

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

SEBASTIÃO PRATAVIEIRA

**Desenvolvimento e avaliação de um sistema de imagem multiespectral para o diagnóstico óptico de lesões neoplásicas**

São Carlos - S.P.

*2010*



SEBASTIÃO PRATAVIEIRA

**Desenvolvimento e avaliação de um sistema de imagem multiespectral para o diagnóstico óptico de lesões neoplásicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:** Física Aplicada

**Orientadora:** Profa. Dra. Cristina Kurachi

São Carlos - S.P.

*2010*

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Pratavieira, Sebastião

Desenvolvimento e avaliação de um sistema de imagem multiespectral para o diagnóstico óptico de lesões neoplásicas / Sebastião Pratavieira; orientadora Cristina Kurachi.-edição revisada- São Carlos, 2010.

84 p.

Dissertação (Mestrado em Ciência - Área de concentração: Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Fluorescência. 2. Refletância. 3. Imagem multiespectral. 4. Processamento de imagens. I. Título.

**Este exemplar foi revisado e alterado em relação ao original, sob a exclusiva  
responsabilidade do autor.**

**São Carlos, \_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de 2010**

---



## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial, meus pais Fátima e Pércio e meus irmãos Leandro e Angélica, pelo apoio e ajuda em todas as horas.

À Profa. Cristina Kurachi, pelas idéias e valiosos ensinamentos que possibilitaram a realização desse trabalho.

Aos professores Milton Ferreira de Souza, Sérgio Carlos Zílio, Vanderlei S. Bagnato e Francisco Gontijo Guimarães, que sempre me apoiaram e ajudaram no ingresso à universidade até os dias atuais.

Aos amigos da graduação Antonio (Nettão), Anderson (Bonelli) e Fernando Tsutae, pelo apoio durante o curso.

Aos amigos Jeison e Paulinha, pelas proveitosas conversas e auxílio em muitas coisas.

Aos amigos do Laboratório de Biofotônica, onde este trabalho foi desenvolvido: Clóvis, Lílian, Natalia, Larissa, Carla, Leandro, Michelle, Luis Gustavo Sabino, Gustavo, Dirceu, Denis, Emery, Vitor, Everton, Fernando, Hilde, Fernanda, Cintia, Juçaira, Mardoqueu, Ruy, Vitória, e ao pessoal que já não está mais no lab. Juliana, Maristela, Priscila Menezes e Alessandra.

À Dra. Mariângela Brunaldi e a Larissa Marilla Souza, pela ajuda na confecção e análise das lâminas histológicas.

Aos funcionários e técnicos do Grupo de Óptica e do Instituto de Física de São Carlos, pelo auxílio em muitas tarefas. Obrigado!

Aos amigos dos laboratórios LIEPO e LAT, por me auxiliarem nas dificuldades técnicas. Muito Obrigado!

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro e do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CePOF – programa CePID/FAPESP).





## RESUMO

PRATAVIEIRA, S. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema de imagem multiespectral para o diagnóstico óptico de lesões neoplásicas.** 2010. 84p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

O aumento da expectativa de vida, associado a hábitos menos saudáveis da população, faz com que a probabilidade de desenvolvimento de algum tipo de tumor aumente. Por isso, o câncer tem se tornado cada vez mais um problema importante em saúde pública. Os métodos atualmente empregados para a detecção não são eficientes para um diagnóstico rápido e preciso, levando à busca de novas técnicas. A utilização de imagens ópticas têm se mostrado uma boa alternativa, para a realização de um diagnóstico precoce. Neste trabalho, apresentamos um sistema de imagem de campo amplo para detecção óptica de alterações teciduais, baseado em fluorescência e refletância. O desenvolvimento do sistema de imagem envolve tanto a montagem do protótipo como a proposta de um processamento das imagens adquiridas. Para a aquisição das imagens de fluorescência e refletância foi construído um sistema que utiliza uma câmera CCD colorida de alta resolução, juntamente com uma fonte de iluminação baseada em Diodos Emissores de Luz (LEDs). Para as imagens de fluorescência, utilizou-se um LED emitindo em 400 nm, juntamente com um filtro óptico, para obtenção apenas do sinal de fluorescência. As imagens de refletância foram feitas em cinco regiões: UV; azul; verde; vermelho e luz branca. Com a aquisição dessas imagens é possível formar uma imagem multiespectral da região analisada, sendo que cada tipo de imagem fornece uma informação diferente sobre o tecido analisado. Para a determinação de regiões que apresentam características ópticas distintas, utilizou-se o algoritmo *k-means*, que através do cálculo da distância geométrica entre as amostras, separa regiões opticamente distintas. Para a validação do sistema, foi utilizado um modelo *in vivo*, através da indução de lesões de pele por exposição a raios UV em camundongos *hairless*. Para formar a imagem multiespectral de uma lesão, foram adquiridas a imagem de fluorescência e as cinco imagens de refletância nas diferentes regiões. Para completar a imagem multiespectral, uma imagem da razão entre as componentes vermelha e verde da imagem de fluorescência foi adicionada, pois durante o desenvolvimento de uma lesão neoplásica, há uma alteração nessa proporção. A utilização de diferentes tipos de imagem permite um aumento do contraste na discriminação entre diferentes regiões. Através da utilização de fluorescência e refletância para a formação de imagens multiespectrais e de um processamento de imagens, foi possível delimitar áreas opticamente diferentes, resultado importante para a detecção e delineamento da lesão.

Palavras-chave: Fluorescência. Refletância. Imagem multiespectral. Processamento de imagens.



## ABSTRACT

PRATAVIEIRA, S. **Assembly and evaluation of a multispectral widefield imaging system for the detection of malignant lesions.** 2010. 84p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

The increase of life expectancy associated to healthless habits results in a higher probability of tumor development. In this sense, cancer has been increasingly considered an important health public concern. The conventional methods for cancer detection are not efficient for the acquisition of a fast and precise diagnostics. In this study we present a widefield imaging system for optical detection of tissue changes based on fluorescence and reflectance. The development of the imaging system involves the device assembly as well as a proposed image processing. For the acquisition of fluorescence and reflectance images a system with a high resolution color CCD camera together with LED-based light source was built. A LED emitting at 400 nm and an optical filter were used for fluorescence imaging. The reflectance images were acquired at five spectral intervals: UV, blue, green, red, and white. After the acquisition of this set of images it is possible to merge a multispectral image of the target tissue, where each image type provides distinct information from the investigated sample. For the determination of the regions that present different optical characteristics, a k-means algorithm was used. An in vivo animal model of UV-induced skin lesions at hairless mice was used for system validation. In order to obtain the multispectral image of a lesion, a fluorescence image and five reflectance images were acquired. To complete the multispectral image, an image of the ratio of the red to green components of fluorescence image was added, because during malignant development a change of this ratio is observed. The use of different image types allows the increase of the discrimination contrast of distinct regions after an image processing it was possible to discriminate optically different regions, a result that is relevant for lesion detection and delimitation.

Keywords: Fluorescence. Reflectance. Multispectral image. Image processing.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Diagrama de níveis de energia	25
Figura 2:	Representação dos fenômenos ópticos que ocorrem quando luz interage com tecido	26
Figura 3:	Modelo de propagação da radiação eletromagnética em meio absorvedor e espalhador	29
Figura 4:	Coefficiente de espalhamento (S) e absorção (K) da pele humana	31
Figura 5:	Espectro de emissão dos LEDs na região do visível	38
Figura 6:	Espectro de emissão do LED branco	39
Figura 7:	Desenho esquemático da peça de suporte dos LEDs	40
Figura 8:	Foto do sistema de iluminação no visível e de aquisição	41
Figura 9:	Espectro de emissão do LED ultravioleta	41
Figura 10:	Foto do sistema de iluminação no UV e da aquisição	42
Figura 11:	Imagem do padrão de resolução espacial	43
Figura 12:	Foto do sistema completo	43
Figura 13:	Montagem para simulação <i>in vitro</i>	45
Figura 14:	Espectro do coeficiente de espalhamento do Intralipid, semelhante ao Lipofundi	45
Figura 15:	Imagens de fluorescência do padrão vermelho, à esquerda a máxima intensidade; e a direita a mínima	50
Figura 16:	Espectros de Fluorescência do padrão vermelho mostrando as diferentes intensidades utilizadas	50
Figura 17:	Comparações das intensidades de cada componente da imagem com intensidade espectroscopia. (a) componente R; (b) componente G; (c) componente B; (d) escala de cinza	51
Figura 18:	Espectros de Fluorescência do padrão verde mostrando as diferentes intensidades utilizadas	52
Figura 19:	Comparações das intensidades de cada componente da imagem com intensidade espectroscopia. (a) componente R; (b) componente G; (c) componente B; (d) escala de cinza	53
Figura 20:	Intensidade de refletância em função da intensidade nominal do padrão	54
Figura 21:	Imagem de fluorescência do padrão fluorescente	54
Figura 22:	(a) contraste por diferença; (b) contraste simples	56
Figura 23:	Distância entre região A e B, em cada tipo de imagem ou combinação de imagens	58
Figura 24:	Espectro de Fluorescência de duas regiões de um camundongo com lesão na pele induzido por radiação ultravioleta	59
Figura 25:	Aparato para aquisição das imagens	60
Figura 26:	Imagens pele camundongo: a) absorção região U.V.; b) luz branca; c) absorção região azul; d) absorção região verde; e) absorção região vermelha; f) imagem de fluorescência	61
Figura 27:	Razão entre as componentes vermelho e verde da imagem de fluorescência de uma lesão	62
Figura 28:	Razão entre as componentes vermelho e verde da imagem de fluorescência de uma pele normal	62
Figura 29:	Imagem dos dois grupos em que foi dividida a imagem multiespectral	63
Figura 30:	Imagem dos três grupos em que foi dividida a imagem multiespectral	63
Figura 31:	Imagens pele camundongo: a) imagem de fluorescência; b) imagem razão vermelha e verde; c) imagem com os dois grupos	64
Figura 32:	Imagens pele camundongo: a) imagem de fluorescência; b) imagem razão vermelha e verde; c) imagem com os três grupos	65
Figura 33:	Imagens pele camundongo: a) imagem com os dois grupos; b) imagem de luz	66

branca com contorno ; c) imagem razão vermelha e verde

Figura 34:	Lâmina histológica, controle normal HE 100X	67
Figura 35:	Lâmina histológica, cisto e normal HE40X	67
Figura 36:	Lâmina histológica, úlcera e proliferação celular, HE40X	68
Figura 37:	Lâmina histológica, epiderme com úlcera e bolhas com líquido, infiltrado inflamatório HE100X	68
Figura 38:	Lâmina histológica, transição úlcera nódulo tinta HE100X	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Principais fluoróforos do tecido epitelial	32
Tabela 2:	Parâmetros de iluminação e aquisição das imagens para os diferentes modos e a principal informação obtida do tecido interrogado	39
Tabela 3:	Comparação da profundidade de penetração óptica	58
Tabela 4:	Características ópticas e histológicas observadas.	69





## GLOSSÁRIO DE TERMOS MÉDICOS

- Adenocarcinoma:** câncer (neoplasia maligna) que se origina de tecido glandular.
- Carcinoma in situ:** alterações celulares malignas apenas no tecido epitelial, sem invasão na submucosa.
- Carcinoma:** tumor maligno de origem epitelial.
- Cisto:** saco fechado contendo uma membrana biológica distinta com crescimento anormal em uma cavidade ou estrutura corpórea.
- Displasia:** lesão celular reversível desencadeada por irritantes crônicos.
- Eritroplasia:** placa de coloração avermelhada em que não é possível diagnosticar clínica ou patologicamente como qualquer outra condição.
- Hiperplasia:** aumento do número de células num órgão ou num tecido.
- Hiperkeratose/ Hiperqueratose:** ocorre quando um excesso de proteínas, denominadas queratinas, são produzidas.
- Lesão exofítica:** massa de tecido com desenvolvimento não-invasivo.
- Leucoplasia:** mancha ou placa de aspecto esbranquiçado, localizada na superfície da pele ou mucosa, não passível de remoção por raspagem.
- Neoplasia/ Lesão Neoplásicas:** designa alterações celulares malignas que resultam em um crescimento celular não-controlado.
- Nódulo:** lesão sólida, elevada, geralmente bem delimitada e de origem epitelial ou conjuntiva. Pode ser pediculada ou séssil. Pode ser também benigno ou maligno.
- Nódulos linfáticos:** pequenos órgãos perfurados por canais que existem em diversos pontos da rede linfática, uma rede de ductos que faz parte do sistema linfático.
- Sarcoma:** tumor maligno de origem de tecido conjuntivo.
- Tumor:** termo genérico que indica um aumento anormal de uma parte ou da totalidade de um tecido.
- Ulceração:** nome genérico dado a quaisquer lesões superficiais em tecido cutâneo ou mucoso com perda da integridade do tecido epitelial.



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 Lesões Neoplásicas .....	20
1.2 Interação Luz-Tecido.....	23
1.3 Sistemas Ópticos para Diagnóstico de Neoplasias.....	32
1.4 Conceitos de Aquisição e Processamento de Imagens.....	34
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
3.1 Montagem do sistema de imagem.....	38
3.1.1 Iluminação.....	38
3.1.2 Aquisição.....	42
3.2 Modelos de simulação testes <i>in vitro</i> .....	44
3.3 Modelo animal testes <i>in vivo</i> .....	46
3.4 Processamento das imagens.....	47
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	50
4.1 Validação do Sistema: Testes <i>in vitro</i> .....	50
4.2 Validação do Sistema: Testes <i>in vivo</i> .....	58
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	71
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73
<b>ANEXO A</b> .....	77
<b>ANEXO B</b> .....	79
<b>ANEXO C</b> .....	81



# 1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida, associado a hábitos cada vez menos saudáveis da população, faz com que a probabilidade de desenvolvimento de algum tipo de neoplasia aumente. Por isso, o câncer e outras doenças têm se tornado cada vez mais um problema importante em saúde pública. O diagnóstico precoce de células alteradas é essencial para aumentar as chances de sucesso no tratamento e minimizar a morbidade. Detectar o tumor quando as células alteradas estão em pequeno número e não se espalharam pelo organismo é um fator de relevância para o prognóstico do paciente. A descoberta dos raios-X em 1895 abriu as portas da primeira técnica não invasiva de visualização interna do corpo humano. Em seguida diversas outras técnicas surgiram para aprimorar as imagens de órgãos humanos. Entretanto, essas técnicas tais como, raios-X (Tomografia Computadorizada), IRM (imagens de ressonância magnética), Tomografia por emissão de pósitrons, (PET - *Positron Emission Tomography*) e imagens por ultrassom (ultrassonografia) não oferecem resolução suficiente para o diagnóstico de alterações celulares.(1)

O procedimento atualmente empregado para a detecção de lesões malignas em pele e boca é a inspeção visual seguida de uma biópsia quando da detecção de uma lesão suspeita. O diagnóstico precoce do câncer, no entanto não é simples, uma vez que as lesões neoplásicas nos estágios iniciais são clinicamente semelhantes a lesões benignas, muito mais frequentes. Uma detecção precoce de lesões pré-malignas e tumores malignos aumenta significativamente as chances de sucesso do tratamento. Outro problema desse procedimento é a biópsia, um procedimento invasivo, que pode ser de complexa execução quando a lesão é extensa. Uma inadequada escolha do sítio de biópsia pode resultar num diagnóstico impreciso. Outro fator clínico relevante é a determinação da extensão da lesão, ou seja, da definição das bordas da lesão. Nesse sentido, a discriminação clínica do tecido alterado *versus* tecido normal é crucial para a remoção completa do tumor.

No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) cerca de 490.000 novos casos de neoplasias serão diagnosticados no ano de 2010, deste total cerca de 140.000 estão relacionados à pele e a boca, instituindo um sério problema de saúde pública (2). O diagnóstico precoce das lesões malignas constitui um dos principais fatores que contribuem para um aumento da taxa de sobrevivência, pois aumenta consideravelmente as chances de sucesso do tratamento. Assim, uma tecnologia que possa realizar um exame rápido, sem muito desconforto ao paciente e que potencialmente permita a discriminação de lesões malignas em estágios iniciais é bastante atrativa.

Uma técnica que possa diagnosticar pequenas alterações nesse tecido e diferenciar entre diferentes tipos de lesões seria muito útil. Uma possível tecnologia para essa aplicação é o diagnóstico por imagem de autofluorescência (AF) e refletância difusa (RD) na região da luz visível. O desenvolvimento inicial do carcinoma, principal tipo de câncer de pele e de boca, ocorre em um tecido bastante superficial, o tecido epitelial que recobre as mucosas do trato digestivo e constitui o tecido mais externo da derme. Deste modo, técnicas ópticas apresentam um grande potencial de aplicação. Imagem de campo amplo na região do visível tem se mostrado uma técnica bastante eficaz, com vantagens em relação às técnicas tradicionais, pois analisa uma área de alguns centímetros. Além disso, se compararmos com outros tipos de imagens médicas como RMN (ressonância magnética nuclear) e raios-X, a instrumentação óptica é mais barata e segura. Diversos estudos utilizando espectroscopia de fluorescência vêm demonstrando a eficiência na discriminação entre carcinoma e uma mucosa saudável com alta precisão. No entanto a distinção entre lesões benignas e pré-malignas ainda não foi bem estabelecida. A combinação de técnicas ópticas, como fluorescência e refletância, além do processamento de imagens possuem o potencial de melhorar a eficácia de diagnóstico, objetivando um alto contraste entre uma lesão e tecido sadio em relação a uma inspeção de luz branca, conseguindo delimitar a área exata do tumor. Assim, uma técnica de diagnóstico que combine informações de imagens de fluorescência e refletância difusa pode ter uma precisão maior em diagnosticar e classificar lesões no tecido epitelial.

### **1.1 Lesões Neoplásicas**

O tecido epitelial é o tecido que reveste os órgãos formando a superfície da mucosa e da pele. As células da camada basal estão em constante divisão celular, sendo assim a região de origem dos carcinomas. Além disso, o tecido epitelial é o mais exposto ao ambiente e por isso está mais sujeito a modificações genéticas induzidas por fatores externos. O tecido epitelial da mucosa bucal está exposto ao contato com bebida alcoólica e aos carcinógenos do tabaco. Já o tecido epitelial da pele está exposto à radiação ultravioleta, que na região entre 315- 280 nm (faixa denominada UVB), é absorvida pelo DNA aumentando as chances de uma mutação. (3)

Essas modificações genéticas podem levar a diversos tipos de lesões, que são divididas nos seguintes casos:

**Carcinoma Basocelular:** é um câncer que se origina na camada mais profunda da epiderme. Habitualmente, o carcinoma das células basais ocorre na superfície da pele exposta à luz solar. Os tumores começam como formações muito pequenas, brilhantes, duras e elevadas sobre a pele (nódulos) e crescem muito lentamente. Ao invés de se disseminar (produzir metástases) para partes distantes do corpo, os carcinomas basocelulares geralmente invadem e destroem os tecidos circunjacentes. Quando eles crescem perto dos olhos, da boca, dos ossos ou do cérebro, as conseqüências da invasão podem ser graves. Mesmo assim, na maioria dos indivíduos, esses tumores simplesmente crescem lentamente no interior da pele.

**Carcinoma Epidermóide:** se origina na camada média da epiderme. Habitualmente, o carcinoma epidermóide ocorre nas áreas expostas ao sol, mas ele pode desenvolver-se em qualquer local da pele ou em locais como a língua ou o revestimento da boca. A maioria dos carcinomas epidermóides afeta somente a área circunvizinha, mas caso não tratado nos estágios iniciais penetra profundamente nos tecidos próximo e, posteriormente, disseminam-se para partes distantes do corpo tornando-se fatais.

