UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CINTIA TELES DE ANDRADE

Identificação de lesões de pele por detecção fotodinâmica mediada por ácido aminolevulínico

São Carlos

2012

CINTIA TELES DE ANDRADE

Identificação de lesões de pele por detecção fotodinâmica mediada por ácido aminolevulínico

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
Orientador: Profª. Drª. Cristina Kurachi

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2012

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

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

Andrade, Cintia Teles de
Identificação de lesões de pele por detecção fotodinâmica mediada por ácido aminolevulínico / Cintia Teles de Andrade; orientadora Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2012.
109 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. Câncer de pele. 2. Diagnóstico. 3. Fluorescência . 4. Fotossensibilizador. 5. Phantom de pele. I. Kurachi, Cristina, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, as pessoas mais importantes da minha vida: Meus Pais. Minha mãe, Josefa, por todo amor e confiança que sempre me passou meu pai, Manuel, por acreditar e me apoiar na difícil decisão de ir morar tão longe de casa. Amo vocês!

A todos os meus familiares que, cada um a sua maneira, acreditaram em mim, me apoiaram e me deram força pra que eu pudesse agüentar todo esse tempo longe dos meus pais.

Ao meu namoradinho, Higor, por todo o companheirismo, cumplicidade, amizade, carinho e, principalmente, pela paciência nos momentos de estresse do final do mestrado.

Aos meus amigos de Aracaju que me deram muito apoio quando eu cheguei a São Carlos, que ficavam no MSN comigo sábado à noite para que eu não ficasse “sozinha” e me esperam de braços abertos todo final de ano.

Aos meus amigos de São Carlos, que mostraram que nerd também tem vida social e que é possível ser feliz mesmo morrendo de frio.

Ao professor Vanderlei Bagnato pela oportunidade, permitindo que eu fizesse o estágio de conclusão de curso em São Carlos, o primeiro passo para chegar a esse mestrado.

A professora Cristina Kurachi, que nos meus momentos de nervoso estava lá para me mostrar o quanto as coisas são mais simples do que eu penso e que tem os melhores conselhos sobre quais caminhos seguir para atingir meu objetivo.

Aos colegas do Laboratório de Biofotônica pelo companheirismo e ajuda todo esse tempo de trabalho. Em especial a Natalia, a melhor companheira de “perrengue” em viagens, por me ajudar com o trabalho feito em jaú. Ao Clóvis, que atrasou uma viagem no feriado para me ajudar com a montagem experimental. Ao Sebastião que, além de conselhos muito importantes, foi fundamental na finalização do modelo matemático. Ao Mardoqueu, pela ajuda na quantificação do

fotossensibilizador. A Fernanda, pela ajuda com os testes estatísticos. E, em mais especial ainda, ao Didi, vulgo José Dirceu, por...tudo: ajudas intelectuais e, principalmente, amizade.

A toda equipe do Departamento de Pele do Hospital Amaral Carvalho. Em especial a Drª Gabriela Salvio, sem a qual o estudo clínico não teria acontecido.

E, a CAPES, pelo suporte financeiro por meio da bolsa de mestrado.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

ANDRADE, C.T. **Identificação de lesões de pele por detecção fotodinâmica mediada por ácido aminolevulínico**. 2011. 109 p. Dissertação (Mestrado em ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

No Brasil, o câncer de pele não-melanoma é o tipo de câncer mais comum, corresponde a cerca de 95% de todos os tipos de câncer de pele e 25% de todo o tipo de tumor maligno. O diagnóstico precoce permite tratar lesões logo nos primeiros estágios da doença, melhorando as condições do paciente. Assim, é de grande importância desenvolver técnicas para auxiliar o diagnóstico, como a fluorescência marcada. Ela consiste em usar substâncias fotossensíveis como biomarcadores e analisar sua resposta de fluorescência à excitação por luz. O uso do ácido aminolevulínico (ALA) é de interesse para tal, pois apresenta seletividade para formação da protoporfirina IX (PpIX) em células alteradas, substância esta que apresenta boa resposta de fluorescência à excitação por luz (região do UV-Azul). Para um diagnóstico adequado, portanto, é necessário entender melhor o comportamento da luz em meios túrbidos, como a pele. Assim, o objetivo do estudo é investigar fenômenos envolvidos com esta técnica *in vitro* e *in vivo*. Para a análise *in vitro* foi usado um *phantom* de pele contendo 2% de nanquim, 1% de Lipofundin® e 5% BRIJ-35. Um derivado de porfirinas (Photogem®) foi inserido no interior dessa solução e excitado de formas diferentes para estudar o comportamento da fluorescência, da luz de excitação e de ambas. No ensaio clínico, soluções de ALA (5% e 10%) foram aplicadas em lesões de pele malignas e potencialmente malignizáveis, e em intervalos regulares de tempo (15, 30, 45 e 60 minutos), as imagens de fluorescência foram coletadas com o protótipo de um sistema de diagnóstico por imagem de fluorescência. A diferente atenuação dos comprimentos de onda envolvidos foi quantificada *in vitro*. Verificou-se que o limitante do diagnóstico é a luz de excitação, sua penetração limitada em meios túrbidos impede que esta chegue à camadas profundas do tecido com uma intensidade suficiente para excitar o centro fluorescente, de modo que a fluorescência emitida possa ser detectada na superfície do tecido. Na investigação *in vivo*, o ALA proporcionou uma fluorescência marcada que distinguiu significantemente a pele normal da tumoral e as lesões de pele pré-malignas foram identificadas através de sua autofluorescência. A técnica de diagnóstico contribuiu também para a identificação das bordas da lesão, o que é muito importante para um tratamento eficaz.

Palavras-chave: Câncer de pele. Diagnóstico. Fluorescência. Fotossensibilizador. *Phantom* de pele.

ABSTRACT

ANDRADE, C.T. **Identification of skin lesions through aminolaevulinic acid-mediated photodynamic detection**. 2011. 109 p. Dissertação (Mestrado em ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Non melanoma skin cancer is the most common cancer lesion in Brazil. It represents about 95% of all skin cancer lesions, and 25% of tumor types. Early diagnosis allows treatment of lesions in the initial stages of the disease, improving patient's condition. Thus, it is of great importance the development of techniques to aid diagnosis, such as marked fluorescence. This technique consists in using photosensitive substances as biomarkers and analyzing their fluorescence response to light excitation. The use of aminolevulinic acid (ALA) as a biomarker precursor is interesting because it shows selectivity for protoporphyrin IX (PpIX) formation in abnormal cells. This substance shows high fluorescence yield when excited with UV-blue range of light spectrum. For an appropriate diagnosis, therefore, better understanding of light propagation in a turbid media, such as skin, is needed. This study aim is to investigate the phenomena involved with this technique *in vitro* and *in vivo*. For *in vitro* analysis, a skin phantom containing 2% India ink, 1% Lipofundin® and 5% BRIJ-35 was used. A haematoporphyrin derivative (Photogem®) was placed into this phantom and excited using different setups to study fluorescence propagation and the excitation light, both individually and simultaneously. In the clinical trial, ALA water solutions (in 5% and 10% concentration) were applied to malignant and pre malignant skin lesions. At regular time intervals (15, 30, 45 and 60 minutes), fluorescence images were collected with a prototype system for fluorescence imaging. Attenuation for different wavelengths was quantified *in vitro*. Results show that the limiting factor for diagnosis is the excitation light penetration in turbid media – the short penetration of UV-blue light avoids it to reach deeper tissue layers with sufficient intensity to excite the fluorescence sources, so that the fluorescence detected on the tissue surface comes from a limited depth. For *in vivo* research, ALA has provided a marked fluorescence that allowed distinguishing, significantly, normal and tumor skin. Pre-malignant lesions were identified by own autofluorescence, not requiring biomarking. The diagnostic technique also helped to better determine lesion edges, which is very important for effective treatment of malignant/pre-malignant lesions..

Key-words: Skin cancer. Diagnosis. Fluorescence. Photosensitizer. Skin phantom

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das principais interações da luz com o tecido biológico. (A) representa a fluorescência, a transmissão primária (direta, sem espalhamento no meio) e a transmissão difusa (indireta, sofre espalhamento no meio). (B) representa a reflexão difusa (ângulo de reflexão diferente do ângulo de incidência), a reflexão especular (ângulo de reflexão igual ao ângulo de incidência), a absorção e a reflexão total interna (ocorre devido à diferença no índice de refração) – (figura modificada de Pratavieira e colaboradores, 2011)..... 26

Figura 2 - Diagrama de Jablonski modificado. (A) absorção de um fóton, (S_0) estado fundamental, (Sn) estado excitado singleto, (S_1) primeiro estado excitado singleto, (RV) relaxamento vibracional, (CI) cruzamento interno, (CSI) cruzamento intersistemas, (F) fluorescência, (P) fosforescência, (Tn) estado excitado tripleto[19]..... 27

Figura 3 - Espectro de absorbância da PpIX (Figura modificada de Torezan e colaboradores, 2009)..... 30

Figura 4 - Características do phantom liquido de pele. (A): Fluorescência e (B): Absorbância..... 34

Figura 5 - Sistema de diagnóstico por espectroscopia de fluorescência 35

Figura 6 - Montagem experimental 1: Para o estudo da coleta da fluorescência do Photogem® e para o estudo da modificação da luz de excitação (verde e azul) no phantom preparado..... 36

Figura 7 - Montagem experimental 2: Afastamento simultâneo da fibra de excitação/coleta da fonte emissora de fluorescência..... 39

Figura 8 - Imagem sob iluminação branca das lesões incluídas no estudo: lesões A, B e C. Carcinoma basocelular, queratose actínica e queratose seborréica, respectivamente..... 40

Figura 9 - Sistema de diagnóstico por imagem de fluorescência. (A): Visão frontal e (B): Ponteira de visualização da fluorescência, utilizada no diagnóstico..... 42

Figura 10 - Diagrama de blocos correspondente a rotina do programa de Matlab®..... 44

Figura 11 - (A): Gráfico da emissão da fluorescência do Photogem®, para diferentes profundidades, em função do comprimento de onda. (B): Gráfico A normalizado..... 46

Figura 12 - Ilustração da geometria de coleta de dados para uma situação hipotética. *R* é o raio da fibra e *r* é o raio da circunferência formada pelo ângulo sólido que atinge a face coletora da fibra. A medida que a fibra se afasta do meio fluorescente, *r* se aproxima de *R* ($r \leq R$)..... 47

Figura 13 - Gráficos do decaimento da intensidade de luz para diferentes comprimentos de onda próximos aos principais picos do espectro de fluorescência do Photogem®. (A),(B),(C) e (D) correspondem aos comprimentos de onda de 612 nm, 625 nm, 670 nm e 685 nm, respectivamente..... 50

Figura 14 - Variação espectral em função da profundidade..... 51

Figura 15 - Intensidade corrigida espectralmente em z = 0,5 mm. (A) para um caso hipotético e (B) para o caso real medido *in vitro*..... 52

Figura 16 - Intensidade modificada dos comprimentos de onda 612nm e 685nm após a atenuação sofrida no meio..... 53

Figura 17 - Ilustração de um volume fluorescente, de extensão *L*, no interior de um meio túrbido e a uma distância *z'* da fibra coletora..... 54

Figura 18 - Gráfico da emissão da fluorescência do Photogem®, para diferentes profundidades, em função do comprimento de onda. (A) excitação em 408 nm e (B) excitação em 532 nm... 57

Figura 19 - Decaimento médio da intensidade de fluorescência em função da profundidade. (A) 408 nm e (B) 532 nm..... 57

Figura 20 - Ilustração de um volume fluorescente, de extensão *L*, no interior de um meio túrbido e a uma distância *z'* da fibra de excitação..... 59

Figura 21 - Gráfico da emissão da fluorescência do Photogem®, para diferentes profundidades, em função do comprimento de onda..... 61

Figura 22 - Ilustração de um volume fluorescente, de extensão *L*, no interior de um meio túrbido e a uma distância *z'* da fibra de excitação e da fibra de coleta..... 61

Figura 23 - Decaimento da intensidade de fluorescência do principal pico de fluorescência do Photogem® em função da profundidade..... 63

Figura 24 - Taxa de variação da concentração de um fotossensibilizador em função da profundidade. (A), formação do fotossensibilizador e (B) degradação do fotossensibilizador... 65

Figura 25 - Degradação da PpIX ao longo do tempo em um CBC pré-auricular esquerdo durante a terapia fotodinâmica. (A), (B), (C) e (D), correspondem aos tempos 0, 6, 12 e 17 minutos de terapia, respectivamente..... 68

Figura 26 - Imagens da formação da PpIX ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente..... 71

Figura 27 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido tumoral..... 73

Figura 28 - Resposta do CBC ao ALA 5%. Porcentagem de aumento de fluorescência obtida após 60 minutos de aplicação da solução contendo o pró-fármaco à concentração de 5%..... 74

Figura 29 - Imagens do CBC no deltóide direito ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente..... 75

Figura 30 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido tumoral..... 76

Figura 31 - Imagens da queratose actínica no antebraço direito ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente..... 77

Figura 32 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido formado por células pré-malignas 78

Figura 33 - Imagens da queratose actínica no antebraço esquerdo ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente..... 79

Figura 34 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido formado por células pré-malignas 80

Figura 35 - Resposta da queratose actínica ao ALA 5%. Porcentagem de aumento de fluorescência obtida após 60 minutos de aplicação da solução contendo o pró-fármaco à concentração de 5%..... 81

Figura 36 - Imagens da queratose seborréica no tórax ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA 5%, respectivamente..... 82

Figura 37 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido contendo células anormais de queratose seborréica..... 83

Figura 38 - Imagens da queratose seborréica temporal direita ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente..... 84

Figura 39 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido contendo células anormais de queratose seborréica..... 85

Figura 40 - Resposta da queratose seborréica ao ALA 5%. Porcentagem de aumento de fluorescência obtida após 60 minutos de aplicação da solução contendo o pró-fármaco à concentração de 5%..... 86

Figura 41 - Imagens da formação da PpIX ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente..... 88

Figura 42 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido tumoral..... 89

Figura 43 - Resposta do carcinoma basocelular ao ALA 10%. Porcentagem de aumento de fluorescência obtida após 60 minutos de aplicação da solução contendo o pró-fármaco à concentração de 10%..... 90

Figura 44 - Imagens da formação da PpIX ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente..... 91

Figura 45 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido tumoral..... 92

Figura 46 - Imagens da formação da PpIX ao longo do tempo. A - Iluminação Branca da lesão. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente..... 93

Figura 47 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido formado por células pré-malignas 94

Figura 48 - Imagens da formação da PpIX ao longo do tempo. A - Iluminação Branca da lesão. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente..... 95

Figura 49 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido formado por células pré-malignas 96

Figura 50 - Resposta da queratose actínica ao ALA 10%. Porcentagem de aumento de fluorescência obtida após 60 minutos de aplicação da solução contendo o pró-fármaco à concentração de 10%..... 97

Figura 51 - (A) CBC curetado, submetido à TFD, (B) e (C) CBCs não curetados, partes do estudo para o diagnóstico, com ALA 5% e 10%, respectivamente..... 98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Ácido 5-aminolevulínico
CBC	Carcinoma Basocelular
FS	fotossensibilizador
PpIX	protoporfirina IX
TFD	Terapia Fotodinâmica
cm	centímetro
mm	milímetros
µm	micrometros
nm	nanômetros
mW	(mili)Watts
cm^2	centímetro quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 23

1.1 Câncer de pele 23

1.2 Interação da luz com o tecido 25

1.3 Diagnóstico óptico por fluorescência 26

1.4 Detecção Fotodinâmica 29

1.5 Objetivos 30

2 MATERIAIS E MÉTODOS 33

2.1 Estudo *In Vitro* 33

2.1.1 Meio 33

2.1.2 Fotossensibilizador 34

2.1.3 Sistema de fluorescência 35

2.1.4 Aparato experimental 36

2.1.5 Montagem experimental *in vitro* 36

2.2 Estudos *In Vivo* 39

2.2.1 Pacientes e Casuística 39

2.2.2 Medicamento 40

2.2.3 Sistema de fluorescência 41

2.2.4 Protocolo Clínico 42

2.2.5 Estatística 44

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45

3.1 Estudo *In vitro* 45

3.1.1 Afastamento da fibra de coleta da fonte emissora de fluorescência 45

3.1.2 Afastamento da fibra de excitação da fonte emissora de fluorescência 56

3.1.3 Afastamento simultâneo da fibra de excitação/coleta da fonte emissora de fluorescência 60

3.1.4 Dependência com o tempo. 64

3.2 Estudo *In vivo* 70

3.2.1 ALA 5% 71

3.2.2 ALA 10% 87

4 CONCLUSÃO 99

REFERÊNCIAS 101

APÊNDICE 1 107

APÊNDICE 2 109

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de pele

A pele é o maior órgão do corpo humano. Ela envolve todo o corpo, delimitando o meio externo. É dividida em epiderme (camada externa) e derme (camada interna). Tem as funções de regulação térmica, barreira contra agentes infecciosos (vírus e bactérias), barreira contra produtos químicos e físicos, e é responsável pela reserva de água, vitamina D e gordura[1].

No Brasil e no mundo, o câncer de pele é o tipo de câncer mais comum. Ele pode ser dividido em dois grandes grupos: melanoma e não-melanoma. O grupo não-melanoma é a grande maioria, corresponde a cerca de 95% de todos os tipos de câncer de pele e 25% de todo o tipo de tumor maligno no Brasil[1-2].

Os fatores de risco para esse tipo de câncer envolvem características individuais tais como tipo de pele, propensão a queimaduras, incapacidade para bronzear, histórico familiar, nível de exposição solar intermitente e cumulativa ao longo da vida[3-4].

O tipo de câncer de pele não-melanoma mais comum é o carcinoma basocelular (CBC). Tem origem nas células basais da epiderme. Sua ocorrência é maior em pessoas de meia idade e idosos de pele clara e seu surgimento tem relação direta com a exposição da pele à radiação solar durante a vida. Aparece, normalmente, em áreas do corpo expostas ao sol como o rosto e o pescoço. É um tumor que se desenvolve lentamente e, em geral, não apresenta metástase[2, 4-7]

Devem ser consideradas, também, as lesões de pele não malignas, como a queratose actínica e a queratose seborréica.

