

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ANGELO BIASI GOVONE

Desenvolvimento de um sistema de imagem de campo amplo de
fluorescência para localização de linfonodo sentinela empregando a
indocianina verde

São Carlos

2016

ANGELO BIASI GOVONE

Desenvolvimento de um sistema de imagem de campo amplo de fluorescência para localização de linfonodo sentinela empregando a indocianina verde

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

Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Kurachi

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2016

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 revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Govone, Angelo Biasi

Desenvolvimento de um sistema de imagem de campo amplo de fluorescência para localização de linfonodo sentinela empregando a indocianina verde / Angelo Biasi Govone; orientadora Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2016.

88 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Diagnóstico. 2. Indocianina verde. 3. Fluorescência de campo amplo. 4. Linfonodo sentinela. 5. Câncer. I. Kurachi, Cristina, orient. II. Título.

À Profa. Dra. Elenice Deffune.

Exemplo de sabedoria, ética, garra e caráter.

Ensina com o olhar, cura com amor.

Agradecimentos

À Deus, pelas alegrias e conquistas e por me ajudar a superar as pequenas dificuldades.

À minha companheira Priscila, por me ajudar tanto, principalmente nesta reta final. Por estar sempre ao meu lado, me amando e me apoiando.

Aos meus pais, José Silvio e Maria Aparecida, pela minha educação e meu caráter. Pelo apoio incondicional que sempre recebi e ainda recebo.

Ao meu irmão Alvaro, meu grande amigo, que sempre me apoiou e incentivou e ficou sem minha ajuda nestes últimos tempos de elaboração da dissertação.

À toda minha família. Meus avós Silvio e Helena, que nestes 10 anos de lembranças continuam ensinando com a velha sabedoria da roça. Meus avós José e Beatriz, que sempre se interessam pelos meus estudos. Meus tios e primos, que ajudam e apoiam.

Ao meu tio Osvaldo, que desde minha infância ensinou física e mecânica automotiva, ensinamentos que trago até hoje e que certamente influenciaram minhas escolhas!

À minha orientadora Profa. Dra. Cristina Kurachi, que sempre esteve disposta a ensinar e ajudar, dar ideias e solucionar problemas. Orientadora e amiga!

Ao meu amigo e professor de física do colégio, Huemerson Maceti, responsável por despertar em mim o gosto pela física.

Aos amigos de laboratório Pablo Aurelio Gómez García e Ramon Gabriel Teixeira Rosa por todo empenho em me ajudar na elaboração do projeto, principalmente no desenvolvimento da rotina computacional e nas viagens intermináveis à Barretos e Bueno de Andrada.

À Mariana Carreira Geralde pela ajuda com os primeiros experimentos *in vivo*.

À Carolina de Paula Campos e Ilaiáli Souza Leite pela amizade e pela fundamental ajuda na formatação desta dissertação.

Aos amigos Dirceu Vollet e Sebastião Pratavieira por toda ajuda durante estes anos e principalmente neste último mês.

A todos os amigos do grupo de óptica, responsáveis por um ambiente integrado e harmonioso.

Aos meus amigos Filipe Gonçalves, Lucas Gonçalves, Woner Mion, Thiago Dreyer, Pedro Henrique Gorayeb e Orlando Gonelli.

Ao professor Vanderlei Bagnato, que sempre esteve disposto a debater ideias que ajudaram no desenvolvimento do projeto.

Ao professor Daniel Varella Magalhães pelos conselhos no desenvolvimento eletrônico.

Ao pessoal do LIEPO, sempre dispostos a ajudar, em especial ao Engenheiro João Marcelo Nogueira que muito me ensinou.

Ao Leandro e ao Evaldo da oficina do grupo de óptica que sempre ajudaram na correria de ultima hora desenvolvendo peças emergenciais.

À oficina mecânica do IFSC, sempre realizando serviços perfeitos que resultaram na confecção de peças extremamente precisas. Um agradecimento especial ao Ademir e ao Pereira.

Aos secretários do grupo de óptica, que auxiliam de maneira primorosa nossos trabalhos.

Aos funcionários da biblioteca, da gráfica e da pós-graduação do IFSC, que demonstram a excelência no serviço público.

Aos funcionários da segurança e da limpeza da USP, que tornam o ambiente agradável.

Aos médicos parceiros do projeto. Dr. André Lopes Carvalho, Dr. Renato de Castro Capuzzo e Dr. Carlos Eduardo Barbosa Carvalho, que utilizaram o equipamento e solicitaram ajustes. Atitude fundamental para a melhoria do projeto.

À Camila Crovador, enfermeira do Hospital de Câncer de Barretos, que foi responsável por todo o suporte para que pudéssemos acompanhar as cirurgias.

À toda equipe do Hospital de Câncer de Barretos que fazem deste Hospital referência mundial e orgulho ao país.

À CAPES, CNPq, FAPESP e FAFQ pelo apoio financeiro dado de maneira direta ou indireta ao projeto.

RESUMO

GOVONE, A. B. **Desenvolvimento de um sistema de imagem de campo amplo de fluorescência para localização de linfonodo sentinela empregando a indocianina verde.** 2016. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A fluorescência é uma técnica amplamente empregada na área de diagnóstico médico, com aplicações distintas. Uma de suas aplicações é a detecção de um determinado marcador que pode ser injetado no paciente. A indocianina verde (ICG) é um exemplo de marcador fluorescente que pode ser empregado para auxiliar na identificação do linfonodo sentinela. A excitação é realizada em 780 nm e a emissão detectada ao redor de 850 nm. Tais comprimentos de onda são muito favoráveis para aplicação médica por apresentarem pouca absorção por tecidos biológicos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de imagens por fluorescência de ICG. Este sistema é basicamente constituído por um dispositivo de iluminação e de aquisição e tratamento de imagem. Dois protótipos foram construídos e testados, um com excitação Laser e o segundo a LED. O dispositivo de iluminação oferece uma iluminação uniforme em uma área de 10 por 15 cm a uma distância de 30 cm. A fluorescência é captada por um sistema composto por duas câmeras perpendiculares uma à outra e um espelho dicróico angulado 45° a ambas, cuja função é separar a imagem por bandas. Uma das câmeras capta a imagem refletida do espelho no espectro visível e a outra capta a imagem transmitida pelo espelho no infravermelho. As imagens obtidas pelas câmeras recebem tratamento em uma rotina desenvolvida em plataforma *LabVIEW*[®] para destacar a região com fluorescência sobreposta na imagem sob iluminação branca em tempo real, sendo possível salvar figuras ou vídeos, dependendo da necessidade do operador. O equipamento foi testado no Hospital de Câncer de Barretos em pacientes para ressecção cirúrgica de tumores de cabeça e pescoço e de melanoma e apresentou resultados promissores.

Palavras chave: Diagnóstico. Indocianina verde. Linfonodo sentinela. Fluorescência de campo amplo. Câncer.

ABSTRACT

GOVONE, A. B. **Development of a wide-field fluorescence imaging system to locate sentinel lymph node using indocyanine green.** 2016. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Fluorescence is a widely used technique in medical diagnostic, with several applications. One of its applications is the screening of a particular marker that can be injected into the patient. The indocyanine green (ICG) is an example of fluorescent marker that can be used to assist the identification of the sentinel lymph node. The excitation is performed at 780 nm and the emission is detected around 850 nm. Such wavelengths are very suitable for medical applications due to their little absorption by biological tissues. The objective of this study was to develop a system of fluorescence imaging of ICG. This system is basically constituted by an irradiation and image acquisition device and a routine for image processing. Two prototypes were built and tested, the first one with Laser excitation and the second with LED. The lighting device provides uniform illumination in an area of 10 by 15 cm at a distance of 30 cm. The fluorescence is collected by a system with two cameras orthogonal to each other and a dichroic mirror angled 45° to both, whose function is to separate the image in bands. One of the cameras captures the image reflected from the mirror in the visible spectrum and the other captures the image absorbed by the mirror in the infrared. The images obtained by the cameras receive treatment on a routine developed in LabVIEW® platform to highlight the fluorescent region overlapping the image under white light in real time, making it possible to save pictures or videos, depending on the needs of the operator. The equipment was tested in Barretos' Cancer Hospital in patients for surgical resection of head and neck tumors and melanoma tumors and presented promising results.

Keywords: Diagnosis. Indocyanine green. Sentinel lymph node. Wild field fluorescence. Cancer.

Lista de Figuras

Figura 1 –	Etapas da detecção de LS de melanoma.	24
Figura 2 –	Esquema do sistema de excitação e aquisição de imagens.	34
Figura 3 –	Visão frontal do primeiro protótipo.	36
Figura 4 –	Sistema de fixação das câmeras com espelho dicróico.	37
Figura 5 –	Tela de execução da rotina em <i>LabView</i> [®] .	38
Figura 6 –	Esquema da base de alumínio e sistema de iluminação dos LEDs.	40
Figura 7 –	Esquema montado para alimentação dos LEDs brancos e infravermelho.	41
Figura 8 –	Esquema da ligação dos 12 LEDs infravermelhos na fonte de corrente.	42
Figura 9 –	Sistema de aquisição, com os reguladores NSI50350 e dissipadores.	43
Figura 10–	Transmissão do espelho dicróico a 45°.	44
Figura 11–	Vista superior do sistema com câmeras e cubo.	45
Figura 12–	Vista geral, equipamento acoplado ao suporte.	47
Figura 13–	Frames de injeção e fluorescência da ICG em um músculo peitoral de frango.	51
Figura 14–	Sistema em uso para teste piloto <i>in vivo</i> .	53
Figura 15–	Primeiro procedimento com camundongo.	54
Figura 16–	Camundongo durante cirurgia.	56
Figura 17–	Equipamento sendo utilizado em cirurgia.	58
Figura 18–	Sequência de imagens da localização e retirada de 2 linfonodos.	60
Figura 19–	O sistema permanece em equilíbrio de forma estática durante cirurgia.	62
Figura 20–	Cirurgia de pescoço para localização e retirada de linfonodo.	64
Figura 21–	Cirurgia para localização e retirada de linfonodo de melanoma.	66
Figura 22–	Cirurgia para localização e retirada de LS de melanoma na região da canela.	67

Lista de Siglas e Abreviaturas

CI – Circuito Integrado

ICG – Indocianina Verde

LS – Linfonodo Sentinela

mA – mili Ampér

V – Volts

W- Watts

Sumário

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Câncer.....	19
1.2	Metástases e o sistema linfático.....	21
1.3	Diagnóstico e tratamento de lesões metastatizadas	25
1.4	Fluorescência e a localização de linfonodos	26
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivo Geral	31
2.2	Objetivos Específicos.....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1	Primeiro protótipo	35
3.2	Segundo Protótipo.....	38
3.2.1	Sistema de Iluminação	39
3.3.3	Testes clínicos	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXOS.....	77
	Anexo A – Datasheet LEDs 780 nm.	77
	Anexo B – Comissão de Ética UNESP.	81
	Anexo C – Comitê de Ética - Hospital de Câncer de Barretos.....	83
	Anexo D – Parecer Médico.	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é um conjunto de doenças que origina-se de uma célula que sofreu uma determinada alteração genética, passando a ter a característica de multiplicação além dos limites normais da divisão celular, e a capacidade de colonizar regiões normalmente destinadas a outras células. (1) Isto pode ocorrer devido a inúmeros fatores que desencadeiam irregularidades no processo de divisão de células saudáveis, dentre eles a predisposição genética, ou alterações que causam nas células a perda na sua habilidade para montar e criar tecidos de forma e função normais. (2-3) A combinação destes fatores favorece a disseminação da neoplasia para diversos tecidos, tornando-se assim uma doença extremamente agressiva e invasiva. (1)

A célula anormal, considerada célula neoplásica, pode gerar dois tipos de tecidos. O tecido neoplásico benigno, que não possui a capacidade de se tornar invasivo e permite a remissão completa da doença, e o tecido neoplásico maligno, que pode se originar na mutação de um tecido benigno e que possui a capacidade de invadir tecidos adjacentes e levar à metástases à distância. (1)

Os cânceres estão agrupados em dois grandes grupos principais. Os carcinomas, derivados de tecidos epiteliais e os sarcomas, derivados de tecidos conectivos e células musculares. Ambos são cânceres que se formam originalmente em um tecido celular sólido, criando um tumor sólido, originalmente fixo ao tecido originário. (1) Além destes grandes grupos, há também cânceres derivados do sistema nervoso ou das células da linhagem branca ou suas precursoras, como as leucemias e os linfomas. (4-5)

De acordo com estudos da Organização Mundial de Saúde (OMS), o número estimado de casos novos de câncer no mundo ultrapassou 10 milhões em 2000, e em 2020 estima-se que ultrapassará 15 milhões. Aproximadamente 60% desses casos novos ocorrerão em regiões menos desenvolvidas. (6) Dentre as principais causas de morbimortalidade mundiais, o câncer se destaca por sua alta incidência, afetando diversas áreas demográficas e classes sociais. Sua ocorrência é tida como a principal causa de morte de hispânicos nos Estados Unidos. Parte desta

permeabilidade ocorre pela variabilidade genética e histopatológica dessas neoplasias, e com fatores de risco que vão desde o tipo de regime alimentar adotado até a predisposição genética familiar e exposição ambiental a carcinógenos, além das associações destas causas. (7-8)

A cirurgia de cabeça e pescoço é uma especialidade dirigida ao tratamento de tumores benignos e malignos da região da face - composta pelas fossas nasais, seios paranasais, boca, faringe, laringe, tireoide, glândulas salivares e dos tecidos moles do pescoço, excluindo-se os tumores intracranianos. (9-10) O câncer de boca é uma denominação que inclui os cânceres de lábio e de cavidade oral (mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua oral e assoalho da boca). (11)

O tratamento do câncer de cabeça e pescoço pode incluir a cirurgia e/ou a radioterapia. A indicação do tratamento mais adequado para cada paciente dependerá da localização do tumor e das alterações funcionais que podem ser ocasionadas pelo tratamento eleito. Geralmente, as lesões iniciais estão restritas ao local de origem e não se disseminaram para gânglios linfáticos do pescoço ou outros órgãos. No entanto, quando uma lesão é classificada como inicial da cavidade oral, principalmente se tratando das localizadas em língua e/ou assoalho de boca, pode haver disseminação subclínica para gânglios linfáticos cervicais entre 10% e 20% dos casos. Na presença de linfonodomegalia metastática, o esvaziamento cervical do lado comprometido é indicado, sendo o prognóstico negativamente afetado. Deriva-se desse fato a grande importância de técnicas que permitam maior precisão na localização dos linfonodos acometidos, permitindo uma cirurgia menos invasiva e conseqüentemente, com menos efeitos deletérios ao paciente. (12)

Outro câncer que apresenta grande incidência é o melanoma, que é o tumor originário de células denominadas melanócitos, que apresenta grande capacidade de metastização. Sua origem é na pele, ocasionalmente em mucosas, e sua patogênese está relacionada à exposição aos raios ultravioletas. A incidência do melanoma em faixas etárias mais baixas (crianças e adolescentes) permanece estável, porém vem crescendo rapidamente na faixa etária adulta. Sua suspeita pode ser feita por achados clínicos de um nevus com rápido crescimento escuro, com mudança de cor, bordos irregulares ou com sangramento local. O diagnóstico é através de avaliação anatomopatológica do material biopsiado. Primariamente, a

conduta é baseada na excisão local da lesão, mapeamento de linfonodos e biópsia do linfonodo sentinela (LS). (13-14)

Dentre as neoplasias de pele, é o de pior prognóstico, e sua incidência vem crescendo notoriamente. A primeira descrição deste tumor foi já no período antes de Cristo, e a designação “melanoma” foi empregada pela primeira vez em 1838 por Robert Carswell que identificou lesões escurecidas malignas em pele. (13-14)

O estadiamento da doença através do rastreamento de LS se deu a partir de 1992 por Morton, corroborando desde então para grande avanço na classificação e tratamento da neoplasia em questão. (13)

A biópsia do LS é direcionada para pacientes com melanoma com risco importante para metástases. (14-15)

O tratamento da patologia oncológica deve ser individualizado de acordo com características do tumor, como localização, extensão e gravidade. (11)

1.2 Metástases e o sistema linfático.

Uma vez desenvolvido o tumor sólido, o tecido ao seu redor começa a sofrer alterações, aumentando a angiogênese para otimizar a oferta de nutrientes às células que estão em rápido crescimento, com alto consumo energético. Neste processo pode se dar início a metástase, que é a proliferação de células neoplásicas em outro tecido que não o de origem. Este processo representa cerca de 90% das mortes associadas ao câncer. (2)

Na metástase, as células neoplásicas desprendem-se da matriz celular que as mantém agrupadas, sendo este processo de desprendimento pouco conhecido, mas de extrema importância para o início do processo de disseminação metastática. (2) Uma vez desprendida do tecido, a célula neoplásica circula na corrente sanguínea até se alojar em uma região onde será iniciada sua proliferação. Este processo é pouco eficiente, uma vez que a célula precisa transpor uma barreira endotelial para atingir a circulação. Ao chegar ao seu destino, deve novamente romper a barreira endotelial para alcançar o novo tecido alvo. Neste processo, a colonização pode não ocorrer, pois a célula pode ter dificuldades na adesão ao novo tecido ou com a variação do pH do meio. Isto leva a crer que, das células que se

desprendem e chegam aos vasos, apenas uma ínfima quantidade é capaz de se desenvolver em outros tecidos, pois a grande maioria não possui as propriedades de célula-tronco para se multiplicar em outra região do organismo senão a de sua origem. (2)

A circulação das células neoplásicas que originarão novos tumores ocorre pelos sistemas vascular e linfático. Quando uma célula penetra no sistema vascular, toma um rumo desconhecido, pois é carregada rapidamente através do sangue podendo atingir qualquer região do organismo. No sistema linfático, esse percurso é muito mais lento, pois apenas após ser drenada juntamente com a linfa, percorrer o sistema linfático lentamente e passar pelos gânglios é que esta célula chega ao sistema venoso. (2)

O sistema linfático possui além de vasos linfáticos e gânglios linfáticos (linfonodos), capilares extremamente finos e com origem em praticamente todos os espaços teciduais. Os capilares confluem em vasos linfáticos que passam pelos linfonodos e terminam em pontos como o pescoço, axilas, abdômen e região inguinal, onde concentram-se a maior parte de linfonodos. Estas regiões são as de maior incidência linfonodal, porém a variabilidade topográfica faz com que muitos pacientes apresentem consideráveis alterações na anatomia do sistema linfático. (2)

A principal função do sistema linfático é drenar as proteínas que extravazam dos capilares sanguíneos e se depositam nos tecidos ao redor da matriz celular, sendo portanto o único meio de devolução destas proteínas à circulação sanguínea. Os capilares linfáticos possuem grande permeabilidade, drenando a linfa, que é composta pelas proteínas, além de água, células mortas, vírus, bactérias e toxinas que estão no tecido. A linfa drenada nos capilares segue até os vasos e até um primeiro linfonodo que filtra a linfa, extraíndo todo o material particulado. Após passar por este primeiro linfonodo a linfa segue para outros linfonodos, passando por uma vasta cadeia linfonodal, a fim de neutralizar qualquer ameaça. Somente após passar por todas estas barreiras é que as células neoplásicas chegam ao sistema vascular. (5)