**Melanoma:** originário das células produtoras de pigmento da pele (melanócitos). O melanoma pode iniciar como um pequeno tumor cutâneo pigmentado sobre a pele normal, mais freqüentemente em áreas expostas ao sol, ou a partir de nevos pigmentados pré-existentes. Ao contrário de outras formas de câncer de pele, o melanoma dissemina-se rapidamente para partes distantes do corpo, onde continua a crescer e a danificar tecidos. Quanto menos o melanoma crescer na pele, maior a possibilidade de cura. Quando o melanoma invade profundamente a pele, é mais provável que ele se dissemine através dos vasos sanguíneos e linfáticos, a evolução da doença varia muito e parece depender da qualidade da defesa imunológica do organismo. (3)

O câncer de boca ocorre mais comumente na borda lateral da língua, no assoalho da boca e no palato mole. O principal tipo de câncer de boca é o carcinoma epidermóide, constituindo mais de 90% dos casos. (2)

Quando a mucosa bucal sofre ação traumática contínua e prolongada de componentes físicos ou químicos, pode ocorrer o desenvolvimento de uma mancha branca e plana que não é eliminada pela fricção (leucoplasia). A mancha apresenta uma cor branca, pois se trata de uma camada espessada de queratina (o mesmo material que reveste a parte mais externa da pele e que, normalmente, é menos abundante no revestimento da boca). Ao contrário de outras áreas brancas que surgem na boca, geralmente devidas ao acúmulo de alimentos, bactérias ou fungos, a leucoplasia não pode ser removida pela raspagem leve. A maioria das leucoplasias é decorrente da resposta protetora normal da boca ao trauma. No entanto, no processo de

formação desse revestimento protetor, algumas células podem sofrer alterações genéticas ao longo das gerações.

Por outro lado, uma área vermelha na boca (eritroplasia) é decorrente de um adelgaçamento do revestimento da boca. A área assume uma coloração vermelha porque os capilares subjacentes tornam-se mais visíveis. Em comparação com a leucoplasia, a eritroplasia é uma lesão com maior potencial de malignização.

Uma úlcera é uma ferida que se forma no revestimento da boca quando a camada celular superior deteriora e o tecido subjacente torna-se visível. A úlcera apresenta um aspecto esbranquiçado por causa da necrose celular e deposição de proteínas no centro da lesão. Frequentemente, as úlceras bucais são decorrentes de um trauma mecânico ou da irritação química dos tecidos.

Clinicamente as leucoplasias são divididas em dois tipos: homogênea e não-homogênea: Leucoplasia homogênea: é uma lesão predominantemente branca, de superfície plana, fina, que pode exibir fendas superficiais com aspecto liso, enrugado, ou corrugado, e textura consistente; Leucoplasia não-homogênea: trata-se de uma lesão predominantemente branca ou branco-avermelhada, que pode ter superfície irregular, nodular, ou exofítica.

A histologia é considerada o padrão-ouro do diagnóstico das lesões. Assim histologicamente, as lesões podem ser classificadas em seis grupos: hiperqueratose com ausência de displasia epitelial; displasia epitelial leve; displasia epitelial moderada; displasia epitelial severa, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. (3)

A classificação dos casos de displasia epitelial é feita utilizando parâmetros histológicos: estratificação epitelial irregular, hiperplasia da camada basal, processos reticulares em forma de gota, aumento do número de figuras mitóticas, perda da polaridade das células basais, aumento da razão núcleo-citoplasma, polimorfismo nuclear, hiperchromatismo nuclear, aumento do tamanho dos nucléolos, ceratinização de células isoladas ou em grupos na camada celular espinhosa e redução da aderência intercelular. Assim, os casos de displasia podem ser caracterizados como:

- displasia leve: quando duas características citadas anteriormente estão presentes;
- displasia moderada: quando duas a quatro das características citadas estão presentes;
- displasia severa: quando cinco ou mais das características citadas estão presentes.

Para a classificação dos casos em carcinoma *in situ*, é necessário que toda a espessura do epitélio apresente as características celulares citadas anteriormente sem invasão do tecido conjuntivo subjacente. Já o caso de carcinoma invasivo ocorre quando células exibem todas as



características citadas anteriormente e estão arranjadas em ilhotas ou cordões e isoladamente invadem o tecido conjuntivo subjacente. (3)

Geralmente existe uma relação entre o aspecto clínico e as alterações histopatológicas das leucoplasias bucais, as leucoplasias homogêneas normalmente apresentaram alterações celulares discretas, enquanto as não homogêneas apresentam características histopatológicas de displasia epitelial severa ou mesmo de carcinoma invasivo. (2-3)

O grande desafio no diagnóstico precoce é a identificação de padrões clínicos de lesões malignas em estágios iniciais. Essa tarefa não é simples, pois apesar das características histológicas distintas, o quadro clínico das lesões benignas, displasias e carcinomas em estágio inicial é bastante semelhante.

## 1.2 Interação Luz-Tecido

O espectro de radiação eletromagnética estende-se, em ordem crescente de energia, das ondas de rádio com longos comprimentos de onda ( $10^3 - 10^0$ )m, até radiações de altíssima energia (raios-X e raio  $\gamma$ ) com comprimentos de onda muito curtos entre ( $10^{-10} - 10^{-15}$ )m). Através da relação de *de Broglie* ( $E = h\nu = hc/\lambda$ ), podemos relacionar energia e comprimento de onda. O espectro inclui também regiões de radiações com energias intermediárias, entre microondas e o ultravioleta do vácuo. Cada uma dessas regiões tem suas próprias formas de serem produzidas e detectadas, e cada uma dessas interage com sistemas atômicos ou moleculares de forma diferente, podendo revelar determinadas características do sistema investigado.

A espectroscopia estuda essa interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Diretamente obtêm-se as diferenças (transições) entre estes e a partir destas medidas determina-se as posições relativas dos níveis energéticos. No caso de moléculas, a região espectral onde estas transições são observadas depende do tipo dos níveis envolvidos: eletrônicos, vibracionais ou rotacionais. Cada nível é acessado por um tipo de radiação:

- Microondas são ondas eletromagnéticas com frequências na faixa de 1 a 100 GHz, esta é a região da espectroscopia de ressonância de *spin*, e também da espectroscopia

rotacional que são transições entre os níveis rotacionais de um dado nível vibracional em um estado eletrônico particular.

- O infravermelho se estende do limite superior da faixa de microondas até o começo da região visível, em um comprimento de onda de cerca de 800 nm. A região espectral de comprimentos de onda mais longos (0,1 – 1 mm) é aplicável a excitação de espectros rotacionais, enquanto a região de comprimentos de onda menores (o infravermelho próximo  $10^{-3} - 10^{-1}$  mm) é o intervalo onde espectros vibracionais, típicos das moléculas são observados. Os denominados espectros rotacionais – vibracionais, consistem de transições dos níveis rotacionais de certo estado vibracional para os níveis rotacionais de outro estado vibracional no mesmo estado eletrônico. O estado de excitação eletrônico permanece inalterado.

- Transições eletrônicas começam no infravermelho. Contudo, elas ocorrem com maior probabilidade nas regiões do visível e do ultravioleta. Os espectros eletrônicos consistem de transições entre os níveis rotacionais dos vários níveis vibracionais de um estado eletrônico e os níveis rotacionais e vibracionais de outro estado eletrônico.

Além da extremidade de comprimentos de onda curtos do ultravioleta e sobrepondo-se com ela está à região dos raios-X e em seguida de radiações  $\gamma$ . Com radiação de tão altas energias, transições dos elétrons mais internos, aqueles nas camadas internas do átomo podem ser investigadas, especialmente por espectroscopia de fotoelétrons.

Os processos que ocorrem entre a absorção e a emissão da luz visível são usualmente ilustrados através do diagrama de Jablonski. Neste diagrama representamos os estados eletrônicos e as possíveis transições, onde cada curva de potencial corresponde a nível eletrônico, e dentro de cada nível eletrônico temos os níveis rotacionais e vibracionais. (Figura 01). Com isso, quando fornecemos energia ao sistema, esse parte de um estado fundamental (geralmente, singleto:  $S_0$ ) atingindo níveis mais energéticos (singleto  $S_1$ ), que decaem por relações internas (vibrações estruturais) até o menor nível vibracional dentro desse estado excitado; a partir daí ele pode decair para o estado fundamental emitindo luz (fluorescência) ou passar por conversão interna para outro estado (triplete:  $T_1$ ) e a partir dele decair por fosforescência, também é uma emissão de luz, porém com tempo de vida maior.

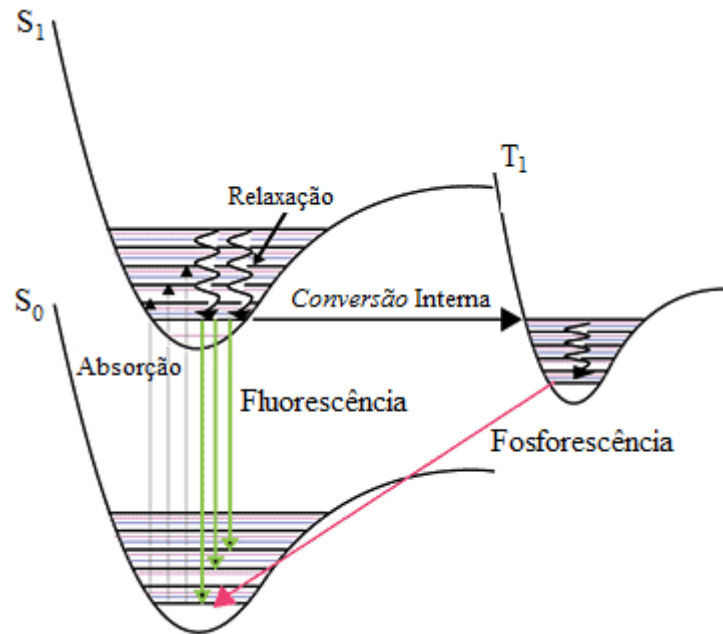


Figura 1 - Diagrama de níveis de energia

A habilidade de um meio em absorver radiação eletromagnética depende de alguns fatores, tais como: constituição eletrônica dos átomos e moléculas, comprimento de onda de radiação, volume do meio absorvedor e parâmetros internos tais como temperatura e concentração.

No caso da espectroscopia de fluorescência, analisamos varias características que estão relacionadas com a eficiência quântica (relação entre fótons incidentes e fótons emitidos) e/ou tempo de vida (tempo de emissão da luz) de uma molécula biológica. A intensidade da fluorescência é uma função da concentração, coeficiente de extinção (poder de absorção) no comprimento de onda de excitação. (4)

Quando incidimos luz num tecido biológico temos a ocorrência dos seguintes fenômenos ópticos: reflexão (espalhamento) especular (ou reflexão de Fresnell), espalhamento difuso, absorção, transmissão e fluorescência. Na reflexão especular a luz é refletida com o mesmo ângulo de incidência em relação à normal. E como a superfície não é perfeitamente regular teremos também refletância difusa, ou seja, com diversas direções de espalhamento. Parte da luz incidente será absorvida pelo tecido iluminado, essa absorção que ocorre em alguns fluoróforos faz com que estes emitam fluorescência. Tecidos biológicos, em geral, são considerados meios túrbidos, pois os fótons incidentes sofrem múltiplos espalhamentos antes de serem absorvidos. Outro tipo de interação da luz com o tecido

biológico é a refletância difusa (RD), resultado dos fótons que penetraram no tecido, sofreram múltiplos espalhamentos e saíram pela superfície.

A fluorescência emitida fará o caminho inverso e será emitida também em várias direções. Essa fluorescência emitida será a somatória da fluorescência de todos os fluoróforos, resultando num perfil característico de emissão. Na figura 02, temos uma síntese dos fenômenos ópticos que ocorrem na interação luz-tecido. (5)

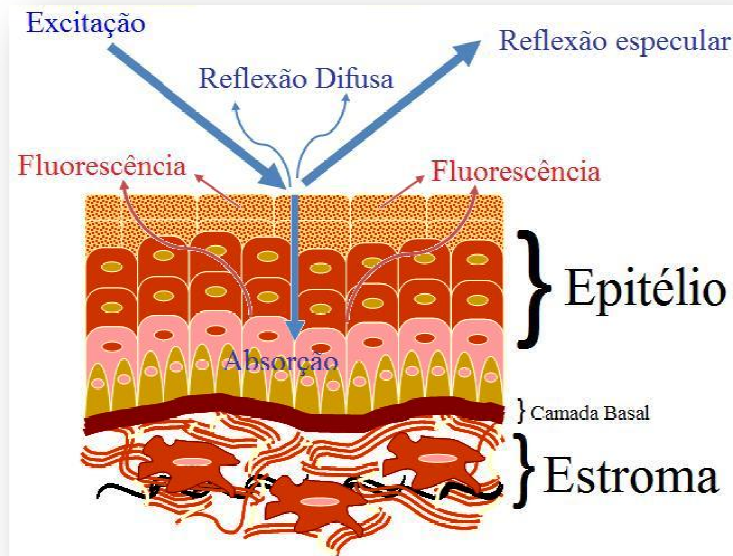


Figura 2 - Representação dos fenômenos ópticos que ocorrem quando luz interage com tecido (6)

A autofluorescência (AF) ou fluorescência endógena (natural) do tecido é produzida pelos fluoróforos presentes no tecido. Esses fluoróforos podem estar localizados na matriz extracelular ou nas células. Os principais fluoróforos endógenos presentes na mucosa são o triptofano, NADH, FAD, colágeno, elastina e queratina. Os principais absorvedores não fluorescentes são a hemoglobina oxigenada e não oxigenada; os espalhadores fundamentais são as células e organelas sub-celulares, fibras de colágeno que indiretamente também afetam a intensidade e forma do espectro de fluorescência do tecido.(7) Considerando a análise óptica, os principais tipos de interação que contribuirão para a caracterização do tecido são a fluorescência e a refletância difusa, pois resultaram da interação da luz com o tecido investigado.

O perfil tanto da AF quanto da RD é alterado pela absorção e espalhamento que dependem das condições do tecido. A presença de uma doença altera a concentração dos fluoróforos alterando assim as propriedades de absorção e espalhamento do tecido. Outras alterações que ocorrem é na concentração de sangue, distribuição do núcleo celular,

quantidade de colágeno e a espessura epitelial, fatores que causam inhomogeneidades no índice de refração em estruturas teciduais e celulares e modificações na emissão e absorção de fótons. Assim, a AF e a RD são afetadas pelas propriedades do tecido de absorver e espalhar a luz. A RD é também afetada pela morfologia do tecido, tamanho do núcleo, distribuição e espessura epitelial, quantidade de colágeno, sendo que todos esses parâmetros variam em tecidos alterados. Já a AF é a informação mais importante, pois produz uma rica informação bioquímica do material analisado, porém os efeitos de espalhamento e absorção no tecido dificultam a obtenção dessa informação.

Cada região do espectro visível tem uma interação diferente com o tecido epitelial. No caso da refletância difusa ela pode ser dividida em cinco regiões:

- Região UV ( $\lambda < 300$  nm) a RD é geralmente muito pequena devido à forte absorção da epiderme; reduzindo a luz retro-espalhada e a reflexão especular. A penetração da luz nessa região não ultrapassa poucas camadas celulares, e os cromóforos epiteliais tem um pequeno efeito no espectro de refletância difusa.
- Região UVA (320-400 nm) nessa região há um aumento da radiação espalhada. A profundidade de penetração da radiação aumenta chegando à ordem de centenas de micrômetros, e a absorção por parte de alguns cromóforos altera o formato do espectro.
- Região do visível (400-700 nm) a profundidade de penetração está entre 0,5 e 2,5 mm. Neste caso, tanto a absorção quanto o espalhamento são dominantes na formação do espectro de refletância difusa. A fração de luz espalhada aumenta devido a múltiplos espalhamentos que ocorrem. O valor da RD está entre 15-70%, onde os menores valores são da região espectral entre 415 – 430 nm devido à absorção da hemoglobina presente na derme.
- Na região espectral de 500-600 nm a absorção é muito baixa. O espalhamento domina sobre a absorção e a profundidade de penetração pode ser da ordem de 8-10 mm. Tendo a RD um aumento até entre 35-70%. O espectro também apresenta novamente duas bandas de absorção, devido à hemoglobina entre, 540-580 nm. Outros picos também surgem devido à absorção do caroteno (480 nm) e da bilirrubina (460 nm).
- Região do Infravermelho próximo, a refletância aumenta entre 800 – 900 nm e diminui devido ao aumento da absorção da água ao redor de 1000 nm. (5, 8)

Quantitativamente, podemos medir o quanto um tecido biológico absorve e espalha a luz, sendo representado, respectivamente, pelo coeficiente de absorção  $\mu_a$  e pelo coeficiente de espalhamento  $\mu_s$ . Para determinar esses parâmetros o modelo de Kubelka-Munk é muito

utilizado. A teoria consiste em um método de equações diferenciais, onde não é necessário um conhecimento preciso da estrutura nem de todos os seus parâmetros ópticos. (9)

No caso de tecidos moles, várias características morfológicas podem influenciar o espalhamento da luz, incluindo mudanças no índice de refração nas membranas celulares e a presença de organelas internas assim como da matriz extracelular, entre outros. O tamanho desses constituintes varia numa ampla faixa (de micrômetros até milímetros). Estas condições representam um problema considerável em modelar um coeficiente de espalhamento médio já que a forma específica da função de fase angular de espalhamento é fortemente dependente do tamanho dos centros espalhadores em relação ao comprimento de onda da luz incidente.

Entretanto, o espalhamento no tecido em um determinado comprimento de onda geralmente pode ser considerado como proveniente do fenômeno de refração em centros de tamanho comparável ou maiores que o comprimento da luz incidente. Este tipo de espalhamento é aproximadamente modelado pela teoria Mie, a qual lida com o espalhamento causado por partículas esféricas de diferentes tamanhos. Assim podemos resumir a dependência da intensidade com o comprimento de onda comparando com o tamanho da partícula ( $d$ ):

Se  $d \sim \lambda$  (Espalhamento Mie):

$$I_S \sim \lambda^{-x} \quad (1)$$

$$0,4 < x < 0,5$$

Se  $d < \lambda$  (Espalhamento Rayleigh):

$$I_S \sim \lambda^{-4} \quad (2)$$

onde  $I_S$  é a intensidade da luz espalhada,  $\lambda$  o comprimento de onda da luz incidente,  $d$  o tamanho das partículas que espalham a luz.

A dependência da luz espalhada com relação ao ângulo e ao comprimento de onda no espalhamento Rayleigh é dado por:

$$I_S(\theta) = \frac{1 + \cos^2 \theta}{\lambda^4} \quad (3)$$

Com relação à direção, os fótons são preferencialmente espalhados para frente, em tecidos biológicos, e esse fenômeno não pode ser explicado pelo espalhamento Rayleigh, sendo mais semelhante com o Mie. Mas a dependência com comprimento de onda é mais

semelhante ao Rayleigh. Para isso temos a função probabilidade  $p(\theta)$ , que é probabilidade de um fóton ser espalhado na direção  $\theta$ . Outra definição é o coeficiente de anisotropia  $g$ . Definido como:

$$g = \frac{\int_{4\pi} p(\theta) \cos \theta d\omega}{\int_{4\pi} \cos \theta d\omega} \quad (4)$$

onde

$$d\omega = \sin \theta d\theta d\varphi \quad (5)$$

Se  $g = 1$ : espalhamento com direção puramente frontal.

$g = -1$ : espalhamento com direção puramente para trás.

$g = 0$ : espalhamento isotrópico.

Em tecidos biológicos,  $g$  apresenta valores entre 0.7 e 0.99; os ângulos com maior frequência estão entre  $8^\circ$  e  $45^\circ$ .