A queratose actínica é uma displasia cutânea da epiderme. Desenvolve-se devido ao efeito cumulativo da radiação ultravioleta a partir da exposição solar. Ocorre, principalmente, em pessoas com a pele clara e idade avançada. Tem maior incidência nas áreas da pele continuamente expostas ao sol: face, couro cabeludo, braços e mãos. Com uma formação provavelmente genética, a queratose seborréica apresenta uma maior incidência no tronco e no rosto. Suas lesões têm um aspecto verrugoso, superfície irregular e uma consistência mole[4-6].

Prevenção e detecção são os grandes desafios ao lidar com câncer de pele: a prevenção depende, principalmente, do uso de protetor solar e deve ser iniciado ainda na infância, pois a exposição solar cumulativa e excessiva nesse período aumenta o risco de desenvolvimento do câncer, mostrando ser essa uma fase vulnerável aos efeitos nocivos do sol; o diagnóstico precoce pode evitar o agravamento da situação com minimização indireta dos custos, da complexidade do tratamento e morbidade do paciente[3, 5-6, 8].

O diagnóstico das lesões em pele é iniciado com uma visualização da pele sob iluminação branca durante o exame clínico. Quando o dermatologista detecta uma lesão, o exame visual e a palpação são mais detalhados para a identificação das características clínicas. Outra técnica para analisar a lesão é o uso do dermatoscópio, equipamento que aumenta o tamanho da área analisada de 10 a 40 vezes, o que possibilita uma melhor percepção de detalhes da lesão[9]. Nos casos onde há suspeita de malignidade, coleta-se uma amostra da lesão através da curetagem e da biópsia incisional ou excisional (totalidade da lesão), para avaliação laboratorial.

O diagnóstico histopatológico, realizado no material processado da amostra tecidual coletada pela biópsia e sob avaliação em microscopia óptica, é considerado o padrão-ouro para análise tecidual. As características clínicas das lesões em estágios iniciais podem ser semelhantes, dificultando a discriminação entre os vários tipos. Além disso, existe uma variabilidade entre a habilidade dos profissionais no reconhecimento das características de discriminação da lesão. A biópsia é uma técnica invasiva e, a depender do tamanho e heterogeneidade da lesão, pode não ser representativa. Ela também não distingue as bordas da lesão, o que é de fundamental importância para o tratamento, pois a lesão pode se estender além da

margem clinicamente aparente. Como as lesões são em áreas de relevância cosmética, como a face, o tratamento deve remover a mínima quantidade de tecido saudável possível[9-10].

A detecção das lesões empregando parâmetros de iluminação/visualização específica apresenta o potencial de aumentar o poder de discriminação dos tecidos (diagnóstico óptico), com menor ou nenhum grau de invasão tecidual [11-12]. Por isso, tais técnicas podem contribuir de maneira efetiva no diagnóstico de lesões.

1.2 Interação da luz com o tecido

As técnicas ópticas para detecção de lesões na pele usam a luz para auxiliar o diagnóstico, pois o tecido biológico possui um elevado número de moléculas que interagem diferentemente com ela: são os denominados *cromóforos*. As interações da luz com o tecido biológico são alteradas pelas composições bioquímicas e estruturais do tecido. As técnicas ópticas apresentam, portanto, um potencial de discriminação tecidual. Os sistemas ópticos são baseados em um ou mais tipos de interação luz-tecido: reflexão, transmissão, espalhamento e absorção (Figura 1).

A reflexão ocorre quando a luz é refletida da superfície do tecido com um ângulo igual ao ângulo de incidência em relação à normal. Transmissão é quando a luz atravessa a camada de tecido e pode ser detectada do outro lado, sem sofrer absorção, espalhamento ou reflexão. O espalhamento ocorre quando a luz sofre várias mudanças de direção dentro do tecido devido aos diferentes índices de refração dos componentes biológicos. A absorção deve-se a uma conversão parcial da energia luminosa em vibração molecular e luminescência pelas moléculas absorventes [13-14].

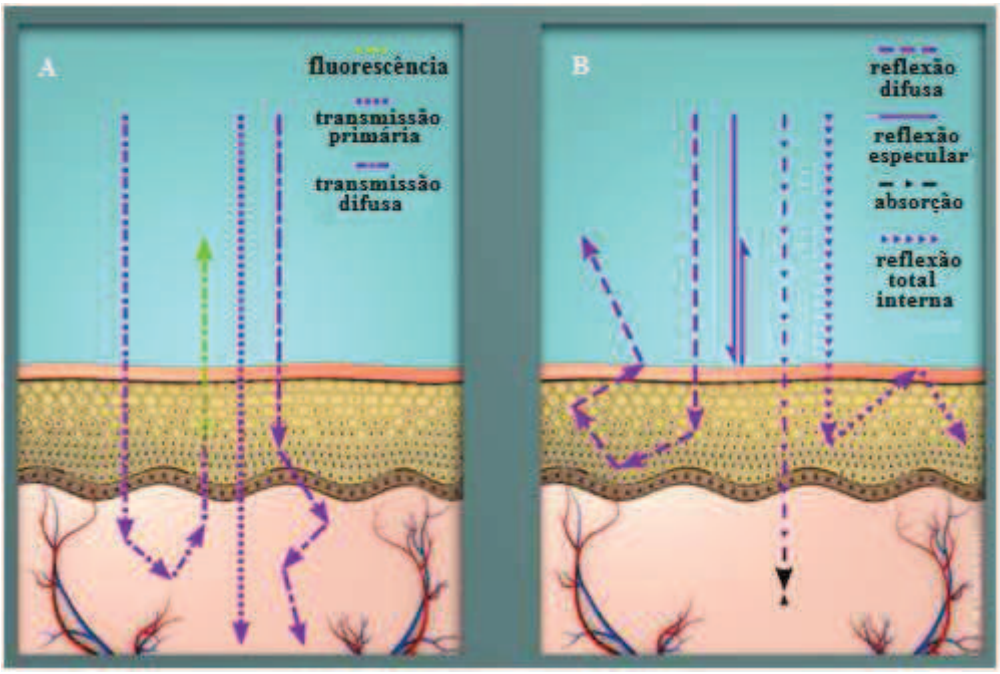

Figura 1 - Esquema das principais interações da luz com o tecido biológico. (A) representa a fluorescência, a transmissão primária (direta, sem espalhamento no meio) e a transmissão difusa (indireta, sofre espalhamento no meio). (B) representa a reflexão difusa (ângulo de reflexão diferente do ângulo de incidência), a reflexão especular (ângulo de reflexão igual ao ângulo de incidência), a absorção e a reflexão total interna (ocorre devido à diferença no índice de refração) – (figura modificada de Pratavieira e colaboradores, 2011)[14].

1.3 Diagnóstico óptico por fluorescência

Para o diagnóstico óptico por fluorescência, a absorção é a principal interação entre a luz e o tecido. Após absorver a energia luminosa, os elétrons do cromóforo biológico vão para um nível eletrônico superior de energia (Sn), que é mais instável. Para recuperar a estabilidade, as moléculas excitadas reemitem o excesso de energia sob forma de luz (luminescência). A luminescência pode ser dividida em fosforescência e fluorescência, dependendo da natureza do estado excitado[15].

Se a energia é reemitida a partir do primeiro estado singleto excitado (S1), o fenômeno corresponde à fluorescência. No estado singleto, o elétron excitado está pareado (orientação de *spin* diferente) ao elétron do orbital de menor energia (S=0). Nesse caso, a transição entre os orbitais é “permitida” pelas leis da mecânica

quântica (ou seja, tem alta probabilidade de ocorrência) e a emissão espontânea da radiação ocorre em alguns nanossegundos. Nos casos em que alcança um estado tripleto, o elétron excitado efetuou um cruzamento intersistema, transição não-radiativa entre estados de diferentes multiplicidades, e está desemparelhado (mesma orientação de *spin*) com relação ao elétron do orbital de menor energia (S=0). Nesse caso, o retorno ao estado fundamental é "proibido" pelo *spin* (ou seja, tem baixa probabilidade de ocorrência), mas acaba ocorrendo devido ao cruzamento intersistema. Assim, as moléculas podem emitir fracamente, e a emissão espontânea persiste por longos intervalos de tempo (fosforescência)[16-18]. A Figura 2 apresenta o diagrama de Jablonski modificado, onde há uma representação dos níveis de energia e das transições eletrônicas que ocorrem entre eles.

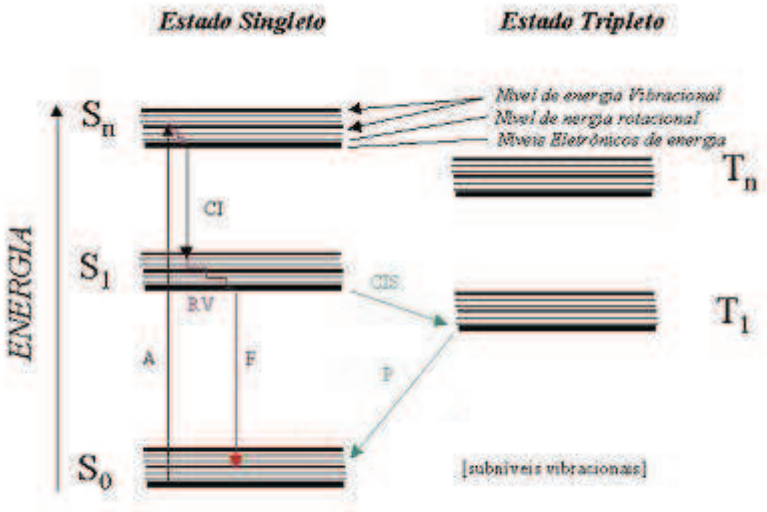

Figura 2 - Diagrama de Jablonski modificado. (A) absorção de um fóton, (S_0) estado fundamental, (Sn) estado excitado singleto, (S_1) primeiro estado excitado singleto, (RV) relaxamento vibracional, (CI) cruzamento interno, (CSI) cruzamento intersistemas, (F) fluorescência, (P) fosforescência, (Tn) estado excitado tripleto[19].

No processo de absorção de energia ocorre a interação do elétron no estado fundamental (S=0) com o fóton. O elétron passa, então, para um estado de maior energia. Em gases sob condições de baixa temperatura e pressão, o fóton emitido pelo elétron quando este retorna para o estado fundamental tende a ter a mesma energia do fóton absorvido (fluorescência ressonante), devido à baixa interação

entre as moléculas. Esse processo não ocorre, entretanto, onde a interação entre elas é maior, como em moléculas não gasosas e/ou com pressão e temperatura mais elevadas. Nesses casos, a fluorescência ocorre, em geral, a partir do menor nível vibracional do estado excitado, devido à energia vibracional ter se dispersado através de colisões intermoleculares. Assim, a emissão ocorre com energia inferior à do fóton absorvido, o que desloca a fluorescência para regiões de maiores comprimento de onda do espectro eletromagnético. O espectro de emissão resultante da fluorescência tem a estrutura eletrônica característica da molécula, sendo por isso empregado para a caracterização e identificação desta[15-18].

O tecido biológico é considerado um meio túrbido. Isso implica em uma maior ocorrência de espalhamento e absorção do que de fluorescência. Quando a luz monocromática, utilizada na excitação, incide no meio túrbido, esta pode ser absorvida ou espalhada. Se absorvida, a luz pode converter-se em fluorescência que, por sua vez, passará pelo meio túrbido, podendo ser novamente absorvida ou espalhada. Somente será detectada pelo aparelho utilizado para o diagnóstico a fluorescência que sair pela superfície do tecido, e ela não será resultado unicamente da emissão dos fluoróforos presentes, mas sim uma contribuição dos absorvedores e espalhadores teciduais[17-18, 20-21].

Há moléculas dentro da pele, que são responsáveis por fazer com que esta apresente essa fluorescência naturalmente, o que é denominado por autofluorescência da pele. A autofluorescência é produzida pelos fluoróforos endógenos (tipo de cromóforo que absorve luz e emite fluorescência). Colágeno, elastina, queratina e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), são exemplos de fluoróforos. A presença de lesão na pele altera a concentração destes fluoróforos, o que modifica a autofluorescência do tecido. Assim, as técnicas de diagnóstico por fluorescência são sensíveis às alterações teciduais[22].

Técnicas que utilizam fluorescência como ferramenta, como imagem e espectroscopia de fluorescência, representam um método promissor na detecção de lesões com base apenas nas propriedades ópticas do tecido. São, portanto, métodos não-invasivos de diagnóstico. A diferença entre elas é que a espectroscopia de fluorescência fornece uma análise puntual do tecido, cuja intensidade é mais facilmente quantificável e permite avaliação espectral imediata,

enquanto o diagnóstico por imagem fornece uma análise em um campo amplo de visão, o que permite delimitar as bordas da lesão[23].

1.4 Detecção Fotodinâmica

A fotodetecção empregando um marcador exógeno pode aumentar o poder de contraste entre o tecido lesionado e o tecido sadio. Na fluorescência marcada, o ácido aminolevulínico (ALA, do inglês *aminolaevulinic acid*) – precursor da protoporfirina IX (PpIX) – é topicamente aplicado na pele. O ALA é um agente hidrofílico que penetra nas células através de transporte ativo. Esse processo é lento e depende do pH e da temperatura, mas são um pouco mais acelerados em células tumorais. Para facilitar a penetração do ALA e o posterior acúmulo da PpIX, na aplicação tópica são misturados componentes que facilitam a penetração do pré-fármaco, dimetilsulfóxido (DMSO), e que inibem a enzima ferroquelatase, o ácido etilenodiaminotetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid*, ou EDTA). A inibição da ferroquelatase é necessária porque sua ação impede o acúmulo das moléculas formadas de PpIX, transformando-as em outras moléculas cujo excesso será degradado pela própria mitocôndria por um mecanismo de *feedback* negativo [24].

A PpIX é um fotossensibilizador (FS) endógeno que ocorre naturalmente nas células, na rota biossintética do grupo heme, porém, em pequena quantidade. Após o ALA penetrar na célula, este entra na biossíntese do grupo heme e estimula a formação da PpIX. Esse FS tem propriedades de fluorescência características e seu acúmulo preferencial em tecidos alterados permite seu uso como ferramenta auxiliar de diagnóstico. Essa preferência no acúmulo não é bem compreendida, mas pode ser causadas pela alteração na penetração das membranas das células anormais e pela imaturidade das fibras de colágeno que integram a lesão – essas fibras possuem grande capacidade de ligação com as porfirinas, que as torna sítios de acúmulo e retenção do FS – entre outros fatores[24-25].

Regiões com maior acúmulo de ALA mostram uma grande fluorescência induzida, enquanto essa fluorescência é muito mais fraca nas regiões de menor acúmulo – àquelas com quantidades normais de PpIX. Para realizar o diagnóstico, após a administração do ALA no local desejado e a espera de um intervalo de tempo para a produção e acúmulo da PpIX no tecido, a pele é irradiada com luz na região UV-azul, visando melhor eficiência na emissão de fluorescência (Figura 3). Sob esta excitação, o fotossensibilizador apresenta uma fluorescência vermelha intensa cujo contraste com a das células não-marcadas é bastante evidente[24, 26-27]. Essa técnica de diagnóstico óptico empregando o ALA é conhecida como detecção fotodinâmica.

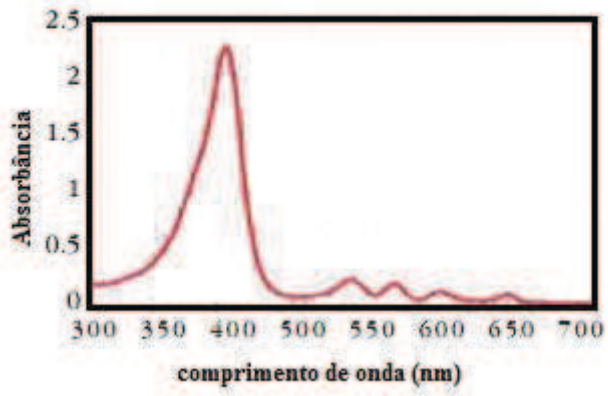

Figura 3 - Espectro de absorbância da PpIX (Figura modificada de Torezan e colaboradores, 2009)[24].

1.5 Objetivos

As técnicas de diagnóstico óptico por fluorescência têm sido apresentadas como opções extremamente atrativas, tanto para a detecção de lesões de pele[9-11] quanto no acompanhamento da terapia fotodinâmica[26-27], por serem métodos não-invasivos e apresentarem uma resposta rápida.

O principio básico de funcionamento dessas técnicas é a interação da luz com o tecido biológico. O tecido, por sua vez, é um meio túrbido e a luz sofre modificação ao percorrê-lo. Portanto, a fluorescência, que é resultado de uma dessas interações, também sofre modificação ao percorrer o meio até ser detectada na superfície do tecido.

Outro ponto importante é a presença de fotossensibilizador (FS) no tecido. Os FS são compostos que emitem uma fluorescência característica ao serem excitados com determinados comprimentos de onda. Na terapia fotodinâmica (TFD), a degradação do FS presente no tecido tumoral é acompanhada para se saber, em tempo real, a resposta do tumor à terapia. No diagnóstico fotodinâmico, é a formação do FS que é acompanhada para aumentar o poder de discriminação da lesão tecidual. Portanto, conhecer a dinâmica de formação e degradação do FS é muito importante quando se deseja estudar os processos fotodinâmicos com base na fluorescência.

Esse é um tema complexo, pois envolve vários processos metabólicos como a reposição de oxigênio no tecido tratado, dinâmica de penetração da pró-droga, formação do fotossensibilizador a partir do fármaco administrado e sua posterior degradação ao reagir com a luz. Na tentativa de acompanhar todo esse processo, como é o enfoque desse estudo, devem ser consideradas apropriadamente as modificações sofridas pela fluorescência ao longo do caminho percorrido, desde sua emissão por estes FS até sua detecção na superfície tecidual.

Diferentes pesquisas têm sido feitas nessa área, com o objetivo de melhor entender a propagação da luz no tecido biológico e, assim, tornar a detecção de tumores e a TFD mais eficientes. Como, por exemplo, usar o método de Monte Carlo para simular a fluorescência da PpIX, produção de oxigênio singleto e a distribuição temporal e espacial desses componentes no tecido[28-29], ou, apenas simular a propagação do fóton de luz no tecido biológico[30]. Há novos algoritmos que são desenvolvidos para descobrir a distância entre a parte superior do centro fluorescente no interior do tecido e a óptica de coleta presente na superfície[31] e para estudar a difusão do ácido aminolevulínico (ALA) em um tecido com lesão[32]. Modelos matemáticos também são desenvolvidos para auxiliar a detecção de câncer em diversos tipos de tecido de uma forma quantitativa[33]. Há ainda métodos para

diagnosticar precocemente câncer de pele em estágios iniciais, utilizando a autofluorescência do tecido ou a marcação da pele com o uso do ALA, essa detecção pode ser feita através da espectroscopia de fluorescência ou da imagem de campo amplo[34-35].