A drenagem ocorre por dois processos: o primeiro pela pressão positiva no tecido, que facilita a drenagem da linfa pelos capilares; o segundo processo é pela atuação da bomba linfática, que age com as válvulas presentes nos capilares e vasos linfáticos (similar ao sistema vascular) e que com a contração dos vasos

linfáticos direciona a linfa no sentido do sistema venoso. Esta contração ocorre de maneira compassada e periódica, assim quando determinado trecho do sistema linfático está distendido pela grande presença de linfa, o tecido se contrai, drenando a linfa para um seguimento posterior, com menor pressão. Esta bomba também atua em caso de contração muscular, quando a pressão aumenta, a linfa escoar pelo sistema. As válvulas impedem que a linfa retorne ao tecido, mesmo sob pressão externa como no caso muscular ou com massagens. (4)

Em tumores sólidos bem delimitados e em estágios iniciais, as células metastáticas desprendidas do tumor podem ainda estar retidas no sistema linfático, no LS. (4) Com isso torna-se importante a localização e ressecção deste linfonodo para o tratamento e seguimento do paciente oncológico. (16) Em alguns casos onde o tumor compreende uma região maior, pode ocorrer o aparecimento de mais de um LS, geralmente próximos uns dos outros. (17)

Os linfonodos são pequenos órgãos que constituem o sistema linfático. Eles estão presentes em todo o corpo, e são conectados entre si através dos vasos linfáticos. Agrupamentos de linfonodos são encontrados no pescoço, região axilar, tórax, abdome e virilha. A linfa, que banha os linfonodos, intersticial auxilia na remoção de substâncias prejudiciais aos tecidos e órgãos, como microrganismos (vírus, bactérias) e células cancerígenas. (4)

Os nódulos linfáticos constituem parte fundamental do Sistema Imune, contendo linfócitos T e B e outras células de defesa. Essas células monitoram a presença de substâncias estranhas ao organismo (vírus, bactérias, células neoplásicas) agindo como um gatilho para o desencadeamento da resposta imunológica. Muitos tipos de câncer se alastram através do sistema linfático, sendo os linfonodos importantes auxiliares para o rastreamento da disseminação e abrangência dessas neoplasias. (18) O LS é o primeiro linfonodo que células cancerígenas atingem a partir de um tumor primário. (5)

Nos últimos 15 anos, a pesquisa do LS se tornou um método extremamente valioso no estadiamento de neoplasias malignas iniciais, como câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama, carcinomas gastrointestinais e melanomas. Sua pesquisa permite cirurgias menos invasivas e estadiamento com planejamento terapêutico adequados, com redução de eventos adversos ao paciente. A extensão

cirúrgica é reduzida, selecionando-se com maior precisão um menor número de linfonodos a serem analisados (Figura 1). (18–20)

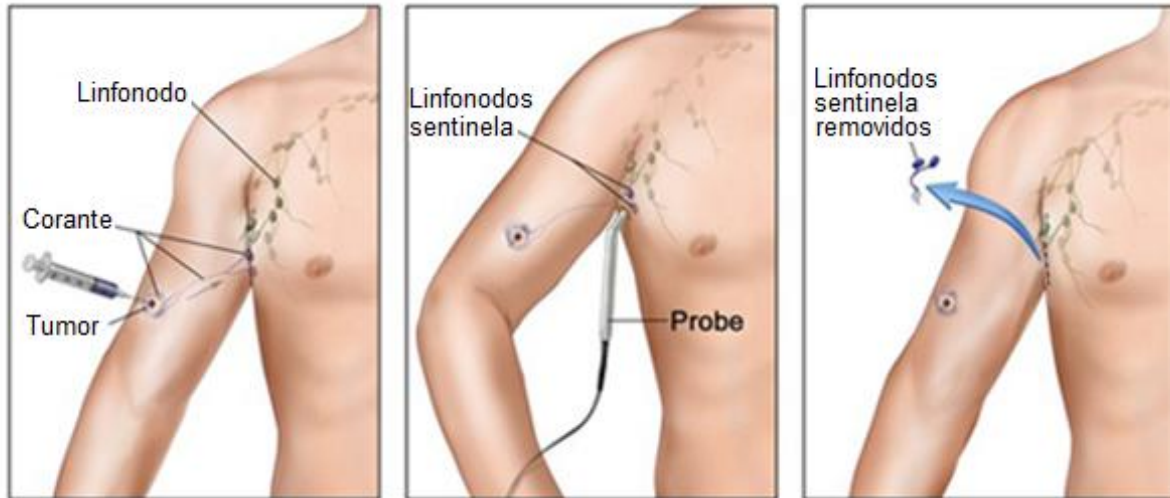


Figura 1 - Etapas da detecção de LS de melanoma.
Fonte: Adaptada de LONG. (21)

A biópsia do LS é um procedimento que identifica, remove e pesquisa se células neoplásicas estão presentes naquele tecido. Se a pesquisa resultar negativa, significa que o câncer não atingiu o sistema linfático local. Se positiva, significa que pode haver comprometimento de outras cadeias linfáticas e eventualmente de outros órgãos. (20-21) Caso o LS apresente células neoplásicas identificadas no exame anatomopatológico e histológico, o cirurgião resseca também outras cadeias linfáticas, muitas vezes no mesmo tempo cirúrgico que a cirurgia de retirada do tumor primário. A cirurgia de remoção de linfonodos apresenta diversos efeitos colaterais, e, quanto maior sua extensão, mais importante os eventos adversos. Dentre eles, pode-se citar: linfedema (por alteração no trajeto habitual da linfa), seroma, prejuízo de movimentação, dor e parestesia. (21)

Os linfonodos se concentram em bolsas linfonodais agregados a vários outros linfonodos. No momento da cirurgia, não é possível a detecção a olho nu de quais linfonodos são responsáveis por drenar a região do tecido comprometida com o tumor. Desta forma, a cirurgia de ressecção tumoral compreendia o esvaziamento total da bolsa linfonodal. Esse procedimento traz ao paciente inúmeros efeitos colaterais, uma vez que os linfonodos envolvidos neste esvaziamento são responsáveis pela drenagem linfática de uma vasta área do tecido, podendo comprometer grandes regiões, como membros. Assim, o esvaziamento traz ao

paciente efeitos adversos como inchaço e perda de sensibilidade da região. Esses eventos levaram à busca e pesquisa árdua por uma metodologia capaz de localizar o LS do tecido afetado, minimizando consideravelmente estes danos. (20,22–24)

1.3 Diagnóstico e tratamento de lesões metastatizadas

Uma metodologia para diagnóstico e tratamento de lesões metastatizadas consiste na utilização de corantes. Inicialmente, eram aplicados ao redor do tumor corantes capazes de marcar o LS que drena a linfa do tumor, como azul de metileno, azul isossulfano, azul patente e verde brilhante. Desta forma o cirurgião necessita dissecar uma vasta região do tecido em busca do linfonodo marcado com corante, o que muitas vezes é de difícil visualização, devido à baixa concentração drenada. Este procedimento é bastante agressivo e invasivo, podendo trazer complicações decorrentes da abrangência do procedimento. Além disso, o tempo gasto na cirurgia pode inviabilizar o procedimento, pois o corante pode ser drenado para linfonodos subsequentes. (25)

Outro método comumente utilizado é a medicina nuclear, com a injeção de radiofármaco marcado com Tecnécio 99 (Tc^{99}). O fármaco é injetado ao redor do tumor, drenando para o LS. Este método conta com um contador *Geiger Muller*, (equipamento capaz de detectar e mensurar a quantidade de radiação ionizante de determinada região) para localizar com precisão a bolsa linfonodal, mesmo em casos onde os linfonodos estão posteriores a determinado músculo. Ao realizar a dissecação do tecido e se aproximar da bolsa linfonodal, o cirurgião frequentemente encontra a situação de saturação do contador, o que impede a localização precisa dos LS. Tornou-se então comum a retirada de linfonodos que não estão comprometidos, o que aumenta a incidência de efeitos colaterais. Apesar desta saturação, este é um método bastante testado e hoje é considerado como padrão ouro na localização de LS. (26)

Combinar estes métodos, através da injeção de um radiofármaco e corante ao redor do tumor, otimiza a precisão da localização do LS. Porém essa combinação resulta em pequena melhoria em relação ao método com aplicação de apenas de radiofármaco, pois a baixa concentração do corante no linfonodo permanece dificultando a localização pelo cirurgião. (26)

1.4 Fluorescência e a localização de linfonodos

Neste cenário, emerge a utilização de fluorescência, uma técnica que emprega a luz para excitar uma determinada amostra de corante fluorescente. O corante absorve a energia luminosa em comprimento de onda específico, característico da substância, e emite esta energia em um comprimento de onda maior. Desta forma é possível diferenciar a energia emitida pela fonte de luz da energia emitida pelo corante fluorescente. Baseando-se nessa propriedade, o método consiste em injetar ao redor do tumor determinado corante capaz de emitir fluorescência. (27)

Imediatamente após a injeção, a excitação do corante é promovida por um sistema de iluminação no comprimento de onda de sua absorção. A luz emitida pelo corante deve ser filtrada para eliminar a luz de excitação e é captada por um conjunto de câmeras capaz de projetar em um monitor a imagem do tecido, destacando o LS marcado. Este método demonstra excelente precisão e é pouco invasivo, porém incapaz de localizar linfonodos em regiões mais profundas, como linfonodos posteriores a grupos musculares. (22)

Recentemente, alguns equipamentos comerciais tornaram-se disponíveis, como o modelo C9830 (*Hamamatsu Photonics K. K.*[®] Tóquio –Japão) que é constituído por um sistema com uma câmera central e diodos emissores de luz (*light emitting diodes*, LEDs) dispostos ao redor, capaz de excitar uma amostra marcada com ICG, um corante da classe das cianinas. A partir da excitação da indocianina, o sistema gerar imagens em tons de cinza em tempo real da fluorescência emitida, destacando a região de fluorescência dos demais tecidos do paciente. (28–30) Este sistema permite localizar com precisão os linfonodos com um sistema que utiliza apenas uma câmera, filtros e LEDs para excitação da ICG. É bastante compacto e conta com regulagem de sensibilidade e ISO próximo à câmera, permitindo ao operador regular o seu funcionamento de maneira bastante simples. A principal desvantagem deste sistema é que ele gera apenas imagens em preto e branco. Desvantagem mais significativa para utilização em cirurgias de cabeça e pescoço, onde o cirurgião tem interesse em diferenciar determinados tipos de tecido durante a dissecação e cores e as tonalidades do vermelho são essenciais para uma efetiva discriminação dos tecidos. O equipamento conta com um único monitor, responsável

por gerar a imagem e que fica próximo ao sistema de processamento de imagens, distante do médico que utiliza o sistema. Esta característica dificulta sua operação, já que obriga o cirurgião a deixar de olhar para o campo cirúrgico para olhar para o monitor do equipamento que está localizado a certa distância. Outro fator que compromete a ampla utilização deste equipamento nos hospitais públicos do país é o custo elevado, que ultrapassa os US\$35.000,00, inviabilizando sua difusão no sistema público de saúde do Brasil.

A utilização do corante fluorescente juntamente com o radiofármaco surge como um método bastante sensível e preciso. Assim é possível injetar radiofármaco em conjunto com o corante ao redor da lesão e utilizando o contador *Geiger* localizar a bolsa linfonodal onde encontra-se o LS. Após a dissecação do tecido, o cirurgião utiliza o sistema de fluorescência para localizar com exatidão qual o LS ao tumor. Este método demonstra ser mais rápido, seguro e minimamente invasivo. (22,31)

A imagem por fluorescência é amplamente utilizada em ciências biomédicas para visualização de tecidos e células *in vivo* e *in vitro*, com benefícios como: alto contraste (diferentes comprimentos de onda são usados para iluminação), alta sensibilidade (com baixas concentrações), auxílio em pesquisas científicas, baixo custo e fácil aplicabilidade. (27)

Existem inúmeras substâncias capazes de gerar fluorescência, portanto é importante buscar uma substância capaz de absorver e emitir fluorescência em regiões espectrais mais vantajosas para o objetivo proposto. Uma substância atualmente considerada eficiente é a ICG (*indocyanine Green, ICG*), que possui banda de absorção e emissão na faixa entre 750 e 900 nm, apresentando, portanto menor competição da absorção pelas biomoléculas constituintes dos tecidos (por ser infravermelho) e também pouca absorção pela água (por estar abaixo de 900 nm). Estas características permitem utilizar sistema óptico com maior penetração nos tecidos biológicos, sendo capaz de interrogar o corante em regiões mais profundas. (32)

A ICG foi desenvolvida em 1955 e aprovada para uso clínico em 1959 nos Estados Unidos. Desde a década de 70 já vem sendo usada em oftalmologia para angiografia de retina. Seu princípio de uso como marcador fluorescente consiste na iluminação do tecido de interesse no comprimento de onda de excitação (750 a 800 nm), dispondo de filtros para selecionar espectralmente a fluorescência antes de

atingir o sensor. Ela apresenta maior emissão de fluorescência ao redor de 800 nm e em comprimentos de onda mais longos, dependendo da concentração, pH e temperatura. Sua aplicação possui diversas vantagens: confinamento ao compartimento vascular, baixa toxicidade, não ionizante, excreção rápida através da bile, ideal para angiografias, meia vida curta na circulação sanguínea, de baixo custo. A aplicação da ICG é recente em cirurgias oncológicas e reconstrutoras. (30)

A ICG é uma molécula de tricarbocianina com peso molecular de 774,96 g/mol. A injeção de ICG contém iodeto de sódio, com possível risco alérgico por essa razão. A solução com o corante possui instabilidade quando exposta à luz. Primeiramente ela deve ser dissolvida em água, e, caso seja necessário uma solução isotônica, sendo possível diluí-la posteriormente em solução salina. (27,30)

Múltiplas repetições das administrações intra-operatórias da ICG podem ser necessárias devido à propriedade do corante ter rápida ligação com proteínas do plasma (lipoproteínas). Essa característica fato não tem demonstrado toxicidade para estruturas proteicas do organismo. (30) A ICG não tem metabólitos conhecidos, e é rapidamente excretada através do suco biliar. Seu transporte é feito através da proteína chamada glutathione-S-transferase. (27,30)

O corante em questão tem inúmeras aplicações clínicas e cirúrgicas. Dentre as clínicas, cita-se: imagens de sistema nervoso central e hemodinâmicas, queimaduras, traumas e estudo de perfusão muscular. Aplicações em cirurgias nas áreas: oftalmologia, neurocirurgia, vascular, cardiologia, oncologia, rastreamento de LS, linfografia, cirurgia hepática, colecistectomia, microcirurgias e cirurgias laparoscópicas. Em terapia fotodinâmica, quando a molécula da ICG é excitada, transfere energia para outras moléculas tornando-se agente da terapia. Como exemplo, após seu uso para revelar LS, a ICG pode ser utilizada para destruição de nódulos metastáticos. Também pode ser empregada como agente antimicrobiano ativado pela luz (como exemplo, no tratamento de acne atuando como antibacteriano e controlador da produção de secretória). (22,27,30,33)

A detecção dos linfonodos é condição essencial para evitar, sempre que possível, recidivas metastáticas de lesões tumorais. Vistas as possibilidades que a técnica de detecção dos linfonodos por fluorescência oferecem, é necessário buscar formas de ampliar a capacidade de detectar linfonodos em profundidade, diminuindo a necessidade de extensão de procedimentos cirúrgicos altamente invasivos, com

consequências graves para as condições clínicas e o prognóstico do paciente, muitas vezes já debilitado pela lesão primária. (19-20,27,30,34)

Assim, este estudo pretende explorar modificações de cunho tecnológico que ampliem o potencial de detecção de fluorescência utilizando ICG, visando contribuir ao cirurgião por aumentar sua habilidade de encontrar linfonodos e minimizar danos excessivos aos tecidos do paciente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento, montagem, caracterização e validação de um sistema de imagem por fluorescência para detecção de LS.

2.2 Objetivos Específicos

1. Montagem do protótipo: Mecânica, óptica, eletrônica e interface.
2. Caracterização do sistema.
3. Validação: *ex vivo* (tecido muscular de ave), *in vivo* (camundongo) e clínico (pacientes).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Um dispositivo de imagem por campo amplo de fluorescência basicamente deve conter um sistema de iluminação para excitação da amostra e um sistema de detecção, como uma câmera digital, CCD, otimizados para a visualização da fluorescência. Neste sentido, a fonte de luz deve emitir principalmente na região de maior absorção do marcador e componentes ópticos, como filtros e espelho, devem ser usados para que, se possível, apenas os fótons fluorescentes do marcador atinjam o sensor da CCD. Usualmente para os dispositivos de uso clínico/cirúrgico se torna imprescindível uma interface para ajuste de algumas variáveis, como irradiância, controle da CCD e para a sobreposição das imagens em tempo real.

Em linhas gerais, o sistema montado conta com um conjunto óptico que após a excitação do corante em 780 nm através de sistema de iluminação a Laser ou LED, capta sua fluorescência em 850 nm. Para isso, é utilizado um espelho dicróico que separa a imagem visível da fluorescente. As imagens seguem para duas câmeras que captam as imagens separadas (Figura 2). No computador, uma rotina desenvolvida em *LabView*[®] subtrai a imagem de fluorescência e sobrepõe à imagem colorida, gerando uma imagem que permite ao médico determinar a região de fluorescência no tecido.