Uma característica geral do espalhamento Mie é a presença de um forte espalhamento na direção do feixe incidente. A extensão do espalhamento frontal é fortemente dependente do tamanho dos centros espalhadores em relação ao comprimento de onda e do índice de refração relativo dos espalhadores e substrato. (5)

Assumindo que a amostra possui inhomogeneidades, (que são menores quando comparadas à espessura da amostra) e que efeitos de borda podem ser desprezados, isso pode ser razoavelmente empregado em tecidos biológicos, como a pele. Considerando um meio de espessura  $d$  onde incidimos radiação em um determinado comprimento de onda com intensidade  $I_0$ , essa radiação sofrerá um espalhamento  $J_0$  (resultando na refletância  $R$ ). Após atravessar o tecido podemos medir a radiação transmitida  $I_D$  (resultando na transmitância do tecido  $T$ ). Essa situação é mostrada na figura 3:

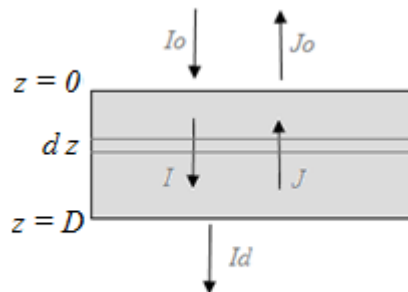


Figura 3 - Modelo de propagação da radiação eletromagnética em meio absorvedor e espalhador

Onde temos que a refletância e transmitância são dadas por:

$$T = \frac{I_D}{I_0} \quad (6a)$$

$$R = \frac{J_0}{I_0} \quad (6b)$$

Analisando a variação da intensidade em um pequeno elemento  $dz$ , temos que:

$$\frac{dI}{dz} = -\mu_s I - \mu_a I - \mu_s J \quad (7)$$

$$-\frac{dJ}{dz} = -\mu_s J - \mu_a J + \mu_s I \quad (8)$$

Ou seja, ocorre diminuição da intensidade da luz incidente devido à absorção e devido ao espalhamento e há um aumento devido uma contribuição do retro-espalhamento de  $J$ . A segunda equação diferencial é análoga (Eq. 8), porém com os sinais invertidos. Integrações e substituições das condições de contorno permitem obter as duas grandezas desconhecidas, o coeficiente de absorção e de espalhamento, em função das grandezas mensuráveis  $R$  e  $T$ .

$$\frac{\mu_a}{\mu_s} = [(1 + R^2 - T^2)/2R] - 1 \quad (9)$$

$$\mu_s = \frac{1}{d} \left[ \frac{\mu_a}{\mu_s} (\mu_s/\mu_a + 2) \right]^{-1/2} \cot^{-1} \left[ \frac{1 - R(\mu_a/\mu_s + 1)}{R[\mu_a/\mu_s (\mu_s/\mu_a + 2)]^{-1/2}} \right] \quad (10)$$

Essas equações foram obtidas por Kubelka e Munk (referência) e têm sido usadas para a medida de  $\mu_a$  e  $\mu_s$ , principalmente em tecidos biológicos. Uma consideração que também podemos fazer é no caso da amostra ter espessura relativamente grande, o que impossibilita a medida da transmitância. Assim podemos obter uma relação entre os coeficientes dada por:

$$\frac{\mu_a}{\mu_s} = \frac{(R-1)^2}{2R} \quad (11)$$

Em geral, podemos considerar que a intensidade da luz incidente segue a lei de Beer. Assim a luz na amostra a intensidade decai exponencialmente e depende dos coeficientes de absorção e espalhamento. O coeficiente de espalhamento é corrigido pelo fator de anisotropia:

$$I = I_0 e^{-(\mu_a + (1-g)\mu_s)z} \quad (12)$$

onde  $g$  é o coeficiente de anisotropia.



Outro termo usado para descrever a transparência de um tecido é a profundidade de penetração óptica ( $\delta = \frac{1}{\mu_a + (1-g)\mu_s}$ ). O termo  $\delta$  fornece uma medida de quanto a luz pode penetrar num tecido, e em geral  $\delta$  diminui com a vascularização do tecido.

Na figura 4, temos um gráfico do coeficiente de espalhamento e de absorção em função do comprimento de onda na região do ultravioleta até o infravermelho de pele humana caucasiana. (9)

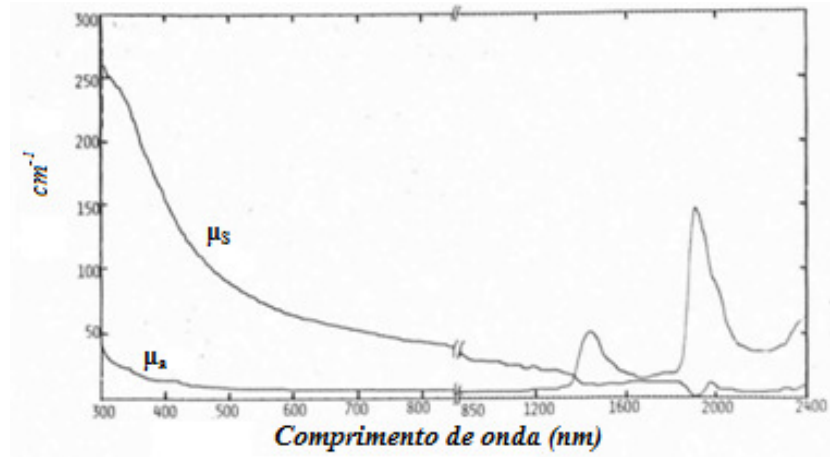


Figura 4 - Coeficiente de espalhamento ( $\mu_s$ ) e absorção ( $\mu_a$ ) da pele humana (9)

A fluorescência tem um intervalo máximo de emissão entre 320 – 370 nm com um pico máximo em 340 nm quando o tecido é excitado entre 250 - 290 nm, essa AF é devido principalmente a aminoácidos aromáticos como triptofano e tirosina.

Quando excitada em torno de 360 nm, a pele apresenta uma emissão entre 400 – 480 nm, com máximo em 460 nm. Os principais fluoróforos responsáveis por essa fluorescência são as diferentes formas do NAD (Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) e a queratina, localizadas na epiderme e no colágeno.

As formas reduzida (NADH) e oxidada (NAD<sup>+</sup>) do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina são muito importantes no metabolismo celular. Participam das reações da cadeia respiratória, e possuem uma intensidade máxima de emissão em torno de 460 e 435 nm, respectivamente.

O principal fluoróforo da pele é o colágeno, compondo aproximadamente 75% da epiderme, sendo a principal estrutura formadora do tecido conjuntivo. Sua fluorescência é em torno de 400 – 480 nm, quando excitado em 300 nm, que está sujeita a atenuação decorrente da absorção por parte de outros cromóforos, como a hemoglobina.

A AF na região espectral do vermelho apresenta uma intensidade muito baixa comparada com a induzida por excitação na região do UVA e azul. A fluorescência dessa região é atribuída às porfirinas, tendo assim vários picos entre 580 – 640 nm. Na tabela 1 estão sumarizados os principais fluoróforos endógenos e seus respectivos picos de absorção e emissão. (10)

**Tabela 1 - Principais fluoróforos do tecido epitelial**

<b>Fluoróforo</b>	<b>Máximo de excitação (nm)</b>	<b>Máximo de emissão (nm)</b>
Colágeno	325	400
Elastina	325	400
NADH	290,340	440, 450
FAD	450	515
Triptofano	280	350
Porfirinas	405	630,690

### **1.3 Sistemas Ópticos para Diagnóstico de Neoplasias**

Atualmente existem diversas tecnologias ópticas propostas para o auxílio no diagnóstico do câncer de pele e de boca. A técnica mais empregada até o momento é a espectroscopia de fluorescência e/ou refletância. Esse tipo de técnica utiliza principalmente fibras ópticas, para levar a luz de excitação e capturar a luz reemitida pelo tecido, seja da fluorescência ou da refletância. Essa metodologia vem apresentando altos níveis de acerto no diagnóstico de alterações teciduais. Porém, por se tratar de uma técnica pontual, o resultado depende fortemente do ponto onde é feita a análise. Isso pode tornar a análise de grandes áreas complexa e o resultado pode não ser o correto, caso o sítio interrogado não seja o mais representativo da lesão. Uma área extensa pode ser investigada. Contudo, é necessário ficar alterando a posição da fibra (varredura) tornando o procedimento lento, pouco viável clinicamente. (11-13)

Outro tipo de técnica óptica são as imagens de fluorescência e refletância, que são divididas em dois grupos: as de resolução celular (imagens microscópicas) e as de resolução tecidual (imagens de campo amplo, macroscópicas, “*widefield*”). A vantagem das imagens microscópicas é a visualização em nível celular, o que permite uma melhor análise das condições do tecido. Todavia, esse tipo de técnica também possui a desvantagem de visualizar apenas uma pequena fração do tecido. (10, 14)

Imagens de campo amplo permitem o exame de grandes áreas da ordem de alguns  $\text{cm}^2$ , e possuem o potencial de delimitar as margens de uma área alterada. Esses dois tipos de imagens ópticas, celular/tecidual, possuem informações complementares, mas a análise em campo amplo é a melhor opção para uma primeira análise clínica e identificação de lesões, pois possibilita a avaliação rápida de áreas extensas. (15-18)

Existem diversos tipos de sistemas de campo amplo para detectar lesões. Alguns são de visualização a olho nu e outros de visualização com auxílio de câmeras e lentes (16, 19-20). Esses dois tipos de sistemas podem ser de fluorescência e/ou refletância, que analisam a variação da intensidade da região analisada. Existem alguns sistemas multiespectrais, com aquisição de imagens de refletância em diversos comprimentos de onda, ou que fazem imagens de fluorescência com diferentes comprimentos de onda de excitação. Outro tipo de imagem multiespectral de fluorescência é aquela que possui resolução espectral da emissão do tecido, que utilizam uma roda de filtros ópticos ou um tipo de filtro óptico sintonizável. (21)

Dentre os sistemas comerciais existentes temos: o Velscope<sup>®</sup> (19) que se baseia somente na visualização a olho nu da variação da intensidade da fluorescência do tecido; outros sistemas são: MoleMax<sup>®</sup> (22), SIAscope<sup>®</sup> (23), SolarScan<sup>®</sup> (24), MelaFind<sup>®</sup> (25), DermLite<sup>®</sup> (26) e Multispectral Dermoscope<sup>®</sup> (27), que são sistemas que utilizam uma ou mais regiões espectrais para a análise da refletância do tecido, empregando luz polarizada ou não. O uso de luz polarizada permite a separação da luz que sofre refletância especular da que sofreu espalhamento dentro do tecido, chamada de refletância difusa. Mais recentemente, surgiu o Identafi 3000<sup>®</sup> (28), como um sistema multiespectral com fluorescência (excitação: região violeta) e refletância (região do amarelo). Porém, trata-se de um equipamento para diagnóstico visual (olho nu).

Dentre os sistemas de imagens multiespectrais que utilizam fluorescência e refletância existentes, não encontramos nenhum que apresente algum tipo de processamento de imagem acoplado ao equipamento, que combine as diferentes informações que cada modalidade possui (20). A combinação de diferentes modalidades permite uma melhor segmentação do tecido, pois permite o agrupamento de regiões que apresentem características ópticas

semelhantes. A técnica de segmentação é usada em imagens bucais para imagens de luz branca somente (29). É empregada também na detecção de câncer cervical, usando somente imagens de fluorescência. (30)

#### 1.4 Conceitos de Aquisição e Processamento de Imagens

Imagens de fluorescência e refletância são usadas para avaliar uma área que pode ter dimensão macroscópica, mostrando a fluorescência e a refletância de uma área de algumas dezenas  $\text{cm}^2$ ; ou microscópica que avalia uma área de dezenas e centenas de  $\text{mm}^2$ . Matematicamente uma imagem é uma matriz de dimensão  $m \times n$ ; onde chamamos o elemento de matriz de *pixel*, que corresponde à menor unidade da imagem. No caso de imagens monocromáticas, um pixel possui um valor de intensidade que pode ir de zero (cor: preta) até um (cor: branca). Essa variação de um extremo ao outro é chamada de escala de cinza. A transformação da energia luminosa em sinal elétrico é feita por minúsculas fotocélulas (sensores), onde cada fotocélula corresponde a um pixel. Os dois tipos mais comuns de sensores são o *CCD* “*Charge Coupled Device*” (dispositivo de cargas acopladas) e o *CMOS* “*Complementary Metal Oxide Semiconductor*” (Semicondutor de metal-óxido complementar). No painel do sensor CCD existem milhares de sensores, gerando cargas elétricas, que são descarregadas uma a uma, em seqüência. Essas cargas formam uma "fila" na saída do painel, acopladas umas às outras, daí a origem do nome. Quanto mais luz incide sobre o CCD, mais energia é gerada: a intensidade de corrente criada é proporcional à intensidade da luz. Já os sensores CMOS são semelhantes em sua função aos do tipo CCD e destinam-se ao registro eletrônico de imagens projetadas em suas superfícies através das lentes de uma câmera. São semelhantes também no conceito de captura de imagem: chips analógicos conectados a uma grade de pixels formada por elementos fotoelétricos gerando cargas elétricas que, após detectadas pelo sensor, passam por um processo de conversão analógico-digital para produzir as imagens. Uma das diferenças do CMOS em relação ao CCD é que enquanto o CCD exige outros chips paralelos externos para efetuar as tarefas do processo de captura da imagem (como a redução dos ruídos da imagem (*noise reduction*)), o processamento do sinal (DSP - Digital Signal Processor) e a conversão analógico-digital

(ADC - Analogical Digital Conversion)), no CMOS todas essas tarefas são executadas dentro do próprio chip. Em outras palavras, enquanto o CCD só faz a conversão da luz em cargas elétricas e as transfere para fora do chip para que todo o processamento da imagem seja feito, o CMOS faz tudo isso dentro do chip. Isso se traduz em menor tamanho ocupado pelo conjunto e também permite tornar programáveis diversas dessas funções.

A formação de imagens coloridas é feita colocando na frente de cada sensor um filtro óptico que permite somente a passagem de determinada região do espectro visível. Existem diversos padrões de formação de cores, sendo o RGB o mais conhecido. Nele temos uma matriz tridimensional ( $m \times n \times 3$ ). Onde cada dimensão dessa matriz possui a variação das cores vermelha (*Red*), verde (*Green*) e azul (*Blue*).

Com essas três cores denominadas primárias podemos representar todas as outras cores. Entretanto através das cores não é possível obter informação exata sobre a região espectral da imagem, pois cada filtro permite a passagem de uma grande região espectral, e também há sobreposição das regiões. O circuito eletrônico então fará a leitura separada das células, conforme a cor, gerando três sinais diferentes. Estes sinais podem ser gravados de maneira analógica ou então convertidos para o formato digital e posteriormente gravados.

Uma imagem colorida pode ser transformada pra escala de cinza (*C*), através da equação 13 onde se atribui a cada cor um determinado “peso” que está relacionado com a sensibilidade de cada cor. A transformação inversa de uma imagem monocromática não é possível, pois podemos ter diferentes combinações das componentes RGB que resultam no mesmo valor em escala de cinza.

$$C = (0,2989 * R + 0,5870 * G + 0,1140 * B) \quad (13)$$

Assim essa transformação atribui diferentes pesos a cada componente de cor levando em consideração a sensibilidade que o olho humano tem para cada cor. (31)

Uma imagem de refletância de um tecido é capturada iluminando-se a área desejada com luz que pode ser apenas de uma região específica do espectro visível, ou de varias regiões. Esse tipo de imagem traz informações de absorção e de refletancia tanto especular quanto difusa do tecido.

Já imagens de fluorescência são obtidas irradiando o tecido com luz de determinada região, e através de filtros ópticos bloqueando a excitação e capturando apenas a fluorescência do objeto. A fluorescência emitida pode ser capturada tomando apenas regiões pequenas do

espectro, ou seja, obtendo a fluorescência com resolução espectral; ou capturando a fluorescência com um todo, excetuando somente a região espectral de excitação.

O desenvolvimento de ferramentas para o processamento dessas imagens capturadas que facilite a detecção de bordas e a classificação de lesões é importante, pois torna o processo de diagnóstico mais eficiente, e com uma menor influência do avaliador no resultado final do diagnóstico. Para que esse processamento seja o mais eficiente possível é necessário que o método consiga extrair de uma imagem biológica, que é rica em informações, apenas o que é mais relevante para a discriminação do tecido alterado. Uma lesão em estágio inicial normalmente apresenta um baixo contraste em relação ao tecido normal ao seu redor, logo a combinação de diferentes tipos de imagens e uma adequada segmentação dessas imagens facilitará o diagnóstico.

Logo, conceitualmente, processar uma imagem consiste em transformar uma imagem, realçando ou revelando características para posterior análise por um observador. O processamento de uma imagem pode ser supervisionado envolvendo pessoas no ciclo, onde imagens são manipuladas e examinadas; ou não-supervisionado. Um exemplo de processamento é quando se segmenta uma região ou realça uma região numa imagem, melhorando a resposta do sistema visual humano.

## **2 OBJETIVO**

O objetivo desse estudo é o desenvolvimento de um sistema de imagem de campo amplo para detecção óptica de alterações teciduais, baseado em fluorescência e refletância. O desenvolvimento do sistema de imagem envolve tanto a montagem do protótipo como a proposta de um processamento das imagens adquiridas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Montagem do sistema de imagem

##### 3.1.1 Iluminação

Para as imagens de refletância difusa foi construído um dispositivo a base de LEDs (Diodos Emissores de Luz) para iluminação em três regiões diferentes do espectro visível: um na região do azul com máximo de emissão (ME) em 460 nm e com uma banda de emissão, ou seja, uma largura de banda a meia altura (FWHM “*full width at half maximum*”) em torno de 20 nm; outro na região do verde, ME em 530nm com FWHM de 40 nm e outro na região do vermelho ME em 640nm e largura de 15 nm (Philips, Luxeon III Emitter, San Jose, California, USA). Abaixo se tem o espectro de emissão dos LEDs obtidos utilizando um espectrofotômetro (Ocean Optics Inc., Dunedin, Florida, USA).

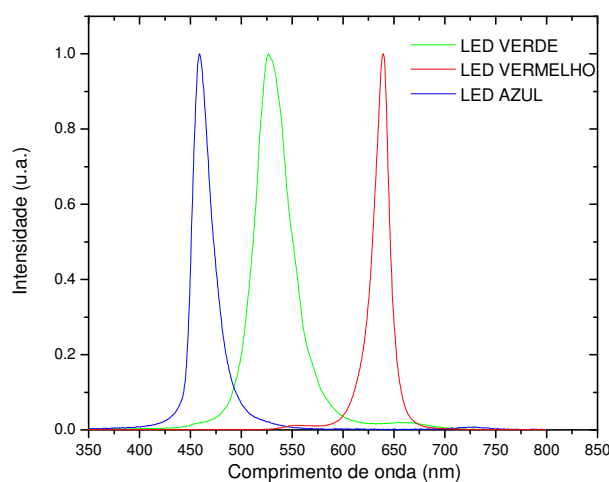


Figura 5 - Espectros de emissão dos LEDs empregados na montagem do sistema na região do visível

Essas cores correspondem a bandas de absorção de determinados cromóforos biológicos, sumarizadas na tabela 2.



Para imagens de luz branca, novamente utilizou-se um LED como fonte de excitação (fig. 6).