O Instituto de Física de São Carlos é pioneiro no trabalho com terapia fotodinâmica e diagnóstico fotodinâmico no Brasil, com o intuito de melhor entender e aprimorar essas técnicas. Os estudos começaram em 1997 e desde então, diversos trabalhos clínicos e em laboratório foram feitos com o objetivo de melhorar a técnica e os protocolos de tratamento em diversos tipos de lesões, como hepática, de pele, esôfago e ginecologicas[14, 17-18, 36-38]. Foi desenvolvido também um sistema óptico de por imagem de campo amplo de fluorescência para detecção e tratamento de câncer de pele[9] e assim criou-se um projeto nacional para difundir a terapia e o diagnóstico fotodinâmico pelo país.

O objetivo desse estudo é fazer uma abordagem simplificada sobre a análise da fluorescência de um *phantom* de pele na presença de um fotossensibilizador (Photogem®) para melhor entender o que se observa nos sistemas de diagnóstico por fluorescência. O modelo desenvolvido nesse estudo apresentará uma análise mais qualitativa do que ocorre no tecido, pois as simplificações nele assumidas, para viabilizar a análise, dificultam a quantificação precisa das modificações teciduais.

Em uma segunda etapa, será apresentado um estudo clínico que tem como objetivo detectar lesões malignas ou pré-malignas de pele, através da formação de um fotossensibilizador produzido endogenamente (protoporfirina IX) após indução pelo precursor ALA tópico e utilizando um sistema de diagnóstico por imagem de campo amplo de fluorescência, portátil e de fácil manuseio.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estudo *In Vitro*

Esse estudo consiste em analisar o comportamento da luz em um meio túrbido simulando as propriedades ópticas teciduais, visando uma melhor compreensão dos fenômenos envolvidos na técnica de diagnóstico óptico por fluorescência.

2.1.1 Meio

Para os estudos *in vitro* foi usado 400 *ml* de um *phantom* líquido de pele (meio que simula as propriedades ópticas da pele), composto de 2% de nanquim, 1% de Lipofundin® - uma solução de gordura que proporciona energia e ácidos graxos essenciais a pacientes que requerem nutrição parenteral[39], utilizado no *phantom* como espalhador - e 5% BRIJ-35, um detergente não iônico utilizado para ajustar o coeficiente de absorção do meio[40].

As características do *phantom* estão apresentadas na Figura 4, onde A representa a fluorescência do *phantom* de pele e B caracteriza sua absorção.

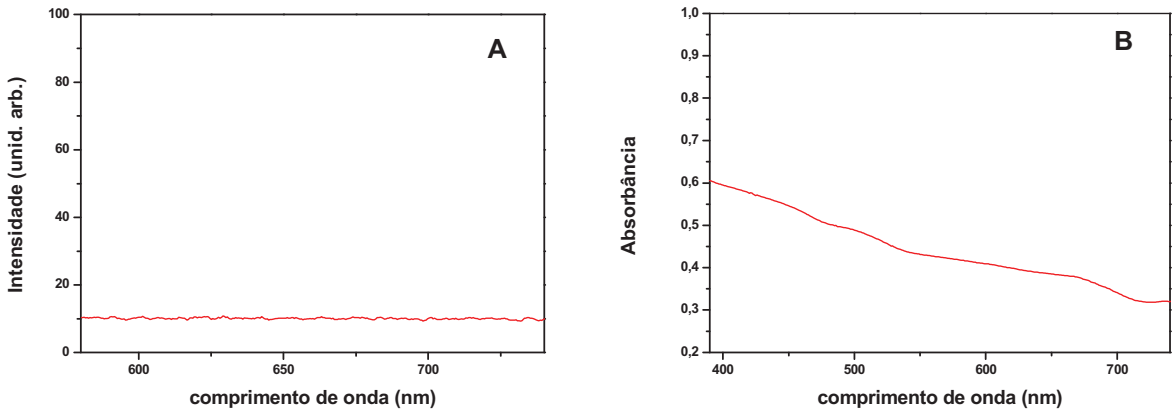

Figura 4: Características do *phantom* liquido de pele. (A): Fluorescência e (B): Absorbância.

2.1.2 Fotossensibilizador

O fotossensibilizador usado *in vitro* foi o Photogem®, um conjunto de oligômeros derivados da hematoporfirina cuja molécula é semelhante à PpIX. Um volume de 0,16 ml do FS, em concentração de 250µg/ml, foi posicionado no interior das soluções e iluminado de formas diferentes para estudar o comportamento da fluorescência coletada, da luz de excitação entregue e de ambas simultaneamente (situação observada no sistema de diagnóstico por imagem). O arranjo experimental é descrito na seção 2.1.5.

A escolha do Photogem® como composto fluorescente foi realizada, pois a detecção de derivados de porfirina é importante tanto no caso da autofluorescência das lesões cutâneas, como no da identificação de PpIX no tecido. As lesões apresentam uma maior concentração de porfirinas em comparação com o tecido sadio correspondente e a PpIX é um composto celular cuja produção é induzida em um protocolo de terapia fotodinâmica.

2.1.3 Sistema de fluorescência

O dispositivo utilizado para excitação, tanto na região do verde quanto na do azul do espectro visível, e coleta da fluorescência foi o protótipo de um sistema de diagnóstico por espectroscopia de fluorescência. Esse dispositivo é constituído de um espectrômetro USB2000 (Ocean Optics®, EUA), que permite a avaliação de fluorescência em uma faixa espectral entre 350 nm e 1000 nm; duas fontes de excitação - um laser Nd^{3+}:YAG dobrado (emitindo em 532 nm) e um laser de semicondutor que emite em 408 nm; e uma sonda de investigação do tipo Y (Ocean Optics®, EUA) composta de duas fibras ópticas de 600 μm, sendo uma a que entrega a luz de excitação e a outra responsável pela coleta da luz reemitida. Um filtro foi usado para remover a luz retroespalhada para que apenas a emissão da fluorescência fosse registrada. O espectrômetro foi acoplado a um computador para aquisição e armazenagem os dados do espectro[41]. A Figura 5 mostra a imagem do sistema.

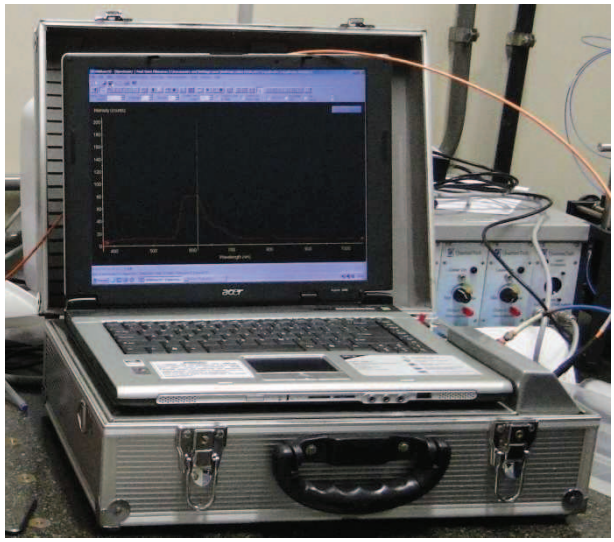

Figura 5 - Sistema de diagnóstico por espectroscopia de fluorescência.

2.1.4 Aparato experimental

Para a realização das medidas, foi utilizado um recipiente de vidro de 15 cm de largura por 15 cm de comprimento e 8 cm de altura, com paredes de 2 mm de espessura, e um orifício de 1 cm de diâmetro e 2 mm de profundidade no centro. Uma lamínula de microscopia foi colocada na base e outra sobre o orifício, de modo que o FS ficasse confinado.

Para afastar a fibra de excitação e/ou fibra coletora foi usado um parafuso micrométrico, cujo passo é de 63,5 μm.

2.1.5 Montagem experimental *in vitro*

A Figura 6 ilustra a montagem experimental para o estudo da coleta da fluorescência do Photogem® e para o estudo da difusão da luz de excitação (verde e azul) no *phantom* preparado.

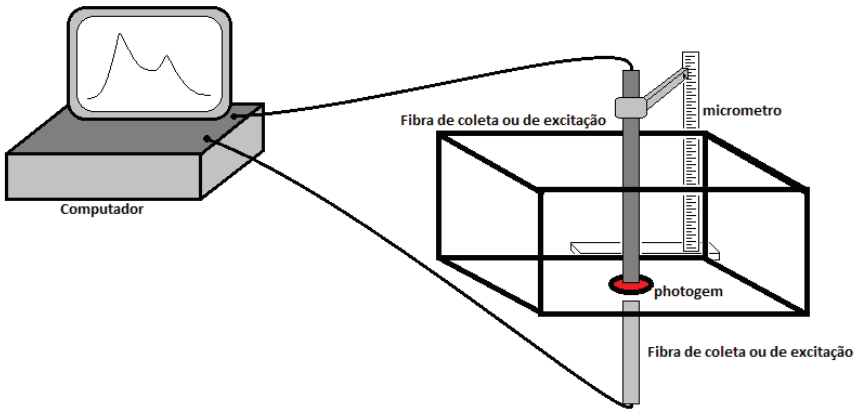

Figura 6 - Montagem experimental 1: Para o estudo da coleta da fluorescência do Photogem® e para o estudo da modificação da luz de excitação (verde e azul) no phantom preparado.

Leitura empregando o afastamento da fibra de coleta da fonte emissora de fluorescência

Para excitar a fluorescência do Photogem®, a ponteira do aparelho de diagnóstico por imagem foi posicionada embaixo da caixa de vidro, diretamente sob a amostra de Photogem®, e a fibra do sistema de espectroscopia, usada na coleta do sinal de fluorescência, foi colocada dentro do liquido, encostada na amostra de fotossensibilizador. Com isso, a ponteira do aparelho de diagnóstico permaneceu fixa, e o espectro de fluorescência do Photogem® foi coletado em diferentes profundidades dentro do meio pela fibra de coleta do sistema de espectroscopia.

No inicio das medidas, a fibra coletora do sistema de espectroscopia encontrava-se encostada perpendicularmente ao centro fluorescente (Photogem®), situação em que apenas uma película do meio estava presente entre eles e, assim, simular que a fibra coletora e o fotossensibilizador encontravam-se na superfície do tecido. Os espectros de fluorescência foram coletados nesta posição, e a fibra de coleta foi afastada do FS, com uso do parafuso micrométrico, com coletas adicionais realizadas a intervalos de 63,5 µm de distância, simulando o efeito de camadas de tecido entre a coleta e o centro emissor. As medidas se repetiram a cada volta do parafuso micrométrico (correspondente ao intervalo de 63,5 µm) até que o espectro de fluorescência do Photogem® não pudesse mais ser detectado. Por este processo, observamos as modificações sofridas pelo espectro de fluorescência do Photogem® dentro do meio.

Leitura empregando o afastamento da fibra de excitação da fonte emissora de fluorescência

Para estudar a modificação sofrida pela luz de excitação dentro do meio, a fibra de detecção do sistema de espectroscopia foi colocada embaixo da caixa de vidro e posicionada perpendicularmente à amostra de FS, e a fibra de excitação do

sistema, com luz na região do azul (408 nm) e/ou na região do verde (532 nm), foi colocada dentro do liquido, também encostada perpendicularmente sobre a amostra. Os espectros de fluorescência foram coletados nesta posição, e a fibra de excitação foi afastada do FS, com uso do parafuso micrométrico, com coletas adicionais realizadas a intervalos de 63,5 µm de distância, simulando o efeito de camadas de tecido entre a excitação e o centro emissor. As medidas se repetiram a cada volta do parafuso micrométrico, até que o espectro de fluorescência do Photogem® não pudesse mais ser detectado. Por este processo, observamos as modificações sofridas pelo espectro de fluorescência do Photogem® devido à distância entre a superfície onde a luz de excitação incide e o centro emissor de fluorescência.

Leitura empregando o afastamento simultâneo da fibra de excitação/coleta da fonte emissora de fluorescência

Com o objetivo de simular a análise realizada quando são empregadas a excitação e a coleta na superfície do tecido, foi feita uma montagem experimental utilizando a fibra tipo Y do sistema de espectroscopia inserida dentro do líquido. Essa fibra foi usada para excitar (no azul, 408 nm) e coletar a fluorescência emitida pelo Photogem® ao mesmo tempo e em diferentes profundidades (Figura 7).

No inicio das medidas, a fibra tipo Y do sistema de espectroscopia encontrava-se encostada perpendicularmente ao centro fluorescente, simulando que ambos estivessem posicionados sobre a superfície do tecido. Os dados da intensidade do espectro de fluorescência foram coletados. Com o parafuso micrométrico, a fibra foi afastada e, novamente, os dados da intensidade do espectro de fluorescência foram coletados. O procedimento se repetiu até que o espectro de fluorescência do Photogem® não fosse mais detectado. Deste modo, observamos as modificações sofridas pelo espectro coletado de fluorescência do Photogem® em uma situação onde tanto a luz de excitação como a fluorescência emitida percorreram caminhos ópticos no *phantom*.

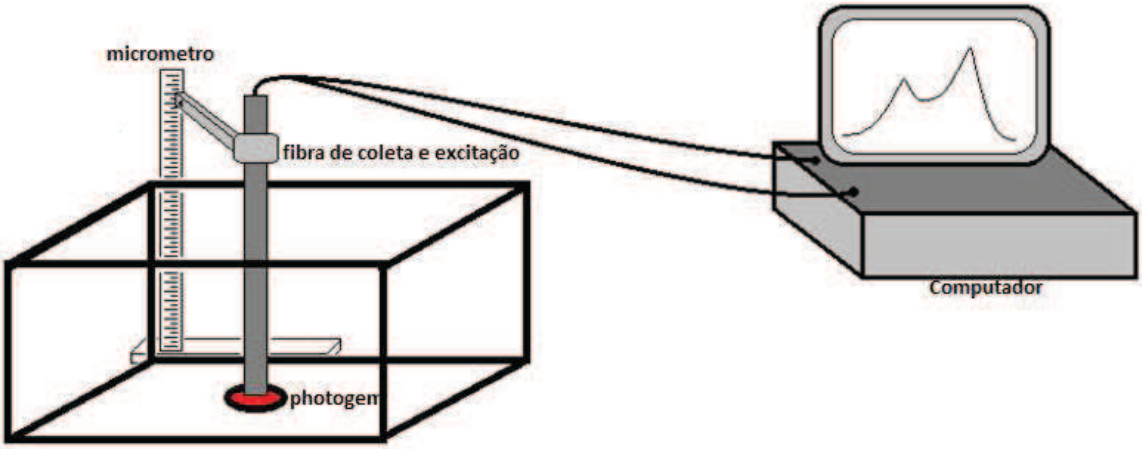

Figura 7 - Montagem experimental 2: Afastamento simultâneo da fibra de excitação/coleta da fonte emissora de fluorescência.

2.2 Estudos *In Vivo*

Esta fase do trabalho teve como objetivo principal avaliar a eficiência do diagnóstico fotodinâmico mediado por ácido aminolevulínico em solução na identificação de lesões cutâneas.

2.2.1 Pacientes e Casuística

Foram incluídos pacientes, de ambos os sexos, com idade entre 45 e 91 anos, caucasianos, com lesões de pele dos tipos carcinoma basocelular, queratose actínica e queratose seborréica (Figura 8), atendidos no Departamento de Pele do Hospital Amaral Carvalho e no Programa de Prevenção de Melanoma da cidade de Jaú, que seriam, posteriormente, submetidos à cirurgia. Para a realização desta

parte do estudo envolvendo seres humanos, o projeto de pesquisa obteve a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospital Amaral Carvalho (CEPFHAC 123/2010. Apêndice 1).Os pacientes e seus acompanhantes foram orientados de forma verbal e escrita e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para a participação no estudo clínico (Apêndice 2).

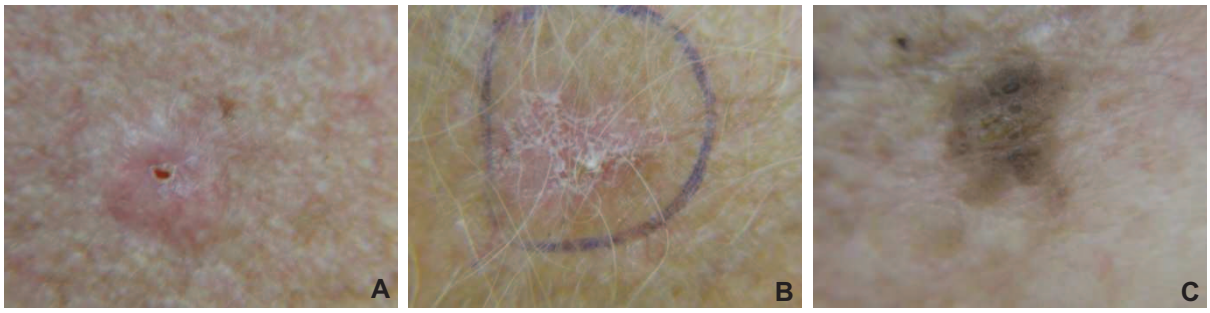

Figura 8 – Imagem sob iluminação branca das lesões incluídas no estudo: lesões A, B e C. Carcinoma basocelular, queratose actínica e queratose seborréica, respectivamente.

2.2.2 Medicamento

O pró-fármaco usado foi o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA - FSUESCC "NIOPIIK" B SADAVAYAd. 1K4, Moscou, Rússia), manipulado nas concentrações de 5% e 10% em solução de água Milli-Q contendo 3% de dimetilsulfóxido (DMSO), facilitador da penetração do ALA no tecido, e 1 mM de ácido etilenodiaminotetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid*, ou EDTA), composto que inibe a enzima ferroquelatase, permitindo maior concentração da protoporfirina IX (PpIX), o biomarcador fluorescente utilizado neste estudo. A formação do fotossensibilizador PpIX ocorre nas mitocôndrias a partir do ALA, no processo de biossíntese do grupo heme[42-43].

2.2.3 Sistema de fluorescência

O equipamento utilizado para a avaliação da fluorescência *in vivo* é um protótipo de um sistema de diagnóstico por imagem de campo amplo de fluorescência. Esse aparelho foi desenvolvido em parceria entre a Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP) e o Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP).