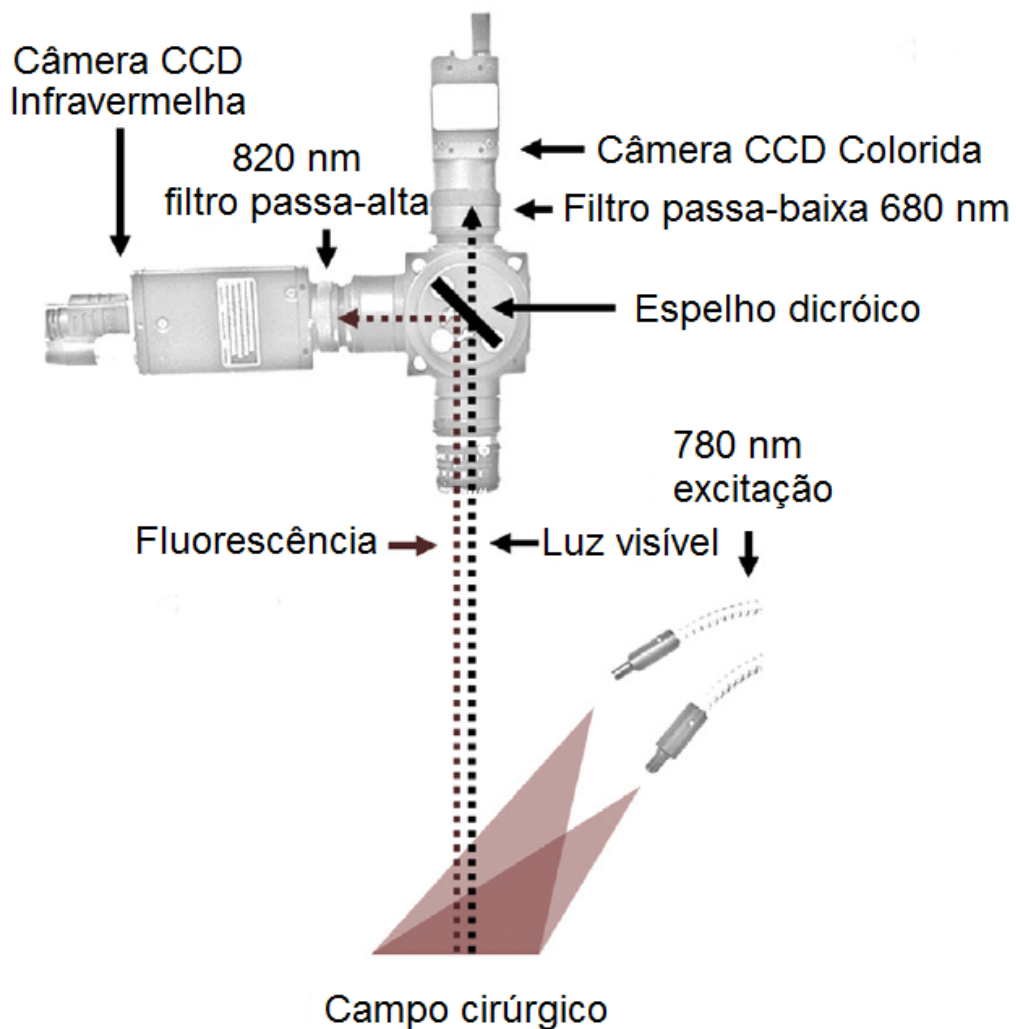


Figura 2 - Esquema do sistema de excitação e aquisição de imagens.
 Fonte: Adaptada de YUJIN. (35)

O equipamento foi desenvolvido com o desenho das peças mecânicas em software *Inventor*[®] e a confecção ocorreu nas oficinas mecânicas do Instituto de Física de São Carlos e do Grupo de Óptica. Os circuitos eletrônicos foram projetados em conjunto com o Laboratório de Instrumentação Eletrônica (LIEPO) e executados no mesmo laboratório.

Foram desenvolvidos dois protótipos, no primeiro, a excitação foi feita por um Laser centrado em 785 nm com largura de banda de 20 nm e no segundo, a fonte de excitação passou a ser um sistema LED, centrado em 780 nm com largura de banda de 40 nm.

3.1 Primeiro protótipo

O sistema de iluminação, responsável pela excitação da ICG, consiste num conjunto composto por 16 diodos Laser agrupados abaixo da câmera, de maneira a distribuir a luz homoganeamente (Figura 3). Estes diodos são do modelo ADL-78901TL - ARIMA LASERS, Taoyuan - Taiwan. A corrente de alimentação destes diodos é de 115 mA com tensão máxima de 2,2 V. Eles foram posicionados em uma base retangular de 120 cm x 150 cm, distanciados de 3 cm. À frente da superfície de iluminação foi posicionada uma placa de vidro jateada para uniformizar a emissão a distância. A alimentação elétrica foi feita por uma fonte desenvolvida em dois módulos distintos. O primeiro módulo fornece tensão constante de 3,5 Volts, que alimenta dezesseis módulos de fonte de corrente independentes, com corrente fixa em 115 mA cada. As fontes são independentes, pois embora os diodos sejam fabricados com rigorosos processos de qualidade, muitas vezes eles apresentam uma pequena variação em sua resistência interna. Neste caso, quando associado a outros diodos, poderá haver sobrecarga em algum destes componentes, causando severa redução de sua vida útil.

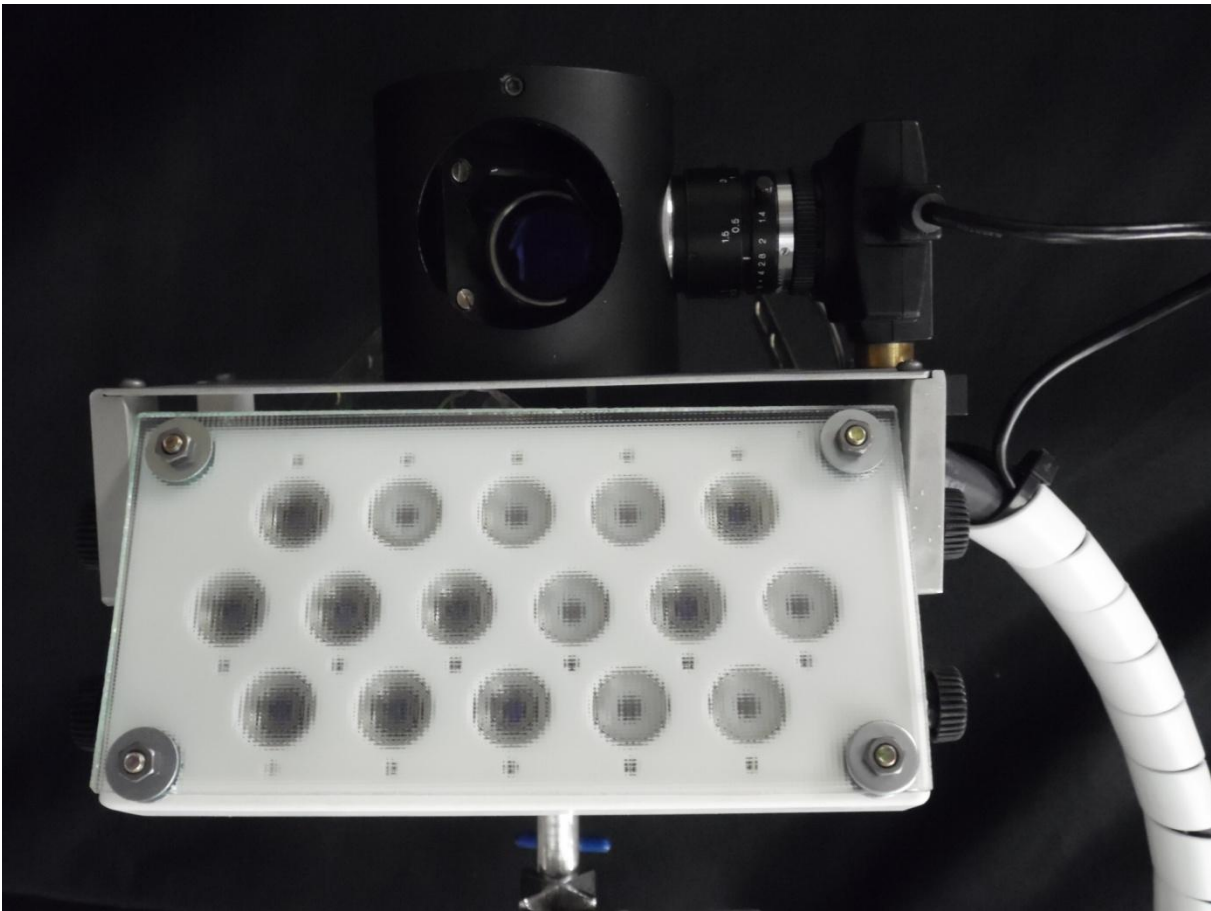


Figura 3 - Visão frontal do sistema, sendo possível visualizar uma câmera, o espelho dicróico e o conjunto de LEDs.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As câmeras e o espelho dicróico foram fixados em um suporte onde é possível variar as distâncias entre as câmeras e o espelho, assim como fazer a rotação do dicróico, possibilitando um ajuste fino na imagem refletida e transmitida pelo equipamento (Figura 4).



Figura 4 - Sistema de fixação das câmeras com espelho dicróico. A seta indica o cilindro de rotação que permite a rotação para calibragem do dicróico.
Fonte: Elaborada pelo autor.

As câmeras utilizadas são FireflyMV[®] 0,3 MP Color e Mono - PointGray - Richmond, Canadá. Possuem sensibilidade para visível e infravermelho próximo, respectivamente, com resolução de 300 K Pixels. O espelho dicróico possui corte em 820 nm, possibilitando a transmissão da luz com comprimento de onda superior a 820 nm e a reflexão com comprimentos inferiores a 820 nm, quando o ângulo de incidência é de 45°.

O computador que recebe as imagens conta com software fornecido pela fabricante das câmeras para a interface do sistema operacional com as câmeras e aquisição das imagens que serão tratadas. O computador também conta com o software *LabView*[®] e as imagens recebidas foram tratadas em uma rotina desenvolvida no programa.

Esta rotina é capaz de gerar uma imagem final que sobrepõe a fluorescência sobre a imagem colorida, permitindo ao médico localizar com precisão o tecido marcado com a ICG (Figura 5).

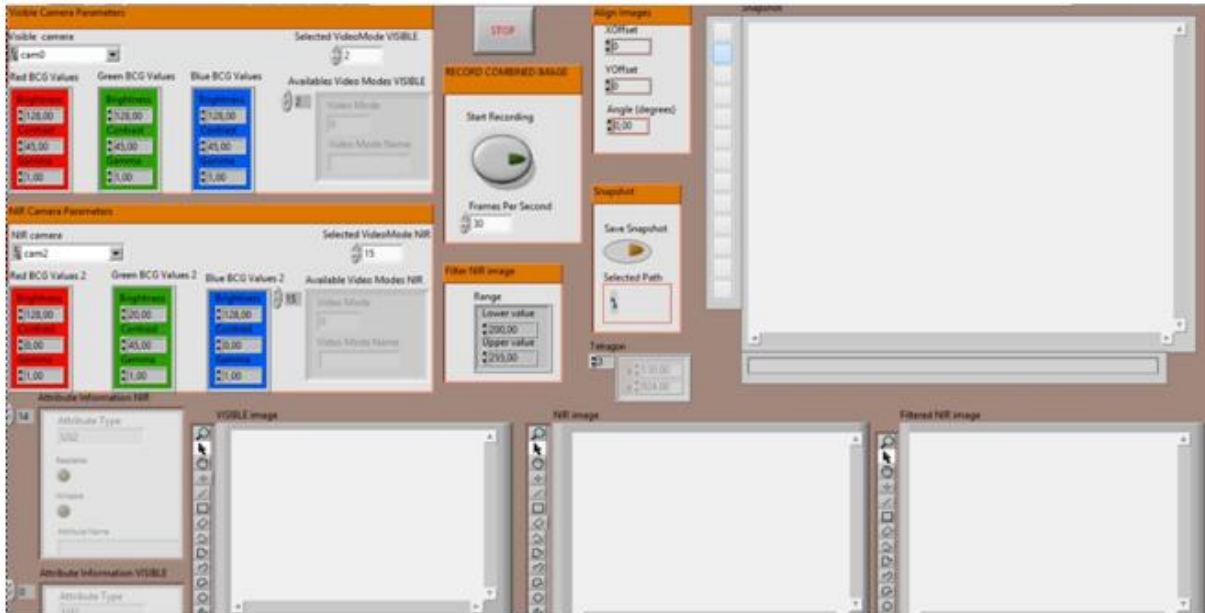


Figura 5 - Execução da rotina em *LabView*[®], com as janelas de entrada de imagem colorida e infravermelho, tela de filtragem infravermelho e tela de saída da imagem com sobreposição.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Todo o tratamento de imagem foi realizado em um notebook modelo VPC-EG13EB VAIO[®] - Sony, Tóquio – Japão e a imagem oriunda do processamento passou a ser visualizada em sua tela. Todo este sistema era utilizado sem que houvesse algum tipo de suporte. Era preciso segurar o equipamento nas mãos, tornando sua operação cansativa e gerando imagens pouco precisas, já que este método produzia imagens tremidas e as dificuldades de operação impediam o posicionamento do equipamento em ângulos mais favoráveis para a obtenção de imagens.

3.2 Segundo Protótipo

O segundo protótipo trouxe inovação em todos os aspectos. Houve reconstrução de todo o sistema, não havendo reaproveitamento de nenhum equipamento do primeiro protótipo.

3.2.1 Sistema de Iluminação

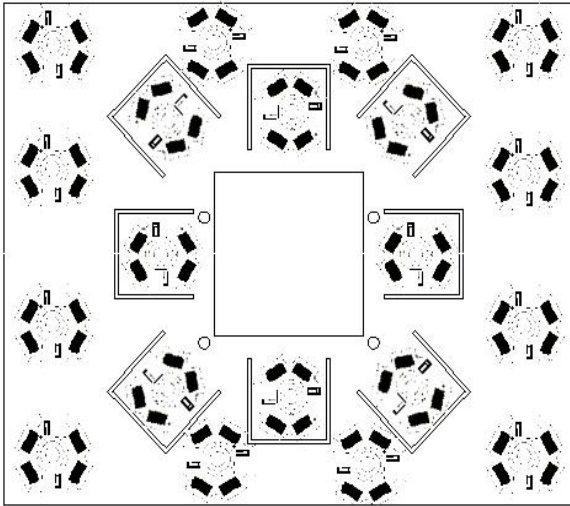
O sistema de iluminação passou a utilizar 18 LEDs de alta potência (1 W elétrico, tensão máxima de 2 V, corrente máxima de 350 mA e emissão com banda centrada em 780 nm, fabricados por HANHUA ELECTRONIC CO.,LTD, Sheen Shen, China – *datasheet* ANEXO A) e também com 2 LEDs de alta potência (1 W elétrico, tensão máxima de 7 V e corrente máxima de 350 mA, emitindo luz branca para aumentar a captação da câmera colorida, CROMAX ELETRÔNICA LTDA. Guarulhos – SP, Brasil). Os LEDs foram igualmente dispostos ao redor da janela de fixação do espelho dicróico, com uma distância entre os LEDs de 3 cm, sendo fixados com cola térmica.

Em função da abertura dos LEDs possuir 170°, o feixe se tornou bastante disperso, com considerável perda de intensidade luminosa. Foram então utilizadas lentes de 60° (CROMAX ELETRÔNICA LTDA. Guarulhos – SP, Brasil) para convergir os feixes, aumentando a irradiância sob o tecido alvo, que a uma distância operacional de 40 cm aumentou a intensidade média de cerca de 3 para 7 mW.cm⁻², mantendo-se entre 6,2 e 7,5 mW.cm⁻² em uma região quadrada de 60 cm de lado. Esta área de iluminação é ideal para a visualização de toda a região lateral do pescoço de um homem adulto.

Estes LEDs estão fixados em uma base de alumínio com espessura de 4 mm e dimensões 120 x 150 mm para dissipação térmica. Após 20 minutos de funcionamento, a temperatura na base de alumínio estabilizou-se em cerca de 40°C. Esta temperatura é bastante segura para os diodos, o que dispensa o uso de outros sistemas de dissipação térmica, como placas de alumínio, ventiladores e pastilhas térmicas. Para o paciente não existe nenhum risco, pois o uso do sistema é completamente sem contato com o tecido alvo de investigação. O mesmo ocorre para o médico, o contato com o sistema para seu posicionamento é realizado através de uma manopla que não apresenta nenhum tipo de aquecimento.

Como a região central possui a janela para captação das imagens, neste local não é possível fixar os LEDs, o que poderia resultar na criação de uma área de sombra. Para solucionar este problema, foram feitos cortes na base de alumínio para a angulação de 15° dos LEDs centrais, aumentando a iluminação na região central (Figura 6).

A - Esquema da base do LED



B - Sistema finalizado

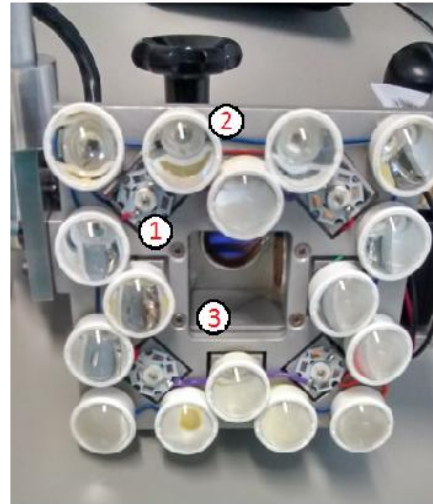


Figura 6 – A - Esquema da base de alumínio, com espessura de 4 mm com os LEDs fixados na peça.
 B - Sistema de iluminação com base de alumínio e LEDs (1) com lentes convergentes (2) e fixados ao redor da janela do filtro dicróico (3).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esse sistema conta com alimentação elétrica proveniente de duas fontes comerciais que possuem alimentação universal (*full-range*) que pode variar de 90 a 240 V que fornece tensão máxima de 12 V e corrente máxima de 700 mA. A fonte é chaveada e possui auto-regulação, variando a frequência do pulso de acordo com o consumo dos LEDs, implicando em uma maior eficiência energética.

Desta forma, em uma das fontes foram ligados 6 LEDs de 780 nm e 2 LEDs brancos, em dois conjuntos em paralelo idênticos. Cada conjunto conta com 3 LEDs 780 nm e 1 LED branco ligados em série. A corrente de 700 mA alimenta os 2 conjuntos ligados em paralelo, fornecendo 350mA por conjunto. No caso de um LED avariar, fechando curto-circuito ou algum fio soltar, ocorre uma drástica alteração na corrente no sistema, podendo ultrapassar os 350 mA e danificar um conjunto de LEDs. Por isso cada conjunto é equipado com um circuito integrado (CI) regulador de corrente de 350 mA, modelo NSI50350 (Figura 7). Os LEDs brancos e infravermelhos possuem tensões de alimentação bastante distintas, mas é possível alimentar estes LEDs em série, pois eles possuem a mesma corrente de alimentação (350 mA).

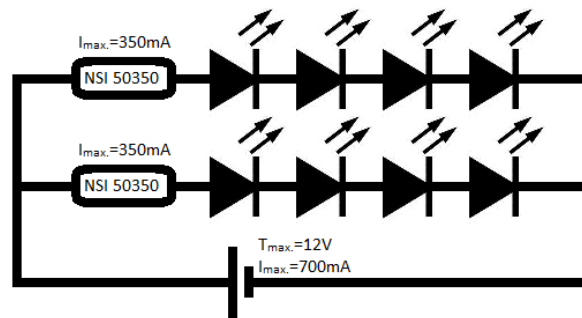


Figura 7 - Esquema do circuito montado para alimentação dos LEDs brancos e infravermelhos.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Se somadas as tensões máximas de cada LED, a tensão final é de 13 V, tensão superior à da fonte, que é de 12 V. Com essa tensão fornecida abaixo da máxima, há redução de intensidade e do calor dissipado pelo alumínio, mas aumento da vida útil do sistema.

