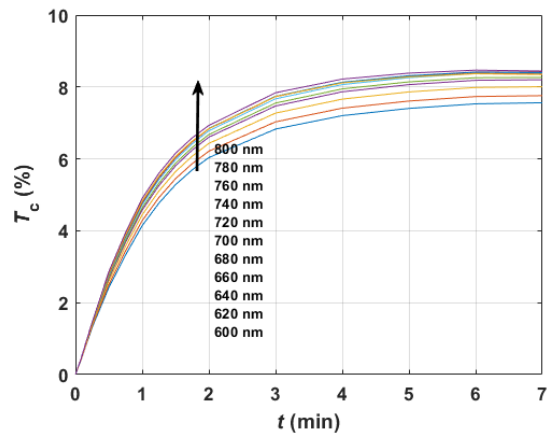
(e)



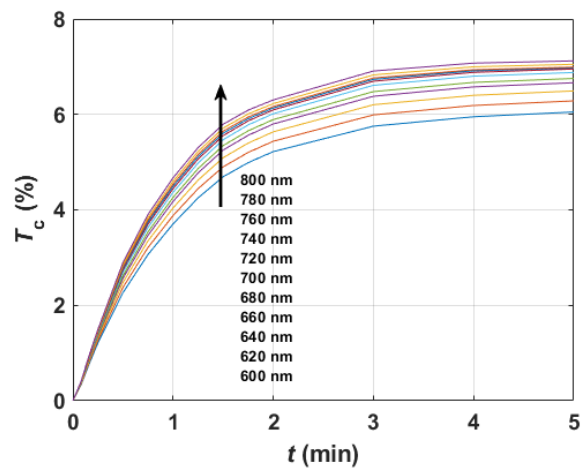
(f)



(g)

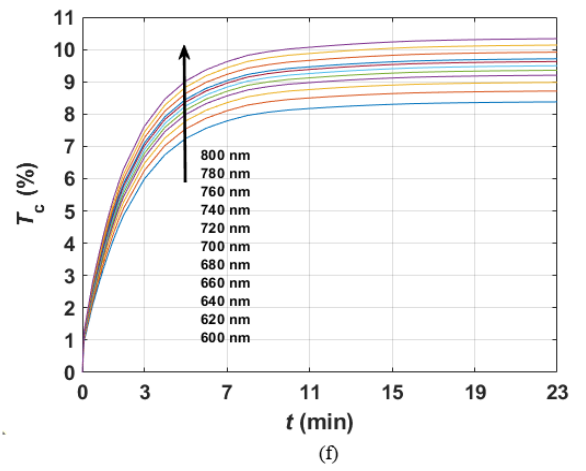
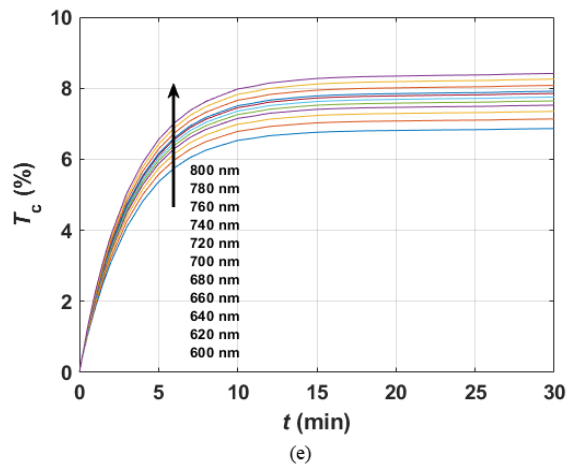
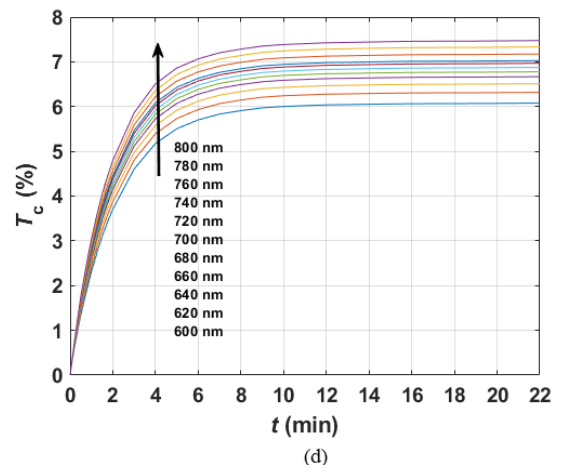
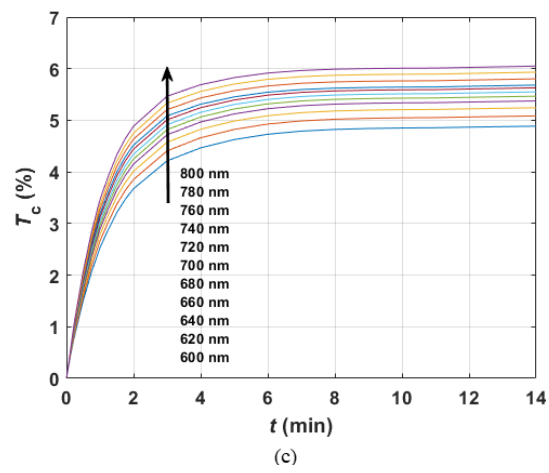
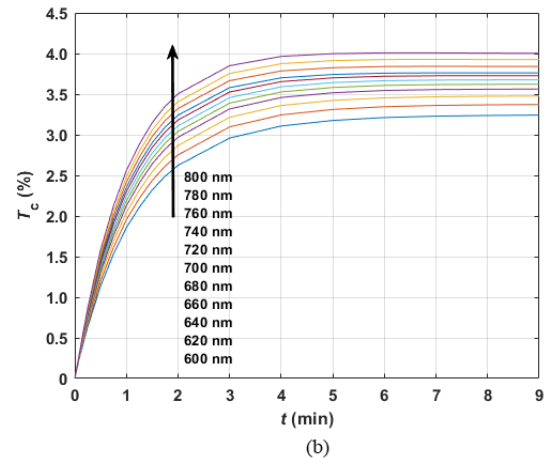
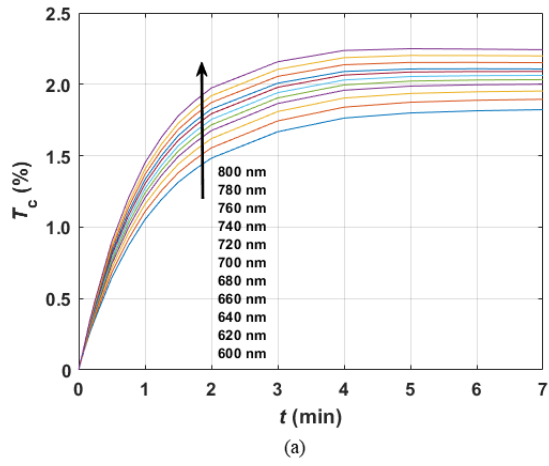