A óptica do dispositivo para visualização do sinal de fluorescência é constituída por sistemas de iluminação e de filtros. O sistema de iluminação é composto por um conjunto de LEDs com emissão em (400±20) nm e intensidade de 50 mW/cm^2. O sistema de filtros é um arranjo de 3 filtros ópticos: um filtro utilizado na excitação (filtro passa-banda, com um intervalo de 390nm a 460 nm), um filtro dicróico e um filtro utilizado na emissão da fluorescência (filtro passa-alto, que transmite a partir de 475 nm até 800nm). Esse arranjo de filtros ópticos foi elaborado de modo a viabilizar a melhor visualização possível do contraste (diferença entre cores e intensidades) da fluorescência emitida nas regiões do verde e vermelho do espectro visível[9, 23].

Uma câmera fotográfica digital colorida (Sony DSC-H50) foi acoplada através de um adaptador para aquisição das imagens.

A Figura 9 mostra o sistema de diagnóstico por imagem de fluorescência. Em A, é possível observar o equipamento e em B, a ponteira de diagnóstico, de onde podemos obter as imagens de fluorescência.

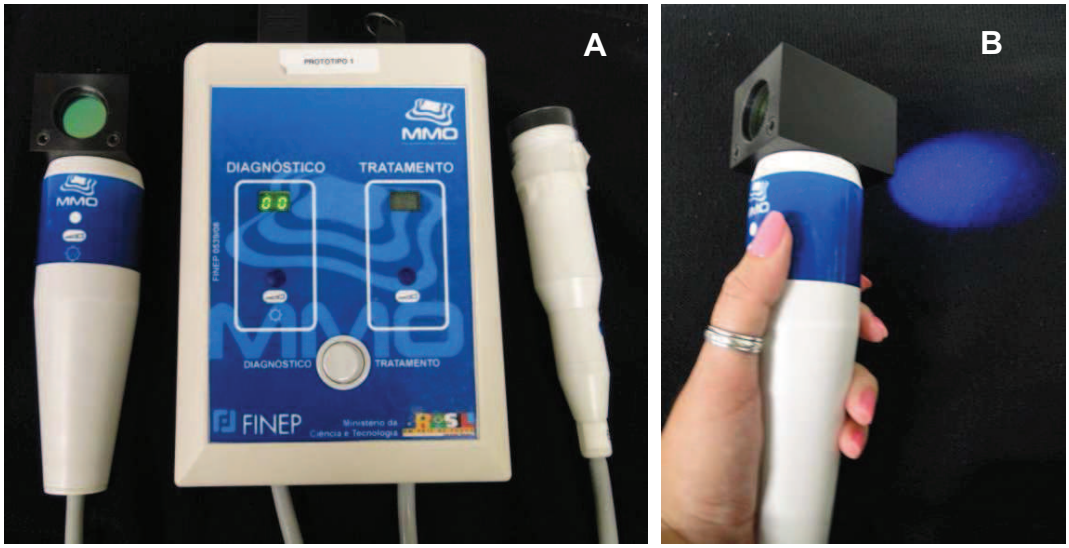

Figura 9 - Sistema de diagnóstico por imagem de fluorescência. (A): Visão frontal e (B): Ponteira de visualização da fluorescência, utilizada no diagnóstico.

2.2.4 Protocolo Clínico

Após triagem dos pacientes pela Dra. Ana Gabriela Sálvio, médica dermatologista da Fundação Hospital Amaral Carvalho, de Jaú, os mesmos foram convidados a participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram investigados 43 pacientes, sendo 71 lesões cutâneas: 29 CBCs, 31 queratoses actínicas e 11 queratoses seborréicas.

Foram preparadas soluções de 5% ou 10% de ALA, colocadas em banho-maria para dissolução total do ALA. A solução foi mantida em temperatura ambiente, ao abrigo da luz até o momento do uso.

As lesões foram previamente higienizadas com clorexidina em sabão. Depois, os pacientes foram avaliados em uma sala escura para evitar a fotodegradação da PpIX formada durante a sensibilização, e para evitar que a luminosidade externa interferisse na coleta das imagens de fluorescência.

Com uso de algodão, foi espalhado ALA solução 5% em 54 lesões (21 CBCs, 22 queratoses actínicas e 11 queratoses seborréicas) e ALA solução 10% em 17 lesões (8 CBCs e 9 queratoses actínicas). As soluções foram espalhadas nas lesões e nas bordas. Após a aplicação do pró-fármaco, as lesões foram protegidas da luz por um curativo. As imagens foram coletadas em intervalos regulares de tempo (15, 30, 45 e 60 minutos). Nesses tempos, o curativo que protegia a lesão da luminosidade era retirado, as imagens coletadas e o curativo era recolocado na lesão. O registro das imagens das lesões (com iluminação branca) de cada paciente foi feito com a câmera fotográfica digital. As imagens de fluorescência foram coletadas com o sistema de diagnóstico por fluorescência acoplado à câmera fotográfica. Todas as imagens foram obtidas com uma lente macro de 74 mm e utilizou-se o aumento óptico da câmera de 6x.

Para quantificar a formação da PpIX, foi usado um algoritmo de quantificação da PpIX escrito em Matlab® 7.5 (The MathWorks, EUA). O algoritmo consiste em quantificar a intensidade da matriz de cores R na imagem RGB como mostra o diagrama de blocos da Figura 10.

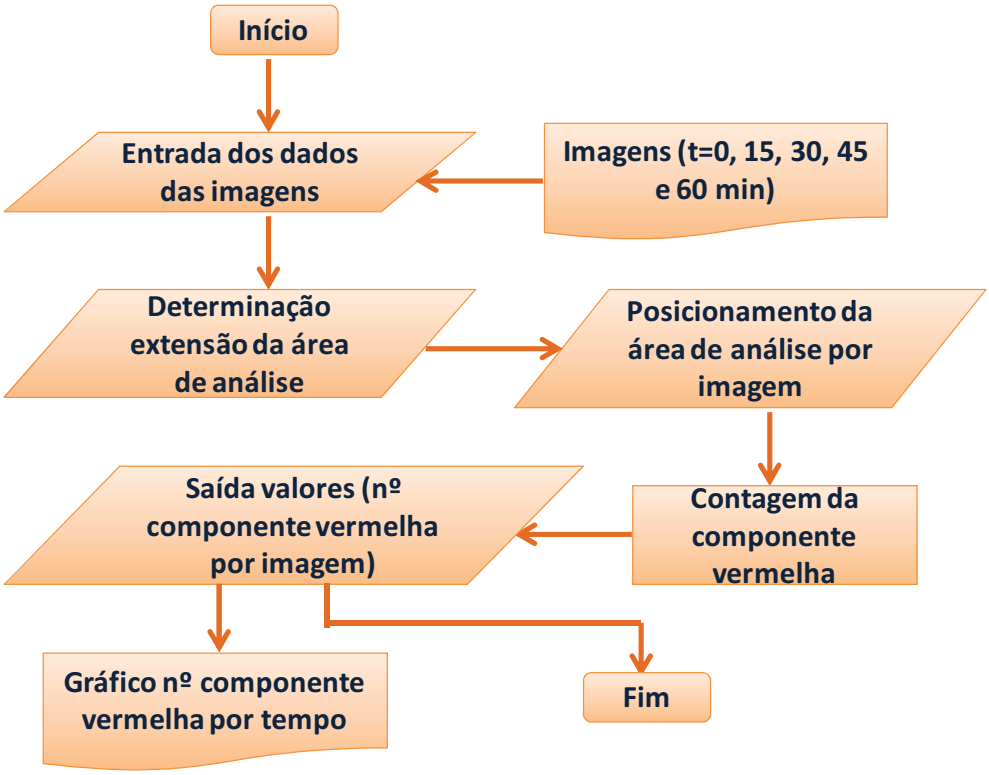

Figura 10 – Diagrama de blocos correspondente a rotina do programa de Matlab®

2.2.5 Estatística

A distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparar as diferenças das lesões e do tecido normal antes e após a aplicação do ALA (diferença intragrupo) foi utilizado o Teste T-Student pareado e para comparação intergrupos (diferença entre lesão e tecido normal) foi utilizado o Teste T-Student não pareado.

Para análise estatística foi utilizado o software Statistica for Windows Release 7 (Statsoft Inc., Tulsa, Ok, USA). O nível de significância estatística empregado foi de 5% ($p \leq 0.05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo *In vitro*

3.1.1 Afastamento da fibra de coleta da fonte emissora de fluorescência

O centro fluorescente (Photogem®) foi excitado com um laser com comprimento de onda 408 nm, e um espectro de fluorescência, representado pela função dependente do comprimento de onda $G_0(\lambda)$, foi coletado. Com o aumento da distância entre o detector e o centro fluorescente, o espectro de emissão da fluorescência é modificado de acordo com a equação (1).

$$G(\lambda,z) = G_0(\lambda)\xi(\lambda,z), \qquad (1)$$

onde $G(\lambda,z)$ é o espectro detectado em determinada profundidade e $\xi(\lambda,z)$ é um valor de correção espectral que depende do coeficiente efetivo (μ_{eff}) do meio, da distância entre o detector e o centro emissor e do comprimento de onda (equação 2). O μ_{eff} é resultante dos coeficientes de espalhamento e absorção do meio (*phantom*). Numa aproximação simplificada, pode-se definir esse $\xi(\lambda,z)$ como um decaimento do tipo:

$$\xi(\lambda,z) = e^{-\mu_{eff}(\lambda).z} \qquad (2)$$

A Figura 11A mostra o espectro da emissão de fluorescência do Photogem®, para diferentes profundidades, em função do comprimento de onda. A Figura 11B mostra o espectro anterior normalizado – dividindo-se todos os espectros pelo da superfície. Este espectro normalizado será usado como base para os cálculos.

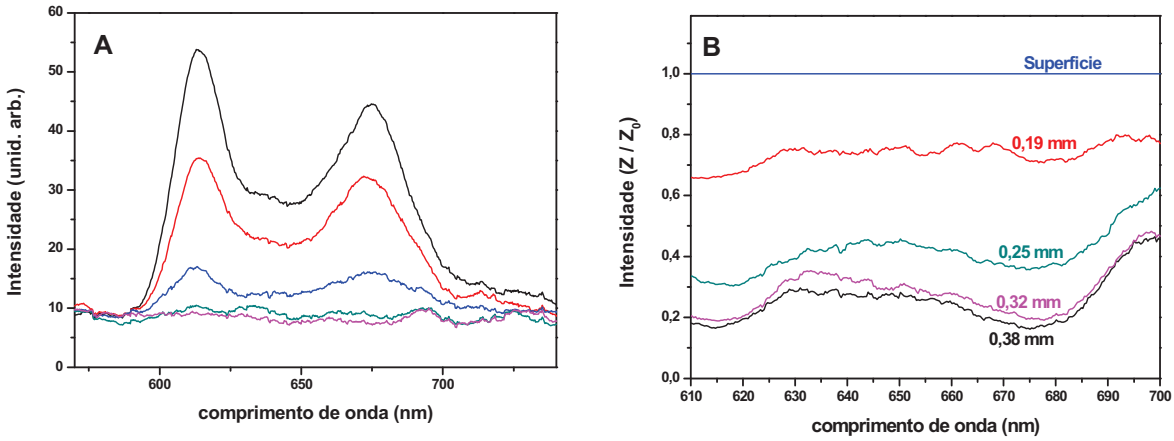

Figura 11 – (A): Gráfico da emissão da fluorescência do Photogem®, para diferentes profundidades, em função do comprimento de onda. (B): Gráfico A normalizado.

Nos gráficos da Figura 11 se observam os diferentes espectros de fluorescência coletados para diferentes valores de *z*, distância entre o detector e o centro fluorescente, como função do comprimento de onda. As distorções com base na profundidade zero (superfície) mostram que alguns comprimentos de onda sofrem uma maior influência do meio, evidenciada pela detecção a maiores profundidades (ou seja, em maiores distâncias). A análise que se segue ajuda a entender a influência do meio no comprimento de onda e, assim, a modificação do espectro detectado.

Em primeiro lugar, deve-se considerar uma limitação existente devido à geometria óptica de coleta. Nos casos de coleta para uma fonte emissora puntual, quando a fibra está posicionada sobre o eixo central e próxima ao emissor, a potência acoplada decai apenas em função do aumento da distância entre ambos. Como $\xi(\lambda,z)$ é exponencial, na expansão em 1ª ordem da função $\xi(\lambda,z)$ em uma série de MacLaurin, $\xi(\lambda,z)$ é aproximadamente igual a 1. Isso mostra que neste regime de proximidade da fonte, o efeito do comprimento de onda não se mostra relevante.

Ao considerar uma fonte puntual, a luz será emitida em todas as direções. Contudo, devido ao ângulo de aceitação da fibra, apenas uma parcela da luz emitida é coletada. Nas proximidades da fibra, pode-se visualizar o ângulo sólido equivalente a esta parcela projetado na face coletora da fibra. O raio da circunferência formada pela projeção na fibra é chamado *r* e o raio da fibra, *R*. À medida que a fibra se afasta da amostra, a projeção do cone na fibra aumenta de tamanho, até que *r* se iguala a *R* (Figura 12).

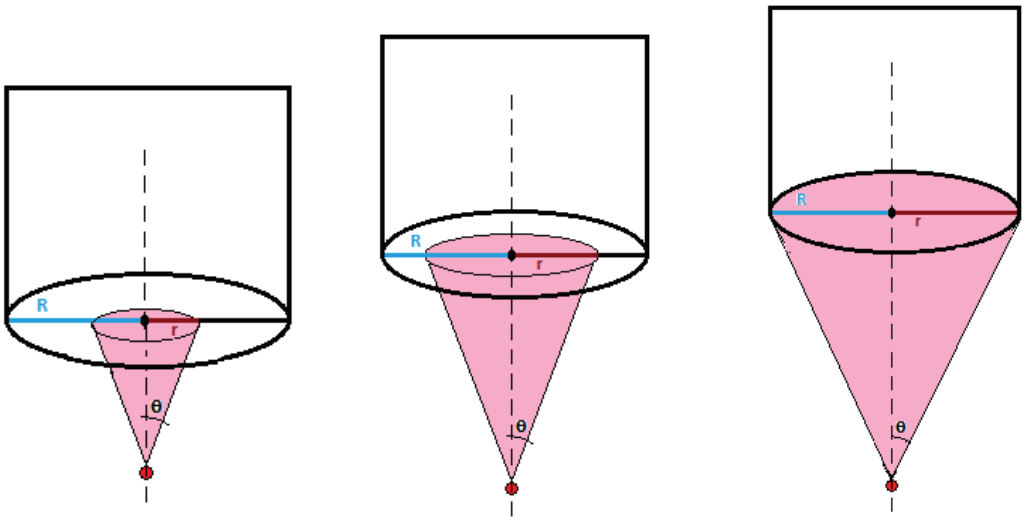

Figura 12 - Ilustração da geometria de coleta de dados para uma situação hipotética. *R* é o raio da fibra e *r* é o raio da circunferência formada pelo ângulo sólido que atinge a face coletora da fibra. A medida que a fibra se afasta do meio fluorescente, *r* se aproxima de *R* ($r \leq R$).

O ângulo sólido Ω é definido como:

$$\Omega = \frac{A}{z^2} \tag{3}$$

onde *A* é a área de emissão total e *z* a distância entre o centro emissor e a fibra de coleta. Assim, $A = \Omega . z^2$. Como $\Omega_{(esfera)} = 4\pi$, então:

$$A = 4\pi z^2 \tag{4}$$

A potência P_z acoplada à emissão de fluorescência é dada por:

$$P_z = \frac{P_0}{A}.4\pi R^2 \qquad (5)$$

com P_0 sendo a potência emitida. Substituindo a equação (4) em (5), temos que:

$$P_z = P_0 \frac{R^2}{z^2} \qquad (6)$$

A equação (6) representa a potência coletada, a uma distância *z*, caso toda luz emitida pela fonte fosse acoplada à fibra. Contudo, para distâncias muito pequenas, a coleta de luz depende do ângulo de aceitação da fibra de coleta. De certa forma, isso pode representar a eficiência η de coleta da fibra, dada pela equação (7):

$$\eta = \frac{r^2}{R^2} \qquad (7)$$

Assim, a equação passa a ser

$$P_z = P_0 \frac{R^2}{z^2}\eta \qquad (8)$$

O valor de *r* está relacionado com a distância *z* por um coeficiente α, conforme a equação (9).

$$r^2 = \alpha.z^2 \qquad (9)$$

Finalmente, substituindo as equações (7) e (9) na equação (8) temos que, neste regime de proximidade, P_z é diretamente proporcional a P_0, e o coeficiente linear desta proporcionalidade é dado pelo coeficiente que relaciona r e z na equação (9).

$$P_z = \alpha P_0 \qquad (10)$$

A equação (10) mostra que, para fontes de emissão muito próximas da coleta, o decaimento da potência não depende do comprimento de onda. Para distâncias maiores, a luz coletada é resultado não apenas da diminuição da intensidade, mas também do efeito do meio túrbido na propagação da luz, que se torna mais evidente com o aumento da profundidade. Outro ponto importante na análise é que, em distâncias muito pequenas, um alto número de fótons balísticos – aqueles que sofreram pouca modificação do caminho óptico em função do meio – é detectado. Assim, para a geometria empregada no experimento, as medidas do espectro de fluorescência, feitas a distâncias de até 0,13 mm, apresentam uma coleta de luz modificada cujos efeitos, por esse motivo, não foram pormenorizados na análise desenvolvida.

A Figura 13 mostra os gráficos do decaimento da intensidade de luz para diferentes comprimentos de onda na região espectral das principais bandas de emissão do espectro de fluorescência do Photogem®, onde A, B, C e D correspondem aos comprimentos de onda de 612 nm, 625 nm, 670 nm e 685 nm, respectivamente. Como as medidas foram feitas uma única vez, as barras de erro foram estimadas em 5%.