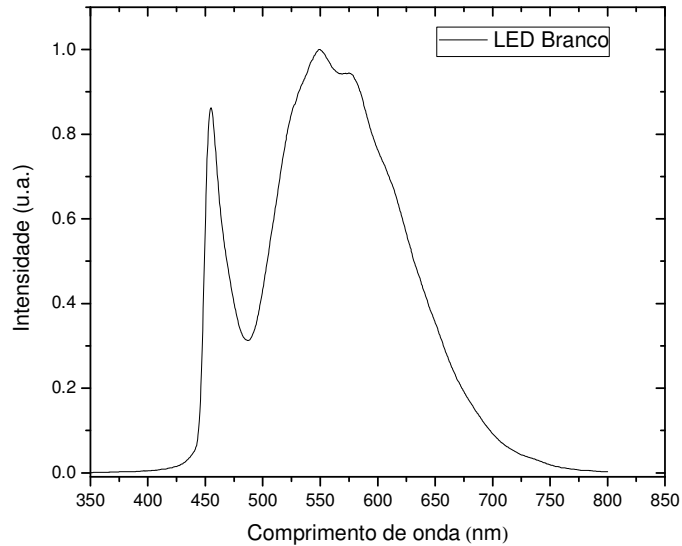


Figura 6 - Espectro de emissão do LED branco

Para o controle dos LEDs foi construída uma fonte de corrente, que é um circuito eletrônico que permite o controle da corrente elétrica que alimenta o circuito. Isso faz com que a intensidade de cada LED varie de zero até a máxima intensidade possível. Os LEDs nas cores verde e azul têm uma corrente máxima de operação de 700 mA. Já o vermelho de 1A, de acordo com as orientações do fabricante.

A tabela 2 apresenta os parâmetros de irradiância e tempo de exposição típico empregados para cada emissor LED.

**Tabela 2 - Parâmetros de iluminação e aquisição das imagens para os diferentes modos e a principal informação obtida do tecido interrogado**

<b>Tipo Imagem</b>	<b>Irradiância (mW/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Tempo de exposição típico (ms)</b>	<b>Característica analisada do tecido</b>
FL ME=400nm	60	175	Fluorescência do colágeno, elastina, flavinas e NADH
RL ME=400nm	60	15	Absorção do colágeno, elastina, flavinas e NADH
RL ME=530nm	15	20	Absorção da hemoglobina, morfologia e identificação de vasos sanguíneos
RL ME=630nm	30	20	Observação de estruturas espalhadoras
RL ME=470nm	15	20	Absorção da melanina e queratina
RL Luz Branca	25	20	Análise global

Os LEDs foram fixados numa peça de alumínio, metal escolhido por ser eficiente na condução de calor, uma vez que esse tipo de LED apresenta aquecimento e caso não haja uma adequada dissipação do calor do sistema, seu funcionamento fica comprometido. Na figura 7 temos uma representação de como foram fixados os LEDs na peça.

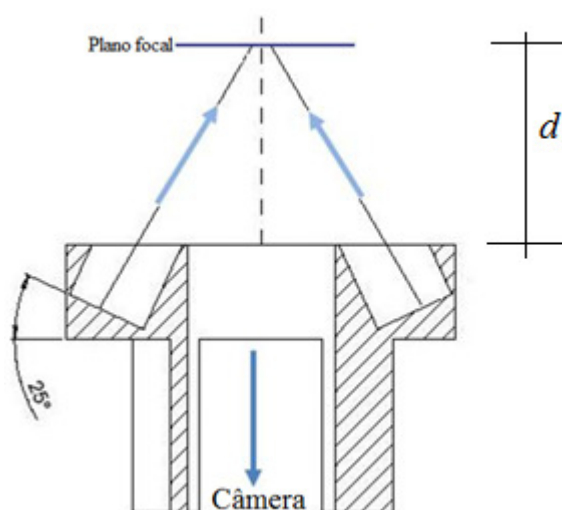


Figura 7 - Desenho esquemático da peça de suporte dos LEDs

Esse tipo de LED apresenta um padrão de emissão lambertiano. Deste modo, para que fosse obtida uma área com uma iluminação uniforme, os emissores foram posicionados a 25° da superfície perpendicular ao eixo óptico. E acoplados a eles um colimador LUXEON *Collimator LXHL-NX05* (Philips, San Jose, California, USA). Esse colimador guia a luz tornando-a mais intensa na direção perpendicular ao LED. Isso possibilitou uma região com iluminação uniforme exatamente no plano focal da imagem ( $d = 6$  cm).

O suporte dos LEDs foi acoplado em volta da objetiva produzindo uma iluminação uniforme no foco da imagem com uma área de  $4\text{cm}^2$ . Nessa área uma sobreposição dos feixes individuais dos LEDs pode ser obtida, formando outras cores a partir das cores primárias. Na figura 8 temos uma foto do sistema de iluminação.

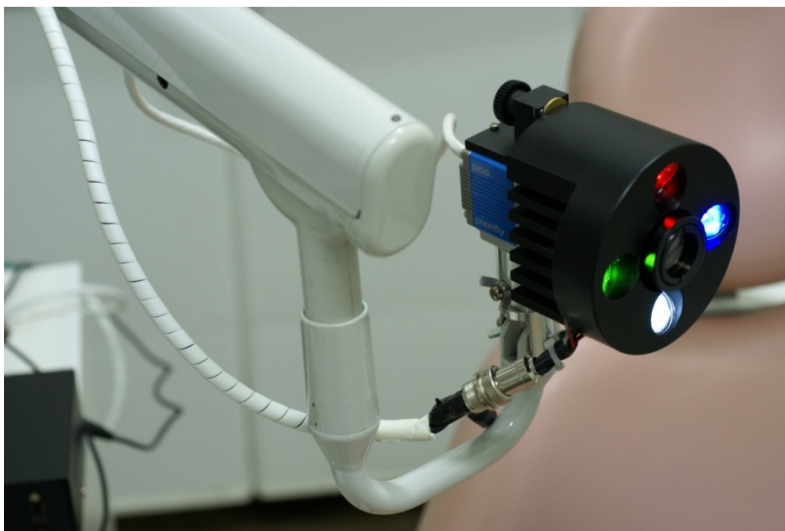


Figura 8 - Foto do sistema de iluminação no visível e de aquisição

Para as imagens de fluorescência utilizamos o LED na região do ultravioleta (Ultraviolet Edixeon by Edison Opto. Corporation) com máximo de emissão em torno de 400 nm e FWHM de 30 nm, como mostra o espectro apresentado na figura 9.

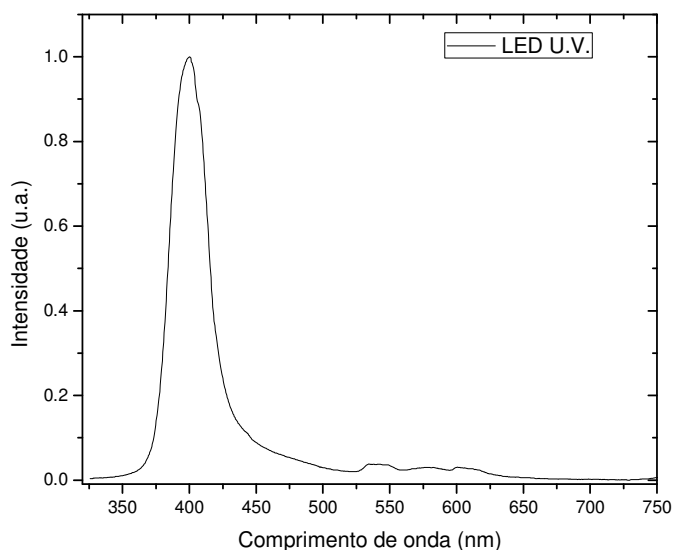


Figura 9 - Espectro de emissão do LED ultravioleta

A luz retroespalhada do tecido foi bloqueada no caminho óptico anterior à CCD com o emprego de um filtro óptico passa alta em 475nm. (GG475 Schott, Mainz, Germany)

Essa iluminação também foi utilizada para imagem de refletância, onde o filtro é retirado.



Figura 10 - Foto do sistema de iluminação no UV e da aquisição

### 3.1.2 Aquisição

O conjunto sistema de iluminação/aquisição foi fixado em um braço articulado mecânico adaptado de um equipamento odontológico. Esse braço articulado possibilita uma liberdade de movimentação vertical, horizontal e angular.

O sistema de aquisição das imagens é formado por uma câmera CCD colorida (padrão RGB) de alta sensibilidade (PixelFly qe, The Cooke Corporation, Michigan, USA), conectada a um computador com placa de aquisição da própria câmera. O software utilizado para aquisição das imagens é o CamWare V2.20 (PCO AG, Kelheim, Germany). A objetiva possui um foco de 85 mm com um campo de visão de 33 mm e com profundidade de 20 mm.

Para se determinar o poder de resolução do sistema utilizamos um padrão de resolução USAF *Target* (Newport, New York, USA), que consiste de retângulos organizados em grupos e elementos. Cada grupo consiste de seis elementos e cada elemento é composto por três

retângulos horizontais e três retângulos verticais igualmente espaçados. Cada elemento de um grupo está associado a uma resolução, baseado nas dimensões de cada retângulo.

A resolução do sistema de imagem é definida pelo grupo e elemento na qual ainda é possível a visualização individual dos retângulos. Esse é um padrão dimensional para a determinação da resolução espacial (horizontal e vertical) de sistemas de imagens.

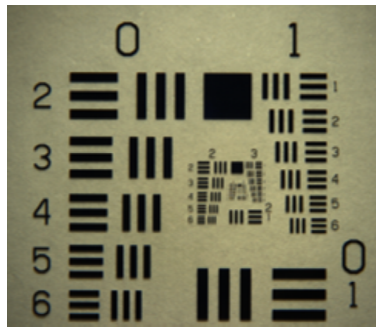


Figura 11- Imagem do padrão de resolução espacial

Na figura 11, tem-se a imagem do padrão de resolução espacial obtida com o sistema montado no presente estudo, onde se obtém que a resolução do sistema é de 100  $\mu\text{m}$ .

A figura 12 apresenta uma foto geral do sistema.



Figura 12 - Foto do sistema completo

A seqüência de operação para a aquisição das imagens é resumida a seguir:

- a) Ajuste da distância focal com iluminação branca. Todas as imagens podem ser visualizadas em tempo real no monitor.
- b) Adequação da intensidade de iluminação e tempo de exposição para o modo refletância. O sistema possibilita ajustar a corrente elétrica de alimentação, evitando a saturação do sinal da imagem. Obtenção das imagens de refletância com iluminação azul, verde, vermelho e UV.
- c) Adequação da intensidade da intensidade de iluminação e tempo de exposição para a obtenção da imagem de fluorescência.

Os valores típicos de intensidade de iluminação e tempo de exposição para as imagens estão sumarizados na tabela 2.

### 3.2 Modelos de simulação testes para avaliação e caracterização do sistema

A detecção de lesões vem sendo baseada na variação da intensidade da fluorescência nas regiões espectrais do verde e do vermelho. Nesse sentido, foi necessária a caracterização do sistema identificando a sensibilidade no verde e no vermelho. Foram utilizados padrões de fluorescências com emissão na região do vermelho (Standard Fluorescent, Spectralon, Labsphere, North Sutton, USA) e na região do verde (Standard Fluorescent, Spectralon, Labsphere, North Sutton, USA). Intensidades de emissão de fluorescência crescentes foram obtidas com intensidades crescentes de iluminação. Os valores relativos de intensidades foram medidos através da espectroscopia de fluorescência.

A verificação da linearidade da refletância foi feita utilizando padrões de refletância (Reflectance Standart, Spectralon, Labsphere, North Sutton, USA) com refletâncias de 99, 75, 50 e 2 %. Cada cor de iluminação foi testada e a intensidade comparada com o valor nominal do padrão.

Outra importante informação na imagem de fluorescência é a resolução de discriminação de centros fluorescentes não superficiais. A imagem resultante é bidimensional. No entanto, a luz emitida pelo tecido que participa da formação da imagem é proveniente de um volume tecidual. A caracterização do sistema em função da resolução em profundidade ( $z$ ) é relevante para o conhecimento do potencial de detecção de uma lesão sub-superficial e qual a variação existente do volume de tecido interrogado em função do comprimento de onda.

Um padrão com a inserção de cinco diferentes concentrações de um polímero fluorescente (ADS108GE, by American Dye Source Inc.) em um suporte de parafina e policloreto de vinila (PVC), foi construído. O polímero foi adicionado a parafina em cinco diferentes concentrações, e cada meio fluorescente apresenta dimensões de 2 por 20 mm<sup>2</sup> e separado lateralmente do outro de 2 mm. Como representado na figura 13.

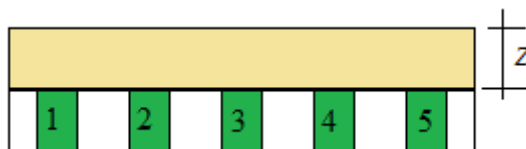


Figura 13 - Montagem para simulação *in vitro*

Essa verificação de sensibilidade foi feita adicionando sobre os diferentes meios fluorescentes um meio turbido (0.2% Lipofundin<sup>®</sup> (B. Braum Melsungen AG, Germany)).

Esse meio tem como característica um coeficiente de espalhamento semelhante ao tecido epitelial como mostra a figura 14; apresentando um maior espalhamento na região do UV e diminuindo na região do vermelho. A sensibilidade foi verificada para diferentes espessuras desse meio espalhador e absorvedor. (variando de 0 a 10 mm).

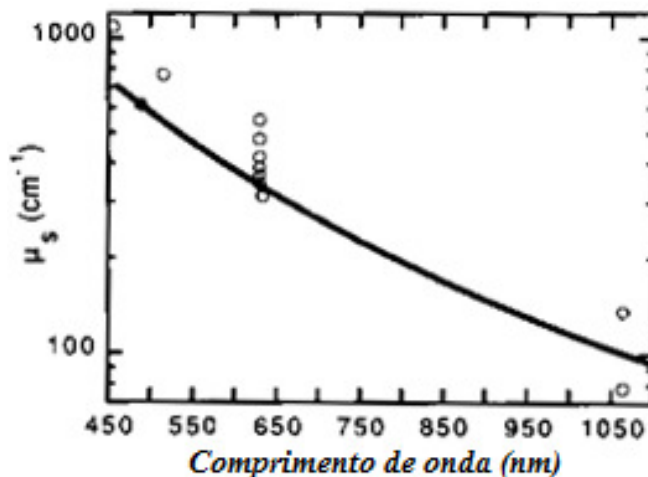


Figura 14 - Coeficiente de espalhamento ( $\mu_s$ ) do Intralipid<sup>®</sup> (semelhante ao Lipofundin<sup>®</sup>) em função do comprimento de onda (32)

### 3.3 Modelo animal - testes *in vivo*

O estudo em animais foi realizado para a obtenção de imagens em pele de camundongos *Hairless* (HRS/J hr/+). Vinte animais ficaram expostos à radiação ultravioleta de uma lâmpada fluorescente ultravioleta (Philips, modelo PL-S9W/01/2P) com emissão máxima na região do UVB em torno de 310 nm, para indução de lesões em pele. A lâmpada ultravioleta foi posicionada sobre a gaiola dos animais que permaneceram conscientes e sem restrição de movimento com uma dose diária de  $2\text{kJ/m}^2$  (sendo o tempo diário de iluminação para atingir a dose de 1 hora e 15 minutos). Os animais foram irradiados durante 5 dias por semana, segundo o modelo de carcinogênese descrito por ... et al. (33). O período de irradiação foi o diurno. À noite os animais ficaram alojados no biotério livre de qualquer radiação. A área irradiada do tecido foi o dorso do animal, sendo a região (olhos) adjacente protegida da iluminação direta através de uma máscara de papel ou tecido. Para a obtenção das imagens os animais foram anestesiados por injeção intramuscular com solução estéril de cloridato de Ketamina a 5% (Vetanarcol<sup>®</sup> - König) na dose de 50 mg/kg de peso corporal



associado ao relaxante muscular, analgésico e sedativo xilasina (Coopazine<sup>®</sup>, Coopers Brasil Ltda) na dose de 5 mg/kg. O desenvolvimento de uma lesão é um processo aleatório e nem todos os animais desenvolvem lesões. Dos vinte animais utilizados na pesquisa, somente um pequeno número desses apresentou algum tipo de neoplasia. Os animais foram posicionados em uma plataforma na posição de decúbito dorsal. A seqüência de imagens de refletância e fluorescência foi obtida. Após aquisição da seqüência de imagens, o animal foi morto com overdose de solução anestésica e o tecido removido para processamento histológico. O material foi processado e corado com hematoxilina e eosina para análise em microscopia óptica.

As lâminas histológicas foram avaliadas por uma patologista Dra. Mariângela Brunaldi do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O protocolo experimental do estudo em animal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Anexo B).

### **3.4 Processamento das imagens**

Imagens de fluorescência e refletância fornecem diferentes informações do tecido biológico. Uma imagem multiespectral é resultante da combinação das imagens individuais obtidas com diferentes parâmetros ópticos de uma mesma região, com potencial de agrupamento de informações distintas em uma única imagem. Neste estudo, uma imagem espectral de sete bandas (canais), foi formada, ou seja, uma matriz ( $m \times n \times 7$ ). As informações incluídas foram: a intensidade total de fluorescência do tecido; absorção do tecido em 400, 470, 530, 630 nm; refletância com iluminação branca do tecido; e razão entre as componentes vermelha e verde da imagem de fluorescência. A escolha das bandas na região do vermelho e do verde do espectro visível deve-se ao fato de que a detecção de lesões malignas baseada na fluorescência tecidual vem sendo associada a uma diminuição da emissão na região espectral verde e um aumento da emissão na região do vermelho. (34)

Como cada tipo de imagem que forma a imagem multiespectral é obtido em um instante de tempo diferente e existe uma pequena movimentação do tecido em decorrência da respiração do animal, o alinhamento (registro) prévio dessas imagens foi realizado. Esse é um

processo utilizado para a sobreposição de imagens (duas ou mais) do mesmo campo de visão por diferentes pontos de vista, obtidas em diferentes tempos, e/ou por diferentes sensores. Esse alinhamento é feito através de transformadas geométricas (rotação, translação, expansão ou contração). O algoritmo utilizado para esse processamento pode ser supervisionado ou automático, este quando o próprio algoritmo realiza o alinhamento automático das imagens, baseado em padrões existentes.

Já outro método consiste em realizar uma transformação linear de um espaço bidimensional Euclidiano para outro, atendendo a um conjunto de pontos que são correspondentes (pontos comuns inseridos nas imagens pelo usuário, portanto, um método supervisionado). A transformação pode implicar em uma mudança de escala, por exemplo, dilatação ou compressão, caso contrário deve ser rígida. Em particular, deve ser conformal, ou seja, ângulos e formas são preservados. (31)

O passo seguinte na análise das imagens foi a segmentação, que é um conceito básico para criar objetos a partir de *pixels*. O processo de segmentação envolve dividir a imagem em regiões ou objetos cujos pixels possuem características semelhantes. Essas características podem ser diversas, tais como: intensidade na escala de cinza, intensidade das cores, características geométricas, entre outras. No processo de segmentação também é possível fazer uma classificação das regiões, isto é, o quão diferente elas são entre si, ou o quanto uma determinada região se assemelha a região de outra imagem.

Para um conjunto composto de  $n$  pontos pertencentes a um espaço de características, e um inteiro  $k$ , o objetivo da segmentação está na determinação de um particionamento do espaço de características em  $k$  agrupamentos, cada um representado por um centro, visando a minimização ou maximização de um critério específico. Por exemplo, a minimização da distância entre os pontos e o centro mais próximo.

Existem dois tipos principais de algoritmos de segmentação e classificação: os métodos não-supervisionados e os supervisionados.