(h)



(i)

Figura 7: Dependências temporais de T_c deslocadas para zero a $t=0s$ e restritas ao intervalo de tempo anterior à saturação, para diferentes λ s obtidos nos tratamentos de tecidos do músculo 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).



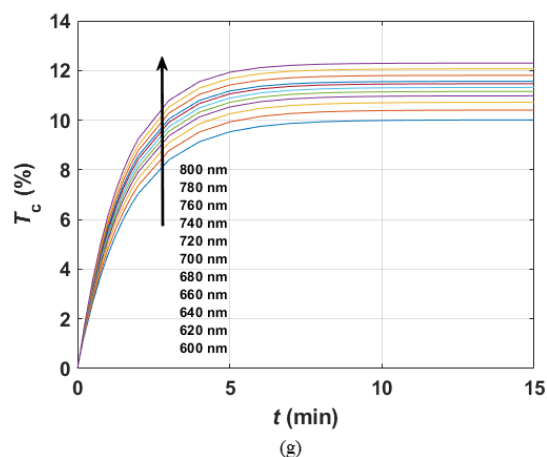


Figura 8: Dependências temporais de T_c deslocadas para zero a $t=0s$ e restritas ao intervalo de tempo anterior à saturação, para diferentes λ s obtidos nos tratamentos de tecidos do músculo com soluções de gadobutrol nas concentrações: 20% (a), 25% (b), 30% (c), 35% (d), 40% (e), 45% (f) e 50% (g).

Conforme podemos ver em todos os gráficos apresentados nas Fig. 7 e 8, as curvas apresentadas tem um comportamento exponencial crescente em toda a extensão de tempo considerada. Assim, e com o objetivo de podermos fazer o ajuste de cada uma dessas curvas com a Eq. (2), cada uma destas curvas foi normalizada ao seu valor máximo. Após se ter feito esta normalização das curvas, cada uma delas foi ajustada com a Eq. (2) no CFTOOL do MATLABTM, para obter o valor de τ correspondente. A Tabela 3 contém estes valores para os tratamentos com soluções de glicerina, conforme obtidos para cada comprimento de onda e para cada tratamento. Encontram-se também na Tabela 3, os valores médios e os de desvio padrão para τ respeitantes a cada tratamento.