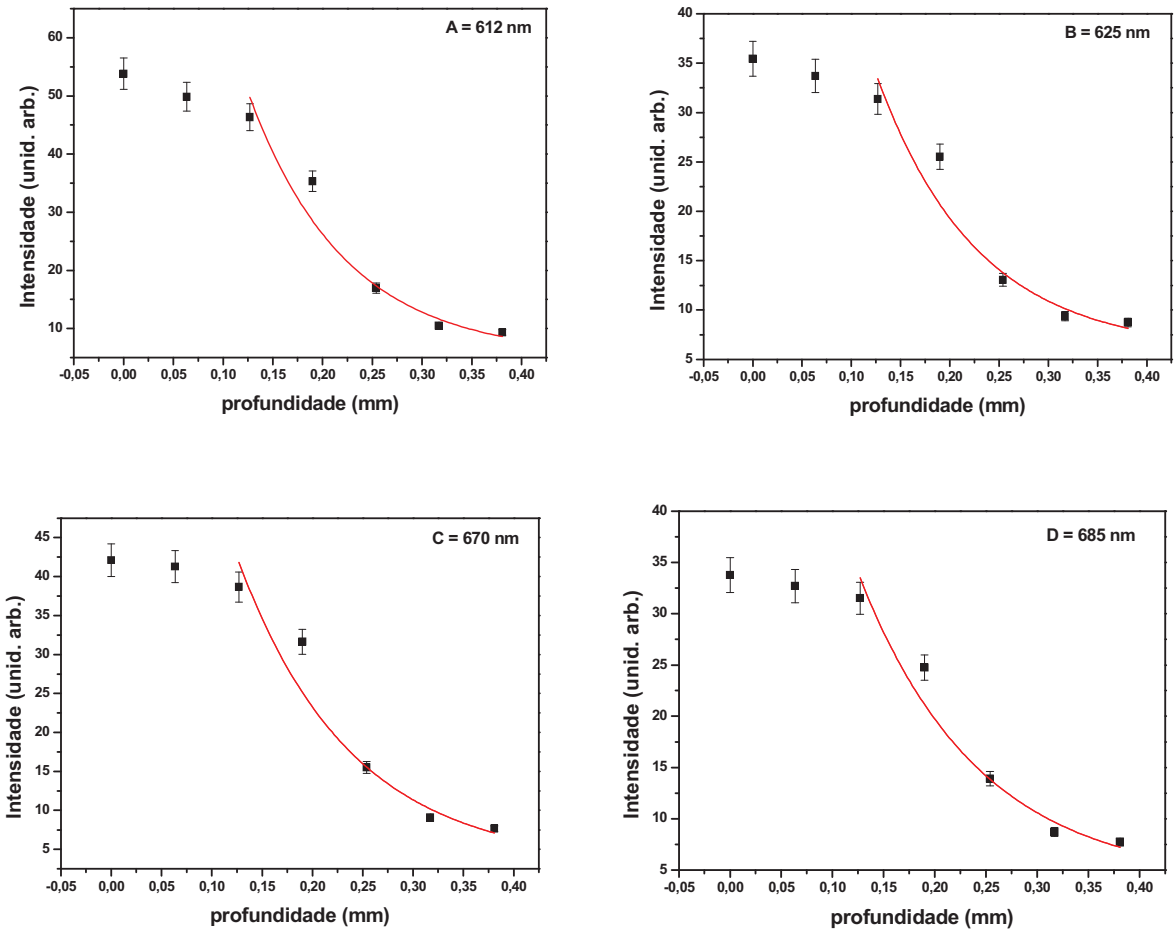

Figura 13 - Gráficos do decaimento da intensidade de luz para diferentes comprimentos de onda próximos aos principais picos do espectro de fluorescência do Photogem®. (A),(B),(C) e (D) correspondem aos comprimentos de onda de 612 nm, 625 nm, 670 nm e 685 nm, respectivamente.

Pode-se observar a partir dos gráficos presentes na Figura 13 que, para distâncias menores que aproximadamente 0,13 mm, o comportamento linear discutido (equação 10) foi observado. Por esse motivo, considerou-se no estudo da propagação da luz no meio túrbido profundidades a partir desse ponto.

Para avaliar o quanto o espectro de fluorescência varia com a distância de coleta, foi definida uma grandeza denominada *variação da fidelidade espectral* (ΔV), dada pelo valor máximo do espectro subtraído por seu valor mínimo, uma vez que o espectro não permanece constante. Esses cálculos foram feitos com base no espectro da Figura 11 e seus resultados são apresentados na Figura 14.

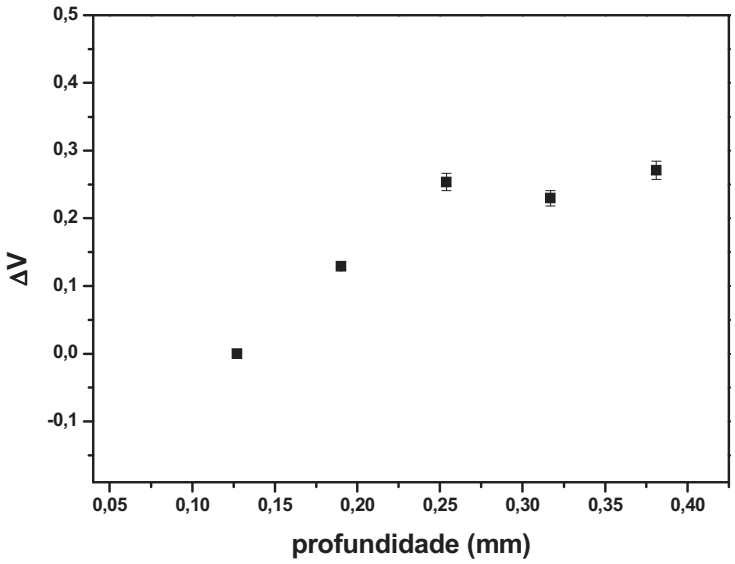

Figura 14 - Variação espectral em função da profundidade.

O gráfico da Figura 14 permite observar um aumento na variação da fidelidade espectral à medida que a profundidade também aumenta. Isso se deve ao fato dos comprimentos de onda sofrerem variações diferentes no meio. Assim, quanto maior a profundidade, mais perceptível se torna essa diferença.

Para analisar a contribuição dos comprimentos de onda na variação espectral, os dados da diminuição da intensidade em função da profundidade foram graficados seguindo a equação (1). Assim, foram obtidos os coeficientes de atenuação efetivos (μ_{eff}) para cada um desses comprimentos de onda, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valor de μ_{eff} para cada comprimento de onda graficado.

Comprimento de onda (nm)	Valor de μ_{eff} (mm^{-1})
612	10±4
625	10±4
670	9±4
685	9±4

O grande desvio entre as medidas aumenta as barras de erro, tornando difícil diferenciar a atenuação para comprimentos de onda próximos. Apesar disso, fica evidente a partir dos valores da tabela 1 que ocorre um decréscimo no coeficiente de atenuação total com o aumento dos comprimentos de onda. As grandes barras de erro devem-se, entre outros fatores, à geometria de coleta – devido à proximidade entre fibra e centro fluorescente – e à alta turbidez do meio – que dificulta a visualização do alinhamento das fibras de excitação e coleta. Além disso, a região espectral investigada, intervalo entre 612 nm e 685 nm, não apresenta grande distinção entre os coeficientes de absorção e espalhamento para o *phantom* produzido e, portanto, não será observada uma grande modificação da propagação no meio.

A partir dos valores de μ_{eff}, torna-se possível obter o valor de correção espectral, $\xi(\lambda,z)$, para cada profundidade. Multiplicando os valores de correção espectral pela intensidade superficial ($I_0 = 1$), obtêm-se os espectros modificados em função do comprimento de onda. A Figura 15 apresenta uma comparação entre as modificações espectrais do caso hipotético (A), em que $\xi(\lambda,z) = 1$, e do caso real medido *in vitro* (B), em que $\xi(\lambda,z)$ sofre variações para cada comprimento de onda, para uma determinada profundidade (z = 0,5 mm).

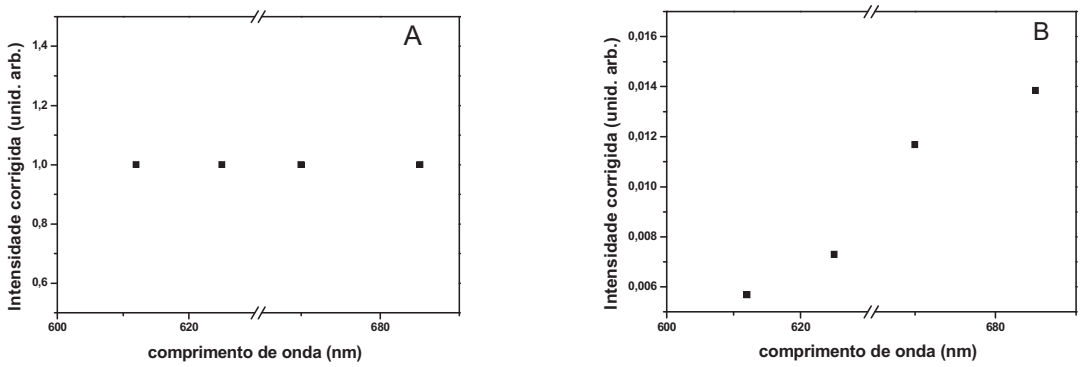

Figura 15 - Intensidade corrigida espectralmente em z = 0,5 mm. (A) para um caso hipotético e (B) para o caso real medido *in vitro*.

Como ilustrado na Figura 15(B), há uma distorção do espectro de fluorescência detectado – ou seja, o sinal de cada componente espectral muda à medida que a luz se propaga pelo meio.

Para exemplificar esse comportamento, a Figura 16 representa um espectro de emissão de fluorescência hipotético, composto de 2 picos, um em 612 nm e outro em 685 nm, e de mesma intensidade inicial, I_0 igual a 1 unidade arbitrária. Ao percorrer 0,5 mm, devido aos efeitos atenuadores (absorção e espalhamento), o espectro será modificado de acordo com seu comprimento de onda e cada um dos picos será diferentemente atenuado.

$$I(612) = e^{-10.0,5} I_0(612) = 0,0067 unid.arb.$$

$$I(685) = e^{-9.0,5} I_0(685) = 0,0111 unid.arb.$$

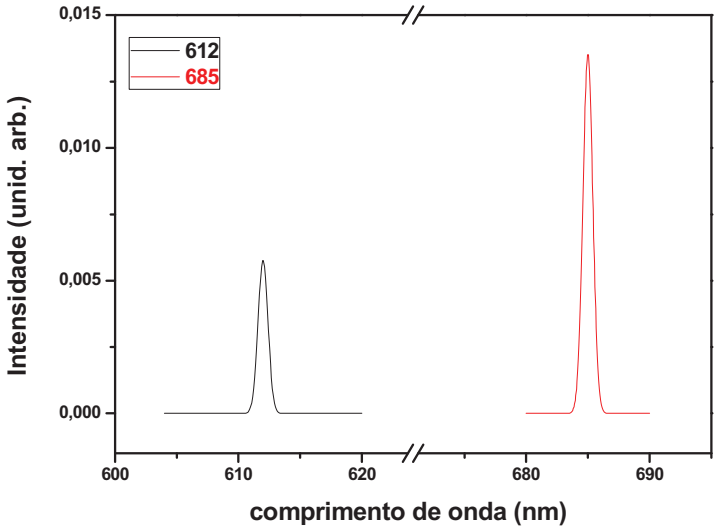

Figura 16 - Intensidade modificada dos comprimentos de onda 612nm e 685nm após a atenuação sofrida no meio.

Apesar de, no espectro de emissão hipotético,

$$\frac{I(612)}{I(685)} = 1 unid.arb.,$$

na detecção tem-se

$$\frac{I(612)}{I(685)} = 0{,}6 unid.arb.$$

Haverá, portanto, 40% de variação no sinal entre os dois comprimentos de onda. Caso a razão destes picos viesse a ser critério de identificação de fluorescência, tal consideração seria comprometida pela atenuação diferenciada para cada comprimento de onda.

Na emissão de fluorescência do Photogem® excitado em 408 nm, esses comprimentos de onda apresentam a razão inicial entre *I*(612) / *I*(685) diferente (*I*(612) / *I*(685) = 1,5), e essa razão muda com a presença do meio (*I*(612) / *I*(685) = 0,9, para *z* = 0,5 mm).

Com base no que foi observado, pode-se descrever o que ocorre com a luz usando uma descrição matemática simplificada. Supondo-se um volume fluorescente, cuja intensidade de excitação fixa, I_0, emite em um determinado comprimento de onda (λ) e tem uma extensão *L*, no interior de um meio túrbido e a uma distância *z'* da fibra coletora, como ilustrado na Figura 17.

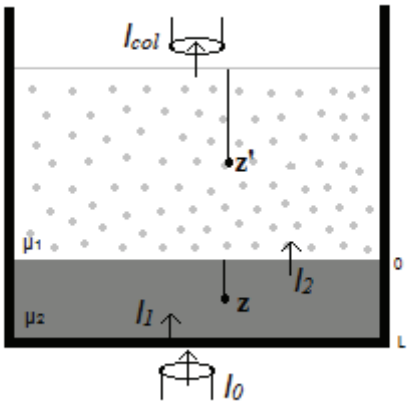

Figura 17 - Ilustração de um volume fluorescente, de extensão *L*, no interior de um meio túrbido e a uma distância *z'* da fibra coletora.

Na equação (11), I_1 é a intensidade de excitação que chega ao FS, μ_2 é o coeficiente efetivo do centro fluorescente e *z* a espessura do volume utilizado de FS

$$I_1 = I_0 e^{-\mu_2(\lambda)z} \tag{11}$$

A fluorescência do centro emissor (I_2) depende da intensidade da excitação (I_0) e do rendimento de emissão de fluorescência γ, ou seja, da capacidade do centro fluorescente em transformar a energia que absorve em fluorescência. Assim, temos:

$$I_2 = I_1 \gamma e^{-\mu_2(\lambda)z} \tag{12}$$

Como o centro fluorescente apresenta uma extensão *L,* é necessário somar a contribuição de todo o volume.

$$dI_2 = I_0 \gamma e^{-2\mu_2(\lambda)z} dz \tag{13}$$

$$I_2 = I_0 \gamma \int_0^L e^{-2\mu_2(\lambda)z} dz \tag{14}$$

A equação (14) corresponde à emissão do meio fluorescente. O rendimento γ depende da concentração *c* do centro fluorescente, da área *A* e da eficiência β de fluorescência do FS,

$$\gamma = c\beta A \tag{15}$$

Então, a intensidade de fluorescência do centro emissor será:

$$I_2 = cA\beta I_0 \int_0^L e^{-2\mu_2(\lambda)z} dz \tag{16}$$

Para ser coletada, essa intensidade I_2 tem que atravessar o meio túrbido e será modificada por ele. Com isso:

$$I_{col} = I_2 e^{-\mu_1(\lambda)z'} \tag{17}$$

$$I_{col} = cA\beta I_0 e^{-\mu_1(\lambda)z'} \int_0^L e^{-2\mu_2(\lambda)z} dz \tag{18}$$

$$\boxed{I_{col} = \frac{I_0 \beta c A}{2\mu_2} e^{-\mu_1(\lambda)z'} \left[1 - e^{-2\mu_2(\lambda)L}\right]} \tag{19}$$

onde μ_1 é o coeficiente efetivo do meio túrbido.

Através da equação (19) obtêm-se a intensidade de fluorescência coletada quando a fibra de detecção está afastada uma distância *z'* do centro fluorescente. A expressão (19), portanto, pode ser utilizada para descrever o sinal coletado sob estas condições. Observando a equação (19), percebe-se que se o coeficiente efetivo do meio onde se encontra o centro fluorescente (μ_2) for muito grande, a intensidade coletada será menor, pois a luz sofrerá mais atenuação do meio.

3.1.2 Afastamento da fibra de excitação da fonte emissora de fluorescência

Além do estudo da variação do espectro de fluorescência coletado, de acordo com a profundidade, em um meio túrbido, também é necessário observar a dependência desse espectro com a excitação que chega ao centro fluorescente.

Para excitar um centro fluorescente dentro do meio túrbido, a luz de excitação propaga-se através deste. Nesse caminho, como já discutido na sessão anterior, diferentes comprimentos de onda sofrem diferentes atenuações. Por isso, o Photogem® foi excitado com os comprimentos de onda 408 nm e 532 nm, a diferentes distâncias entre excitação e emissão, simulando diferentes profundidades. Os gráficos obtidos são mostrados na Figura 18, onde A corresponde a excitação com o comprimento de onda 408 nm e B à 532 nm.

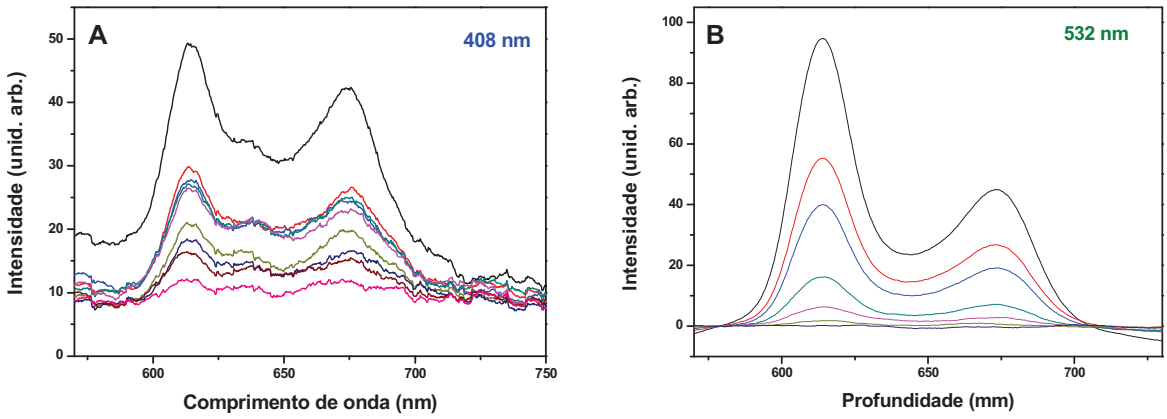

Figura 18 - Gráfico da emissão da fluorescência do Photogem®, para diferentes profundidades, em função do comprimento de onda. (A) excitação em 408 nm e (B) excitação em 532 nm

O decaimento médio da intensidade de fluorescência em função da profundidade para os comprimentos de onda 408 nm e 532 nm, respectivamente, pode ser observado na Figura 19.