O método não-supervisionado agrupa pixels com características semelhantes em grupos ou classes que são estatisticamente discrimináveis. Cada pixel da imagem é individualmente comparado e posicionado em um determinado grupo, o resultado final é uma nova imagem mostrando a classificação de cada pixel. Entretanto, esse procedimento exige o conhecimento prévio do número de grupos presente na imagem.

Já os métodos supervisionados de classificação exigem um conhecimento prévio das características presentes na imagem, ou seja, exige previamente um grupo de dados para treinamento (aprendizado). Esse procedimento requer o conhecimento prévio de um

determinado pixel ou região que corresponde a um determinado grupo. Assim, o processo de treinamento consiste em saber que determinado grupo apresenta determinadas características, e após esse treinamento procurar em outras imagens regiões que possuem essas mesmas características. Essa técnica possui algumas características diferentes em relação à anterior. A primeira é que exige o processo de treinamento. Contudo após essa etapa não é necessário informar quantos grupos tem a imagem e também podemos dizer que determinado grupo corresponde a um determinado objeto. Já o método não-supervisionado apenas separa regiões sem ser possível saber a que corresponde essas regiões.

A análise por *k-means* é um dos muitos métodos de classificação não supervisionado. O objetivo de métodos de classificação não supervisionados é encontrar agrupamentos naturais para um conjunto de dados sem qualquer prévia classificação, baseado em padrões de medida de similaridade. O algoritmo de agrupamento examina múltiplas partições dos dados em  $k$  grupos a fim de determinar aquele mais apropriado. Cada agrupamento possui elementos com características parecidas. A melhor divisão de um conjunto de dados é aquela que minimiza a soma dentro de um grupo, e isso é realizado para todos os grupos. A discriminação entre cada membro de um grupo específico e o centro do grupo ou centróide pode ser caracterizada por diferentes maneiras, tais como distância Euclidiana, distância Euclidiana ao quadrado e distância de Mahalanobis.

Para análise de agrupamentos *k-means* é necessário se ter inicialmente os números de grupos e o centro de cada grupo especificado. Um método de determinar os grupos iniciais é o de aleatoriamente dividir os dados e de determinar o centróide de cada grupo. O algoritmo de agrupamento empregado no presente estudo é o apresentado a seguir:

1. Colocação de  $k$  pontos dentro do espaço que representam os dados. Esses são os centróides iniciais de cada grupo.
2. Cálculo da distância de cada ponto em relação ao centróide, e marcação de cada ponto como pertencendo ao grupo do centróide mais próximo
3. Novo cálculo da posição dos  $k$  centróides.
4. Repetição dos passos 2 e 3 até os centróides não apresentem alterações.

Como a imagem multiespectral aqui proposta apresenta um espaço de sete dimensões (cada eixo representa uma característica citada anteriormente) e cada *pixel* da imagem é representado por um ponto em cada dimensão, a distância Euclidiana dada pela fórmula abaixo foi empregada:

$$d = \sqrt{(\mathbf{x} - \mathbf{c})^2} \quad (14)$$

Onde  $\mathbf{x}$  representa o ponto e  $\mathbf{c}$  o centróide.

Essa rotina de agrupamento foi implementada em MatLab (MathWorks Inc, USA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Caracterização do Sistema: Testes *in vitro*

Imagens de fluorescência na região do vermelho e na região do verde foram adquiridas e comparadas com a intensidade medida por um espectrofotômetro. Na figura 15, temos uma imagem de fluorescência do padrão vermelho, com a máxima e a mínima intensidade obtida. Na figura 16 os espectros de fluorescência da amostra coletados sob iluminação com diferentes intensidades de iluminação UV do sistema.

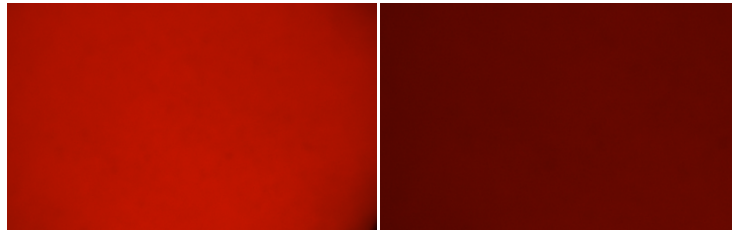


Figura 15 - Imagens de fluorescência do padrão vermelho, à esquerda a máxima intensidade; e a direita a mínima

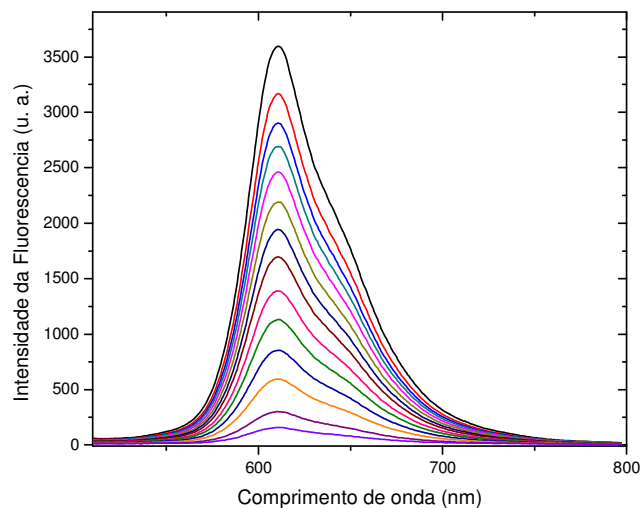


Figura 16 - Espectros de Fluorescência do padrão vermelho mostrando as diferentes intensidades utilizadas

A imagem de fluorescência foi processada utilizando uma rotina do MatLab (MathWorks Inc, USA), para a separação das suas componentes espectrais R (vermelho), G (verde) e B (azul). A intensidade média de cada componente da imagem foi calculada e correlacionada com a intensidade obtida através da integral do espectro de fluorescência. Na figura 17, temos a correlação de cada componente e também a comparação da imagem em escala de cinza com o espectro de fluorescência.

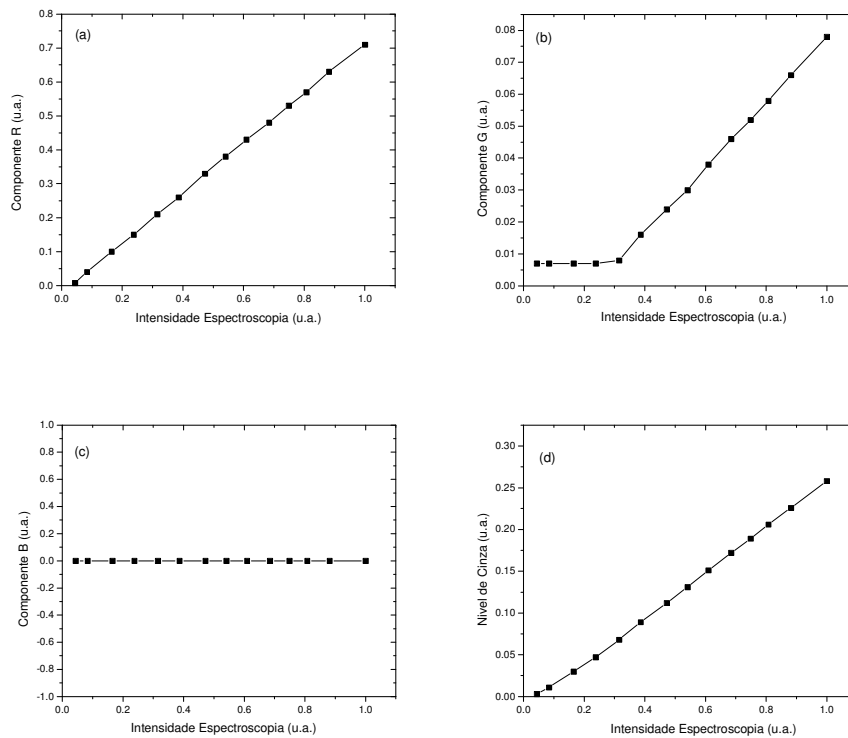


Figura 17 - Avaliação comparativa das intensidades de cada componente da imagem com intensidade espectroscopia. (a) componente R; (b) componente G; (c) componente B; (d) escala de cinza

Observamos que as componentes: vermelho e verde apresentam resposta linear, assim como a intensidade do nível de cinza. Já a componente azul devido a pouca fluorescência nessa região do padrão praticamente se manteve constante isso foi observado, pois dada a excitação ao redor de 400 nm e o filtro passa-alta em 475 nm, a luz coletada e aquisitionada pela câmera CCD apresenta pouca contribuição da região azul. A correlação da imagem em escala de cinza com o espectro de fluorescência também foi linear indicando que variações em intensidade numa imagem correspondem a variações na intensidade de fluorescência.

No caso de tecidos biológicos, como a pele e a mucosa, a fluorescência a ser analisada apresenta, quando excitados em 400 nm, a região verde do espectro como a mais relevante, e para a detecção de lesões, um aumento da emissão na região vermelha.

O mesmo procedimento foi repetido com o padrão de fluorescência na região do verde. A figura 18 apresenta os espectros coletados para o padrão verde.

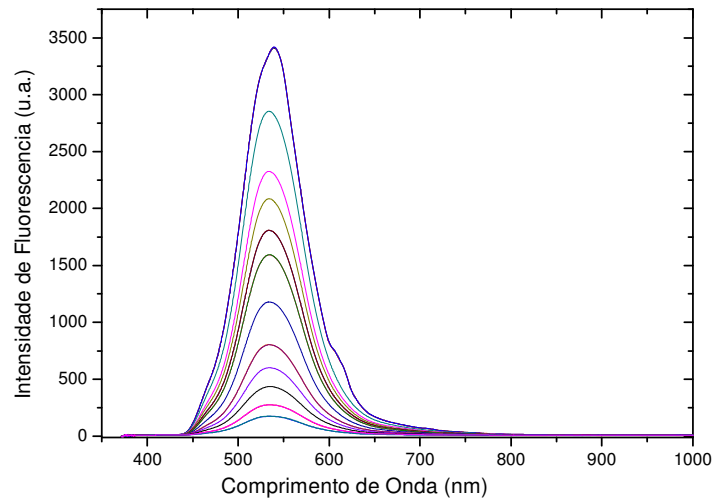


Figura 18 - Espectros de Fluorescência do padrão verde mostrando as diferentes intensidades utilizadas

O mesmo processamento foi feito para as imagens do padrão verde e a comparação feita da mesma forma. Os gráficos com a comparação da intensidade obtida pela espectroscopia e pelas componentes RGB da imagem são apresentados na figura 19.

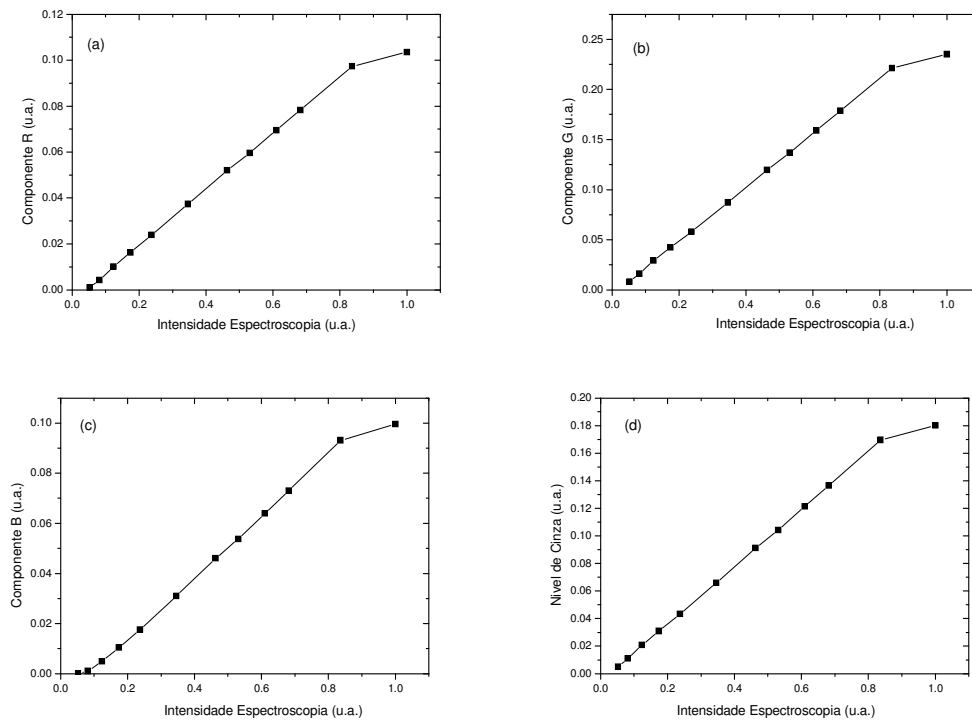


Figura 19 - Avaliação comparativa das intensidades de cada componente da imagem com intensidade espectroscopia. (a) componente R; (b) componente G; (c) componente B; (d) escala de cinza

Pode-se notar que todas as componentes apresentam linearidade quando comparadas com o sistema de espectroscopia, agora a componente azul (B) da imagem está presente. Observamos que na maior intensidade de fluorescência houve uma saturação na imagem, porém para valores inferiores a correspondência é linear. Isso indica que variações na fluorescência de um tecido biológico podem ser observadas através do sistema de imagem. E a variação na imagem corresponde a uma variação real de fluorescência do material, no intervalo investigado.

A verificação da linearidade da refletância foi feita utilizando padrões de refletância com refletâncias de 99, 75, 50 e 2 %. Cada cor de iluminação foi testada e a intensidade comparada com o valor nominal do padrão.



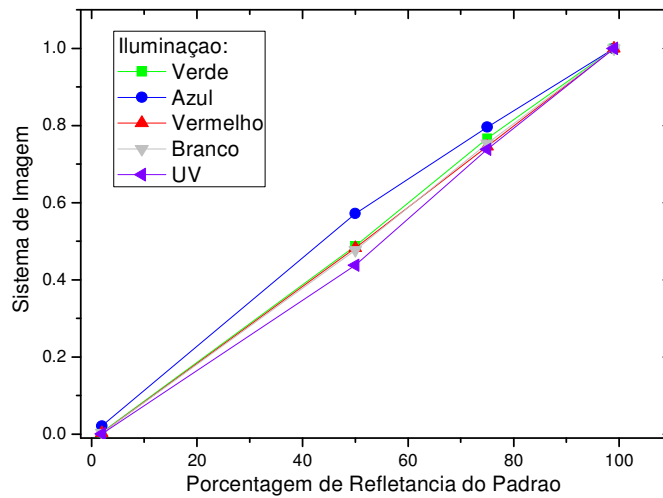


Figura 20 - Intensidade de refletância em função da intensidade nominal do padrão

Observamos que o sistema também apresenta razoável linearidade da refletância. Exceto as cores verdes e azuis que apresentaram um pequeno desvio, que podem advir tanto de problemas com o padrão quanto do sistema de imagem. Porém, não são significativas. Isso indica que variação de intensidade na imagem pode ser atribuída à variação na refletância do tecido analisado.

Posteriormente, imagens do padrão com as diferentes concentrações do polímero fluorescente foram obtidas. A figura 21 apresenta a imagem de fluorescência obtida, representada em escala de cinza, uma vez que foi necessária uma normalização preliminar para corrigir a não uniformidade da iluminação. Essa normalização é feita dividindo-se a imagem analisada pela imagem do padrão de refletância.

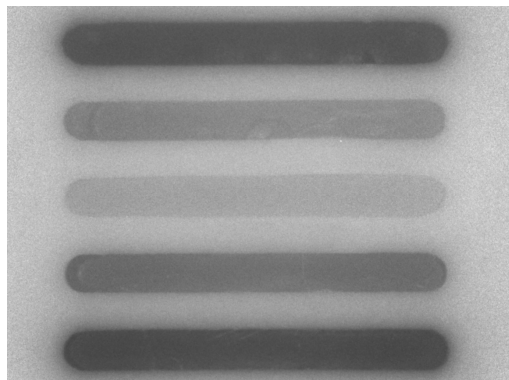


Figura 21 - Imagem de fluorescência do padrão fluorescente

Em seguida foi depositada sobre o padrão uma película do meio espalhador e os seis tipos de imagens adquiridos. A intensidade de iluminação e o tempo de exposição foram fixados em  $10 \text{ mW/cm}^2$  e 20 ms, respectivamente, para todos os tipos de imagem exceto para a imagem de fluorescência na qual o tempo de exposição foi de 100 ms. O objetivo dessa medida é a verificação da espessura máxima do meio espalhador até que as regiões com emissão fluorescente possam ser discriminadas, ou seja, a avaliação da sensibilidade do sistema na detecção de um centro fluorescente situado abaixo da superfície. Apesar de a imagem formada ser bidimensional, a contribuição dos componentes biológicos fluorescentes e espalhadores é volumétrica. Duas regiões, área A e área B, são analisadas e calculadas, em função da altura ( $z$ ) do meio espalhador: a variação do contraste simples (CS), a razão entre as intensidades de duas regiões; e variação da diferença entre as intensidades ou contraste por diferença (CD).

Na figura 22, temos os dois tipos de contraste em função da espessura do meio espalhador.

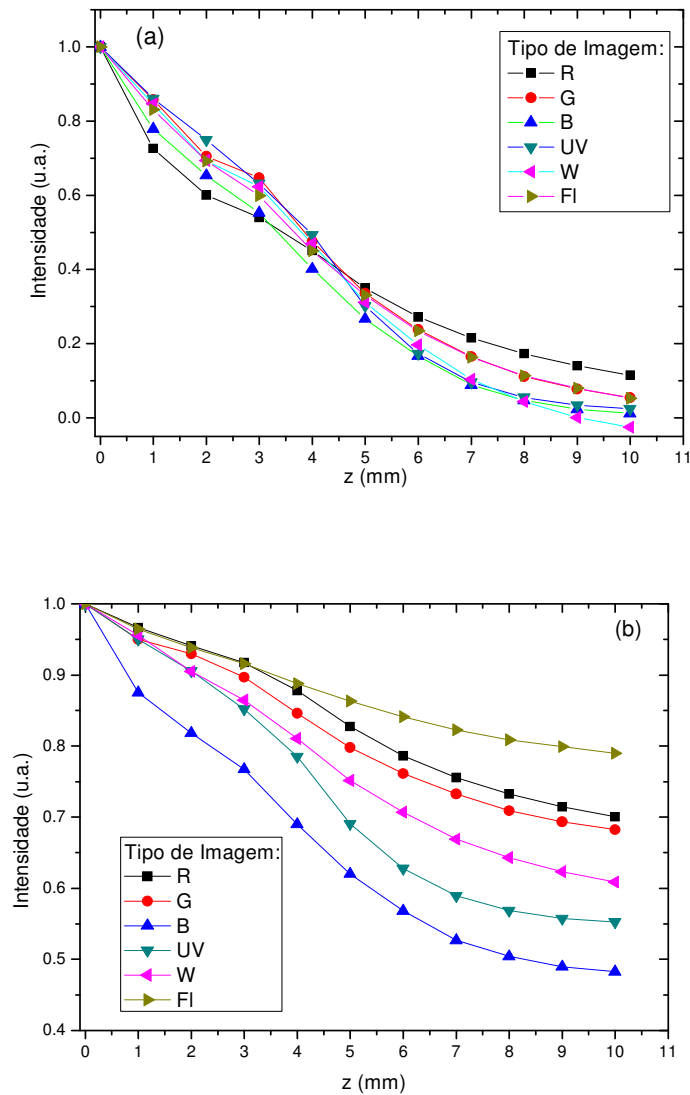


Figura 22 - (a) contraste por diferença; (b) contraste simples

Se assumirmos que a intensidade de cada região segue a lei de Beer, teremos:

$$I_a(z) = I_{0a}e^{-\delta z} \quad (15a)$$

$$I_b(z) = I_{0b}e^{-\delta z} \quad (15b)$$

Onde os subíndices a e b indicam as diferentes regiões e  $\delta$  a profundidade de penetração óptica.