Tabela 3: Valores experimentais do tempo de difusão para cada tratamento com glicerina.

Solução (%)	λ (nm)	600	620	640	660	680	700	720	740	760	780	800
20	τ (s)	71.28	70.87	70.47	69.8	69.41	69.02	68.22	67.69	67.39	67.01	66.74
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	68.9 ± 1.72										
25	τ (s)	78	76	74	72	71	69	68	66	65	63	62
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	69.45 ± 5.26										
30	τ (s)	89	88	87.89	85.45	83.37	79	76	73	72	71	70
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	79.52 ± 7.46										
35	τ (s)	157	153	149	145	142	139	136	132	130	128	126
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	139.73 ± 10.43										
40	τ (s)	257.5	253.1	247.6	241.1	235.4	228.8	225.6	218.7	215.3	210.6	201.4
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	230.46 ± 18.19										
45	τ (s)	169.4	167.3	166.8	167	168.1	168.7	168.4	168.4	169.8	170.7	170.5
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	168.65 ± 1.34										
50	τ (s)	120.1	118.4	117.5	116.8	103	102	100	97.9	97.05	96.38	95.74
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	105.90 ± 10.03										
55	τ (s)	76.14	75.38	74.82	74.24	73.62	73.06	72.52	71.97	71.41	70.98	70.66
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	73.16 ± 1.84										
60	τ (s)	62.39	61.65	60.92	60.29	59.71	59.15	58.52	57.8	57.13	56.73	56.23
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	59.14 ± 2.05										

O mesmo procedimento foi adotado para os tratamentos com o gadobutrol, resultando nos valores de τ apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores experimentais do tempo de difusão para cada tratamento com gadobutrol.

Solução (%)	λ (nm)	600	620	640	660	680	700	720	740	760	780	800
20	τ (s)	70.12	68.73	67.04	65.45	64.21	63.02	61.62	60.22	59.62	59.24	58.23
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	63.41 \pm 4.04										
25	τ (s)	71.27	69.86	68.14	65.53	65.30	64.11	62.71	61.28	60.68	60.24	59.10
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	64.38 \pm 4.06										
30	τ (s)	84.8	83.42	81.68	80.06	78.89	77.75	76.29	74.81	74.17	73.69	72.29
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	76.17 \pm 6.24										
35	τ (s)	126.2	125.3	123.9	122.7	122.1	121.3	120.1	119.0	118.5	118.1	116.5
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	121.25 \pm 3.12										
40	τ (s)	198.0	198.3	198.1	198.1	198.8	199.1	198.9	199.2	199.2	199.1	197.9
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	198.61 \pm 0.53										
45	τ (s)	134.9	133.9	132.4	131.0	130.3	129.5	128.1	126.9	126.3	125.9	124.1
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	129.39 \pm 3.48										
50	τ (s)	98.15	96.95	95.33	93.83	92.85	91.83	90.43	89.07	88.47	88.01	86.53
	<i>média</i> $\pm sd$ (s)	91.95 \pm 3.83										

Considerando os valores médios de τ (e os respectivos desvios padrão) apresentados nas Tabelas 3 e 4, procedeu-se à sua representação gráfica em função da

concentração do OCA correspondente. A Fig. 9 contém estes dois conjuntos de dados, que foram interpolados por *splines* para se ver a dependência.