A fonte elétrica que alimenta o outro conjunto também fornece até 12 V com 700 mA de corrente máxima e é responsável por alimentar 12 LEDs de 780nm. O aumento da quantidade de LEDs com o mesmo modelo de fonte ocorre pelo fato de que os LEDs infravermelhos necessitam de uma tensão de alimentação menor, permitindo substituir 1 LED branco por 3 LEDs infravermelhos em cada conjunto de LEDs em série.

Da mesma forma como no circuito anterior, os LEDs foram divididos em dois grupos de 6 LEDs cada, ligando estes dois conjuntos em paralelo para dividir a corrente de alimentação dos LEDs. Neste caso também foi utilizado um CI regulador de corrente NSI50350 para proteger os LEDs de um aumento crítico de corrente (Figura 8) e a soma das tensões máximas dos LEDs é de 12 V, exatamente a tensão máxima da fonte. Neste sistema tanto o conjunto de LEDs como a fonte trabalham à plena carga.

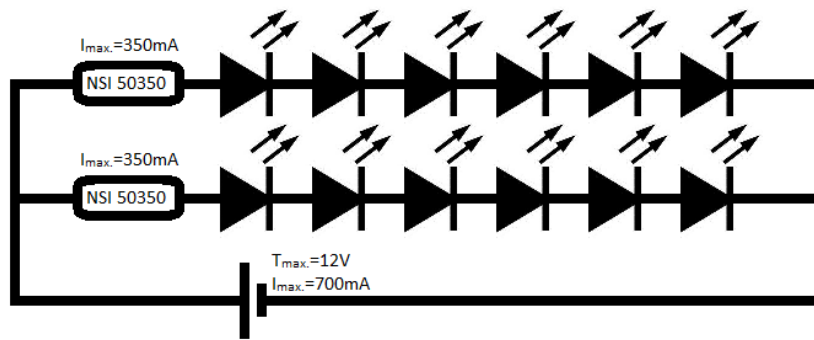


Figura 8 - Esquema da ligação dos 12 LEDs infravermelhos na fonte de corrente regulada.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Em ambos os circuitos as fontes trabalham com uma tensão de flutuação geralmente pouco acima dos 12 V, mas nunca com corrente além dos 700 mA. Por isso os reguladores de corrente NSI50350 foram fixados próximos aos conjuntos de LEDs (Figura 9), reduzindo assim a queda de tensão que ocorre por dissipação térmica dos fios. Estes reguladores dissipam a corrente extra em forma de calor, por isso eles estão fixados em dissipadores de alumínio, dentro de pequenas caixas plásticas fixadas na região posterior da base de alumínio que sustenta os LEDs.

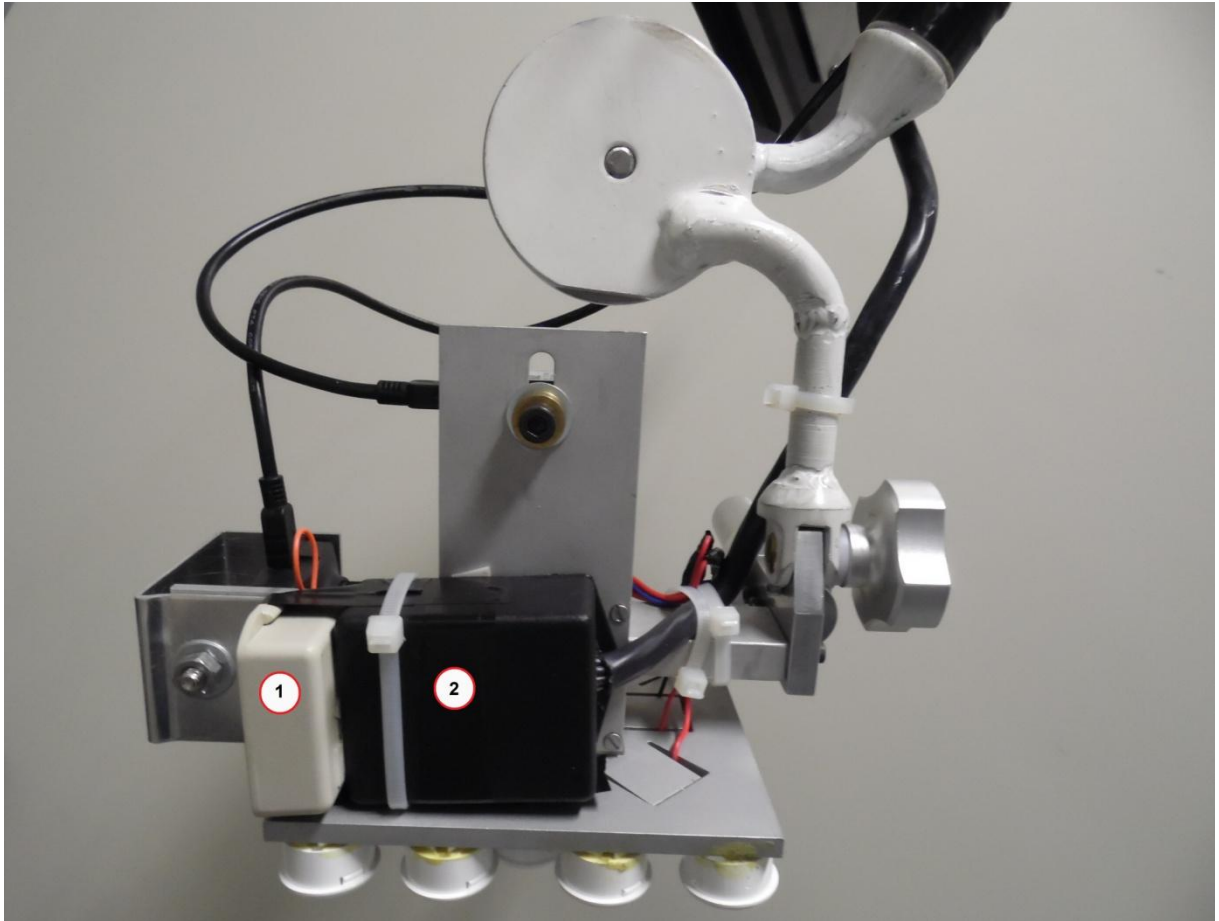


Figura 9 – Sistema de aquisição, onde 1 e 2 indicam a localização das caixas onde estão alocados os reguladores de corrente NSI50350 com dissipadores de alumínio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os fios utilizados para alimentar o conjunto de LEDs possuem seção nominal de 1 mm, suportando correntes de até 12 A, bastante superior aos 700 mA requeridos pelo sistema. Isso ocasiona as possíveis diminuições de quedas de tensão decorrente do aumento da resistência causada pelo aquecimento dos fios, que estão em um cabo PP de 4 vias e comprimento aproximado de 150 cm.

3.2.2 Sistema de Aquisição.

O sistema de aquisição consiste em captar a imagem do paciente para que o médico tenha como resultado a imagem colorida do espectro visível com a sobreposição da fluorescência. Para isso é necessário que o sistema seja capaz de

captar a imagem do espectro visível e da fluorescência do corante, sem a interferência da luz proveniente dos LEDs de infravermelho.

O sinal é captado por duas câmeras que recebem a mesma imagem, a fim de proporcionar uma sobreposição bastante precisa, sem erros na localização da fluorescência sobre a imagem colorida. A separação da imagem em dois feixes que seguem para as câmeras ocorre no espelho dicroico, que tem a capacidade de selecionar o espectro refletido e transmitido, realizando uma seleção espectral. Desta forma, foi utilizado um espelho dicroico da empresa Proteon[®] com corte na região dos 695 nm (Figura 10). O espelho foi fixado para incidência a 45°, permitindo a reflexão da banda abaixo dos 695 nm e a transmissão da banda acima dos 695 nm. Desta forma, a luz proveniente dos LEDs infravermelho é transmitida pelo espelho dicroico (Figura 11), atingindo a câmera ao fundo do equipamento.

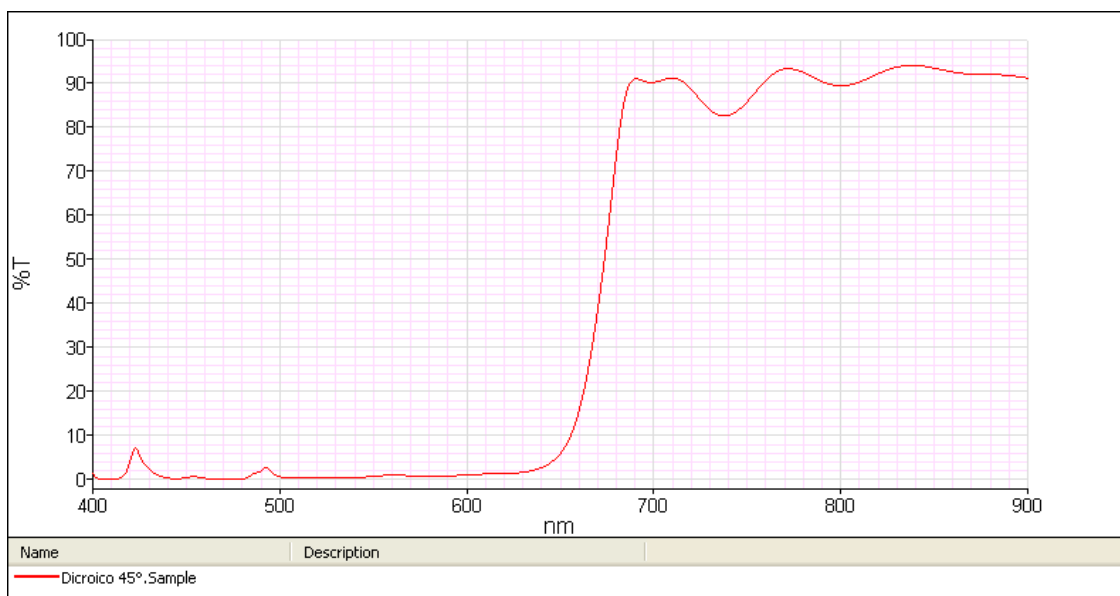


Figura 10 - Gráfico da transmissão do espelho dicroico para incidência a 45°. A reflexão é dada pelo gráfico complementar.

Fonte: Fornecido pela empresa PROTEON.

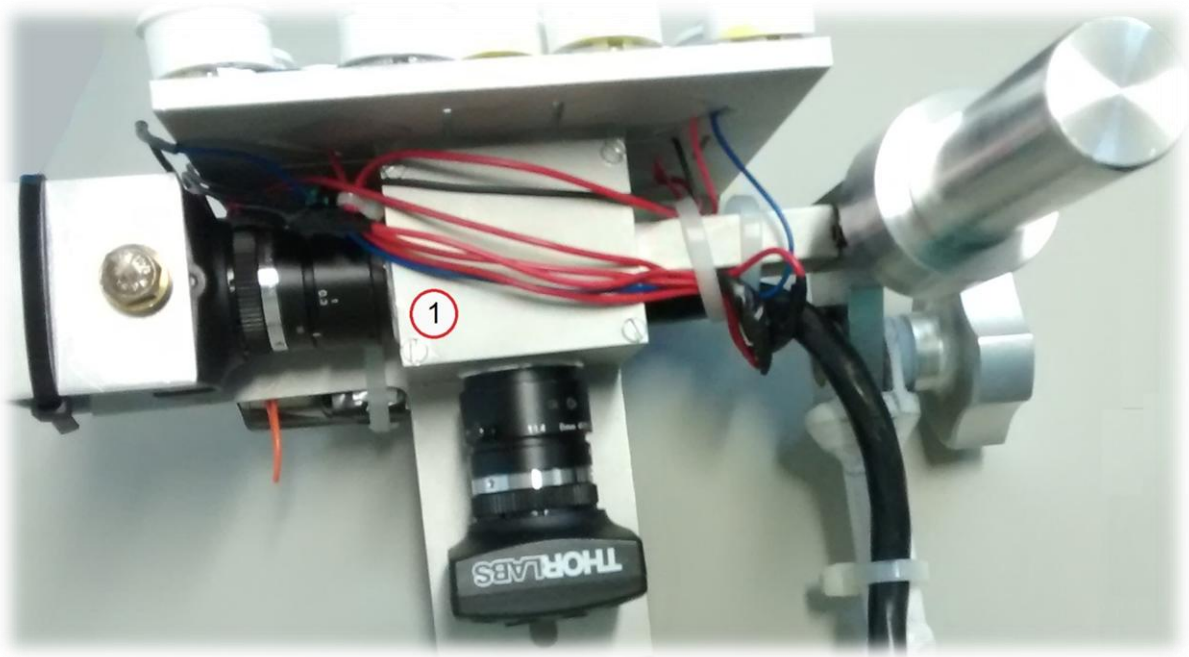


Figura 11 - Vista superior do sistema com câmeras e cubo (1) onde está alojado o espelho dicróico.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para que a luz dos LEDs infravermelho não interfira no funcionamento do equipamento, este sistema conta com filtros para seleção das bandas desejadas. A câmera colorida, responsável por captar a reflexão da luz visível, conta com um filtro passa-baixa de 680 nm da marca Edmund Optics[®]. Desta forma a câmera capta a banda visível, mas não sofre interferência dos feixes provenientes dos LEDs infravermelho que eventualmente sejam refletidos pelo espelho dicróico. A câmera preto e branco, responsável por captar a luz infravermelha emitida pela fluorescência, conta com filtro passa-alta de 820 nm da marca Edmund Optics[®] que é responsável por barrar toda a luz retroespalhada dos LEDs que emitem em 780 nm.

As câmeras utilizadas são da marca *ThorLabs*[®], modelos DCC1545M e DCC1645C. A câmera DCC1545M possui alta sensibilidade na região do infravermelho e gera imagens em tons de cinza (preto e branco). A câmera DCC1645C possui sensibilidade na região visível e gera imagens coloridas. As câmeras são equipadas com lentes objetivas *ThorLabs*[®] capazes de realizar o ajuste de foco mas que não permitem o zoom. Os filtros são fixados a frente das lentes objetivas.

3.2.3 Sistema de fixação e suporte.

Os sistemas de iluminação e aquisição são acoplados através da fixação com a utilização de parafusos, de forma a manter o menor volume possível. Todas as peças mecânicas deste sistema foram projetadas no software *Inventor*[®] e confeccionadas pela oficina mecânica do IFSC. Os sistemas acoplados possuem uma haste para fixação em um suporte e também um pino para fixação de uma manopla com envoltório descartável e engate rápido para utilização em campo cirúrgico, permitindo ao médico operar o equipamento sem contaminar o campo cirúrgico (Figura 12). A manopla é a que os cirurgiões usualmente empregam para a apreensão do sistema de iluminação do campo cirúrgico e é a única parte do sistema em contato com o operador. Anterior ao seu uso, a manopla é protegida com um saco de plástico esterilizado, evitando qualquer tipo de contaminação cruzada.

A haste proveniente dos dois sistemas é fixada a um pedestal com rodas que possui 6 graus de liberdade, permitindo ao operador movimentar o equipamento da maneira como desejar. O pedestal possui 5 rodas, onde foi fixada uma anilha de 20 kg para aumentar o peso do lastro, dando mais estabilidade ao sistema. Ele também conta com sistema de molas, capaz de equilibrar o peso do equipamento que está fixado neutralizando o peso do sistema, que possui a capacidade de variar sua altura de 70 a 220 cm.

Desta forma, quando o cirurgião posiciona o equipamento na posição que desejar e o sistema permanece estático para a aquisição das imagens.

Um monitor de 7 polegadas foi fixado ao pedestal para mostrar a imagem gerada pelo computador. Assim o cirurgião observa a imagem gerada exatamente acima do paciente, sem a necessidade de olhar para os lados, aumentando a concentração e o seu conforto.

As fontes comerciais que alimentam o conjunto de iluminação foram fixadas no pedestal, juntamente com a fonte que alimenta o monitor de 7 polegadas.

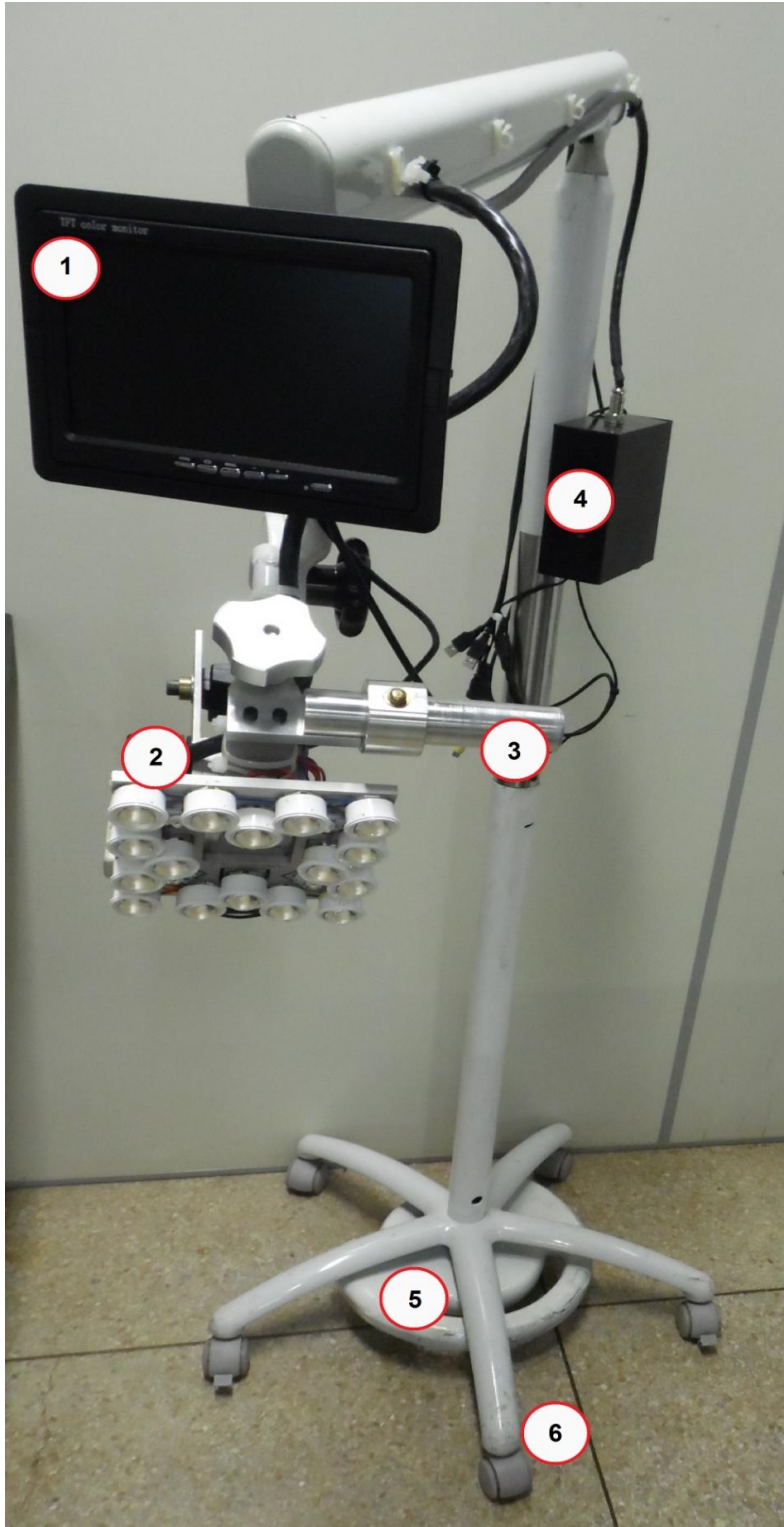


Figura 12 – Equipamento acoplado ao suporte. Numeração indica os componentes do sistema, sendo 1, o monitor de 7 polegadas; 2, sistemas de iluminação e aquisição acoplados; 3, haste para fixação de puxador descartável com engate rápido; 4, fontes para alimentação dos LEDs e do monitor de 7 polegadas; 5, anilha de 20 Kg fixada na base para aumento de lastro e 6, pés com rodas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2.4 Computador.