Usando as definições de contraste simples (CS) e contraste por diferença (CD), obtemos:

$$CS = \frac{I_a(z)}{I_b(z)} = \frac{I_{0a}}{I_{0b}} \quad (16)$$

$$CD = I_a(z) - I_b(z) = (I_{0a} - I_{0b})e^{-\delta z} \quad (17)$$

Observamos que o CS teoricamente deveria ser uma constante, ou seja, independente da altura  $z$ . Porém, como observamos no gráfico da figura 22b, este não é constante. Essa variação pode advir de outros fatores, provavelmente da óptica do sistema, de iluminação e captura da imagem. Já o CD além de depender do sistema de iluminação e captura da imagem, depende também do meio espalhador, por isso apresenta uma variação maior.

O valor de  $\delta$  obtido experimentalmente através do CD, pode ser comparado com o obtido através da equação 18, usando os valores de  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  e  $g$  (anisotropia), do meio espalhador. Duas considerações são necessárias: a primeira é o fator dois que foi incluído, pois consideramos o caminho de ida e volta da luz. E a segunda é que para a imagem de fluorescência e de refletância com luz branca seria necessário determinar um coeficiente de espalhamento e absorção médios levando em consideração a forma espectral do espectro da luz branca e do espectro de fluorescência; contudo isso foge do objetivo desse trabalho. Portanto, esses valores não foram calculados.

$$\delta_{teórico} = \frac{1}{2[\mu_a + (1-g)\mu_s]} \quad (18)$$

Tabela 3 - Comparação da profundidade de penetração óptica

Tipo de Imagem:	R	G	B	UV	W	FI
$\delta^{-1}$ (cm):	4.8	7.7	5.9	8.0	9.0	6.8
$\delta^{-1}_{teórico}$ (cm):	10.6	13.2	14.4	13.4	-	-

A diferença existente é devido a outros fatores tais como: geometria de iluminação e coleta, intensidade de iluminação, tempo de exposição entre outros. Assim a profundidade de excitação é uma função complexa, sendo que nem em meios controlados, foi possível sua previsão. Isso é uma das limitações de imagens de campo amplo, pois uma informação global do tecido analisado é captada. Entretanto, essa informação mesmo que global dos diferentes tipos de imagens pode ser usada para uma segmentação da área analisada.

O algoritmo *k-means* é baseado no cálculo da distância entre as intensidades das regiões A e B para cada tipo de imagem e nas combinações entre os diferentes tipos de imagens, (equação 14), onde rRG (é a imagem razão entre as componentes vermelha e verde

da imagem de fluorescência). Para o caso de um único tipo de imagem teremos uma única dimensão para o cálculo da distância, mas conforme aumentamos o número de imagens, aumentamos uma dimensão.

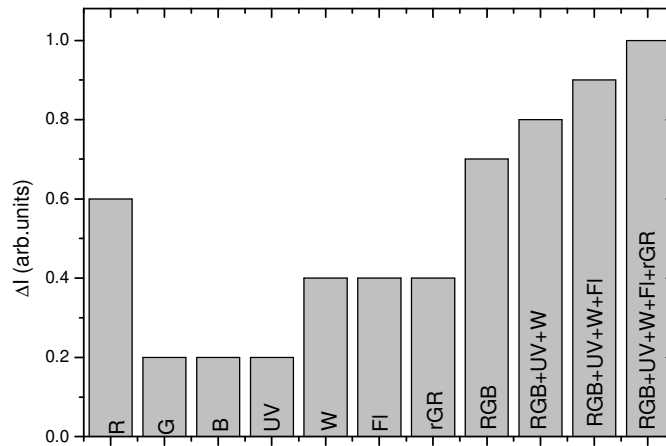


Figura 23 - Distância entre região A e B, em cada tipo de imagem ou combinação de imagens

Quando a combinação de diferentes tipos de imagens é realizada, o cálculo da distância é feito, levando em consideração diversas interações ópticas, conseqüentemente, a distância (separação) entre uma região e outra aumenta, (figura 23). Esse aumento na separação é importante, pois assim o algoritmo de processamento conseguirá distinguir melhor diferentes regiões.

#### 4.2 Modelo animal - testes *in vivo*

Ao submeter os animais a radiação ultravioleta nem todos desenvolvem lesões semelhantes, mesmo sendo da mesma espécie e submetidos às mesmas condições de irradiação, existe o fator individual que modula as alterações teciduais. Do grupo inicial de animais somente alguns desenvolveram lesões clinicamente detectáveis.

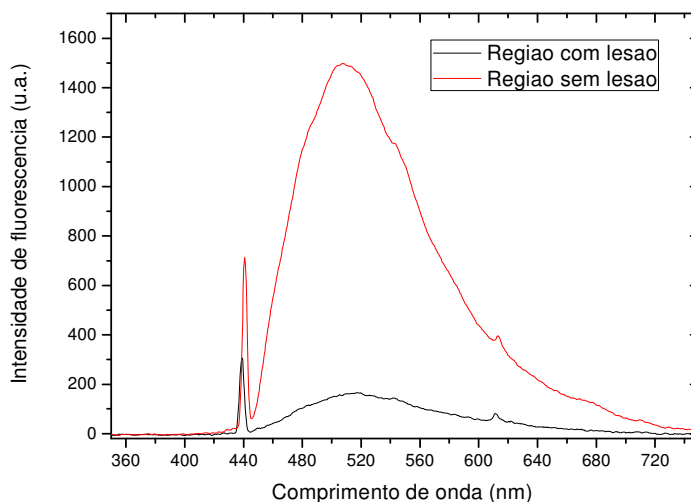


Figura 24 - Espectro de Fluorescência de duas regiões de um camundongo com lesão na pele induzido por radiação ultravioleta

Uma primeira análise feita, apenas como referência, foi a espectroscopia de fluorescência. A figura 24 ilustra um espectro de fluorescência utilizando o espectrofotômetro (Ocean Optics Inc., Dunedin, Florida, USA) e o laser de HeCd (442 nm) como excitação, em duas regiões do animal: uma sadia e outra com alteração tecidual típica observada. Desses espectros podemos obter algumas informações: a) não houve alteração significativa na forma do espectro, mas apenas uma variação na intensidade; b) a absorção do tecido, que pode ser relacionada com a intensidade do pico de excitação retro-espalhado, não totalmente atenuado pelo filtro; tem uma intensidade menor na região alterada quando comparada com a região sadia. Isso indica uma maior absorção do tecido, porém que não resulta em uma maior fluorescência.

Em seguida, realizamos a análise através das imagens e para a aquisição das imagens o animal foi anestesiado e colocado sobre uma plataforma como ilustrado na figura 25.

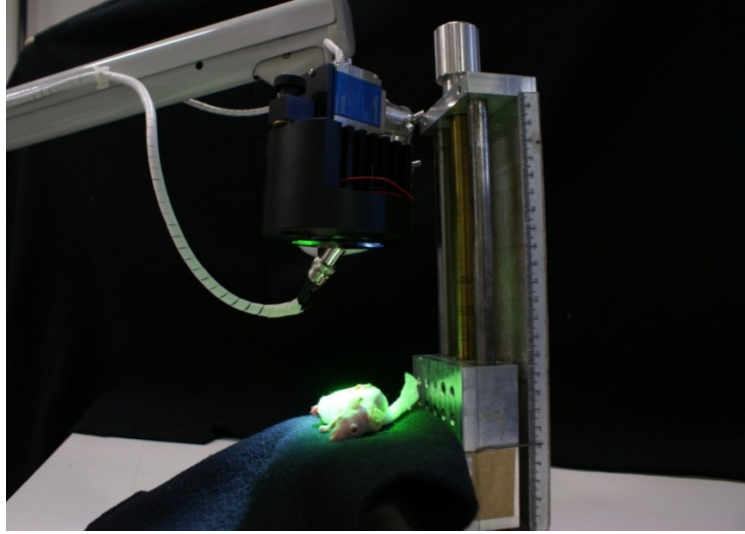


Figura 25 - Aparato para aquisição das imagens

As imagens produzidas a partir do camundongo são ilustradas na figura 26.

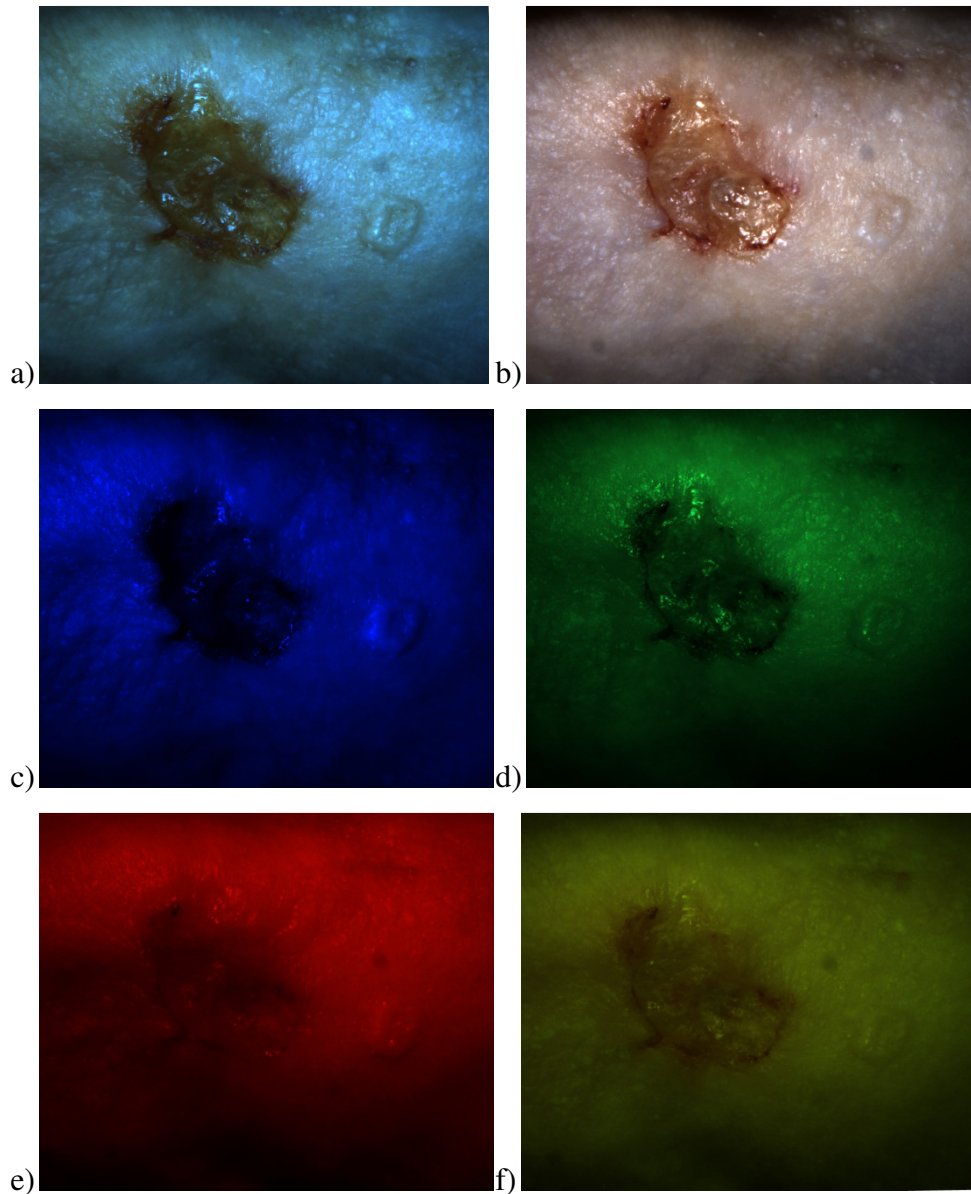


Figura 26 - Imagens da pele de um camundongo: a) refletância região U.V.; b) refletância luz branca; c) refletância região azul; d) refletância região verde; e) refletância região vermelha; f) imagem de fluorescência.

Podemos observar que cada tipo de imagem mostra uma determinada característica da lesão. As regiões mais escuras em imagens de refletância indicam maior absorção do tecido. Já na imagem de fluorescência podemos observar as variações na intensidade e também mudanças na cor (indicação de mudança no perfil espectral). A não uniformidade da iluminação devido a não homogeneidade da iluminação foi novamente corrigida dividindo cada imagem pela sua respectiva imagem do padrão de refletância.

Através da imagem de fluorescência obtivemos a imagem razão entre as componentes vermelho e verde. Para o animal da figura 26, essa razão é mostrada na figura 27. Já na figura 28 temos uma imagem razão para um animal com pele saudável não submetido à radiação.



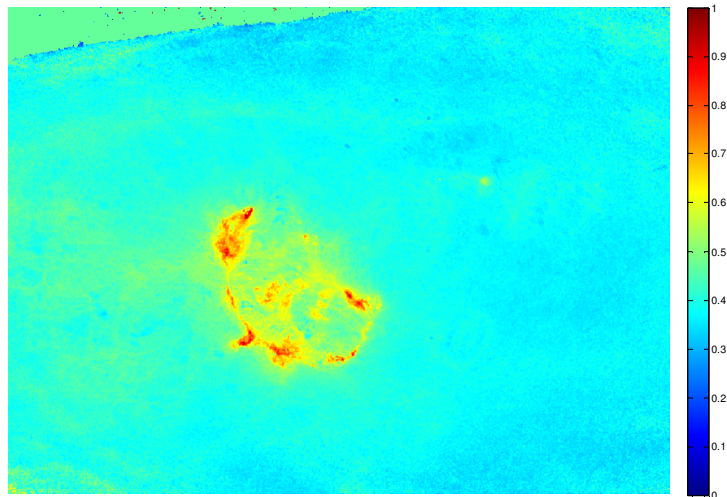


Figura 27 - Razão entre as componentes vermelho e verde da imagem de fluorescência de uma lesão

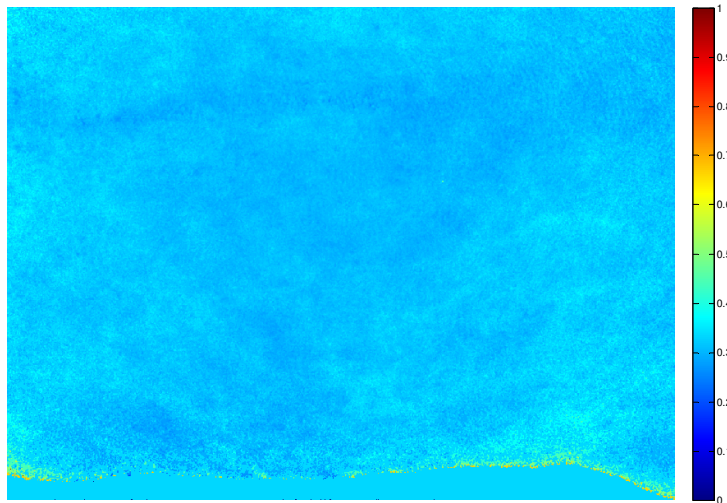


Figura 28 - Razão entre as componentes vermelho e verde da imagem de fluorescência de uma pele normal

A imagem da razão foi normalizada para ter um máximo igual a um, e convertida em cores falsas, para melhor visualização. Nelas, se observa que em uma pele normal a contribuição da componente verde é maior, assim a razão tende a ficar próxima a zero, como observamos na figura 28. Já numa imagem que apresenta uma lesão, observa-se que o valor dessa razão altera e em geral aumenta, ou seja, a contribuição das componentes vermelha e verde é semelhante.

Essa diminuição da fluorescência no verde é atribuída à diminuição do sinal do colágeno no estroma, decorrente da quebra de ligações cruzadas entre as fibras durante o processo de invasão do tumor. Já o aumento da fluorescência vermelha também tem sido observado em lesões bucais e é freqüentemente atribuído a porfirinas. (34)

A partir das sete imagens (cinco imagens de refletância normalizadas, imagem de fluorescência normalizada e imagem da razão) construímos a imagem multiespectral e utilizamos o algoritmo  $k$ -means para a separação em duas regiões ( $k=2$ ), e também em três regiões, ou seja,  $k=3$ .



Figura 29 - Imagem dos dois grupos em que foi dividida a imagem multiespectral

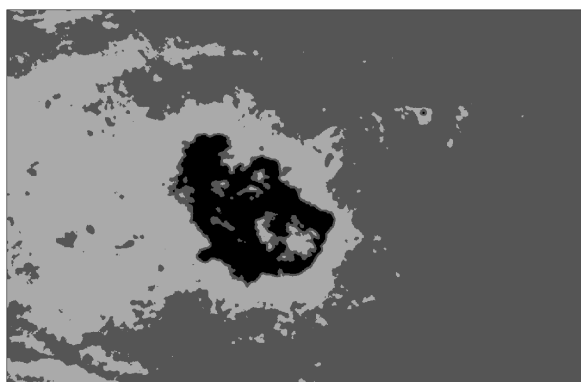


Figura 30 - Imagem dos três grupos em que foi dividida a imagem multiespectral

A mesma cor nas imagens das figuras 29 e 30 indica regiões com características ópticas semelhantes. Como o número de divisões pode ser escolhido, temos na figura 29 a separação da imagem com  $k=2$  e na figura 30, com  $k=3$ . A divisão em duas regiões divide a área analisada em alterada e normal. Para  $k=3$ , a divisão é de área com dois estágios de alteração e normal. Observamos que a lesão exofítica presente na pele do animal, (elevação tecidual ao lado direito da lesão principal), apesar de clinicamente aparente nas imagens, está mais próxima de ser uma área identificada como normal do que como tecido alterado. Isso ocorre pela presença de uma pele clinicamente normal sobre o crescimento abaixo da derme, ressaltando que a informação extraída do tecido investigado é bastante superficial.