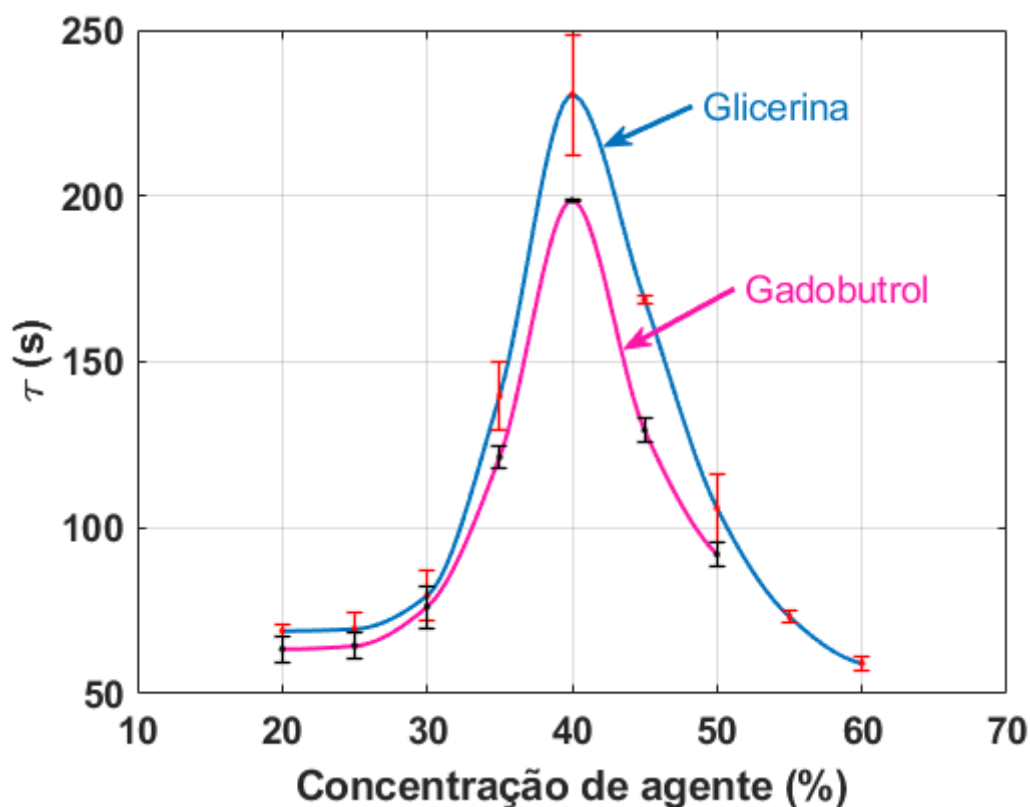


Figura 9: Tempos de difusão obtidos nos tratamentos em função da concentração de glicerina e de gadobutrol na solução de tratamento.

A primeira informação importante que a Fig. 9 nos dá é que os picos de difusão ocorrem aproximadamente na mesma concentração. No caso dos tratamentos com soluções de glicerina, esse pico ocorre para uma concentração de 40.2%, um valor que é próximo ao obtido para músculo esquelético de rato [9]. No caso dos tratamentos com gadobutrol, o pico ocorre para a concentração de 40%, o mesmo valor que foi obtido para musculo coloretal humano [9]. Considerando a média destes dois valores, podemos concluir que o músculo esquelético de coelho tem um conteúdo de água livre de 59.9%. Por outro lado, a diferença entre as concentrações às quais ocorrem os picos para os tratamentos com os dois OCAs é de apenas 0.2%. Este valor, apesar de pequeno, indica-nos que pode ter havido um pequeno erro no cálculo das concentrações de gadobutrol como resultado dos nossos testes preliminares com as diluições do gadovist.

No entanto, dado se ter obtido apenas um desvio de 0.2%, verificamos que os nossos cálculos não apresentam um erro muito significativo e, por conseguinte, a metodologia que usamos para calcular o conteúdo do gadobutrol no gadovist foi adequada.

Ainda da Fig. 9, podemos retirar os valores de τ que correspondem aos fluxos únicos de glicerina, de gadobutrol e de água. Da curva a azul na Fig. 9, que corresponde aos tratamentos com glicerina, verificamos que o valor máximo de τ é de 230.3s, que corresponde ao real tempo de difusão da glicerina no músculo esquelético de coelho. Este valor não difere muito dos 231.6s obtidos para a glicerina em músculo colorectal humano que foi publicado na Ref. [9]. Ainda do mesmo conjunto de dados da Fig. 9, observamos que o valor mínimo de $\tau=59.1s$, obtido para o tratamento com 60% de glicerina, é também semelhante ao valor médio de 57.7s, que foi obtido com tratamentos de vários OCAs no músculo colorectal humano [9]. No que diz respeito aos tratamentos com gadobutrol, obteve-se um τ máximo de 198.6s, que corresponde ao real tempo de difusão deste OCA no músculo esquelético de coelho. Dado que de acordo com os dados apresentados na Fig. 9 apenas foi possível conseguir uma solução com concentração máxima de 50% de gadobutrol a partir do gadovist comercial, não nos é possível estimar o tempo de difusão da água para os tratamentos com este agente.