O computador utilizado para o processamento do sinal recebido é um Intel NUC Centrum, com processador Core I3 que possui a capacidade operacional de um desktop, mas com dimensões reduzidas, possibilitando sua fixação atrás do monitor de vídeo. O NUC conta com duas saídas de vídeo digital. Os dados captados pelas câmeras são enviados através de cabos USB de 5 metros de comprimento, dando maior liberdade ao equipamento, que pode se distanciar do computador.

A aquisição é feita pelo computador através de software disponibilizado pela fabricante das câmeras, sendo capaz de operar as duas câmeras simultaneamente.

O monitor possui 18 polegadas e conta com tela sensível ao toque, facilitando a operação no centro cirúrgico. A entrada é VGA, sendo necessária a conversão do sinal digital para analógico através de um adaptador.

O monitor de 7 polegadas conta apenas com entrada analógica do padrão auxiliar de vídeo (AV) e por isso foi necessária a utilização de um sistema de conversão de vídeo da – *COMTAC – Santa Rita do Sapucaí, MG* que permite converter o sinal digital em várias saídas analógicas, inclusive a saída AV. Este sistema conversor necessita de alimentação de 5 V, fornecida pela saída USB do NUC.

Atrás do monitor foi fixada uma placa onde está alocado o NUC, uma caixa de distribuição de energia e o sistema de distribuição de vídeo.

Este protótipo é dividido em duas partes, sendo uma delas das dimensões de um monitor de 17 polegadas, com suporte traseiro e o NUC com massa aproximada de 5 Kg e a outra parte é composta por todo o sistema de aquisição, com massa aproximada de 35 Kg e altura de máxima de 220 cm. Como o pedestal possui rodas, o sistema pode ser facilmente transportado por diferentes salas no centro cirúrgico do hospital. Este sistema é desmontável rapidamente para facilitar viagens e manutenção.

3.2.5 Software

A interface para uso do sistema e o tratamento das imagens é feito utilizando uma rotina construída na plataforma LabView®.

A rotina foi desenvolvida pelos alunos Pablo Aurelio Gómez García (intercambista de iniciação científica, ETSIA (UPM) Madrid - Espanha) e Ramon Gabriel Teixeira Rosa (doutorando do IFSC-USP) e faz a aquisição das imagens obtidas pelas câmeras e realiza o tratamento necessário para que possa ser visualizada e gravada pelo cirurgião em tempo real.

Ambas as câmeras recebem regulagem na taxa de aquisição, que é mantida em 20 frames por segundo, e no caso da câmera colorida, recebe controle RGB. A imagem infravermelha é projetada na tela para que o cirurgião possa observar a fluorescência sem tratamento do software. Essa visualização é importante, pois essa imagem é muito mais sensível à fluorescência, possibilitando a visualização de menores intensidades da fluorescência, essencial para a rápida detecção do LS.

A câmera colorida conta também controle RGB para aumentar o conforto do médico ao visualizar a imagem no monitor auxiliar.

A câmera infravermelha também recebe tratamento onde é aumentado o contraste, a imagem eventualmente sofre rotação e controle de zoom, a fim de igualar os campos das câmeras e permitir a sobreposição das imagens. Finalmente a imagem passa por um filtro de intensidade onde apenas a imagem mais intensa é mantida e então esta imagem é sobreposta à imagem visível, gerando a imagem final colorida com a marcação da região onde ocorre a fluorescência da ICG.

3.3 Validação do equipamento

Para validar o equipamento, foram realizados testes *ex vivo* e *in vivo*, com o intuito de assegurar a capacidade operacional do sistema. Os estudos *ex vivo* foram realizados em músculo peitoral de frango convencional para consumo, posteriormente testes *in vivo* foram realizados camundongos e finalmente, testes clínicos em pacientes do Hospital de Câncer de Barretos.

3.3.1 Experimentação *ex vivo*.

Os testes iniciais do equipamento foram realizados *ex vivo* em músculo peitoral de frango, pois apresenta um coeficiente de absorção na região do infravermelho próximo similar ao do músculo humano. O sistema de detecção foi posicionado sobre o músculo a uma distância de 14 cm da superfície do tecido e o software acionado para a gravação de um vídeo. Foi injetado 1 ml de soro fisiológico com ICG diluída na concentração de 200 μ M a uma profundidade de aproximadamente 13 mm e foi possível após cerca de 5 s a distribuição do corante na profundidade e atingindo a superfície do músculo (Figura 13).

Nestes testes foi possível calibrar o posicionamento das câmeras e do espelho dicróico. Também foi possível verificar a homogeneidade da iluminação e testar a funcionalidade da rotina em *LabView*[®], especialmente da geração das imagens sobrepostas e a resposta em tempo real do sistema. Além disso, foi testado se o sistema apresentava sensibilidade suficiente para detectar a concentração de ICG usualmente injetada nos pacientes.

A regulagem inicial do sistema foi bastante complexa, sendo necessário implementar a funcionalidade de rotacionar, transladar e cortar a imagem na rotina em *LabView*[®] para que a sobreposição de imagens ocorresse com maior precisão. Estes detalhes consomem mais memória do computador, tornando a geração de imagens mais lenta e por isso foi necessário reduzir a taxa de frames por segundo, reduzindo o consumo de memória.

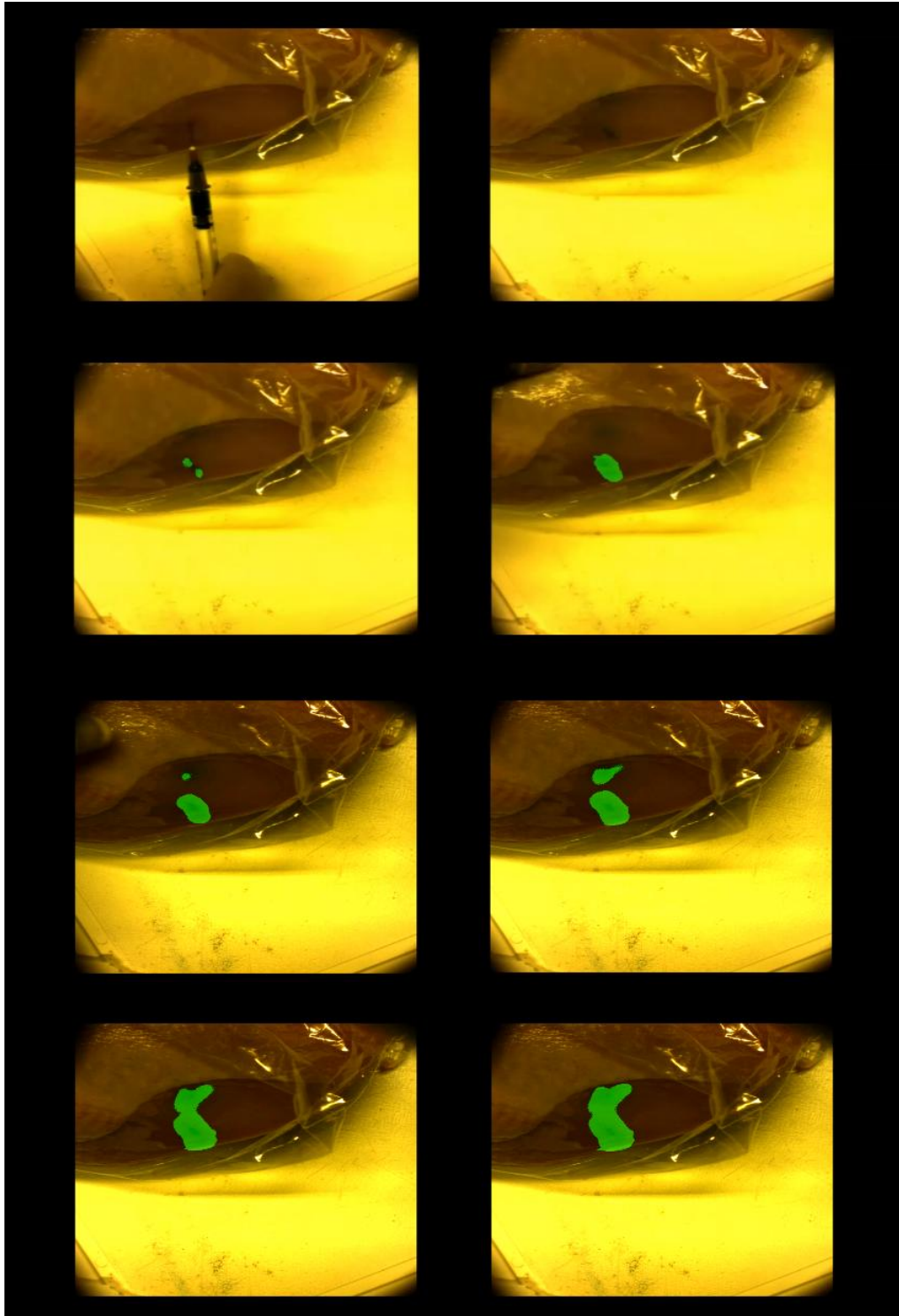


Figura 13 - Frames do vídeo realizado em um músculo peitoral de frango. Na sequência das imagens, inicialmente a injeção para entrega da solução de indocianina verde e a detecção da fluorescência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.2 Experimentação piloto *in vivo*

A experimentação *in vivo* ocorreu com teste piloto em 2 camundongos fêmea da linhagem *SKH1 Hairless Mouse*, com 9 semanas e 25 g cada, que participavam do projeto de pesquisa da doutoranda Mariana Carreira Geralde que receberam uma gota de ICG na concentração de 200 µg/mL diluída em solução salina no nostrum esquerdo para tratamento de pneumonia através de terapia fotodinâmica. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, sob protocolo CEUA/FCF/CAr nº 30/2013, Anexo B. Nesse experimento, buscava-se determinar o tempo de espera até a detecção da indocianina no pulmão esquerdo do camundongo e o comportamento de distribuição. Os animais foram sedados com uma combinação de xilazina (0,1 mg/kg) e ketamina (100 mg/kg) durante todo o procedimento. Ao final do período de análise do pulmão, o animal foi sacrificado com uma overdose de anestésico injetado no coração e uma laparotomia realizada para acesso e visualização direta dos órgãos com o sistema.

O experimento permitiu verificar que o equipamento estava funcionando de maneira adequada, com as câmeras e espelho dicróico devidamente calibrados, permitindo visualizar a fluorescência ocorrendo com precisão sobre a imagem colorida do tecido irradiado, e com o software operando sem travamentos. Um importante teste de uso do equipamento foi o efeito da respiração (movimentação do tecido imageado) na visualização e sobreposição das imagens no software (Figura 14).

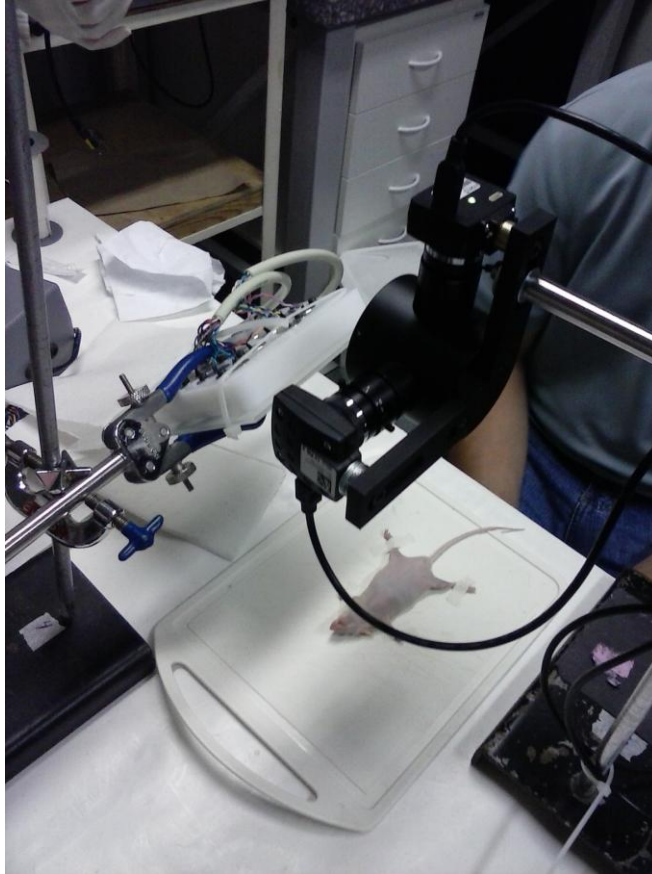


Figura 14 - Sistema em uso para teste piloto *in vivo*.
Fonte: Elaborada pelo autor.

O procedimento com o primeiro camundongo ocorreu com apenas a câmera infravermelho, gerando imagem em preto e branco. Os Lasers operavam em baixa potência, o sinal de fluorescência era muito baixo, resultando em uma imagem de baixa qualidade. No entanto, ainda assim, foi possível observar a fluorescência da indocianina verde no pulmão esquerdo do animal, tanto pela superfície lateral e dorsal, e em todo o momento, a fluorescência na região do focinho e da boca, locais próximos a administração do marcador (figura 15).

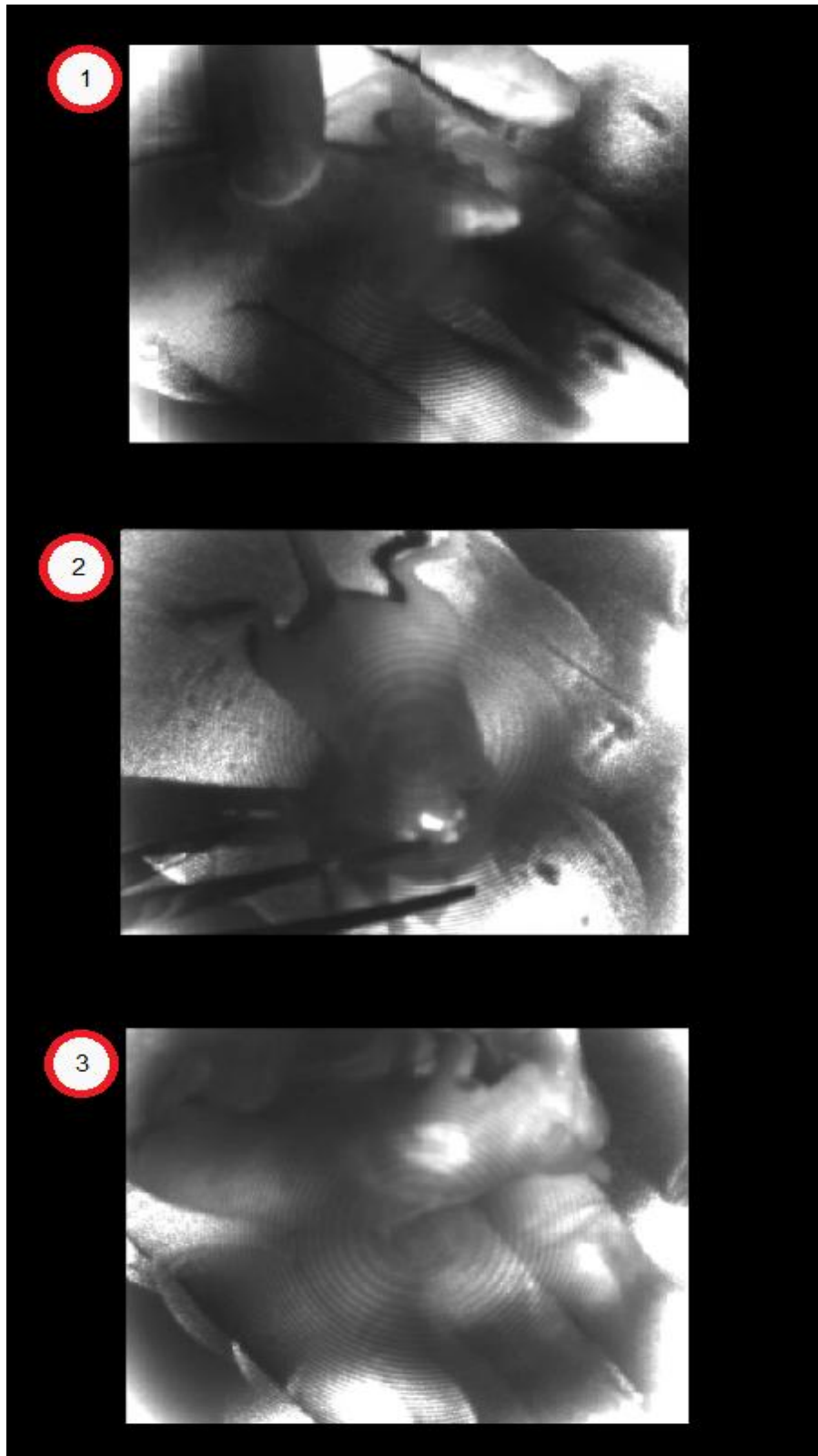


Figura 15 – Primeiro procedimento com camundongo. (1) Fluorescência no focinho e na boca. (2) Fluorescência no pulmão através do dorso. (3) Fluorescência no pulmão pela vista lateral.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os testes com o segundo camundongo já contavam com o sistema completo, gerando imagens coloridas e sobrepostas, com qualidade significativamente superior ao experimento anterior. Embora os avanços significativos, é possível observar ao redor do animal a presença de borda marcada pelo software como sendo fluorescente. Esta marcação ocorre por grande sensibilidade do software e pelo papel abaixo do animal, que reflete a iluminação.

Neste experimento foi possível verificar fluorescência do pulmão na região dorsal do animal, e após a abertura da caixa torácica, a confirmação de que o sinal era proveniente do pulmão esquerdo (Figura 16).