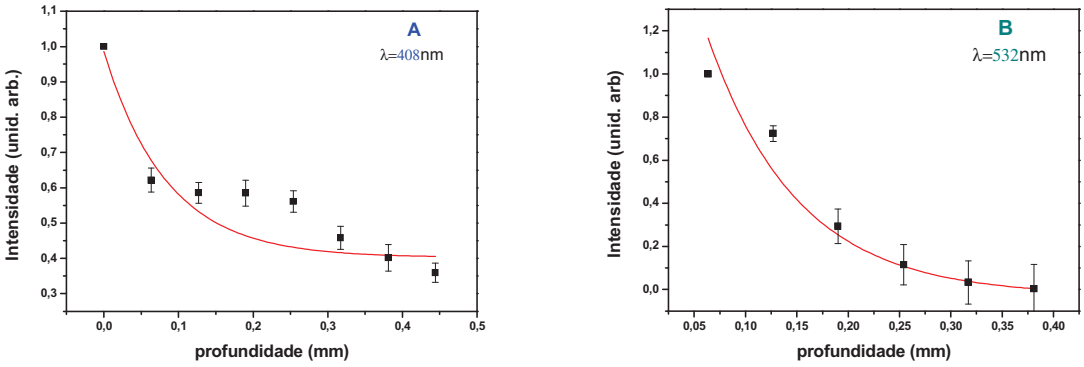

Figura 19 - Decaimento médio da intensidade de fluorescência em função da profundidade. (A) 408 nm e (B) 532 nm.

Os dados da Figura 19 foram graficados seguindo a equação (1). Assim, foi obtido o valor de μ_{eff} para cada um desses comprimentos de onda, como é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Valor de μ_{eff} para cada comprimento de onda.

Comprimento de onda (nm)	Valor de μ_{eff} (mm^{-1})
408	12±3
532	11±1

A partir dos valores de μ_{eff} de cada comprimento de onda é possível obter o valor de correção espectral, $\xi(\lambda)$, para cada profundidade. Novamente, é possível supor uma fonte de excitação emitindo a mesma intensidade inicial, I_0 igual a 1 unidade arbitrária, nos comprimentos de onda 408 nm e 532 nm. Na profundidade de 0,5 mm, devido aos efeitos atenuantes do meio (absorção e espalhamento), os comprimentos de onda serão diferentemente atenuados.

$$I(408) = e^{-12.0,5} I_o(408) = 0,0025 unid.arb.$$

$$I(532) = e^{-11.0,5} I_o(532) = 0,0041 unid.arb$$

Com base nas observações realizadas e supondo intensidades iniciais de mesma ordem, pode-se demonstrar que o comprimento de onda 408 nm sofre maior atenuação no meio do que o comprimento de onda 532 nm.

Essa consideração é um fator importante quando se deseja observar a fluorescência, pois mostra que a intensidade de excitação é o limitante para a detecção. Para que a fluorescência de um centro emissor seja observada, a luz de excitação precisa atingir o FS em uma intensidade que seja suficiente para excitá-lo. Assim, se houver FS em uma região onde a luz de excitação não consiga atingir, não será observada a fluorescência.

A Figura 20 apresenta a ilustração de um volume fluorescente, de extensão *L*, no interior de um meio túrbido, a uma distancia *z'* da fibra de excitação.

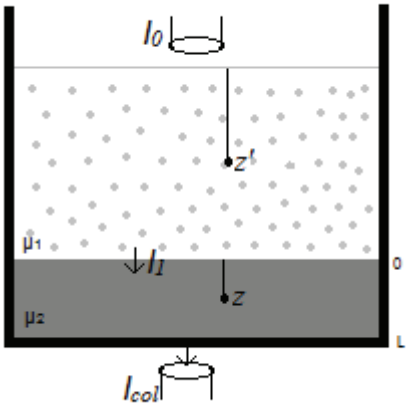

Figura 20 - Ilustração de um volume fluorescente, de extensão *L*, no interior de um meio túrbido e a uma distância *z'* da fibra de excitação.

De modo similar ao da seção anterior, é possível descrever matematicamente, de modo simples, a propagação da luz nestas condições. A luz de excitação I_0 sofre atenuação do meio túrbido até atingir o centro fluorescente, e continua sofrendo atenuação até atingir todo o volume do FS:

$$I_1 = I_0 e^{-\mu_1(\lambda)z'} e^{-\mu_2(\lambda)z} \tag{20}$$

Na equação (20), I_1 é a intensidade de excitação que chega ao FS, μ_1 é o coeficiente efetivo do meio túrbido, μ_2 é o coeficiente efetivo do centro fluorescente, *z'* é a espessura do volume do meio túrbido e *z* é a espessura do volume do centro fluorescente.

A fluorescência do centro emissor que será coletada pela fibra (I_{col}), depende da intensidade da excitação que chega a ele (I_1), do rendimento de emissão de fluorescência γ, da espessura *z* do volume do centro fluorescente.

$$I_{col} = I_1 \gamma e^{-\mu_2(\lambda)z} \tag{21}$$

$$dI_{col} = I_0 \gamma e^{-\mu_1(\lambda)z'} e^{-2\mu_2(\lambda)z} dz \tag{22}$$

$$I_{col} = I_0 \gamma e^{-\mu_1(\lambda)z'} \int_0^L e^{-2\mu_2(\lambda)z} dz \tag{23}$$

Substituindo a equação (15) na equação (23):

$$I_{col} = cA\beta I_0 e^{-\mu_1(\lambda)z'} \int_0^L e^{-2\mu_2(\lambda)z} dz \tag{24}$$

Enfim, obtém-se a descrição da fluorescência coletada variando-se a distância da excitação:

$$\boxed{I_{col} = \frac{I_0 \beta c A}{2\mu_2} e^{-\mu_1(\lambda)z'} \left[1 - e^{-2\mu_2(\lambda)L}\right]} \tag{25}$$

Através da equação (25) obtêm-se a intensidade de fluorescência coletada quando a fibra de excitação está afastada uma distância *z'* do centro fluorescente

Nota-se que, quando se varia apenas um parâmetro (coleta ou excitação), as equações que regem a I_{col} são iguais – equação (19) igual a equação (25). Contudo, o comprimento de onda que vai se propagar pelo meio túrbido será diferente, o que influenciará a I_{col}. A luz de excitação (menores comprimentos de onda) será mais atenuada que a fluorescência emitida pelo centro fluorescente (maiores comprimentos de onda).

3.1.3 Afastamento simultâneo da fibra de excitação/coleta da fonte emissora de fluorescência

A Figura 21 mostra o gráfico da emissão da fluorescência do Photogem®, para diferentes profundidades, em função do comprimento de onda quando há um afastamento simultâneo da fibra de excitação/coleta da fonte emissora de fluorescência.

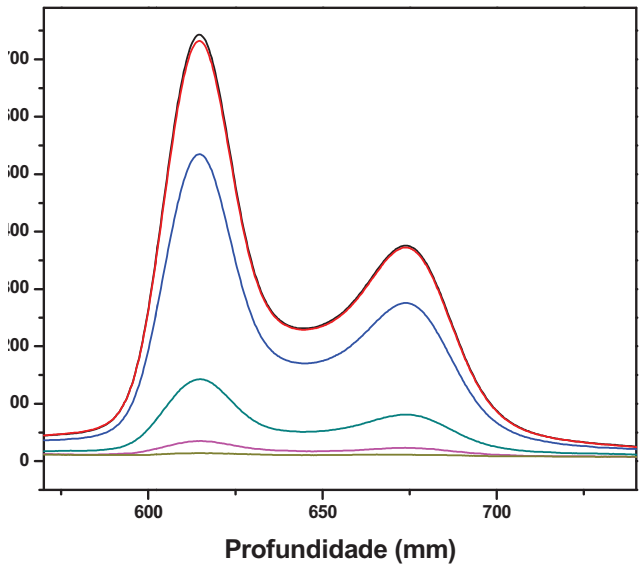

Figura 21 - Gráfico da emissão da fluorescência do Photogem®, para diferentes profundidades, em função do comprimento de onda

A modificação da luz de excitação e a modificação da fluorescência no meio túrbido ocorrem de modo inter-relacionado. A Figura 22 é a ilustração de um volume fluorescente, de extensão *L*, no interior de um meio túrbido, a uma distância *z'* da fibra de excitação e da fibra coletora.

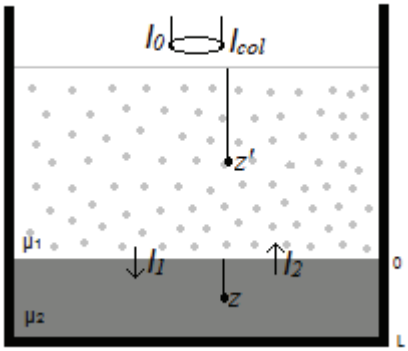

Figura 22 - Ilustração de um volume fluorescente, de extensão *L*, no interior de um meio túrbido e a uma distância *z'* da fibra de excitação e da fibra de coleta.

A luz de excitação, I_0, em 408 nm, percorre o meio túrbido para chegar ao centro fluorescente – na forma expressa pela equação (20) – pois a luz de excitação sofre alterações no meio túrbido.

Ao chegar ao centro fluorescente, a intensidade I_1 é absorvida e uma parcela é transformada em fluorescência – equação (12). A intensidade I_2 que será emitida pelo centro fluorescente está representada pela equação (26).

$$I_2 = I_0 \gamma e^{-\mu_1(\lambda)z'} \int_0^L e^{-2\mu_2(\lambda)z} dz \tag{26}$$

A intensidade I_2 será coletada após atravessar novamente o meio túrbido e sofrer atenuação.

$$I_{col} = I_0 \gamma e^{-2\mu_1(\lambda)z'} \int_0^L e^{-2\mu_2(\lambda)z} dz \tag{27}$$

substituindo a equação (15) na equação (27):

$$I_{col} = cA\beta I_0 e^{-2\mu_1(\lambda)z'} \int_0^L e^{-2\mu_2(\lambda)z} dz \tag{28}$$

$$\boxed{I_{col} = \frac{cA\beta I_0 e^{-2\mu_1(\lambda)z'}}{2\mu_2}[1 - e^{-2\mu_2 L}]} \tag{29}$$

Como se pode observar na equação (29), a intensidade de fluorescência coletada depende da atenuação da intensidade inicial de excitação e da atenuação da intensidade de fluorescência do centro emissor. Percebe-se, também, ao analisar a equação (29), que se o coeficiente efetivo do meio onde se encontra o centro fluorescente (μ_2) for muito grande, a intensidade coletada será menor, pois a luz sofrerá mais atenuação do meio.

A Figura 23 mostra a curva do decaimento da intensidade do principal pico de fluorescência do Photogem® (612 nm) em função da profundidade. Nota-se no gráfico que, para as medidas realizadas com uma distância entre a fibra de coleta e o centro emissor menor do que aproximadamente 0,13 mm, o mesmo comportamento de coleta explicado no começo deste capítulo é observado. Por este

motivo, considerou-se na análise apenas os dados obtidos a partir dessa profundidade.

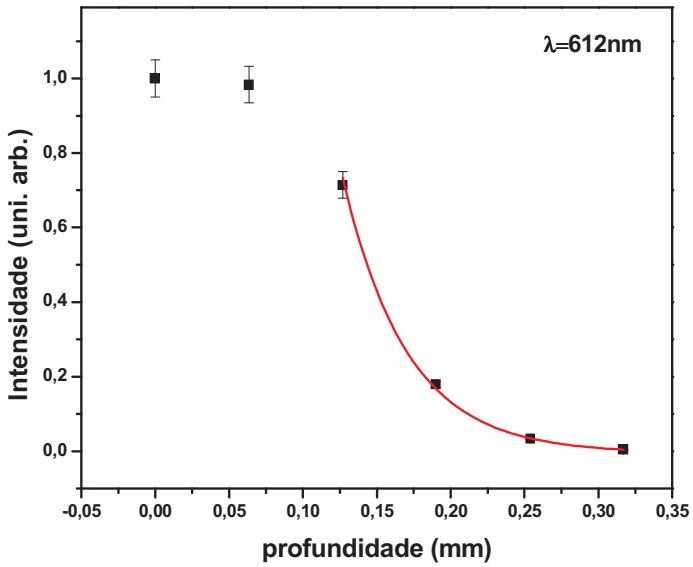

Figura 23 - Decaimento da intensidade de fluorescência do principal pico de fluorescência do Photogem® em função da profundidade.

Os dados presentes no gráfico da Figura 23 foram graficados de acordo com a equação (1), e o μ_{eff} para esse decaimento foi calculado:

$$\mu_{eff}(612) = 23 \pm 1 \text{ mm}^{-1}$$

Observa-se na equação (29) que a intensidade coletada depende da atenuação da luz de excitação e da atenuação da fluorescência no meio túrbido, ou seja:

$$e^{-2\mu_{eff_1}(\lambda)z} = e^{-\mu_{eff_1}(408)z} . e^{-\mu_{eff_1}(612)z}$$

$$e^{-2\mu_{eff_1}(\lambda)z} = e^{-(12+10)z}$$

Assim, ao se associar o μ_{eff} para 408 nm, usado para a excitação, ao μ_{eff} do 612 nm da fluorescência, obtém-se um μ_{eff} total de:

$$\mu_{eff\ total} = (12 \pm 3) + (10 \pm 4)\ mm^{-1}$$

$$\mu_{eff\ total} = 22 \pm 7\ mm^{-1}$$

Ao comparar as medidas experimentais e os cálculos, verifica-se que os valores coincidem dentro do erro atribuído. Isso mostra que a fluorescência coletada depende de fato das alterações sofridas pela luz no meio túrbido, de forma muito análoga às considerações feitas nesse estudo. Pode-se, portanto, assumir que as simplificações e suposições feitas nesse estudo descrevem razoavelmente bem os fenômenos envolvidos, e podem ser aceitas como válidas.

A análise realizada aqui foi feita assumindo-se que a concentração do centro fluorescente não varia com o tempo. Isto representa bem situações como as observadas no diagnóstico óptico de lesões quando se analisa a autofluorescência do tecido. Por outro lado, há casos em que o elemento fluorescente não é constante ou estável no meio investigado. Tais dinâmicas temporais são elementos importantes, que devem ser considerados em aplicações como detecção fotodinâmica e terapia fotodinâmica.

3.1.4 Dependência com o tempo.

Nas seções anteriores foi visto que a intensidade de fluorescência de um FS depende do rendimento de emissão de fluorescência γ do mesmo. Esse rendimento, por sua vez, depende, entre outros fatores, da concentração c do FS. Até agora, a concentração foi considerada constante. Porém, se essa concentração apresenta uma variação temporal, consequentemente a intensidade de fluorescência também sofrerá modificação com o tempo. Nessa seção, serão observadas as situações onde as taxas de variação de fluorescência estão associadas às taxas de variação de concentração.

A concentração, agora, depende do tempo *t* e de *z*, em uma função cujo comportamento pode ser descrito, em primeira aproximação, pela equação (30) para o processo de formação do fotossensibilizador (detecção fotodinâmica) e pela equação (31) na degradação do fotossensibilizador (terapia fotodinâmica).

$$c(z,t) = c_0(1 - e^{\frac{-t}{\tau_F}})e^{\frac{-z}{\zeta_F}} \tag{30}$$

$$c(z,t) = c_0 e^{\frac{-t}{\tau_D}} e^{\frac{-z}{\zeta_D}} \tag{31}$$

Nestas expressões, τ_F é o tempo característico de formação do fotossensibilizador, τ_D é o tempo característico de degradação do fotossensibilizador, ζ_F é o decaimento da concentração do FS em função da profundidade no processo de formação do FS (depende, entre outros fatores metabólicos, da penetração do pró-fármaco no tecido), ζ_D é o decaimento da concentração do FS em função da profundidade no processo de degradação do FS (depende, entre outros fatores metabólicos, da penetração da luz de tratamento no tecido), *z* é a profundidade e c_0 é uma constante.

O gráfico da Figura 24 ilustra uma situação onde *z'*=0 (lesão na superfície), na formação do fotossensibilizador (A) e na degradação do fotossensibilizador (B). Onde t=0 é o inicio desses processos.

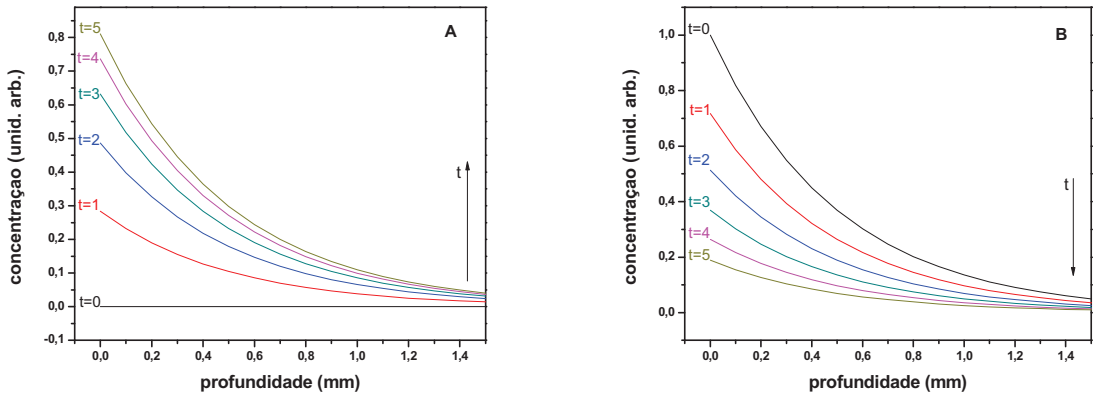

Figura 24 - Taxa de variação da concentração de um fotossensibilizador em função da profundidade. (A), formação do fotossensibilizador e (B) degradação do fotossensibilizador.

Assim, a equação (28) fica:

$$I(t,z) = A\beta I_0 e^{-2\mu_1(\lambda)z'} \int_0^L c(z,t) e^{-2\mu_2(\lambda)z} dz \tag{32}$$

e a taxa de variação da intensidade de fluorescência será:

$$\frac{\partial I}{\partial t} = A\beta I_0 e^{-2\mu_1(\lambda)z'} \int_0^L \frac{\partial c(z,t)}{\partial t} e^{-2\mu_2(\lambda)z} dz \tag{33}$$

Substituindo a equação (30) na (33), tem-se a taxa de variação de intensidade de fluorescência, na formação do fotossensibilizador, quando esta varia com o tempo e a posição (equação 34).

$$\boxed{\frac{dI}{dt} = A\beta I_0 e^{-2\mu_1(\lambda)z'} \frac{c_0 \zeta_F}{\tau_F (1 + 2\zeta_F \mu_2(\lambda))} e^{\frac{-t}{\tau_F}} (1 - e^{\frac{-L}{\zeta_F}} e^{-2\mu_2(\lambda)L})} \tag{34}$$

Da mesma forma, para obter a equação correspondente à taxa de variação de intensidade de fluorescência na degradação do fotossensibilizador (equação 35), substitui-se a equação (31) na (33).

$$\boxed{\frac{dI}{dt} = -A\beta I_0 e^{-2\mu_1(\lambda)z'} \frac{c_0 \zeta_D}{\tau_D (1 + 2\zeta_D \mu_2(\lambda))} e^{\frac{-t}{\tau_D}} (1 - e^{\frac{-L}{\zeta_D}} e^{-2\mu_2(\lambda)L})} \tag{35}$$

O comportamento geral de ambas as taxas de variação – equações (34) e (35) – diferem apenas no sinal. Contudo, é importante ressaltar que os coeficientes de formação e degradação dependem de fatores diferentes. Se os fatores dos quais eles dependem resultarem em valores de τ_F e τ_D, bem como de ζ_F e ζ_D, iguais, então será observado que as taxas de formação e degradação estarão equilibradas, ou seja, serão iguais em módulo.