Após se terem determinado os valores dos tempos de difusão da glicerina, do gadobutrol e da água no músculo esquelético, resta agora calcular os coeficientes de difusão correspondentes para que os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs fiquem caracterizados. Para se proceder a esses cálculos com a Eq. (3), realizamos medições de variação de espessura de amostras de músculo em tratamento com as soluções de 40% e de 60% de glicerina e de 40% de gadobutrol. Para cada um destes tratamentos foram feitos três estudos. A Fig. 10 apresenta as variações médias de espessura obtidas nos tratamentos com soluções de glicerina e a Fig. 11 apresenta a variação média de espessura obtida no tratamento com 40% de gadobutrol.

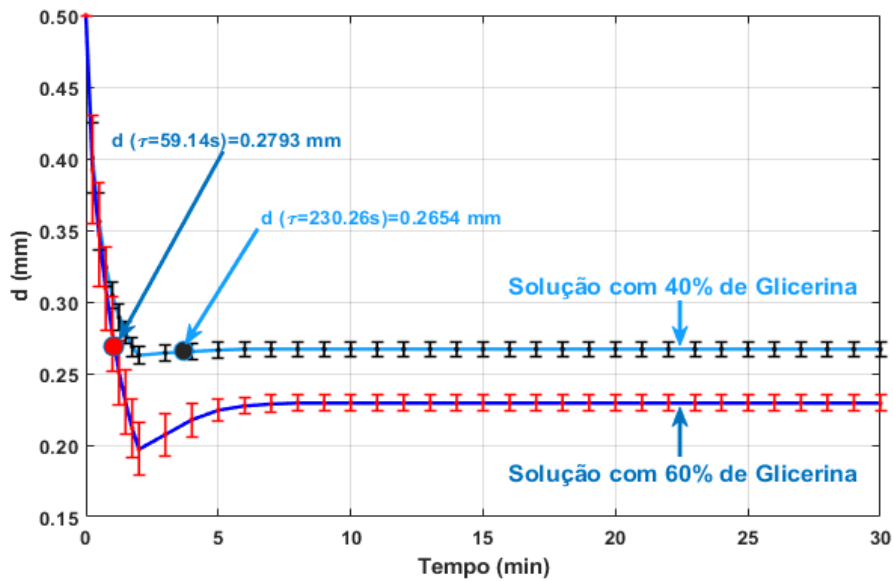


Figura 10: Variação média da espessura das amostras de tecido do músculo em função do tempo para tratamento com soluções de glicerina nas concentrações de 40% e de 60%.

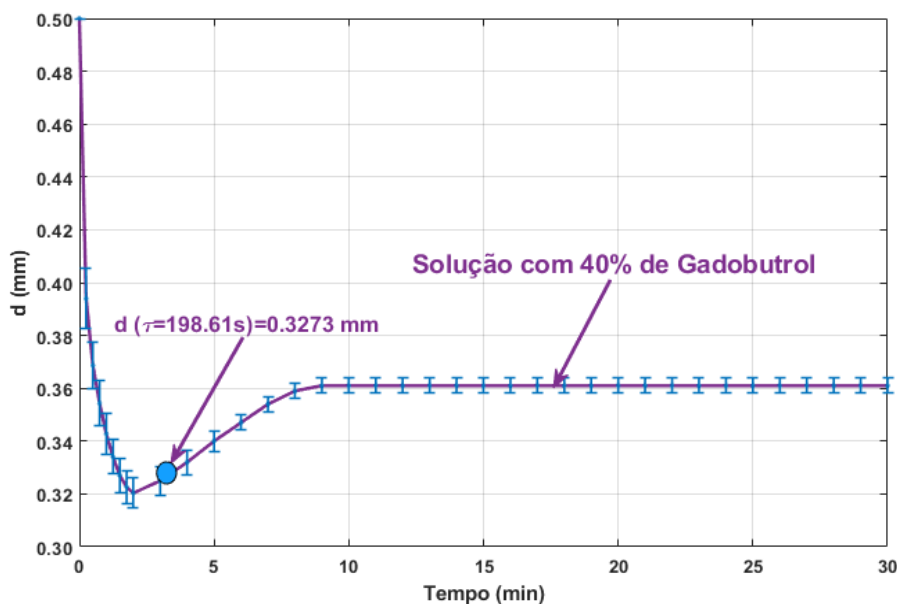


Figura 11: Variação média da espessura das amostras de tecido do músculo em função do tempo para tratamentos com a solução de gadovist com uma concentração de 40%.