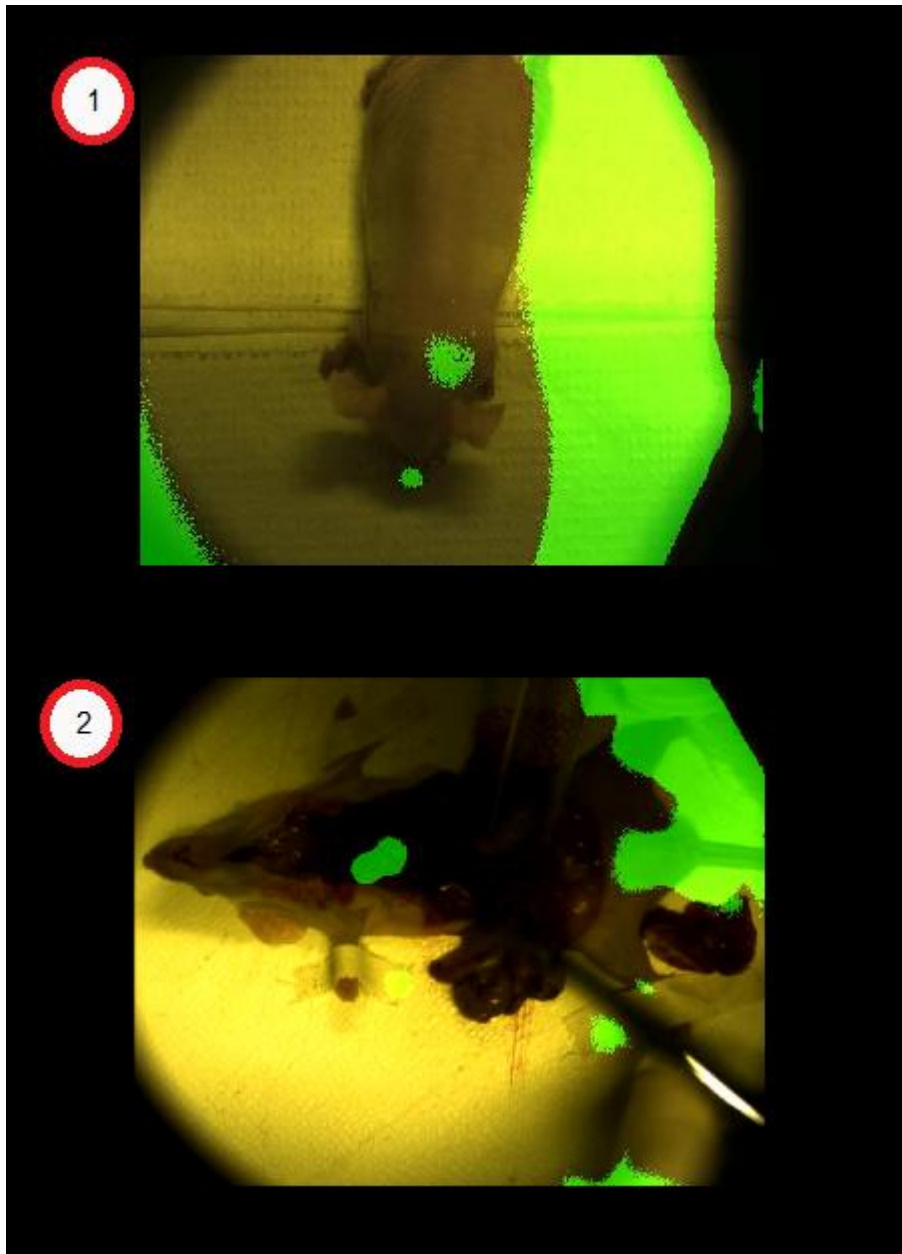


Figura 16 - Camundongo durante cirurgia, sendo (1) a fluorescência do pulmão após injeção de ICG e (2) fluorescência do pulmão durante laparotomia.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.3 Testes clínicos

Posteriormente, com o equipamento devidamente calibrado e validado, foram realizados testes clínicos no Hospital de Câncer de Barretos.

Todas as medidas ocorreram durante o procedimento cirúrgico para ressecção tumoral. O presente sistema foi testado para localização de linfonodo sentinela, em um mesmo projeto de pesquisa no qual o equipamento Hamamatsu

modelo C9830, que possui o mesmo método estava sendo realizado (processo do comitê de ética em pesquisas em humanos, CEP-HCB N° 792/2014, Anexo C.

Anteriormente a investigação por imagem, cerca de 1,6 mL de solução de indocianina verde diluída em soro fisiológico na concentração de 500 µM é injetada.

Nesse presente estudo clínico, a combinação das técnicas com radiofármaco e com fluorescência está sendo investigada.

O procedimento mais comum é que antes da cirurgia o paciente é submetido ao rastreamento do LS na medicina nuclear, com radiofármaco, onde os médicos daquela unidade marcam na pele do paciente a região onde está localizado o linfonodo LS. Já no centro cirúrgico com o paciente sedado, é injetado ao redor do tumor a solução de ICG.

Por ser um equipamento em desenvolvimento, o cirurgião busca o linfonodo sem dissecar o paciente, para testar a capacidade do sistema em localizar os linfonodos mesmo com a pele íntegra. Após esta primeira busca pelo linfonodo, o paciente é dissecado na região indicada pela medicina nuclear e o equipamento é novamente utilizado para buscar com precisão o LS, que ao ser localizado é dissecado e enviado para biópsia para verificar a necessidade da remoção total da bolsa linfonodal. Caso haja comprometimento deste primeiro linfonodo, ocorrerá a remoção total da bolsa linfonodal. Se o LS não estiver comprometido, há um forte indicativo de que não há metástase, sendo desnecessária a retirada completa dos linfonodos. (36)

Os testes no Hospital de Câncer de Barretos foram realizados por três equipes médicas. A primeira delas foi chefiada pelo Dr. André Lopes Carvalho, ainda com o primeiro protótipo. Neste primeiro momento acompanhamos 3 cirurgias de remoção de LS de câncer de língua. A segunda equipe, chefiada pelo Dr. Renato de Castro Capuzzo, deu seguimento aos testes com o equipamento em cirurgias de remoção de LS de câncer de língua. Nesta etapa foi utilizado e aprimorado o segundo protótipo, sendo possível acompanhar 8 cirurgias. A terceira equipe, chefiada pelo Dr. Carlos Eduardo Barbosa Carvalho, utilizou o equipamento para a detecção e remoção de LS de melanoma. Foram realizadas 6 cirurgias, todas empregando o segundo protótipo (Figura 17).



Figura 17 - Equipamento sendo utilizado durante cirurgia para localização e remoção de LS de melanoma.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro protótipo operou satisfatoriamente quando bem calibrado, o sistema de detecção localizou os linfonodos com sensibilidade similar ao equipamento comercial. O equipamento permitia rotacionar o espelho dicróico para buscar a melhor sobreposição. Esse sistema foi bastante útil nas primeiras calibrações quando ajustávamos o sistema para o melhor rendimento, pois facilitou o processo de determinar qual o melhor ângulo para a aquisição de imagens. No uso cotidiano, porém, mostrou-se pouco eficiente ao não fixar o espelho com a precisão e rigidez devida, descalibrando com facilidade. Esta característica posteriormente inviabilizou sua utilização clínica, já que muitas vezes o desalinhamento do espelho e do conjunto de câmeras ocorria durante o transporte até o hospital e levava até duas horas para ser refeito, inviabilizando a utilização em procedimentos cirúrgicos.

Outros problemas ocorreram com a homogeneidade da iluminação Laser, que por possuir grande variabilidade da intensidade incidente no tecido, acabou prejudicando a excitação do corante. Assim, o cirurgião precisava variar a posição do protótipo para que grandes intensidades luminosas atingissem o tecido e gerassem boas imagens de fluorescência.

Na Figura 18 é possível observar a sequência de imagens da cirurgia para localização e retirada do LS utilizando o primeiro protótipo. Verifica-se que o linfonodo parece diminuir de tamanho, este fenômeno não ocorre pela degradação da ICG, mas pela variação de intensidade luminosa, que diminui consideravelmente com a movimentação do sistema. Acompanhando a sequência de imagens, é possível notar que após a retirada do primeiro LS, foi possível localizar um segundo LS, que também foi retirado para análise.

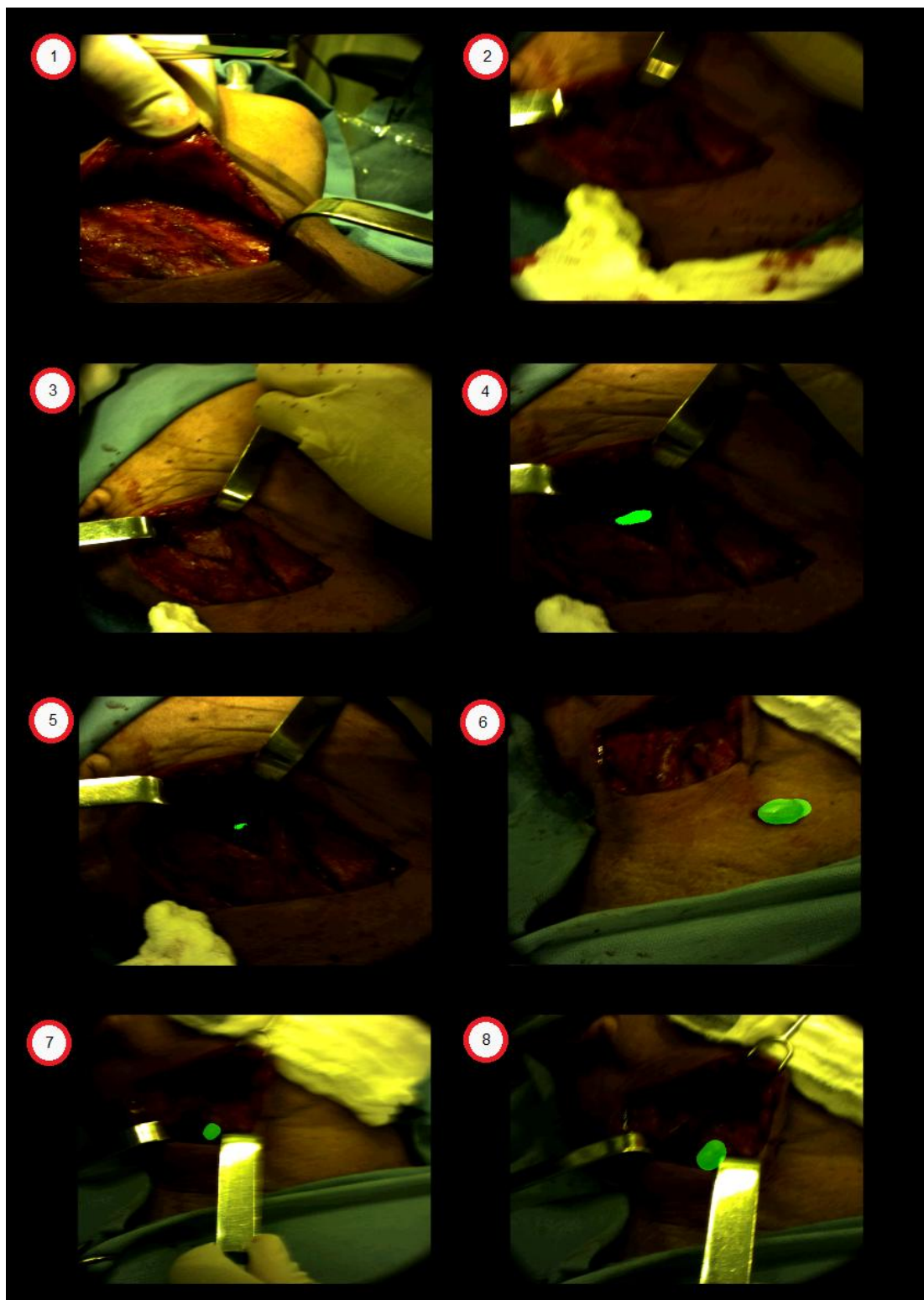


Figura 18 - Sequência de imagens da localização e retirada de 2 LS. Nas imagens de 1 a 3 é possível verificar o tecido sendo dissecado. Imagem 4 mostra o LS. Imagem 5 mostra o mesmo linfonodo com brilho reduzido, por conta da mudança de posição do equipamento. Imagem 6 mostra o linfonodo após sua retirada, fluorescendo sobre o tecido íntegro do paciente. Imagens 7 e 8 mostram o segundo LS localizado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com o aperfeiçoamento do sistema para sanar estes problemas e trazer outras melhorias, grandes alterações surgiram, sendo necessário o desenvolvimento de um segundo protótipo, para atender a demanda dos médicos parceiros, como aumento da sensibilidade e da resolução das câmeras, melhora na homogeneidade da iluminação, melhora na tela para visualização das imagens, aumento da robustez do sistema de aquisição com a fixação do espelho e das câmeras com maior precisão e firmeza, reduzindo significativamente a necessidade de calibração do sistema. Assim o espelho dicróico é mantido, no segundo protótipo, em um ângulo fixo, impedindo que sofra movimentação durante o transporte.

A iluminação, agora a LED, é muito mais homogênea. Por isso o sistema pode ficar fixo, sem o risco de sombreamento na região estudada.

As imagens do segundo protótipo mostraram ser muito mais homogêneas, com maior sensibilidade e maior fluidez, tais avanços permitiram a comparação com o modelo comercial.

O sistema passou a contar com pedestal para apoio, permitindo ao médico estabilizar o equipamento na posição desejada com pouquíssimo esforço, já que o sistema de mola compensa o peso do sistema, mantendo-o estático. O sistema, que conta com 6 graus de liberdade, permite rotação total, favorecendo a aquisição de imagens de regiões de difícil acesso, como virilha e axila (Figura 19).

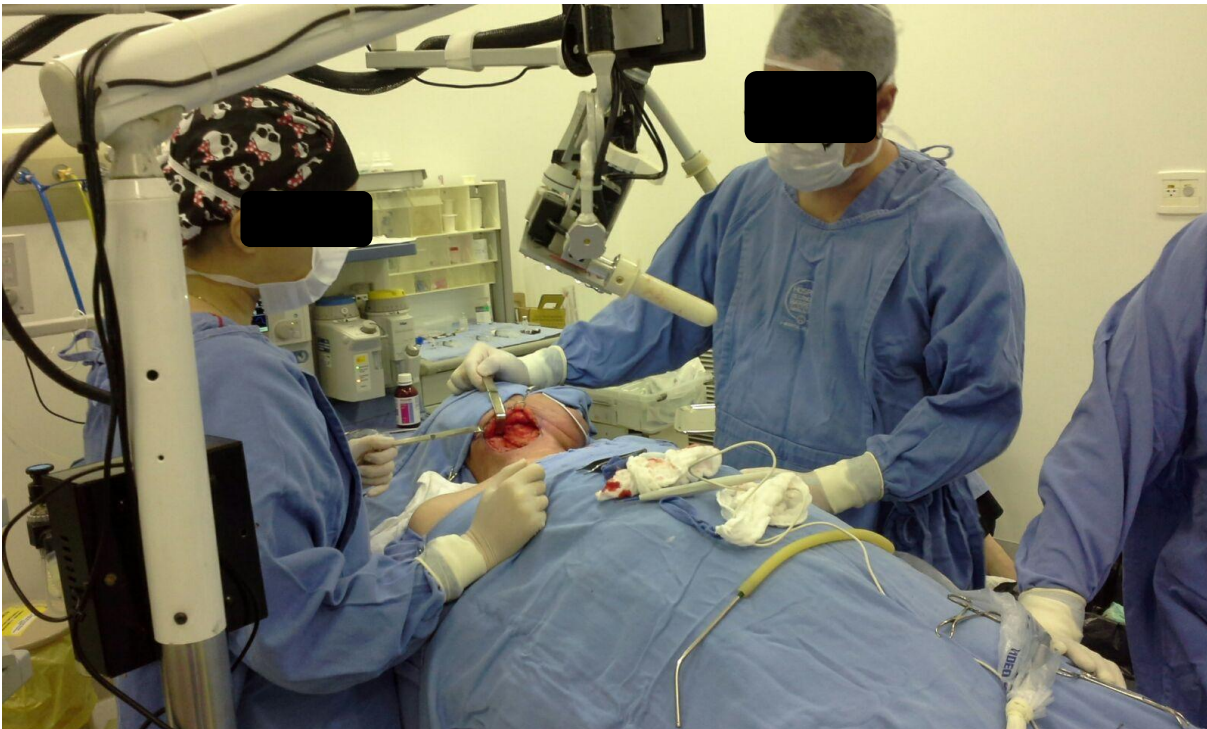


Figura 19 - O sistema durante a cirurgia permanece em equilíbrio de forma estática, sem a necessidade de apoio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O protótipo desenvolvido alcançou resultados similares ao do equipamento comercial, com a vantagem de fornecer imagens em preto e branco e também coloridas, de acordo com a solicitação dos nossos colaboradores. A comodidade do seu uso, a partir da visualização na posição cirúrgica, foi uma das vantagens observadas. No entanto, seu maior diferencial é o baixo custo, já que o custo para construir o equipamento é da ordem de US\$ 5000,00, gravação das imagens em fotos e vídeos, suporte com rodas que mantém o equipamento estático quando necessário, porém com total liberdade de movimentação e a geração de imagens em preto e branco e colorida.

A vantagem na imagem em preto e branco é o maior contraste, a maior sensibilidade e conseqüente facilidade do cirurgião em identificar uma região de fluorescência precocemente, além de não estar suscetível aos possíveis erros do software que faz a sobreposição. Por outro lado, a imagem colorida auxilia o cirurgião durante a dissecação do tecido em busca do linfonodo, facilitando a diferenciação dos tecidos, pois apresenta uma imagem similar ao que observa a

olho nu. Por possuir vantagens e desvantagens, o equipamento permite a visualização e gravação das duas imagens simultaneamente.

Na Figura 20 é apresentado o registro de uma cirurgia para retirada de LS de câncer de língua utilizando o segundo protótipo.

Neste tipo de cirurgia, o LS frequentemente está na região do pescoço, posterior ao músculo esternocleidomastoideo, que é um músculo espesso. Esta localização impossibilita a localização pelo método de fluorescência. Por este motivo o médico é guiado pelo marcador radioativo e o paciente tem o tecido dissecado até ultrapassar o músculo. Uma vez dissecado o músculo, o método de fluorescência passa a ser utilizado para buscar com precisão o LS que encontra com precisão os LS, marcando sua localização com a cor verde.

A Figura 20 também mostra o mesmo LS sendo detectado pela câmera infravermelha. Este diagnóstico acaba sendo anterior ao do sistema colorido, já que não é necessário que a ICG apresente brilho suficiente para o software marcar sua fluorescência.

Ao redor do paciente é possível observar regiões marcadas como fluorescentes. Nesta região encontram-se os campos cirúrgicos, tecidos estéreis que são tratados quimicamente para este fim e que por esta razão possuem substâncias químicas que acabam refletindo a iluminação recebida, gerando esta falsa indicação de LS.