Parâmetros ópticos do tecido, como μ_1, μ_2 e a distância L, podem ser obtidos através de diferentes técnicas. Uma vez conhecidos, e a partir do monitoramento da intensidade em função do tempo, é possível estimar os parâmetros cinéticos de formação, importantes para definir protocolos de tratamento. O parâmetro τ_F, por exemplo, pode permitir a identificação do melhor momento para iniciar o tratamento.

Tal monitoramento poderia ainda permitir que se avalie a eficiência de formação do FS no tecido, apenas com base na variação de intensidade de luz coletada.

De forma análoga, podemos obter também os parâmetros cinéticos de degradação, os quais são importantes para avaliar até que ponto, no tempo, o monitoramento da concentração do FS é efetivo, ou seja, até onde o sinal emitido é detectável. Conhecendo estes parâmetros, seria possível realizar estudos que permitissem estimar, em profundidade, o que acontece durante a TFD a partir do sinal coletado na superfície.

Quando se trata de lesões de pele, estas geralmente já apresentam alterações na superfície do tecido biológico (em profundidades próximas de z'=0), e a atenuação que a luz sofre no meio, comumente túrbido, é basicamente aquela relacionada à lesão (em termos da análise aqui apresentada, aos parâmetros μ_2 e z).

O exemplo que se segue é uma ilustração de como a diminuição da intensidade de fluorescência da PpIX é usada para acompanhar o processo de terapia fotodinâmica (TFD). O procedimento consiste, basicamente, em aplicar um pró-fármaco (neste estudo, o ácido aminolevulínico a 20%), esse pró-fármaco é um precursor da PpIX que vai se acumular, preferencialmente, em tecidos lesionados e, após 3 horas de espera, a sua fluorescência na região do vermelho poderá ser observada. No decorrer da TFD, o FS será degradado e a observação da sua fluorescência tende a diminuir.

A sequência de imagens da Figura 25 mostra a degradação da PpIX ao longo do tempo em um CBC pré-auricular esquerdo durante a iluminação da TFD. Essa sequência é representada de A a D, que correspondem aos tempos 0, 6, 12 e 17 minutos de terapia, respectivamente. O tempo zero corresponde à lesão antes do início do tratamento e o tempo de 17 minutos corresponde à lesão imediatamente após o tratamento.

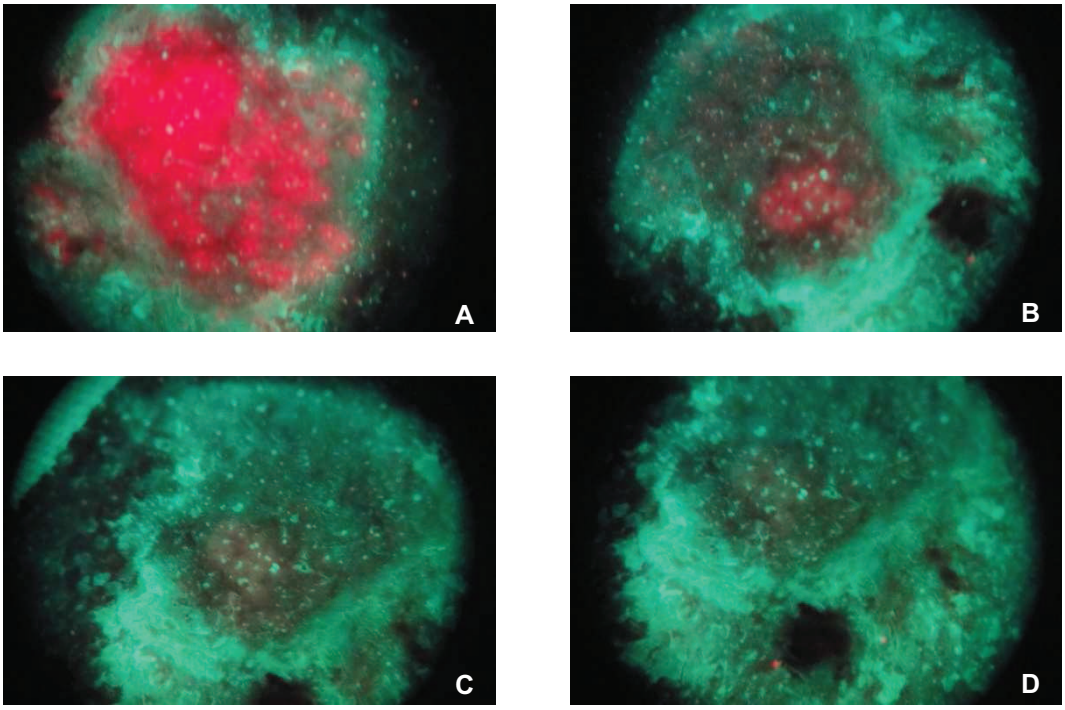

Figura 25 - Degradação da PpIX ao longo do tempo em um CBC pré-auricular esquerdo durante a terapia fotodinâmica. (A), (B), (C) e (D), correspondem aos tempos 0, 6, 12 e 17 minutos de terapia, respectivamente.

Como se observa nas imagens da Figura 25, nos primeiros 6 minutos de tratamento tem-se uma grande diminuição da fluorescência da lesão, o que poderia levar à interpretação de que a iluminação empregada teria sido suficiente para degradar praticamente toda a PpIX presente na lesão. Contudo, com base nas observações realizadas *in vitro*, é possível fazer uma análise mais cuidadosa desta observação *in vivo.* A diminuição de fluorescência visualizada não quer necessariamente dizer que todo o FS foi degradado. O que ocorre é que a PpIX presente na superfície da lesão (onde chega a luz de excitação da fluorescência) foi degradada, mas não é possível saber sobre o fotossensibilizador presente nas regiões mais profundas do tumor. Em regiões abaixo da superfície, a luz de excitação (408 nm) pode não ter atingido intensidade suficiente para excitar o fotossensibilizador e/ou a fluorescência de centros emissores profundos pode não ter atingido a superfície, onde se encontra o detector. Esse é um dos motivos pelos quais os protocolos prevêem uma continuação da iluminação mais prolongada: para garantir que a luz de tratamento (630 nm), que penetra mais profundamente no tecido, possa ativar tanto quanto possível o fotossensibilizador que está em uma região mais profunda do tumor.

Com esses resultados, é possível concluir que não se pode dizer, observando a fluorescência de uma lesão através de uma avaliação superficial, qual a sua profundidade no tecido. Usando a fluorescência, não é possível observar profundidades maiores que aquelas a que a luz de excitação consegue chegar, pois esta é a profundidade máxima da qual a fluorescência gerada poderá ser coletada na superfície, lembrando que a luz de excitação sofre maior atenuação em meios túrbidos. Esta observação tem conseqüências importantes para o diagnóstico e tratamento de lesões de pele. Se a lesão tiver uma espessura muito grande, a luz utilizada no tratamento não será capaz de atingi-la em sua totalidade. Então, ao final da terapia, é provável que ainda haja células de tecido alterado, o que pode levar a uma recidiva da lesão, o que pode agravar o quadro clínico do paciente. Por isso, a TFD não é recomendada para lesões espessas e que já tenham invadido camadas mais profundas do tecido. Por outro lado, se a lesão for superficial, não infiltrativa, essa técnica é muito eficiente e o monitoramento em tempo real da evolução do tratamento através da fluorescência pode ser empregado.

No caso da fluorescência utilizada no diagnóstico de lesões de pele, a informação de que em uma determinada área superficial existe uma lesão já é de extrema importância para o diagnóstico. Mesmo que não seja possível dizer sua profundidade, pode-se ter informação sobre a borda da lesão, essencial para estimar margens de segurança para remoções cirúrgicas ou por técnicas como a TFD.

Na seção seguinte, será apresentado um estudo clinico que usará as informações da fluorescência da pele para ajudar no diagnóstico de lesões malignas e pré-malignas. O estudo em questão usará imagens de fluorescência para distinguir o tecido sadio do tecido lesionado, empregando a autofluorescência e a detecção dinâmica (induzida por ALA).

3.2 Estudo *In vivo*

Na sessão 3.1 foi visto que, para se observar a fluorescência de um determinado centro fluorescente, a luz de excitação precisa sair de uma fonte, atravessar um meio túrbido com intensidade suficiente para excitar o centro fluorescente, que vai absorver essa luz de excitação, emitir a fluorescência e essa volta a atravessar o meio túrbido até ser detectada.

Esse processo pode ser observado no estudo clínico do uso da imagem de fluorescência para diagnóstico. Como já detalhado anteriormente, o que acontece na prática é aplicar um pró-fármaco (ALA), que é o precursor da formação do fotossensibilizador (PpIX), e após algum tempo de espera (nesse estudo, 1 hora), ilumina-se a lesão e observa-se a fluorescência. Essa técnica é empregada, pois tem sido demonstrado uma maior produção de PpIX por células tumorais em comparação às células normais.

Após o estudo inicial, sabe-se que a fluorescência que se observa sofreu modificações devido à penetração da luz no tecido biológico e que a luz de excitação é um limitante da observação da fluorescência da lesão. Isso significa que, ao observar a fluorescência das lesões que se seguem não terá como dizer a qual profundidade ela se estende, já que não tem como saber se há mais fotossensibilizador onde a luz azul, usada para excitar o fotossensibilizador, não consegue atingir.

O objetivo dessa sessão é, assim, observar se a detecção fotodinâmica aumenta o poder de discriminação visual de lesões cutâneas. O tempo para a aquisição das imagens foi contado a partir da aplicação da solução de ALA, onde o tempo zero corresponde à aquisição da imagem da autofluorescência da lesão.

3.2.1 ALA 5%

Carcinoma Basocelular

A sequência de imagens da Figura 26 mostra a formação da PpIX ao longo do tempo em uma lesão de CBC temporal direito. Essa sequência é representada de A a F, onde A é a imagem com iluminação branca do tumor e B, C, D, E e F são as imagens com os tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente, após a aplicação do ALA 5%.

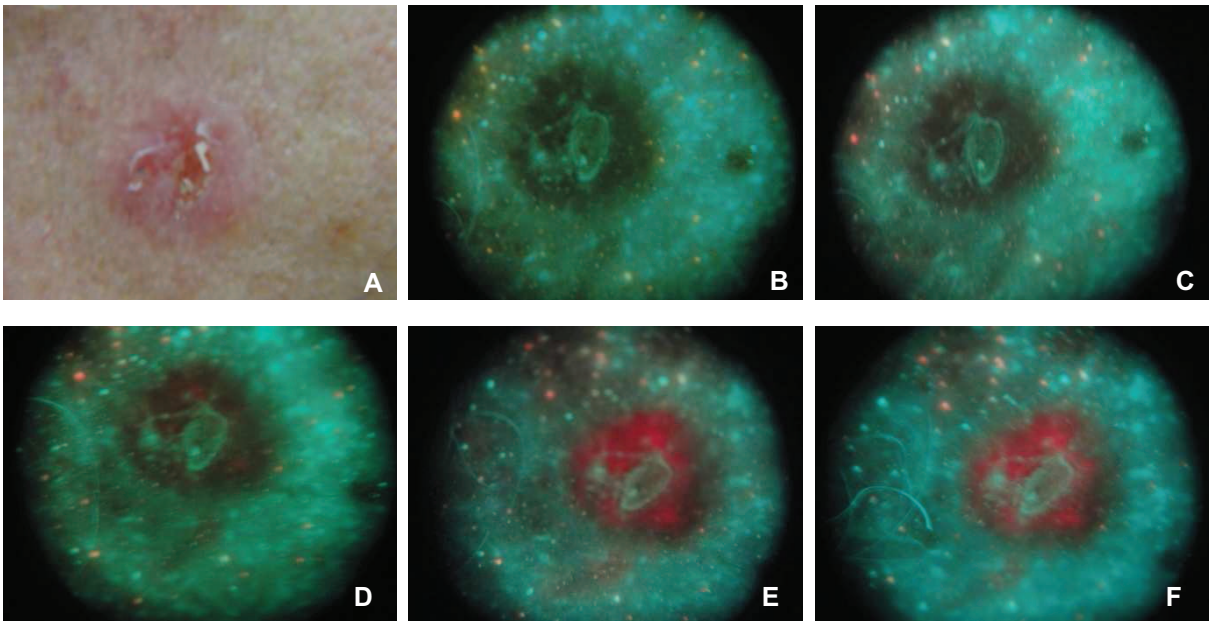

Figura 26 - Imagens da formação da PpIX ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente.

Na Figura 26 é possível observar o tecido sadio pela sua fluorescência mais intensa na região verde do espectro, o tecido com lesão tem por característica uma fluorescência menos intensa, correspondendo a uma região mais escura. Essa

observação é justificada pela diminuição da fluorescência do colágeno[44]. A fluorescência na região do vermelho, presente nas fotos de *C* a *F*, deve-se à PpIX formada preferencialmente em tecido anormais. Na sequência de imagens da Figura 26 é notável o aumento da fluorescência da PpIX em função do tempo de aplicação da solução contendo ALA 5%, sendo assim evidenciada sua formação.

As imagens de fluorescência, após a aplicação do ALA 5%, mostram o acúmulo preferencial da PpIX em regiões da pele com lesão, o que representa um potencial método auxiliar para o diagnóstico pois aumenta o contraste visual entre o tecido sadio e o tecido lesionado. Com esse aumento no contraste, é possível identificar mais facilmente as bordas da lesão, o que é de extrema importância para um tratamento eficaz.

Um algoritmo de processamento de imagem escrito em Matlab foi usado para quantificar a intensidade de fluorescência da PpIX. Foi selecionada uma região normal e outra na lesão e calculada a intensidade da cor vermelha para cada imagem de fluorescência. Em seguida, para saber o quanto a intensidade de fluorescência aumentou, esta foi normalizada pela sua mínima, ou seja, a autofluorescência (tempo 0).

A Figura 27 apresenta o gráfico da intensidade da PpIX formada na lesão mostrada na Figura 26 em função do tempo, comparando o tecido sadio do paciente com o tecido lesionado.

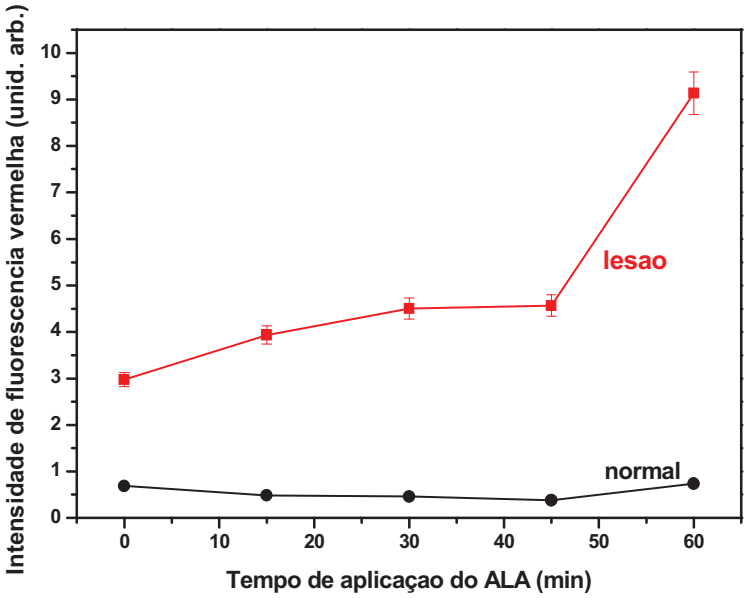

Figura 27 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido tumoral.

Pode-se observar no gráfico a diferença existente na fluorescência do tecido normal e do tecido tumoral. Essa diferença já está presente mesmo sem a aplicação do ALA e posterior formação da PpIX (tempo 0), mostrando que um tecido com lesão emite fluorescência de maneira diferente do tecido sadio. Essa característica observada também concorda com outros estudos na literatura, que demonstram uma diminuição da fluorescência na região verde e aumento na região do vermelho de lesões tumorais[26-27, 45]. Após a aplicação da solução de ALA, essa diferença entre os tecidos fica mais evidente com o passar do tempo, mais uma vez mostrando que a detecção fotodinâmica ajuda a aumentar o contraste entre tecido normal e lesão.

Do total de 21 lesões estudadas nesse grupo, 15 apresentaram um aumento da fluorescência da PpIX 60 minutos após a aplicação do ALA 5%. O que resulta em uma porcentagem de 71,4% de lesões que aumentaram seu contraste após a aplicação do ALA 5%. A Figura 28 mostra o gráfico da resposta da lesão do tipo CBC após 60 minutos de aplicação do ALA 5%, ou seja, qual a porcentagem de aumento da fluorescência após a aplicação do pró-fármaco.

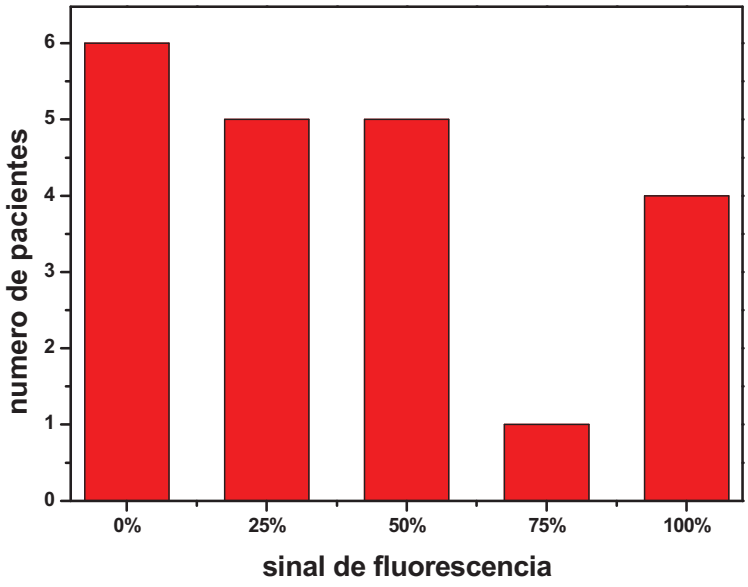

Figura 28 - Resposta do CBC ao ALA 5%. Porcentagem de aumento de fluorescência obtida após 60 minutos de aplicação da solução contendo o pró-fármaco à concentração de 5%.