Nas Fig. 10 e 11 estão representados os pontos médios discretos das medições e respectivas barras que representam o desvio padrão, assim como as *splines* que foram criadas para interpolar os pontos médios de cada estudo. Foram também já identificadas nas curvas representadas nas Fig. 10 e 11, as espessuras que correspondem aos instantes de tempo dos valores de τ para cada tratamento. Esses valores são os seguintes: 0.2654

mm para $\tau=230.3s$ no tratamento com 40% de glicerina, 0.2793 mm para $\tau=59.1s$ no tratamento com 60% de glicerina e 0.3273 mm para $\tau=198.6s$ no tratamento com 40% de gadobutrol. Utilizando estes pares de valores de τ e d para cada tratamento na Eq. (3) foram calculados os coeficientes de difusão da glicerina (Eq. (8)), do gadobutrol (Eq. (9)) e da água (Eq. (10)).

$$D_{glicerina} = \frac{d^2}{\pi^2 \tau_{glicerina}} = \frac{0.02654^2}{\pi^2 \times 230.26} = 3.1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s} \quad (8)$$

$$D_{gadobutrol} = \frac{d^2}{\pi^2 \tau_{gadovist}} = \frac{0.03273^2}{\pi^2 \times 198.61} = 5.5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s} \quad (9)$$

$$D_{\acute{a}gua} = \frac{d^2}{\pi^2 \tau_{\acute{a}gua}} = \frac{0.02793^2}{\pi^2 \times 59.14} = 1.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s} \quad (10)$$

No caso do coeficiente de difusão da glicerina, o valor de $3.1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ é muito próximo do valor obtido para o coeficiente de difusão da glicerina em músculo coloretal humano, que de acordo com a Ref. [9], tem o valor de $3.3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Note-se que considerando a difusão de glicerina em tecido muscular, apenas este valor foi reportado, pelo que esta é a única comparação que podemos fazer. No caso da água, o valor que obtivemos para o seu coeficiente de difusão no músculo esquelético do coelho é de $1.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Comparando este valor com outros obtidos em tecido muscular, verificamos que é cerca de $2.4 \times$ inferior ao valor de $3.1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ que foi publicado para o músculo coloretal humano e para o músculo esquelético de rato [9]. Esta diferença pode ter a ver com a natureza dos tecidos usados em cada estudo ou com o facto de os tecidos que foram usados no presente trabalho terem estado congelados por um período de 12 a 24 h antes de serem utilizados nos estudos experimentais. No caso do gadobutrol, os resultados obtidos, seja para o tempo de difusão seja para o coeficiente de difusão, são os primeiros a ser publicados, pelo que não podemos fazer qualquer tipo de comparação.

Com a obtenção destes resultados, nomeadamente os tempos e os coeficientes de difusão da glicerina, da água e do gadobutrol, ficam

caracterizados os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs no músculo esquelético de coelho, para os tratamentos de transparência com soluções de glicerina e gadobutrol.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO

5. Conclusão

O presente trabalho consistiu no estudo da difusão de agentes de transparência, como a glicerina e o gadovist, e da água em tecidos músculo-esqueléticos de coelho. Tal como referido no estado da arte, as patologias associadas ao tecido muscular ocorrem por vezes no interior do músculo, que é um tecido espesso. Para se proceder a diagnóstico e/ou tratamento dessas patologias recorrendo a tecnologias óticas, é necessária a aplicação de tratamentos de transparência para eliminar ou reduzir o espalhamento da luz nas camadas a atravessar por um feixe ótico. As propriedades de difusão obtidas no presente trabalho são assim de elevada importância para se desenvolverem tais procedimentos clínicos.

Estas propriedades permitem caracterizar os dois mecanismos de transparência estudados – desidratação do tecido e adaptação de IRs. Relativamente às propriedades de difusão da glicerina no músculo, os valores obtidos mostraram-se semelhantes aos já observados noutros tecidos musculares.

Dado não se conhecer o conteúdo de água no gadovist, foi necessário realizar alguns estudos experimentais preliminares para estimar esse valor e o IR do agente de transparência que se encontra neste produto comercial – o gadobutrol. Após tais estudos experimentais, foi possível obter uma estimativa acertada do conteúdo de água no gadovist e assim preparar as várias soluções para os tratamentos a realizar com boa precisão. Como resultado dos tratamentos com este agente, foi possível obter as suas propriedades de difusão no músculo, que agora podemos comparar com as obtidas para a glicerina. Verificamos que o tempo de difusão da glicerina (230.3s) é significativamente superior ao obtido para o gadobutrol (198.6s). Esta diferença mostra que a glicerina leva mais tempo a se difundir para o interior do tecido muscular. Uma difusão mais lenta por parte da glicerina pode ser justificada pela sua viscosidade e também por outro aspeto. Dado que a glicerina apresenta uma molécula ($C_3H_8O_3$) de menores dimensões do que a do gadobutrol ($C_{18}H_{31}GdN_4O_9$), pode acontecer que no tempo de tratamento considerado, as moléculas de glicerina se consigam difundir do líquido intersticial para o

interior das fibras musculares através das membranas e reduzir a hidratação destes scatterers. A grande dimensão das moléculas de gadobutrol impede que se consigam difundir através das membranas e permaneçam apenas no líquido intersticial que as rodeia.