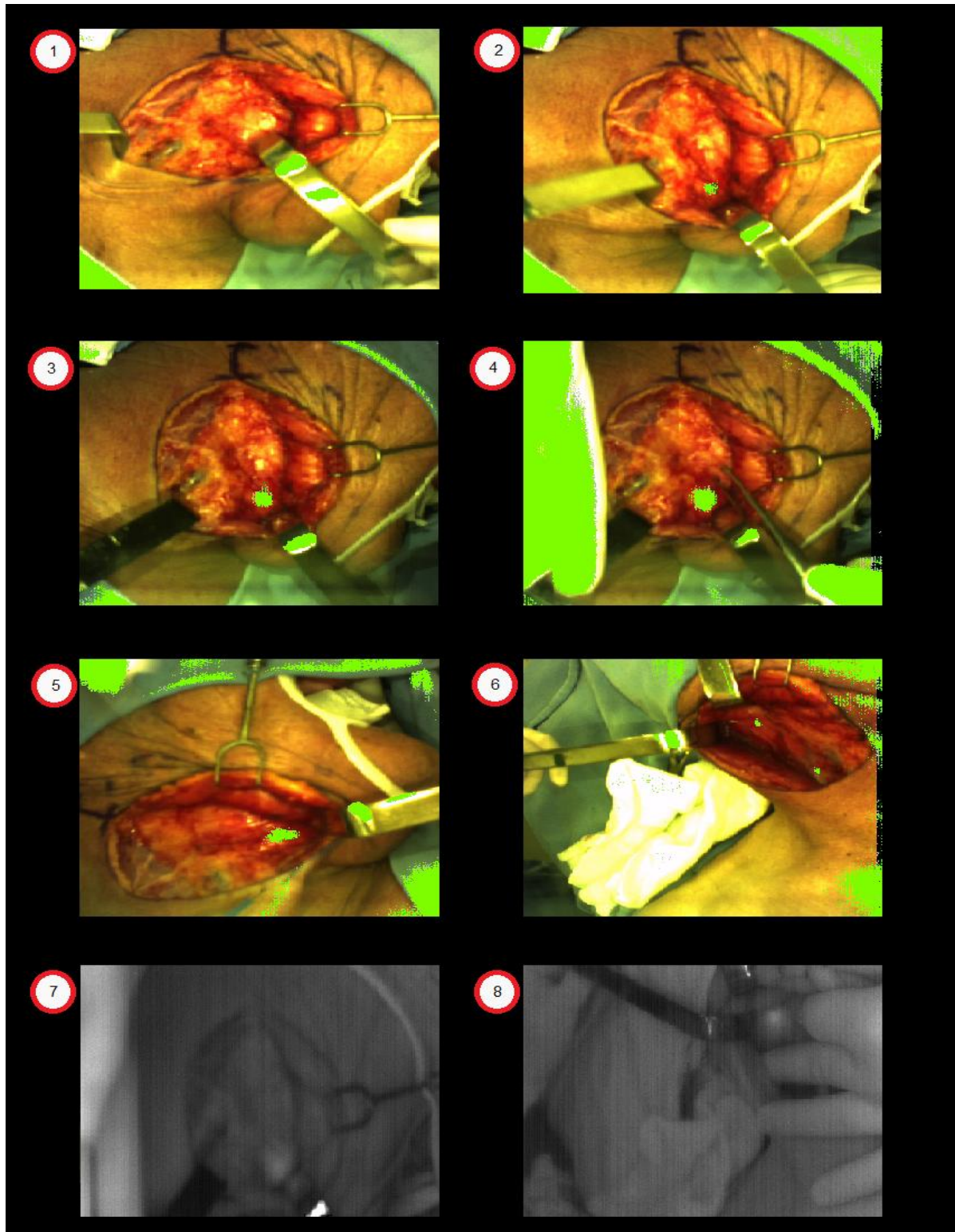


Figura 20 - Cirurgia de pescoço para localização e retirada de LS de tumor de língua. (1) Tecido dissecado após indicação da medicina nuclear. (2 - 5) Início e aumento gradual da fluorescência do primeiro linfonodo. (6) Surgimento de mais 2 linfonodos após a retirada do primeiro. (7 e 8) Imagem em preto e branco da fluorescência do primeiro linfonodo. Fonte: Elaborada pelo autor.

Além da localização de LS em pescoço, o equipamento também foi utilizado para localizar LS de melanoma. LS de melanoma pode estar localizado a uma distância maior que o LS de língua. Neste tipo de cirurgia, o equipamento deve se movimentar muito mais, exigindo versatilidade do mesmo.

A figura 21 demonstra cirurgia onde o paciente apresenta câncer na panturrilha e o LS ao tecido com câncer foi localizado na virilha. Geralmente o LS está mais superficial, podendo ser possível localizar o LS apenas com o uso da técnica de fluorescência.

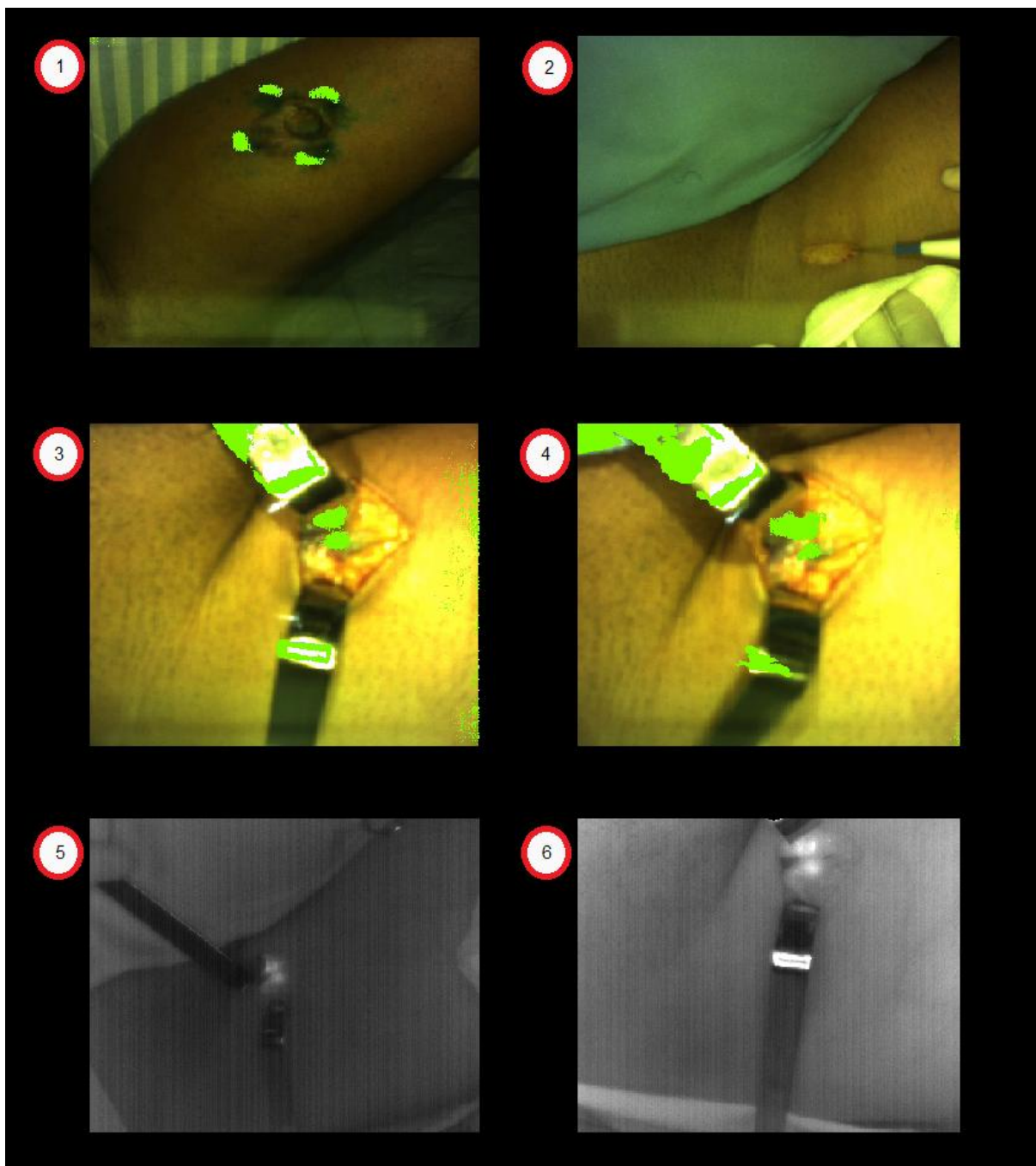


Figura 21 - Cirurgia para localização e retirada de LS de melanoma na região da panturrilha. (1) Região onde a ICG foi injetada. (2) Área dissecada. (3 e 4) LS fluorescendo. (6 e 7) LS fluorescendo, com visão preto e branco.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Outra cirurgia de retirada de LS é demonstrada na Figura 22, onde a paciente apresentava uma lesão de melanoma na região anterior da perna. O LS encontrado estava localizado na virilha, que é uma região rica em gânglios linfáticos.

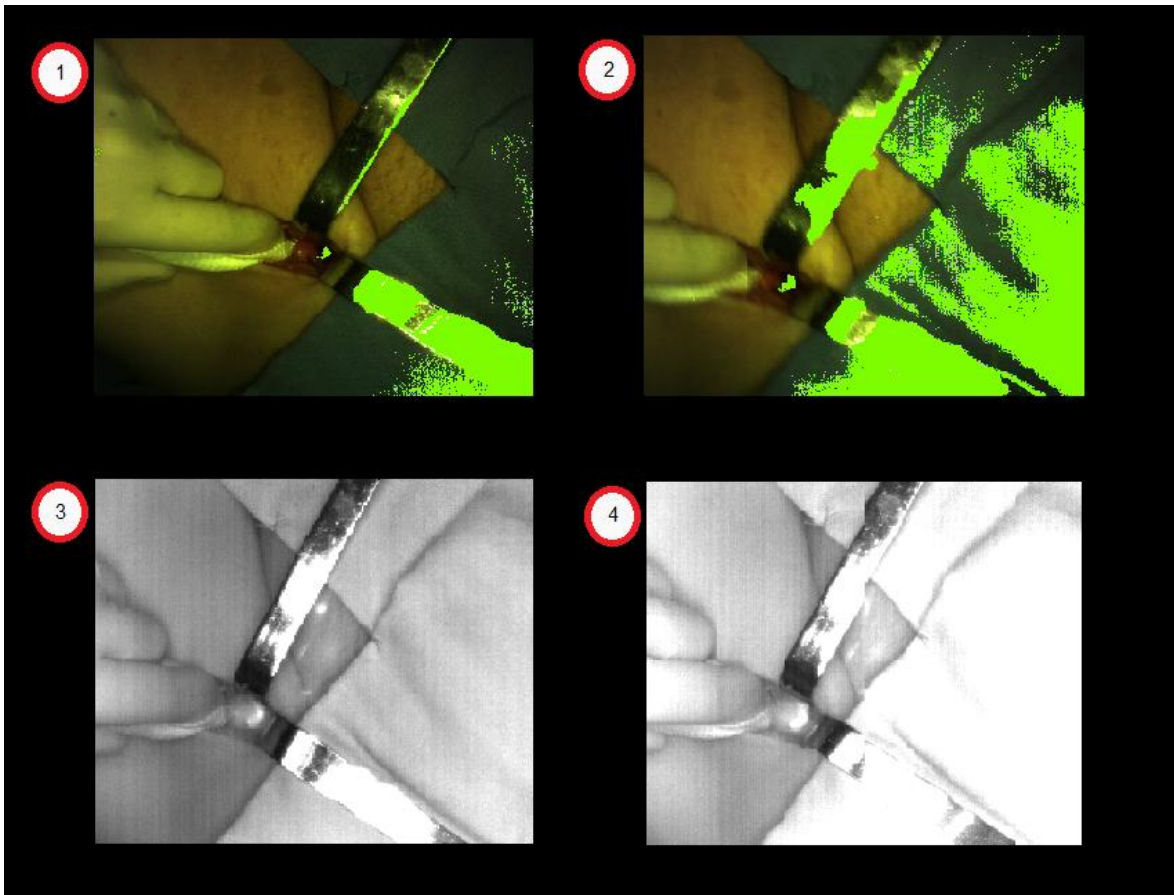


Figura 22 - Cirurgia para localização e retirada de LS de melanoma na região da canela. (1 e 2) LS fluorescento. (3 e 4) mesmo sistema fuorescendo, mas apenas com imagens preto e branco.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nestes dois últimos casos de melanoma, existe a necessidade do sistema de detecção apresentar uma fácil movimentação, uma vez que após injetada a indocianina verde, a drenagem pela rede linfática é rápida e a área a ser coberta pela investigação é grande. Se o operador não puder rapidamente movimentar o sistema, a detecção do LS pode ser comprometida pela marcação do segundo e demais linfonodos regionais. O cirurgião da equipe conseguiu manipular e posicionar adequadamente o sistema montado e o LS foi identificado em ambos os casos.

Apesar dos resultados bastante promissores apresentados nos testes realizados em pacientes, o segundo protótipo ainda pode sofrer pequenas modificações para aumentar sua performance. Alguns ajustes em sua alimentação elétrica, para aumentar a tensão de saída da fonte, buscando aumentar a corrente elétrica que circula pelos LEDs e conseqüentemente a potência óptica resultante de cada diodo podem ser implementados. No software de processamento de imagens,

algumas alterações precisam ser feitas, buscando aumentar a velocidade de processamento e estabilidade do programa que eventualmente apresenta problemas como travamentos e reinicializações indevidas, causados pelo uso excessivo de memória RAM. Estes problemas não impediram seu excelente desempenho, gerando imagens precisas, com a possibilidade de o cirurgião visualizar simultaneamente a imagem em preto e branco e a imagem colorida.

Outro ajuste necessário é quanto ao corte do espelho dicróico, já que o equipamento não funciona quando as luzes do centro cirúrgico estão acesas. Este problema é compartilhado com o equipamento comercial, que opera somente com o sistema de iluminação do centro cirúrgico desligado. Este problema não acontecia no primeiro protótipo e foi atribuído à mudança no corte do espelho.

Os filtros e o software necessitam ser reavaliados para aumentar o contraste da câmera infravermelha. Este aumento beneficiaria a visualização da fluorescência na imagem preto e branco e também permitiria melhorar a percepção do software na coloração verde da imagem colorida.

A retirada de dois LEDs infravermelho aumenta a tensão e a corrente nos demais LEDs, e com isso a potência deve aumentar consideravelmente. Além disso, um novo conjunto de lentes pode convergir ainda mais o feixe, implicando em um aumento maior da potência.

Embora o equipamento necessite de alterações em seu software e também a substituição de alguns componentes, como o espelho dicróico, o sistema de modo geral tem atingido seu objetivo.

Com este sistema, é possível determinar com precisão similar ao do equipamento comercial, a localização dos linfonodos sentinela de determinada lesão. Tal característica permite assegurar que o sistema possui as características que o constituem um sistema alternativo ao equipamento comercial, embora novos estudos devam ser implementados para garantir a segurança dos médicos e pacientes. Os resultados obtidos com o uso deste protótipo estão alinhados com a literatura, que ao utilizar equipamentos comerciais encontra resultados similares na excitação, fluorescência, captação, processamento e precisão das imagens obtidas, demonstrando que as características do protótipo estão adequadas para o uso clínico. (37-38)

Como vantagens em relação ao equipamento comercial, podem ser citados: a) a presença de um monitor auxiliar logo acima do conjunto de câmeras que facilitou a visualização da imagem, b) o sistema pode ser operado pelo próprio cirurgião, pois o equipamento conta com suporte para manopla estéril, c) fácil manipulação e rápido posicionamento, o equipamento permanece estático ao ser sustentado pelo pedestal que permite 6 graus de liberdade e que mantém o equilíbrio em qualquer posição que o equipamento é deixado, d) visualização da imagem de preto e branco e da imagem colorida com a fluorescência, priorizando a detecção precoce do LS, e e) menor custo.

Em cirurgias como a de cabeça e pescoço, é indicado mesclar seu uso com o padrão ouro, que utiliza marcadores radioativos, já que a profundidade dos linfonodos pode inviabilizar a localização dos mesmos.

Em cirurgias em que se espera encontrar os linfonodos na região axilar ou na virilha, os ajustes pretendidos podem possibilitar utilizar o equipamento sem o auxílio da medicina nuclear, já que estes linfonodos estão superficiais, facilitando a fluorescência.

5 CONCLUSÕES

Um sistema de imagem de campo amplo de fluorescência para a detecção do linfonodo sentinela foi desenvolvido e testado. O segundo protótipo montado a base de LEDs foi utilizado em 8 cirurgias para ressecção de tumores em cabeça e pescoço e em 6 de melanoma. A resposta do sistema foi semelhante ao equipamento comercialmente disponível considerando a sensibilidade de detecção e qualidade da imagem. O presente sistema apresentou como principais vantagens a visualização mais confortável para o cirurgião em uma imagem colorida sobreposta com a de fluorescência e o menor custo final. Alguns ajustes no software, assim como algumas modificações na iluminação e nos componentes ópticos podem ser realizados para melhorar o desempenho do sistema atual.

REFERÊNCIAS

- 1 ALBERTS, B.; et al. **Biologia molecular da célula**. São Paulo: Artmed Editora, 2008.
- 2 WEINBERG, R.A. **A biologia do câncer**. São Paulo: Artmed, 2008.
- 3 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Barueri: MANOLE, 1997.
- 4 GUYTON, A. **Fisiologia humana**. São Paulo; Guanabara Koogan, 1988.
- 5 HALL, J.E.; GUYTON, A.C. **Tratado de fisiologia médica**. 12ed. São Paulo: Elsevier Health Sciencesl, 2011
- 6 WORLD HEALTH ORGANIZATION. National Cancer Control Programmes. **Policies and managerial guidelines**. 2nd. ed. Geneva: 2002. v. 1, p. 1–180.
- 7 WHEELER, C. Wide variation in cancer deaths mapped by congressional district. **Cancer**, v. 122, n. 1, p. 13–13, 2016.
- 8 SIEGEL, R.L. et al. Cancer statistics for hispanics / latinos, **Cancer**, v. 65, n. 6, p. 457–480, 2015.
- 9 COBANOGLU, B.H. et al. Nonmelanoma skin cancer of the head and neck. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v.20, n.4, p.455-471,2012.
- 10 SHAH, J.P.; PATEL, S.G. **Cancer of the head and neck**. Hamilton: BC Decker Inc., 2001.v.1.
- 11 SILVERMAN, S. **Oral cancer**. Hamilton: BC Decker Inc., 2003.v.1.
- 12 CÂNCER de boca. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=324>. Acesso em: 01 01. 2016.
- 13 RIVITTI, E.A. **Manual de dermatologia clínica**. São Paulo: Artes Médicas Editora, 2014.
- 14 WAINSTEIN, A.J.A.; BELFORT, F.A. Conduta para o melanoma cutâneo. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 31, n. 3, 2004.
- 15 DIRETRIZES diagnósticas e terapêuticas do melanoma maligno cutâneo. Brasília, 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0357_08_04_2013.html>. Acesso em: 31 12. 2015.