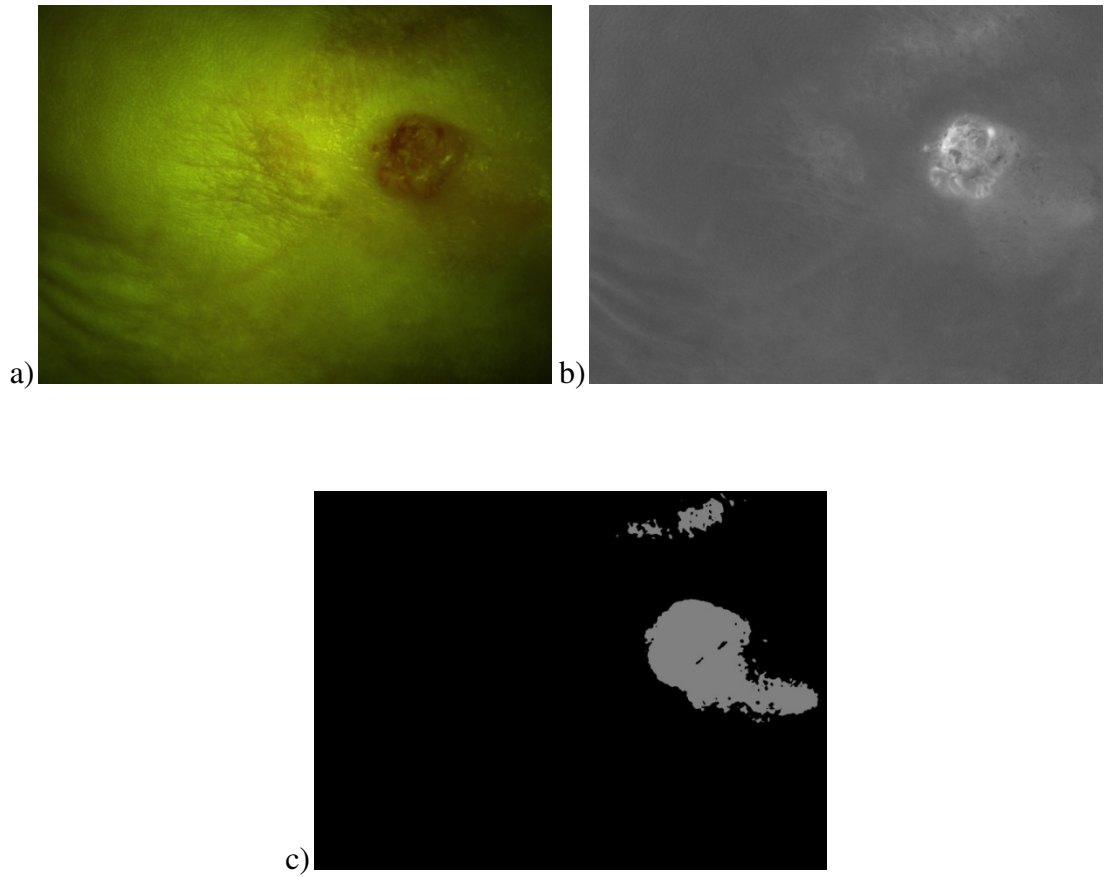


Figura 31 - Imagens pele camundongo: a) imagem de fluorescência; b) imagem razão vermelha e verde; c) imagem segmentada para  $k=2$

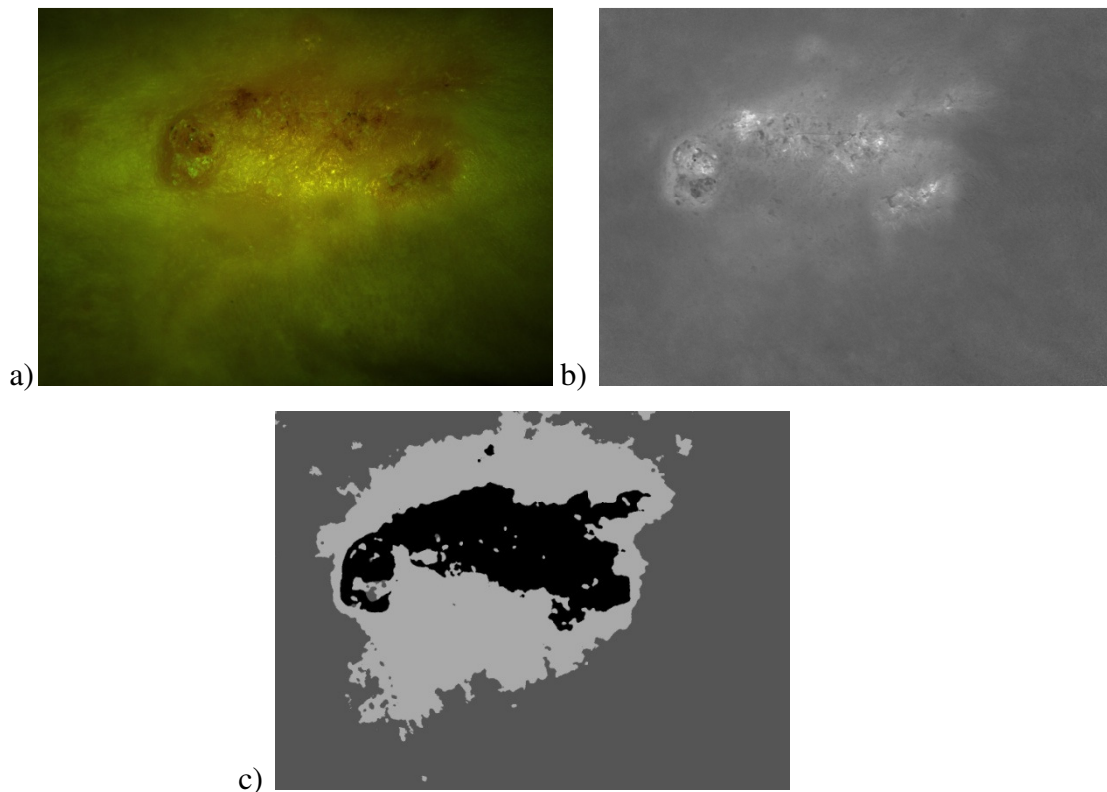


Figura 32 - Imagens pele camundongo: a) imagem de fluorescência; b) imagem razão vermelha e verde; c) imagem segmentada para  $k=3$

Nas figuras 31 e 32, outras lesões foram analisadas e novamente aplicamos o algoritmo de agrupamento para  $k=2$  na figura 31 e para  $k=3$  na figura 32. Novamente observamos, pela imagem de fluorescência, que a lesão aparenta ser menor. Combinando as outras imagens notamos que existe uma extensão maior de área alterada. As lesões investigadas no presente estudo eram todas clinicamente detectáveis sob iluminação branca convencional, no entanto, o processamento de imagens proposto promoveu um maior contraste de visualização com cores falsas e apresenta um potencial de melhor delineamento da região de tecido alterado, principalmente da área de alteração além das margens da lesão propriamente dita. Mas é claro que esse potencial de diagnóstico de extensão da lesão deve ser mais bem investigado em estudos que demonstrem com maior precisão a correlação da informação óptica e o resultado histológico, padrão ouro de diagnóstico atual.

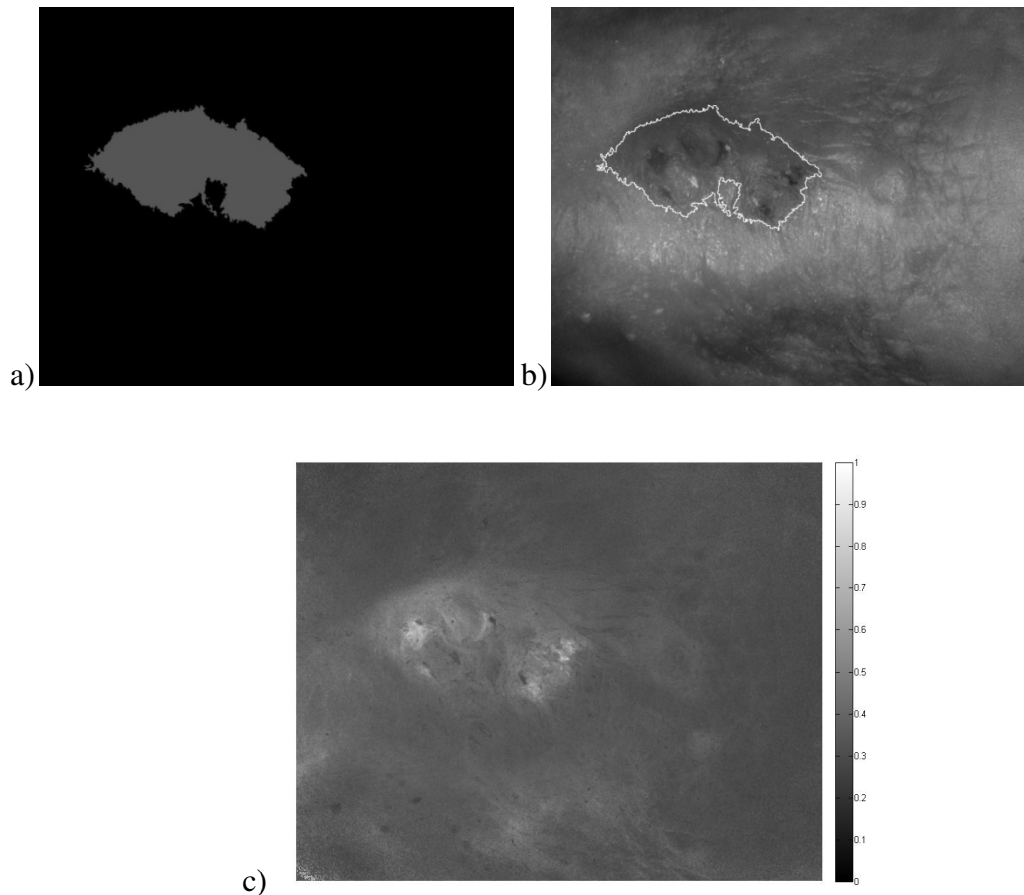


Figura 33 - Imagens pele camundongo: a) imagem com os dois grupos; b) imagem de luz branca com contorno ; c) imagem razão vermelha e verde

Na figura 33, outra lesão foi analisada e novamente aplicamos o algoritmo de agrupamento. Neste caso, também adicionamos o contorno obtido da imagem com os grupos, na imagem de luz branca. O contorno na imagem é importante, pois isso ajuda nos procedimentos cirúrgicos a orientar a delimitação de remoção de uma lesão e na escolha de uma região para biópsia.

Realizamos a tentativa de verificar se as regiões delimitadas através do algoritmo *k-means* eram realmente distintas histologicamente. Porém a tentativa de utilizar uma tinta de marcação de tecido biológico (The Davidson Marking System, Bloomington, MN, USA) não foi bem sucedida. O objetivo era marcar com cores diferentes a pele do camundongo as regiões delimitadas como diferentes após o processamento das imagens. Esse procedimento é convencionalmente empregado para a marcação de linfonodos e tecido mamário na avaliação do câncer de mama. No entanto, a tinta não se fixou no tecido, sendo removida durante o processo de preparo das lâminas histológicas. Dessa forma, a análise histológica das lesões foi realizada somente com o diagnóstico histológico da região alterada como um todo, sem a possibilidade de correlação precisa para cada região delimitada pelo algoritmo *k-means*. A

pele normal (figura 34) apresenta organização celular, e regiões bem definidas, resultando em uma fluorescência e a refletância uniforme. A existência de cistos (figura 35), apesar de proporcionarem uma elevação visível nas imagens, por apresentar uma camada de tecido normal recobrindo-o, resultou em uma fluorescência e refletância sem alterações significativas. Esse tipo de imagem não é capaz de detectar esse tipo de alteração em camadas mais profundas.

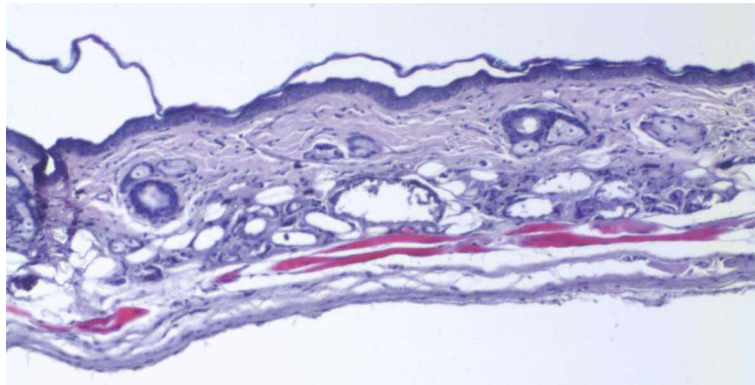


Figura 34 - Lâmina histológica, controle normal HE 100X

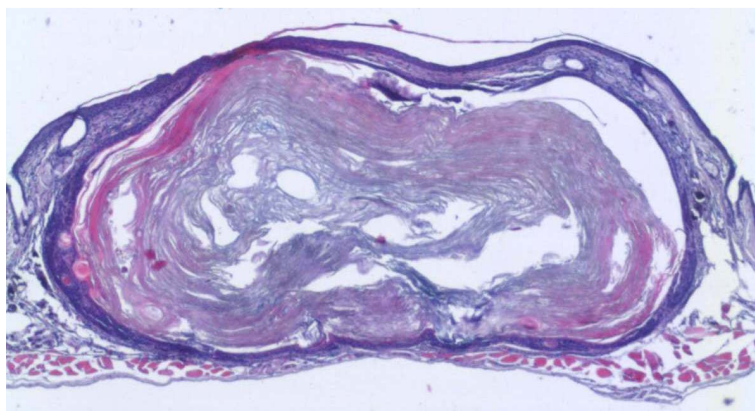


Figura 35 - Lâmina histológica, cisto e normal HE40X

Já a presença de ulcerações, hiperplasia e nódulos (Figuras. 36-38) levam a diferentes variações na fluorescência e refletância. Essas variações podem ser agrupadas de acordo com suas características ópticas. Quando temos áreas com ulcerações aparentes, a absorção devido à hemoglobina é grande, assim as imagens de refletância apresentam regiões com características ópticas distintas em comparação com áreas não-ulceradas. Como não foi possível uma precisa correlação da histologia com as áreas de características ópticas distintas em cada lesão, será apresentado na tabela 4, um resumo das características ópticas e histológicas que foi observado nas lesões investigadas.

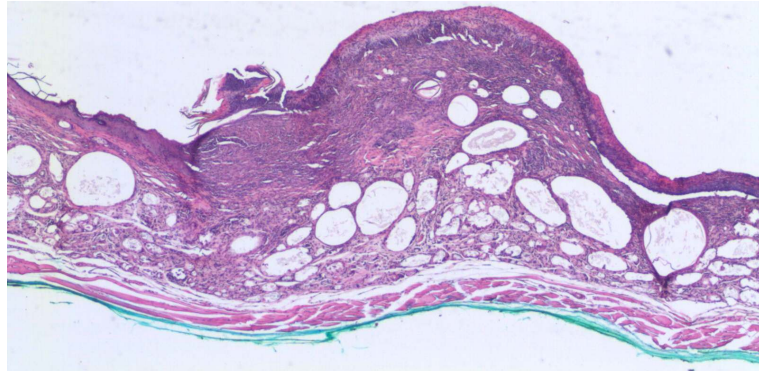


Figura 36 - Lâmina histológica, úlcera e proliferação celular, HE40X

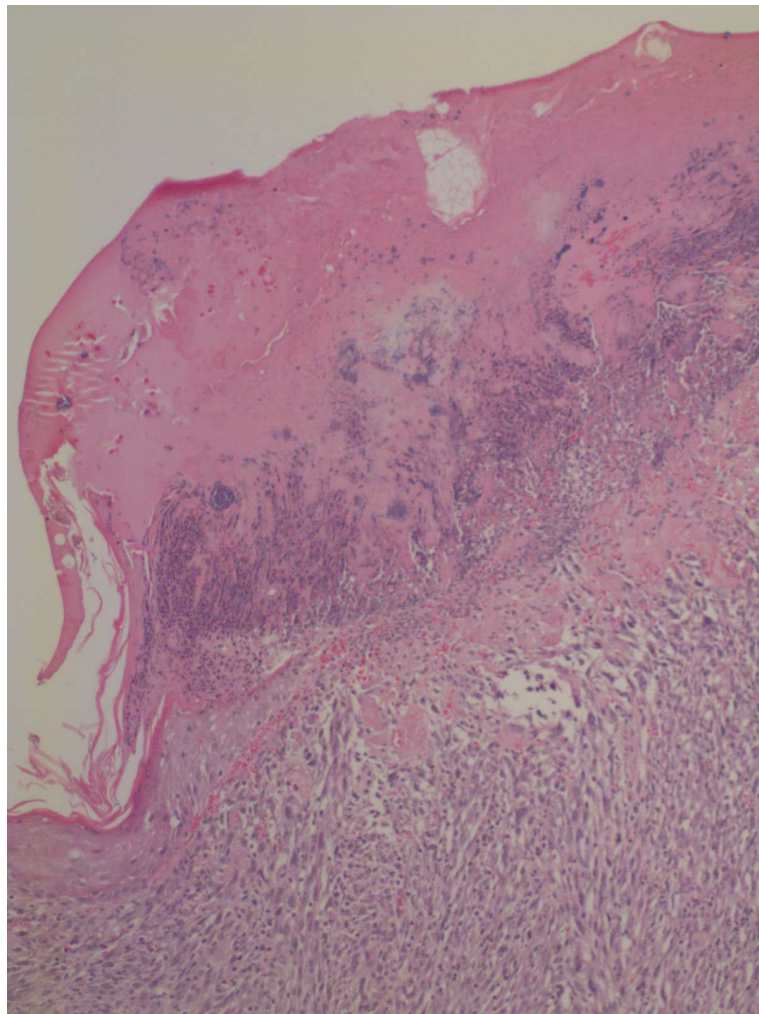


Figura 37- Lâmina histológica, epiderme com úlcera e bolhas com líquido, infiltrado inflamatório  
HE100X

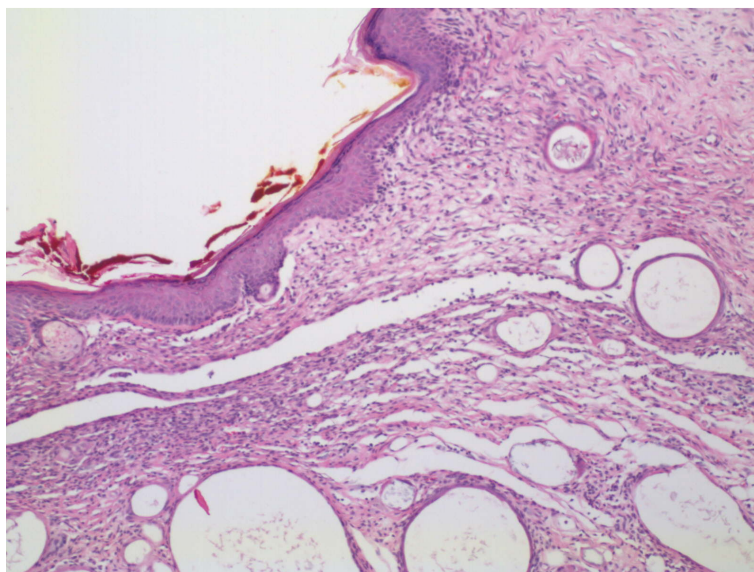


Figura 38 - Lâmina histológica, transição úlcera nódulo tinta HE100X

Os resultados obtidos no modelo animal de lesões em pele de camundongo demonstraram que o sistema de imagem montado pode ser operado facilmente e que as imagens, dos modos fluorescência e refletância, adquiridas apresentam informações complementares para a discriminação das lesões investigadas.

Tabela 4 - Características ópticas e histológicas observadas

Característica clínica	Característica refletância	Característica fluorescência	Característica razão RG	Histologia
Úlcera	ausente	ausente	aumenta	Úlcera e proliferação epitelial da camada basal
Margens da úlcera (cl clinicamente normal)	normal	diminuída	aumenta	Sem correlação precisa
Crescimento exofítico	normal	normal	normal	Proliferação epitelial



O processamento de imagem proposto e aplicado no modelo animal foi eficiente para aumentar o contraste de diferenciação entre tecido normal e alterado. No entanto, a determinação de índices de sensibilidade e especificidade, relevantes para a definição da precisão do método de diagnóstico, deve ser realizada em estudos futuros em pacientes de câncer de pele com maior número de lesões investigadas. A tecnologia desenvolvida e apresentada neste estudo apresenta o potencial de auxílio no diagnóstico.



## 5 CONCLUSÕES

Neste estudo foi desenvolvido um sistema de imagem de campo amplo para detecção óptica de alterações teciduais, baseado em fluorescência e refletância. O desenvolvimento do sistema de imagem envolveu tanto a montagem de um protótipo bem como a proposta de um processamento das imagens adquiridas. O algoritmo utilizado foi o *k*-means, um algoritmo relativamente simples, já permitiu a separação em grupos. Isso indica que outros algoritmos mais complexos de reconhecimento de padrões poderão ser usados no futuro e que possivelmente uma maior precisão seja obtida. Outra melhoria possível é aumentar o vetor característico de cada região com outras características, como textura, irregularidades superficiais etc. Em seguida, a classificação pode ser simultaneamente implementada através de métodos supervisionados.