A metodologia utilizada no presente trabalho pode perfeitamente ser aplicada a diversos tecidos biológicos, uma vez que não é complexa e é de fácil compreensão. Esperamos no futuro poder realizar outros estudos semelhantes, onde a avaliação e a comparação das propriedades de difusão de diferentes OCAs venha a permitir caracterizar os mecanismos de desidratação e de adaptação de IRs para diferentes situações.

Referências

- [1] L. M. C. Oliveira and V. V. Tuchin, “The Optical Clearing Method – A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering,” Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2019, pp. 1–106.
- [2] 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, Mar. 2015.
- [3] 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, Jul. 2021.
- [4] V. V. Tuchin, *Optical clearing of tissues and blood*. Bellingham, Usa: SPIE, 2005.
- [5] D. S. Richardson and J. W. Lichtman, “Clarifying Tissue Clearing,” *Cell*, vol. 162, no. 2. Cell Press, pp. 246–257, Jul. 18, 2015.
- [6] 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, Jul. 2021.
- [7] 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, Sep. 2016.
- [8] V. V. T. T. Yu. D. Zhu, L. Oliveira, E. A. Genina, A. N. Bashkatov, “Tissue optical clearing mechanisms,” in *Tissue optical clearing: new prospects in optical imaging*, EDS: CRC Press, 2021.
- [9] 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, Apr. 2019.
- [10] 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. 051019, Dec. 2014.

- [11] L. Oliveira, “Study of the spectral transmission response of biological tissues under the influence of different osmotic agents,” *FEUP Edições, Porto, Port.*, 2007.
- [12] D. K. Tuchina *et al.*, “Magnetic resonance contrast agents in optical clearing: Prospects for multimodal tissue imaging,” *J. Biophotonics*, vol. 13, no. 11, p. e201960249, Nov. 2020.
- [13] A. Iqbal, J. J. Glagola, and T. M. Nappe, “Ethylene Glycol Toxicity,” *StatPearls*, Aug. 2020, Accessed: Jul. 11, 2021. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537009/>.
- [14] T. Vo-Dinh, Ed., *Biomedical Photonics Handbook Therapeutics and Advanced Biophotonics*, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2014.
- [15] S. Carvalho, I. Carneiro, R. Henrique, V. Tuchin, and L. Oliveira, *Lipofuscin-Type Pigment as a Marker of Colorectal Cancer*. 2020.
- [16] I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, and V. Tuchin, “Moving tissue spectral window to the deep-ultraviolet via optical clearing,” *Journal of Biophotonics*, vol. 12, no. 12. Wiley-VCH Verlag, Dec. 01, 2019.
- [17] M. Aswendt, M. Schwarz, W. M. Abdelmoula, J. Dijkstra, and S. Dedeurwaerdere, “Whole-Brain Microscopy Meets In Vivo Neuroimaging: Techniques, Benefits, and Limitations,” *Molecular Imaging and Biology*, vol. 19, no. 1. Springer New York LLC, Feb. 01, 2017.
- [18] A. Azaripour, T. Lagerweij, C. Scharfbillig, A. E. Jadczyk, B. Willershausen, and C. J. F. Van Noorden, “A survey of clearing techniques for 3D imaging of tissues with special reference to connective tissue,” *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 51, no. 2. Elsevier GmbH, pp. 9–23, Aug. 01, 2016.
- [19] Werner Spalteholz, *Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen : Nebst Anhang: Über Knochenfärbung*. Germany: Leipzig Hirzel, 1911.
- [20] Werner Spalteholz, *Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang Über Knochenfärbung*. Germany: Leipzig S. hirzel, 1914.
- [21] 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.
- [22] 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, Jul. 2021.
- [23] V. V. Tuchin, I. L. Maksimova, D. A. Zimnyakov, I. L. Kon, A. K. Mavlutov, and A. A. Mishin, “Light propagation in tissues with controlled optical properties,” vol. 2925, pp. 118–142, Dec. 1996.
- [24] A. Y. Sdobnov, M. E. Darvin, E. A. Genina, A. N. Bashkatov, J. Lademann, and V. V. Tuchin, “Recent progress in tissue optical clearing for spectroscopic application,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 197, pp. 216–229, May 2018.
- [25] J. Hirshburg, B. Choi, J. S. Nelson, and A. T. Yeh, “Correlation Between Collagen Solubility and Skin Optical Clearing Using Sugars,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 39, pp. 140–144, 2007.
- [26] V. V. Tuchin, *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*, 3rd ed. Bellingham, WA, USA: Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE), 2015.
- [27] A. E. Lamminen, “Magnetic resonance imaging of primary skeletal muscle diseases: patterns of distribution and severity of involvement,” vol. 63, no. 756, pp. 946–950, May 2014.
- [28] M. K. Javaid *et al.*, “Best practice management guidelines for fibrous dysplasia/McCune-Albright syndrome: a consensus statement from the FD/MAS international consortium,” *Orphanet J. Rare Dis.* 2019 141, vol. 14, no. 1, pp. 1–17, Jun. 2019.
- [29] 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, Jul. 2013.
- [30] 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, Feb. 2017.
- [31] E. A. Genina, L. M. C. Oliveira, A. N. Bashkatov, and V. V. Tuchin, “Optical