- 16 FUJISAWA, Y. et al. A custom-made, low-cost intraoperative fluorescence navigation system with indocyanine green for sentinel lymph node biopsy in skin cancer. **Dermatology**, v. 222, n. 3, p. 261–8, 2011.
- 17 SCHOLS, R.M. et al. Near-infrared fluorescence imaging for real-time intraoperative anatomical guidance in minimally invasive surgery : a systematic review of the literature. **World Journal of Surgery**, p. 1069–1079, 2015.
- 18 PRIETO, V.G.; REED, J.A. Sentinel lymph node biopsy in melanoma. **Cancer Journal**, v. 18, n. 2, 185–191, 2012.
- 19 BOLAND, G.; GERSHENWALD, J. Sentinel lymph node biopsy in melanoma. **Cancer Journal**, v. 18, n. 2, p. 185–191, 2012.
- 20 PLANTE, M. et al. Gynecologic oncology sentinel node mapping with indocyanine green and endoscopic near-infrared fluorescence imaging in endometrial cancer . a pilot study and review of the literature. **Gynecologic Oncology**, v. 137, n. 3, p. 443–447, 2015.
- 21 LONG, E.D.; READ, J.R. Sentinel lymph node biopsy. **British Medical Journal**, v.329, n.7458, p.170, 2004.
- 22 MARSHALL, M. V. et al. Near-infrared fluorescence imaging in humans with indocyanine green: a review and update. **Open Surgical Oncology Journal**, v. 2, n. 2, p. 12–25, 2010.
- 23 CHU, M.; WAN, Y. Sentinel lymph node mapping using near-infrared fluorescent methylene blue. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 4, p. 455–459, 2009.
- 24 AOYAMA, K. et al. Sentinel lymph node biopsy for breast cancer patients using fluorescence navigation with indocyanine green. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 9, n. 1, p. 157, 2011.
- 25 QUADROS, L.G. DE A.; GEBRIM, L.H. A pesquisa do linfonodo sentinela para o câncer de mama na prática clínica do ginecologista brasileiro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.29, p.158-174,2007.
- 26 BROUWER, O.R. et al. Feasibility of sentinel node biopsy in head and neck melanoma using a hybrid radioactive and fluorescent tracer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 19, n. 6, p. 1988–94, 2012.
- 27 ALANDER, J.T. et al. A review of indocyanine green fluorescent 73 imaging in surgery. **International Journal of Biomedical Imaging**, v. 2012, p. 1–26, 2012.
- 28 PDE near infrared fluorescence imager C9830. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em:
<<http://www.hamamatsu.com/us/en/product/category/5002/5024/C9830/index.html>>. Acesso em: 01 01. 2016.

- 29 ONISHI, T. et al. Topical bFGF Improves Secondary Lymphedema through Lymphangiogenesis in a rat tail model. **Plastic and Reconstructive Surgery Global Open**, v. 2, n. 8, p. e196, 2014.
- 30 REINHART, M.B. et al. Indocyanine Green : historical context, current applications, and future considerations. **Surgical Innovation**, sept. 2015. 10p.
- 31 SEVICK-MURACA, E.M. et al. Imaging of lymph flow in breast cancer patients after microdose administration of a near-infrared fluorophore: feasibility study. **Radiology**, v. 246, n. 3, p. 734–741, 2008.
- 32 HARITOGLOU, C. et al. Light-absorbing properties and osmolarity of indocyanine-green depending on concentration and solvent medium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 44, n. 6, p. 2722–2729, 2003.
- 33 OH, Y. et al. Intraoperative fluorescence image-guided pulmonary segmentectomy. **Journal of Surgical Research**, v. 199, n. 2, p. 287–293, 2015.
- 34 NAKAMURA, Y. et al. Improvement of the sentinel lymph node detection rate of cervical sentinel lymph node biopsy using real-time fluorescence navigation with indocyanine green in head and neck skin cancer. **Journal of Dermatology**, v.40, n.6,p. 453–457, 2013.
- 35 YUJIN, O.H, et al. Intraoperative combined color and fluorescent images – based sentinel node mapping in the porcine lung : Comparison of indocyanine green with or without albumin premixing. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 146, n. 6, p. 1509–1515,2013.
- 36 SUMNER, W.E. et al. Implications of lymphatic drainage to unusual sentinel lymph node sites in patients with primary cutaneous melanoma. **Cancer**, v. 95, n. 2, p. 354–360, 2002.
- 37 TROYAN, S.L. et al. The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping. **Annals of Surgical Oncology**, v. 16, n. 10, p. 2943–2952, 2009.
- 38 GRAND, A.M. DE; FRANGIONI, J. V. An operational near-infrared fluorescence imaging system prototype for large animal surgery. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 2, n. 6, p. 553–562, 2003.

ANEXOS

Anexo A – Datasheet LEDs 780 nm.

HHE 深圳市汉华光电子有限公司
 SHEEN ZHEN HANHUA ELECTRONIC CO.,LTD
 地址：深圳市观澜镇环观南路易事达科技园 A 栋 5 楼 电话：0755-33693901
 网址：www.hanhualed.com 传真：0755-33693906

SPECIFICATION FOR APPROVAL

承 认 书

CUSTOMER'S CODE

客户代码 L029

DESCRIPTION

品 名 High Power Led Diode

SPECIFICATION

规 格 1W780

DATE

送样日期

PART NO.

本厂型号 HH-1WP278013-M

REFERENCE No.

档 案 号 G14294

NUMBER OF SAMPLE

送样数量

COPY OF ACKNOWLEDGEMENT

承认书份数

Approved By Customer	Qualified By	Form Designer
客 户 承 认	核 准	制 作

HHE 深圳市汉华光电子有限公司

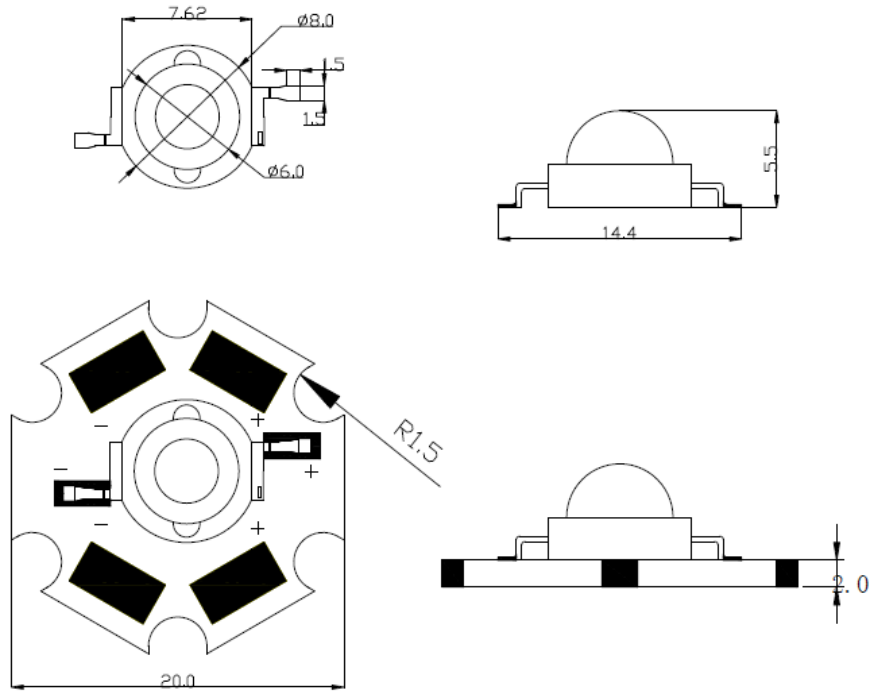
SHEEN ZHEN HANHUA ELECTRONIC CO.,LTD

地址：深圳市观澜镇环观南路易事达科技园 A 栋 5 楼 电话：0755-33693901

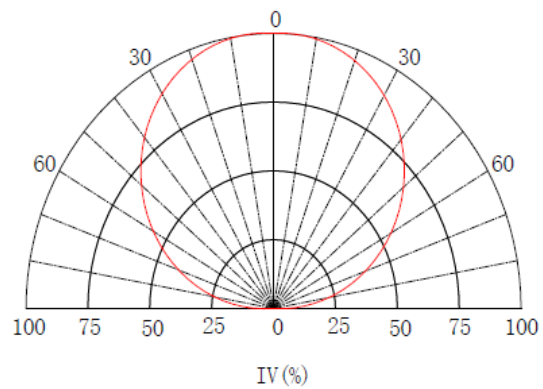
网址：www.hanhualed.com

传真：0755-33693906

Emitter 外型图：



Spatial Distribution



HHE

 深圳市汉华光电有限公司

SHEEN ZHEN HANHUA ELECTRONIC CO.,LTD

地址：深圳市观澜镇环观南路易事达科技园 A 栋 5 楼 电话：0755-33693901

网址：www.hanhualed.com

传真：0755-33693906

■ Absolute Maximum Rating 极限工作参数

Item 项目	Symbol 代号	Absolute Maximum Rating 极限工作参数	Unit 单位
Forward Current 正向电流	IF	350	mA
Peak Forward Current 瞬间脉冲电流	IFP	700	mA
Reverse Voltage 反向电压	VR	5	V
Power Dissipation 消耗功率	PD	\	mw
Electrostatic discharge 静电释放	ESD	10000	V
Operation Temperature 工作温度范围	TOPR	-25~+120	°C
Storage Temperature 存放温度范围	TSTG	-40~+80	°C
Lead Soldering Temperature 最高焊接温度	TSOL	300 °C for 5sec Max.	

*Ifp Conditions: Pulse Wide ≤ 10msec ≤ 1/10

瞬间脉冲电流

■ Typical Optical/Electrical Characteristics 光电特性参数

Item 项目	Symbol 代号	Condition 测试条件	Min 最小值	Typ 典型值	Max 最大值	Unit 单位
Forward Voltage 正向电压	VF	IF=350mA	1.7	1.9	2.0	V
Reverse Current 逆向电流	IR	VR=5V	0	0	5	uA
Viewing Angle 半光全角	2 θ 1/2	IF=350mA			140	deg
Luminous Intensity 辐射强度	Ie	IF=350mA	180	190	200	mw
Waveleng 波长	WD	IF=350mA	/	780	/	nm
Recommend Forward Current 持续正向电流	IF(rec)	IF=350mA			350	mA

Notes:

1. Work absolute ratings Ta=25°C 工作常规值 温度=25°C
2. Tolerance of measurement of forward voltage ±0.1V 正向电压误差范围 ±0.1V

Anexo B – Comissão de Ética UNESP.

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 30/2013

Interessado: MARIANA CARREIRA GERALDE

Orientador: Profª Drª Cristina Kurachi

Projeto: Descontaminação do Sistema Respiratório por Terapia Fotodinâmica com Iluminação Extracorpórea: um estudo *in vivo*

Parecer nº 46/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 14 de Agosto de 2013, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Descontaminação do Sistema Respiratório por Terapia Fotodinâmica com Iluminação Extracorpórea: um estudo *in vivo*”, apresentado pela Pós-graduanda Mariana Carreira Geralde, sob orientação da Profª Drª Cristina Kurachi, do Departamento de Física – Grupo de Óptica da Universidade de São Paulo, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

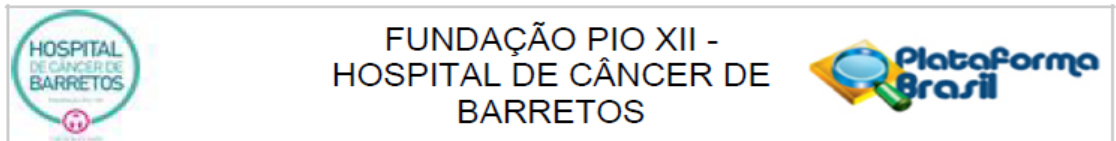
Um relatório parcial do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em FEVEREIRO de 2015 e o relatório final deverá ser entregue em AGOSTO de 2016, ambos em formulários para este fim.

Araraquara, 15 de agosto de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Anexo C – Comitê de Ética - Hospital de Câncer de Barretos.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Cirurgia guiada por luz infravermelha para linfonodo sentinela em melanoma

Pesquisador: Vinicius de Lima Vazquez

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30174614.0.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 626.883

Data da Relatoria: 24/04/2014

Apresentação do Projeto:

Um estudo prospectivo de acurácia do método de pesquisa do linfonodo sentinela com o uso de indocianina verde e luz infravermelha, adicionado à pesquisa de LS convencional, comparando-a ao padrão ouro de pesquisa de linfonodo sentinela - Medicina Nuclear e corante azul patente.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar e comparar a sensibilidade do método proposto somado ao método tradicional;

Avaliar a especificidade do método testado somado ao método tradicional;

Objetivos secundários

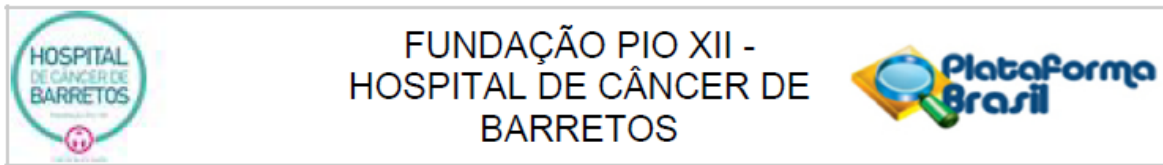
Sobrevida global, específica por câncer e sobrevida livre de doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios:

Pode ser detectado com mais precisão o linfonodo sentinela, sendo que possa existir uma maior chance de localizar algum linfonodo contendo tumor. O estudo fornecerá informações que ajudarão a conhecer melhor esta doença e poderá ajudar a melhorar o diagnóstico e o tratamento futuro de outros portadores de melanoma. Em caso de reação alérgica, serão tomadas as medidas clínicas adequadas para o tratamento desta reação, e todos os esforços serão feitos para que este

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 626.883

quadro se reverta o mais rápido possível.

Caso a sensibilidade do método seja menor que 85% e a especificidade menor que 95% (falso negativo maior que 5%), o estudo será interrompido. Todos os casos serão monitorados quanto a efeitos adversos, sejam eles relacionados a droga ou não, e serão tratados prontamente e notificados ao CEP. Caso as análises interinas demonstrem resultados já significativos, o estudo será interrompido com amostragem menor que a definida no projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo bem elaborado com revisão bibliográfica detalhada, aonde o pesquisador expressa e manifesta sua preocupação com relação às considerações éticas da pesquisa.

Estudo que pode trazer uma nova maneira de abordar a pesquisa do linfonodo sentinela com maior sensibilidade e especificidade do método.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE bem escrito em linguagem clara, acessível e esclarecedor ao participante da pesquisa

Recomendações:

No TCLE, sugiro substituição de sujeito de pesquisa por participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



FUNDAÇÃO PIO XII -
HOSPITAL DE CÂNCER DE
BARRETOS



Continuação do Parecer: 626.883

BARRETOS, 26 de Abril de 2014

Assinador por:
Sergio Vicente Serrano
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

Anexo D – Parecer Médico.

Parecer do Dr. Renato de Castro Capuzzo sobre o equipamento desenvolvido e testado sob sua supervisão no hospital de Câncer de Barretos.

Barretos, 29 de dezembro de 2015

Sou cirurgião de Cabeça e Pescoço do Hospital de Câncer de Barretos e trabalho com a pesquisa de linfonodo sentinela nos tumores iniciais de cavidade oral desde 2010. Tenho experiência com o uso de soluções comerciais importadas de sistemas de visualização de fluorescência com luz infravermelha que já estão no mercado internacional e serviram de referência para avaliar a eficiência deste protótipo. Contudo, nenhum equipamento para este fim estava disponível em território brasileiro.

Acompanhei todo o processo de desenvolvimento e aperfeiçoamento do projeto do aluno Angelo Govone, da divisão de óptica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, campus de São Carlos. Trata-se de um protótipo cujo sistema óptico e software dedicado foi sendo aperfeiçoado durante os últimos dois anos e que foi adaptado às necessidades do cirurgião que necessita um equipamento eficiente e de simples manuseio. Permite visualizar com imagem infravermelha exclusiva ou com fusão com imagem em cores, o que auxilia a melhor visualização de estruturas anatômicas delicadas do pescoço.

Grande parte do processo de aperfeiçoamento do equipamento foi baseado em demandas dos próprios cirurgiões do Hospital de Barretos, que solicitavam funcionalidades que foram prontamente atendidas pela equipe de São Carlos. A interação entre a equipe de desenvolvimento e a equipe cirúrgica foi bastante interessante e resultou em um sistema que não fica atrás dos modelos importados.

Fico orgulhoso e grato em poder ter participado deste processo e espero poder colaborar para futuros aperfeiçoamentos.

Renato de Castro Capuzzo

Parecer dos Drs. Carlos Eduardo Barbosa Carvalho e Vinicius de Lima Vazquez.

Relatório sobre desenvolvimento da técnica do linfonodo sentinela com uso de indocianina verde e câmeras de infra-vermelho.

Durante os anos de 2014 e 2015 iniciamos em nosso serviço a utilização de uma nova técnica para realização do linfonodo sentinela. Ela consiste no uso de substância fluorescente – indocianina verde – e câmeras adaptadas para localização topográfica do linfonodo. A detecção e biópsia deste gânglio, o primeiro a receber drenagem linfática da região tumoral, tornou-se em pedra fundamental para o tratamento de diversos tipos de neoplasias, pois reduz comorbidades, auxilia no prognóstico e pode afetar sobrevida global e tempo livre de doença. As formas clássicas de realizar o PLS (pesquisa de linfonodo sentinela) envolvem a utilização de um corante, o azul patente, e um radiofármaco, com auxílio da medicina nuclear. Através desta técnica objetivamos aumentar a acurácia do método e aumentar a disponibilidade do PLS para hospitais menores e que não dispõem de serviço de Medicina Nuclear.

O uso de câmeras e fontes de iluminação de menor custo e de produção nacional torna-se bastante atraente nesse contexto, o de disponibilizar a técnica para o maior número de centros de tratamento de câncer. Além disso, ajudar a desenvolver novas tecnologias e usos.

Como todo projeto em seu início, o protótipo desenvolvido pelo Sr. Angelo apresentou limitações e entraves. No entanto, durante as atividades em campo, notamos claramente uma evolução. Evidentemente os equipamentos importados apresentam um eficiência notável, e foram importantes balizadores, ou melhor, referência. A comparação permitiu definir onde estavam as limitações e que caminhos o projeto deveria perseguir. Também ficou evidente a relevância do trabalho em conjunto da equipe médico-cirúrgica e os pesquisadores do IFSC-USP. Durante as cirurgias foi possível testar e comparar os equipamentos, além de diversas alterações estruturais feitas no protótipo, tais como redução do monitor, adaptação na fonte de luz, melhorias na mobilidade do aparelho, etc. tais fatos encorajam a continuidade do processo e permitem antever novas parcerias.

Gostaríamos de parabenizar a equipe de São Carlos e particularmente ao Sr Angelo pelo interesse e esforço realizados no transcorrer deste período e esperamos continuar o trabalho nos anos vindouros.

Dr. Vinicius de Lima Vazquez
Dr. Carlos Eduardo Barbosa Carvalho

Departamento Melanoma e Tumores Mesenquimais
do Hospital de Câncer de Barretos.