O sistema montado mostrou-se flexível, robusto e eficiente para a aquisição das imagens. Os resultados desse trabalho mostraram que imagens ópticas de campo amplo, apesar de serem simples, são eficientes no auxílio da discriminação de pele normal e lesão induzida por ultravioleta em camundongos *hairless*. Isso é observado, uma vez que a interação da luz com o tecido biológico depende fortemente das suas características. A combinação das diferentes informações que cada tipo de imagem revela foi eficiente para a separação de regiões opticamente distintas, que correspondem a diferentes condições do tecido investigado. A validação do método ainda é algo necessário. A confirmação de que as regiões delimitadas como opticamente diferentes são realmente diferentes histologicamente, ou seja, a verificação da precisão do método ainda deve ser realizada. Esses estudos, bem como a verificação se esse tipo de procedimento é viável clinicamente serão realizados futuramente. Um maior número de amostras deve ser investigado para a correta verificação do grau de confiabilidade do sistema.



## REFERÊNCIAS

- 1 KHERLOPIAN,A.R.; SONG,T.; DUAN, Q.; NEIMARK,M. A.; PO, M. J.; GOHAGAN, J. K.; LAINE, A. F. A review of imaging techniques for systems biology. *BMC Systems Biology*, v. 2, n.74 , p.1-18, 2008.
- 2 INCA - Instituto Nacional do Câncer. Disponível em:<<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 10 dezembro 2009.
- 3 NEVES, R. G.; LUPI,O.; TALHARI,S. *Cancer de pele*. Rio de Janeiro:MEDSI Editora Médica e Científica Ltda., 2001.
- 4 ATKINS, P.; PAULA, J. D. *Físico-química*. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 2004.
- 5 NIEMZ, M. H. *Laser-tissue interactions fundamentals and applications*. Berlin: Springer Verlag, 2007.
- 6 TISSUE Optical Spectroscopy Laboratory. Disponível em: <<http://nimmi.bme.duke.edu>> Acesso em: 10 dezembro 2009.
- 7 DE VELD, D. C. G.; WITJES, M. J. H.; STERENBORG, H. J. C. M.; ROODENBURG, J. L. N. The status of in vivo autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology. *Oral Oncology*, v. 41,n.2, p.117-131, 2005.
- 8 VO-DINH, T. *Biomedical photonics handbook*. Washington: CRC PRESS, 2002.
- 9 ANDERSON, R. R. ; PARRISH, J. A. The optics of human-skin. *Journal of Investigative Dermatology*,v. 77, n.1, p. 13-19, 1981.
- 10 PAVLOVA, I.; WILLIAMS, M.; EL-NAGGAR, A.; RICHARDS-KORTUM, R. ; GILLENWATER, A. Understanding the biological basis of autofluorescence imaging for oral cancer detection: high-resolution fluorescence microscopy in viable tissue. *Clinical Cancer Research*, v.14, n.8, p.2396-2404, 2008.

11 DE VELD, D. C. G.; SKURICHINA, M.; WITJES, M. J. H.; DUIN, R. P. W.; STERENBORG, H. J. C. M.; ROODENBURG, J. L. N. Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy for oral oncology. *Lasers in Surgery and Medicine*, v.36, n.5, p.356-364, 2005.

12 DE VELD, D. C. G.; SKURICHINA, M.; WITJES, M. J. H.; DUIN, R. P. W.; STERENBORG, H. J. C. M.; ROODENBURG, J. L. N. Clinical study for classification of benign, dysplastic, and malignant oral lesions using autofluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, v. 9, n.5, p.940-950, 2004.

13 KURACHI, C.; FONTANA, C. R.; ROSA, L. E. B. ; BAGNATO, V. S. Fluorescence spectroscopy for the detection of tongue carcinoma - validation in an animal model. *Journal of Biomedical Optics*, v.13, n.3, p.0340181-0340186, 2008.

14 MULDOON, T. J.; PIERCE, M. C.; NIDA, D. L.; WILLIAMS, M. D.; GILLENWATER, A.; RICHARDS-KORTUM, R. Subcellular-resolution molecular imaging within living tissue by fiber microendoscopy. *Optics Express*, v.15, n.25, p.16413-16423, 2007.

15 KONG, S. G.; DU, Z.; MARTIN, M.; VO-DINH, T. Hyperspectral fluorescence image analysis for use in medical diagnostics. In: VO-DINH, T.; GRUNDFEST, W. S.; BENARON, D. A.; COHN, G. E. (Ed.) *Advanced biomedical and clinical diagnostic systems III*. Bellingham: SPIE, 2005. p.21-28. (Proceedings of the SPIE, v.5692). doi: 10.1117/12.596463.

16 RAHMAN, M.; CHATURVEDI, P.; GILLENWATER, A. M. ; RICHARDS-KORTUM, R. Low-cost, multimodal, portable screening system for early detection of oral cancer. *Journal of Biomedical Optics*, v.13, n.3, p.0305021- 030502-3, 2008.

17 ROBLYER, D.; RICHARDS-KORTUM, R.; SOKOLOV, K.; EL-NAGGAR, A. K.; WILLIAMS, M. D.; KURACHI, C. ; GILLENWATER, A. M. Multispectral optical imaging device for in vivo detection of oral neoplasia. *Journal of Biomedical Optics*, v.13, n.2, p. 024019- 024035, 2008.

18 CURVERS, W. L.; SINGH, R.; SONG, L. M.; WOLFSEN, H. C.; RAGUNATH, K.; WANG, K.; WALLACE, M. B.; FOCKENS, P.; BERGMAN, J. J. Endoscopic tri-modal imaging for detection of early neoplasia in Barrett's oesophagus: a multi-centre feasibility study using high-resolution endoscopy, autofluorescence imaging and narrow band imaging incorporated in one endoscopy system. *GUT*, v.57, n.2, p.167-172, 2008. doi:10.1136

19 LANE, P. M.; GILHULY, T.; WHITEHEAD, P.; ZENG, H. S.; POH, C. F.; WILLIAMS, P. M.; ZHANG, L. W.; ROSIN, M. P.; MACAULA, Y C. E. Simple device for the direct visualization of oral-cavity tissue fluorescence. *Journal of Biomedical Optics*, v.11, n.2, p. 0240061-0240067, 2006.

20 ROBLYER, D.; RICHARDS-KORTUM, R.; SOKOLOV, K; EL-NAGGAR, A. K.; WILLIAMS, M. D.; KURACHI, C.; GILLENWATER, A. M. Multispectral optical imaging device for in vivo detection of oral neoplasia. *Journal of Biomedical Optics* v.13, n.2, p.024019 - 024035, 2008.

21 LIU, Q.; CHEN, K.; MARTIN, M.; WINTENBERG, A; LENARDUZZI, R.; PANJEHPOUR, M.; OVERHOLT, B. F.; VO-DINH, T. Development of a synchronous fluorescence imaging system and data analysis methods. *Optics Express*, v.15, n.20, p.12583-12594, 2007.

22 DERMA Medical Systems. Disponível em: <[www.dermamedicalsystems.com](http://www.dermamedicalsystems.com)>, Acesso em: 10 dezembro 2009.

23 SIASCOPE. Disponível em: <[www.siascope.com](http://www.siascope.com)>, Acesso em: 10 dezembro 2009.

24 POLARTECHNICS Limited. Disponível em: <<http://www.polartechnics.com.au>> Acesso em: 10 dezembro 2009.

25 MELAFIND Inc. Disponível em: <<http://www.eo-sciences.com>>. Acesso em: 10 dezembro 2009.

26 DERMLITE Inc. Disponível em: <<http://www.dermlite.com>>, Acesso em: 10 dezembro 2009.

27 KAPSOKALYVAS, D.; BRUSCINO ,N.; CANNAROZZO, G.; DE GIORGI, V.; LOTTI, T.; PAVONE, F. S. Multispectral dermoscope.In: GEORGAKOUDI, I.; POPP, J.; SVANBERG, K. (Ed.) *Clinical and biomedical spectroscopy*. Bellingham: SPIE, 2009. p. 73680D-73680D-6. (Proceedings of the SPIE, v. 7368). doi:10.1117/12.831564.

28 REMICALM LLC. Disponível em: <<http://www.trimira.net>>. Acesso em: 10 dezembro 2009.

29 HAMARNEH, G.; CHODOROWSKI, A.; GUSTAVSSON, T. Active contour models: application to oral lesion detection in color images. In: IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON SYSTEMS, MAN & CYBERNETICS,SMC, 2000, Nashville, USA. *Proceedings...*Nashville:IEEE,2000.v.1-5 2458-24633895.doi: 10.1109/CSMS2000,884361.

30 MILBOURNE, A.; PARK, S. Y.; BENEDET, J. L.; MILLER, D.; EHLEN, T.; RHODES, H.; MALPICA, A.; MATISIC, J.; VAN NIEKIRK, D.; ATKINSON, E. N.; HADAD, N.; MACKINNON, N.; MACAULAY, C.; RICHARDS-KORTUM, R.; FOLLEN, M. Results of a pilot study of multispectral digital colposcopy for the in vivo detection of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic Oncology*, v.99, n.3, p.S67-S75, 2005.

31 GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. *Digital image processing*. New York: Addison-Wesley Pub, 1992.

32 VANSTAVEREN, H. J.; MOES, C. J. M.; VANMARLE, J.; PRAHL, S. A.; VANGEMERT, M. J. C. Light-scattering in intralipid-10-percent in the wavelength range of 400-1100 nm. *Applied Optics*, v.30, n.31, p.4507-4514, 1991.

33 DEGRUIJL, F. R.; FORBES, P. D. UV-induced skin-cancer in a hairless mouse model. *Bioessays*, v.17, n.7, p.651-660, 1995.

34 ROBLYER, D.; KURACHI, C.; STEPANEK, V.; WILLIAMS, M. D.; EL-NAGGAR, A. K.; LEE, J. J.; GILLENWATER, A. M.; RICHARDS-KORTUM, R. Objective detection and delineation of oral neoplasia using autofluorescence imaging. *Cancer Prevention Research*, v.2, n.5, p.423-431, 2009.



## ANEXO A

### Algoritmo de registro as imagens

A transformação linear que descreve a transformação utilizada neste trabalho é dada por:

$$\begin{bmatrix} u_i \\ v_i \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a & -b \\ pb & pa \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_i \\ y_i \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} c \\ d \end{bmatrix}$$

Onde  $x_i$ 's,  $y_i$ 's,  $u_i$ 's, e  $v_i$ 's são pontos conhecidos usados para a calibração da transformação e  $p$  é um “parâmetro de paridade” que especifica se o sistema arbitrário de coordenadas  $x$ - $y$  é o mesmo (1) ou oposto (-1) ao sistema arbitrário de coordenadas  $u$ - $v$ .

Assim temos que encontrar os parâmetros da transformação  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , e  $d$  que minimizam o valor da função  $F$  abaixo:

$$F = \sum_i \left[ (ax_i - by_i + c - u_i)^2 + (pbx_i + pay_i + d - v_i)^2 \right]$$

Essa é uma técnica de mínimos quadrados. Assim derivamos  $F$  em função dos parâmetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , e  $d$  e igualamos a zero:

$$\frac{\partial F}{\partial a} = 2 \sum_i [(ax_i - by_i + c - u_i)x_i + (bx_i + ay_i + pd - pv_i)y_i] = 0$$

$$\frac{\partial F}{\partial b} = 2 \sum_i [-(ax_i - by_i + c - u_i)y_i + (bx_i + ay_i + pd - pv_i)x_i] = 0$$

$$\frac{\partial F}{\partial c} = 2 \sum_i [ax_i - by_i + c - u_i] = 0$$

$$\frac{\partial F}{\partial d} = 2 \sum_i [pbx_i + pay_i + d - v_i] = 0$$

Escrevendo essas equações na forma matricial, temos:

$$\begin{bmatrix} \sum (x^2 + y^2) & 0 & \sum x & p \sum y \\ 0 & \sum (x^2 + y^2) & -\sum y & p \sum x \\ \sum x & -\sum y & n & 0 \\ p \sum y & p \sum x & 0 & n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a \\ b \\ c \\ d \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sum ux + p \sum vy \\ -\sum uy + p \sum vx \\ \sum u \\ \sum v \end{bmatrix}$$

Onde  $n$  é o número de pontos. Resolvendo as duas ultimas linhas da matriz, obtemos:

$$c = \bar{u} - a\bar{x} + b\bar{y}$$

$$d = \bar{v} - p a \bar{y} - p b \bar{x}$$

Onde  $p^2 = 1$ . Substituindo  $c$  e  $d$  nas duas primeiras linhas da matriz, temos:

$$a \sum (x^2 + y^2) + (\bar{u} - a\bar{x} + b\bar{y}) \sum x + (p\bar{v} - a\bar{y} - b\bar{x}) \sum y = \sum ux + p \sum vy$$

$$b \sum (x^2 + y^2) - (\bar{u} - a\bar{x} + b\bar{y}) \sum y + (p\bar{v} - a\bar{y} - b\bar{x}) \sum x = -\sum uy + p \sum vx$$

Dividindo por  $n$  e resolvendo para  $a$  e  $b$  temos:

$$a = \frac{\overline{ux} - \bar{u} \cdot \bar{x} + p\overline{vy} - p\bar{v} \cdot \bar{y}}{D}$$

$$b = \frac{-\overline{uy} + \bar{u} \cdot \bar{y} + p\overline{vx} - p\bar{v} \cdot \bar{x}}{D}$$

$$\text{Onde } D = \overline{x^2} + \overline{y^2} - \bar{x}^2 - \bar{y}^2.$$

É possível determinar se  $p$  é 1 ou  $-1$  *a priori*, sem um conhecimento prévio, apenas determinando o valor de  $p$  que leva ao menor valor de  $Q$ . Substituindo  $C$  e  $d$  na expressão de  $F$ . Temos que:

$$F = \sum_i \left[ (a(x_i - \bar{x}) - b(y_i - \bar{y}) - (u_i - \bar{u}))^2 + (pb(x_i - \bar{x}) + pa(y_i - \bar{y}) - (v_i - \bar{v}))^2 \right]$$

$$\frac{F}{n} = (a^2 + b^2)D + \overline{(u - \bar{u})^2} + \overline{(v - \bar{v})^2}$$

$$+ 2a \left( -\overline{(u - \bar{u})(x - \bar{x})} - p\overline{(v - \bar{v})(y - \bar{y})} \right) + 2b \left( \overline{(u - \bar{u})(y - \bar{y})} - p\overline{(v - \bar{v})(x - \bar{x})} \right)$$

$$= (a^2 + b^2)D + \overline{(u - \bar{u})^2} + \overline{(v - \bar{v})^2} - 2a^2D - 2b^2D$$

$$= \overline{(u - \bar{u})^2} + \overline{(v - \bar{v})^2} - (a^2 + b^2)D$$

Agora substituindo  $a$  e  $b$ :

$$\frac{F}{n} = \overline{(u - \bar{u})^2} + \overline{(v - \bar{v})^2}$$

$$- \frac{\overline{(u - \bar{u})(x - \bar{x})}^2 + \overline{(v - \bar{v})(y - \bar{y})}^2 + 2p\overline{(u - \bar{u})(x - \bar{x})} \cdot \overline{(v - \bar{v})(y - \bar{y})}}{D}$$

$$- \frac{\overline{(u - \bar{u})(y - \bar{y})}^2 + \overline{(v - \bar{v})(x - \bar{x})}^2 - 2p\overline{(u - \bar{u})(y - \bar{y})} \cdot \overline{(v - \bar{v})(x - \bar{x})}}{D}$$

Definindo  $F_+$  e  $F_-$  como sendo  $\frac{F}{n}D$  para  $p = 1$  e  $p = -1$ , respectivamente. Então

$$F_- - F_+ = 4\overline{(u - \bar{u})(x - \bar{x})} \cdot \overline{(v - \bar{v})(y - \bar{y})} - 4\overline{(u - \bar{u})(y - \bar{y})} \cdot \overline{(v - \bar{v})(x - \bar{x})}$$

Se  $F_- - F_+ > 0$ , então  $p = 1$  leva ao menor valor de  $F$ . Se  $F_- - F_+ < 0$ , então  $p = -1$  leva ao menor valor de  $F$ .

Com esses valores podemos realizar o alinhamento das imagens, fazendo com que as diferentes imagens tenham o mesmo campo de visão.

## ANEXO B

## Certificado de Comissão de ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 124/2008, sobre o projeto intitulado “*Desenvolvimento e avaliação de um sistema de imagem para diagnóstico óptico de lesões neoplásicas*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Cristina Kurachi** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **29 de setembro de 2008**.

(We certify that the protocol n° 124/2008, about “*Development and evaluation of an optical imaging system for cancer detection*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **09/29/2008** meeting).

Ribeirão Preto, 29 de setembro de 2008.

**Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha**  
Presidente da Comissão de Ética em  
Experimentação Animal



## ANEXO C

### Prêmios e Participações em Congressos

#### Prêmios:

- Melhor pôster no 12th World Congress of the International Photodynamic Association.
- Melhor Trabalho na área de Terapia Fotodinâmica e Diagnóstico Óptico no XIII Congresso Brasileiro de Física Médica.
- Trabalho entre os nove selecionados para a final da Olimpíada USP de Inovação. Área: Saúde, Agência USP de Inovação - Universidade de São Paulo.

#### Participações em Congressos:

- Pratavieira, S.; Santos, P. L. A.; Bagnato, V.S.; Kurachi, C.; Widefield reflectance and fluorescence imaging device and digital image processing for the detection of skin and oral cancer. In: SPIE Photonics West, 2010, San Francisco, California.
- Pratavieira, S.; Santos, P. L. A.; Bagnato, V.S.; Kurachi, C.. Development and characterization of a widefield imaging system combining fluorescence and reflectance images for the detection of skin and oral cancer. In: World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, 2009, Munique.
- Lins, E. C.; Pratavieira, S.; Bagnato, V.S.; Kurachi, C.. Assembly, Calibration and Application of a Hyperspectral Image System for Biomedical Imaging. In: World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, 2009.
- Lins, E. C.; Vollet-Filho, J. D.; Pratavieira, S.; Bagnato, V.S. ; Kurachi, C.. Study of Kinetics and Distribution of Photogem in Animal Liver Through Fluorescence Imaging. In: World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, 2009, Munique.
- Pratavieira, S.; Shigeyosi, W.; Lins, E. C.; Bagnato, V.S.; Kurachi, C.. Avaliação da desmineralização de dente bovino utilizando sistemas de imagens de fluorescência. In: Congresso Brasileiro de Física Médica (13: 2008 : Belo Horizonte);, 2008, Belo Horizonte.
- Pratavieira, S.; Bagnato, V.S.; Kurachi, C.. Widefield fluorescence and reflectance imaging system: instrumentation and results in an animal model. In: Meeting of the South American Division of World Federation for Lasers in Dentistry - WFLD: (2009: São Paulo); Congress of the Brazilian Association for Lasers in Dentistry - ABLO (5: 2009 : São Paulo), 2009, Sao Paulo.
- Pratavieira, S.; Santos, P. L. A.; Bagnato, V.S.; Kurachi, C.. Development of a widefield reflectance and fluorescence imaging device for the detection of skin and oral cavity cancer. In: 12th World Congress of the International Photodynamic Association, 2009, Seattle.

- Pratavieira, S.; Bagnato, V.S.; Kurachi, C.. Development and evaluation of an optical system for cancer detection based in images of the fluorescence and reflectance.. In: Escola de Diagnóstico Óptico e Terapia Fotodinâmica, 2008, São Carlos.
- Pratavieira, S.; Bagnato, V.S.; Kurachi, C.. Development and evaluation of an optical imaging system for oral and skin cancer detection. In: Spec 2008 - Shedding Light on Disease: Optical Diagnosis for the New Millenium, 2008, São José dos Campos.