- Clearing of Biological Tissues: Prospects of Application for Multimodal Malignancy Diagnostics,” in *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer*, Springer International Publishing, 2020, pp. 107–131.
- [32] 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, p. e201800283, May 2019.
- [33] 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, Oct. 2016,
- [34] L. Oliveira and V. V. Tuchin, “Optical clearing for cancer diagnostics and monitoring,” in *Tissue optical clearing: new prospects in optical imaging*, D. Zhu, E. Genina, and V. V. Tuchin, Eds. CRC Press, 2021.
- [35] V. V. Tuchin and L. Oliveira, “Recent progress in tissue enhanced spectroscopy for cancer detection,” *Asian J. Physic*, vol. 1, pp. 427–444, 2021.
- [36] Dev Bukhsh Singh and Timir Tripathi, *Frontiers in Protein Structure, Function, and Dynamics*. Springer Singapore, 2020.
- [37] J. Robin Harris and Jon Marles-Wright, *Macromolecular Protein Complexes III: Structure and Function*, vol. 96. Cham: Springer International Publishing, 2021.
- [38] “Refractive Index of Glycerine-Water Solutions at 20°C (69°F).” [http://edge.rit.edu/edge/P13051/public/Research Notes/refractive index glycerin water.pdf](http://edge.rit.edu/edge/P13051/public/Research%20Notes/refractive%20index%20glycerin%20water.pdf) (accessed Jun. 28, 2021).
- [39] “Gadovist®1.0: Gadobutrol | Bayer Radiology.” <https://www.radiology.bayer.com/products/gadovist> (accessed Jul. 12, 2021).
- [40] “Gadobutrol - Wikipedia.” <https://en.wikipedia.org/wiki/Gadobutrol> (accessed Jul. 12, 2021).
- [41] “Glycerol - Wikipedia.” <https://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol> (accessed Jul. 12, 2021).
- [42] L. M. Oliveira, M. I. Carvalho, E. M. Nogueira, and V. V. Tuchin, “Skeletal

-
- muscle dispersion (400-1000 nm) and kinetics at optical clearing,” *Journal of Biophotonics*, vol. 11, no. 1. Wiley-VCH Verlag, Jan. 01, 2018.
- [43] K. M. Meek, S. Dennis, and S. Khan, “Changes in the Refractive Index of the Stroma and Its Extrafibrillar Matrix When the Cornea Swells,” *Biophys. J.*, vol. 85, no. 4, pp. 2205–2212, Oct. 2003.
- [44] K. M. Meek, D. W. Leonard, C. J. Connon, S. Dennis, and S. Khan, “Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma,” *Eye 2003 178*, vol. 17, no. 8, pp. 927–936, Nov. 2003.
- [45] O. Zhernovaya, O. Sydoruk, V. Tuchin, and A. Douplik, “The refractive index of human hemoglobin in the visible range,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 56, no. 13, p. 4013, Jun. 2011.
- [46] E. N. Lazareva and V. V. Tuchin, “Measurement of refractive index of hemoglobin in the visible/NIR spectral range,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, no. 3, p. 035004, Mar. 2018.
- [47] M. Daimon and A. Masumura, “Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region,” *Appl. Opt.*, vol. 46, no. 18, pp. 3811–3820, Jun. 2007.