Como se pode notar pelo gráfico, algumas lesões apresentam pouco, ou até nenhum aumento de fluorescência mesmo após a aplicação do ALA 5%. Nas lesões onde não houve aumento da emissão da fluorescência vermelha, o que provavelmente ocorreu foi uma inadequada penetração da solução de ALA 5%. No presente protocolo, não foi realizada a curetagem da lesão previamente à aplicação da solução de ALA 5%, o que limita a absorção do pró-fármaco. Muitas lesões de CBC apresentam extensa queratinização e a curetagem é um procedimento indicado na TFD para a remoção da camada de queratina e de células mortas, aumentando a penetração do pró-fármaco. No presente estudo, avaliamos o potencial da técnica de detecção fotodinâmica sem esse procedimento invasivo, no entanto, verificamos a sua limitação dependendo das características da lesão. Na Figura 29 temos um exemplo de CBC no deltóide direito onde o aumento da fluorescência não pôde ser observado.

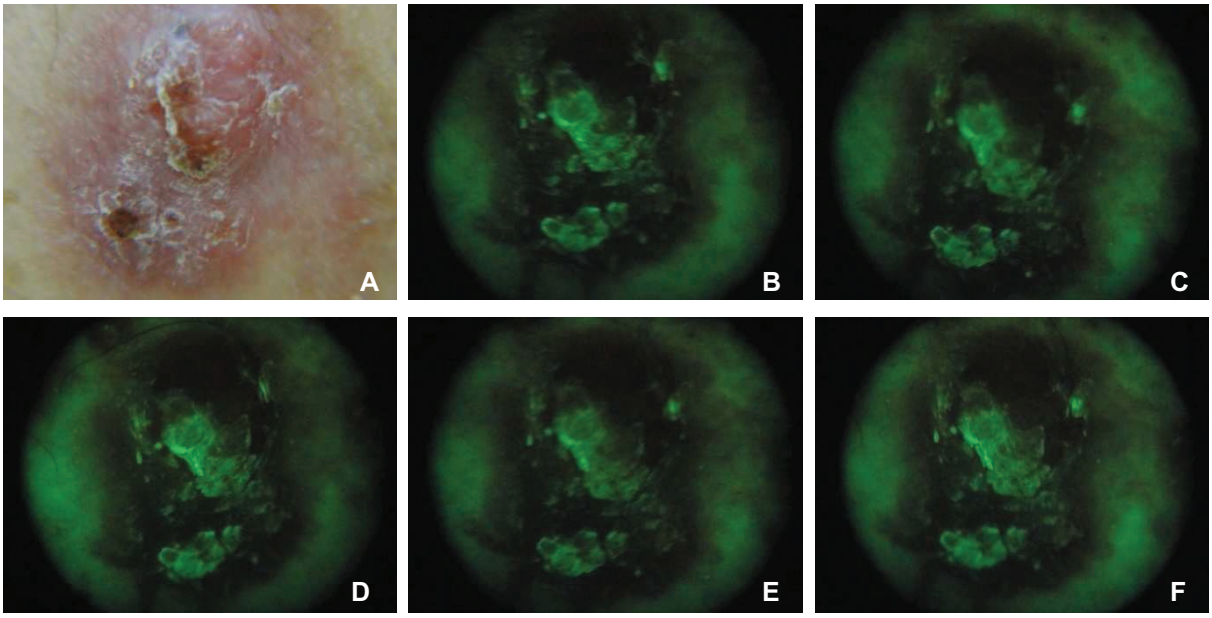

Figura 29 - Imagens do CBC no deltóide direito ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente.

A sequência de A a F representada na Figura 29, onde A é a imagem com iluminação branca do tumor e B, C, D, E e F são as imagens com os tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente, após a aplicação do ALA 5% mostra que não houve fluorescência na região do vermelho mesmo 60 minutos após a aplicação do pré-fármaco. O gráfico apresentado na Figura 30 corresponde a análise quantitativa da formação da PpIX nessa lesão.

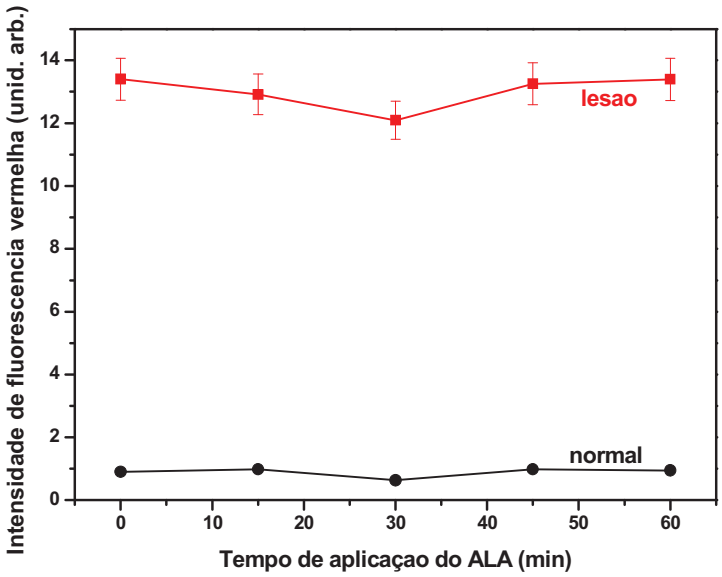

Figura 30 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido tumoral.

De acordo com o gráfico, a intensidade de fluorescência da lesão permanece praticamente inalterada, as pequenas variações observadas devem-se ao fato da resolução das imagens serem alteradas pela movimentação do paciente ao longo dos 60 minutos de espera.

Testes estatísticos foram feitos para avaliar se houve diferença significativa entre a fluorescência da lesão e do tecido normal (antes e após a aplicação do ALA 5%), bem como entre as lesões antes e após a aplicação do ALA 5%. Com o objetivo de mostrar que a formação da PpIX ocorre preferencialmente nas lesões, os testes também foram feitos avaliando-se tecido normal antes e após o ALA 5%.

Na avaliação intergrupo, tecido lesionado comparado com tecido normal, antes da aplicação do ALA 5% (autofluorescência dos tecidos), houve diferença significativa (p=0,000089), o que mostra que a fluorescência da lesão é diferente da fluorescência do tecido sadio. O mesmo ocorreu ao se comparar o tecido lesionado como tecido normal após 60 minutos da aplicação do ALA 5% (p=0,000014).

Quando a autofluorescência das lesões foi comparada com os valores de fluorescência 60 minutos após a aplicação do ALA 5% (avaliação intragrupo), observou-se diferença significativa (p=0,008367), fato que não ocorreu ao se

comparar o tecido normal antes e 60 minutos após a aplicação do ALA 5% (p=0,398652). A avaliação mostrou que, após aplicar o ALA 5%, houve um aumento da fluorescência apenas no tecido lesionado, demonstrando que a protoporfirina IX se acumula preferencialmente em lesões e que representa um marcador de tecido alterado.

Queratose Actínica

A sequência de imagens da Figura 31 mostra a formação da PpIX ao longo do tempo em uma queratose actínica no antebraço direito. Essa sequência é representada de A a F, onde A é a imagem com iluminação branca da lesão e B, C, D, E e F são as imagens com os tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente, após a aplicação do ALA.

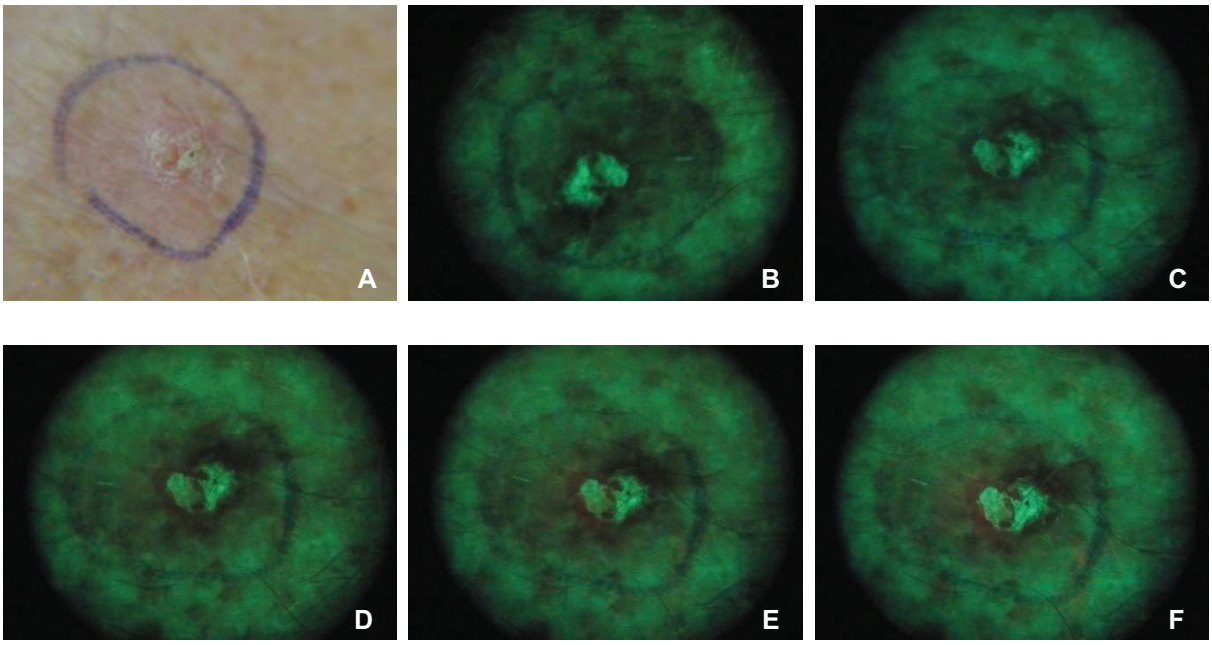

Figura 31 - Imagens da queratose actínica no antebraço direito ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente.

Nas imagens da Figura 31 é possível observar a fluorescência do tecido normal na região do verde, a fluorescência do tecido com queratose actínica em um tom mais escuro e a fluorescência brilhante devido ao excesso de queratina formada nesse tipo de lesão. Essa queratina forma uma barreira física, dificultando a penetração do ALA 5%. Assim, só é possível notar o surgimento da fluorescência na região do vermelho, característica da formação da PpIX, nas bordas da lesão, onde ainda é possível a penetração do medicamento.

As imagens foram processadas para quantificar a intensidade de fluorescência da PpIX formada, conforme o algoritmo descrito anteriormente. Na Figura 32 é apresentado um gráfico da intensidade de fluorescência formada na lesão em função do tempo, comparando o tecido lesionado do paciente com seu tecido normal.

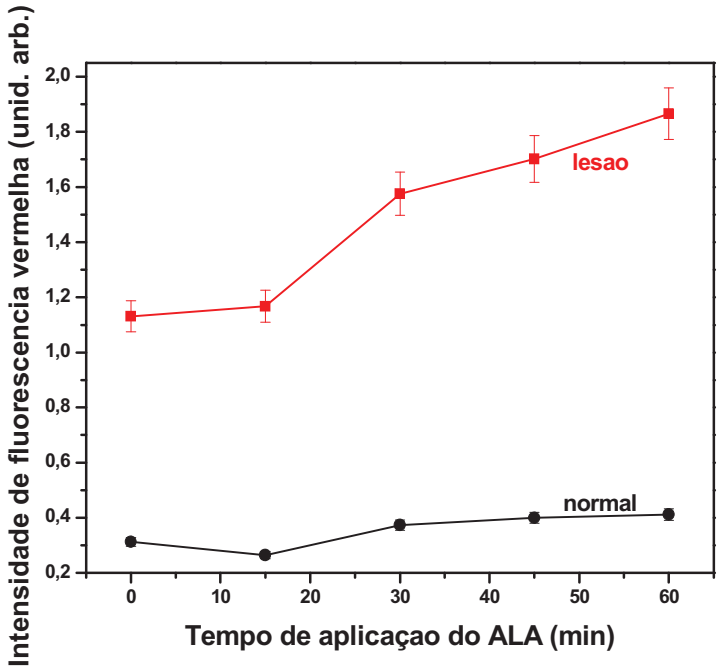

Figura 32 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido formado por células pré-malignas.

Observa-se no gráfico acima a diferença na fluorescência do tecido normal e do tecido pré-maligno, fluorescência esta que já está presente mesmo antes da

aplicação do ALA 5% e posterior formação da PpIX (tempo 0), fato que mostra que o tecido com lesão fluoresce de maneira diferente do tecido sadio. Após a aplicação do ALA 5%, a diferença entre os tecidos fica mais evidente com o passar do tempo, mas esse não foi um comportamento comum observado nos tecidos investigados com esse tipo de lesão.

A queratose actínica, por apresentar um acúmulo de queratina em sua superfície, se comporta como uma “camada impermeável”, dificultando a penetração do ALA[32]. O resultado disso é um grande número de lesões que não apresentam um aumento na fluorescência da PpIX mesmo 60 minutos após a aplicação do ALA 5%. Um exemplo de lesão que não permite a penetração do ALA está apresentado na Figura 33, uma queratose actínica no antebraço esquerdo, na sequência de A a F, onde A é a imagem com iluminação branca da lesão e B, C, D, E e F são as imagens com os tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente, após a aplicação do ALA 5%.

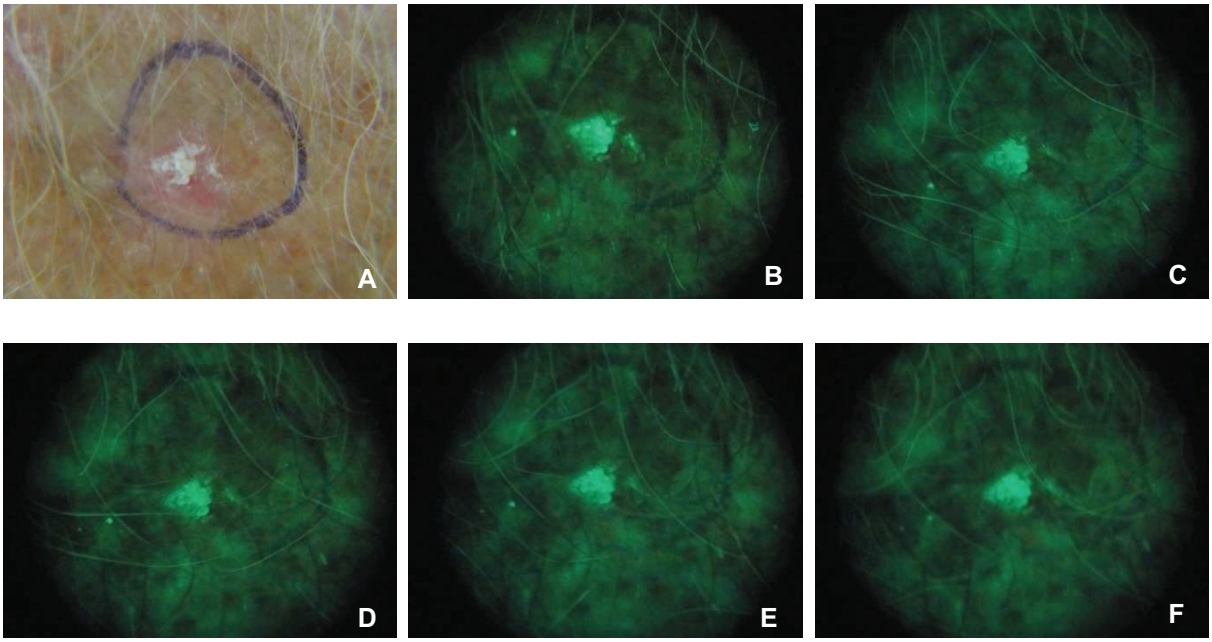

Figura 33 - Imagens da queratose actínica no antebraço esquerdo ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente.

Ao analisar quantitativamente a intensidade de fluorescência da lesão da Figura 33, obtém-se o gráfico da Figura 34.

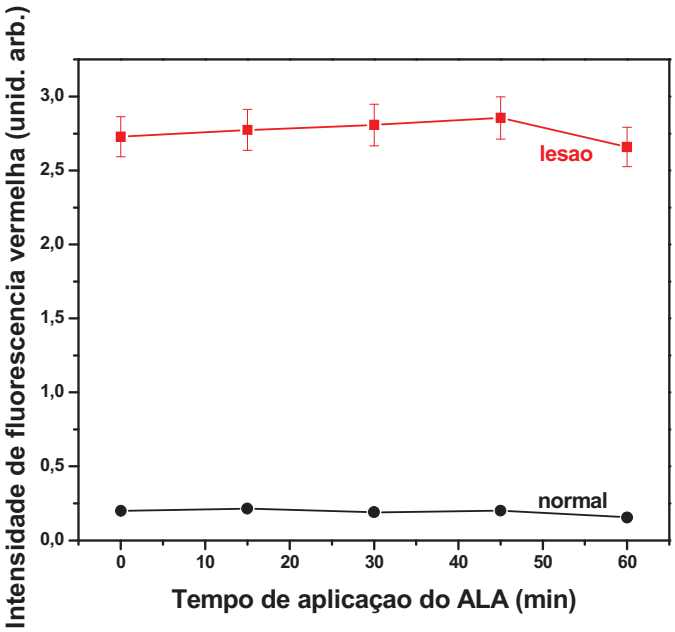

Figura 34 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido formado por células pré-malignas.

De acordo com o gráfico, a intensidade de fluorescência da lesão permanece praticamente inalterada, as pequenas variações observadas devem-se ao fato da resolução das imagens serem alteradas pela movimentação do paciente ao longo dos 60 minutos de espera.

Nesse grupo, do total de 22 lesões estudadas, 11 formaram PpIX.O que resulta em uma porcentagem de 50%. Nas queratoses actínicas, a protoporfirina IX se formou apenas nas bordas das lesões, fato que já facilitaria a demarcação dos limites da lesão, mas essa formação foi muito pequena, como mostra o gráfico apresentado na Figura 35.

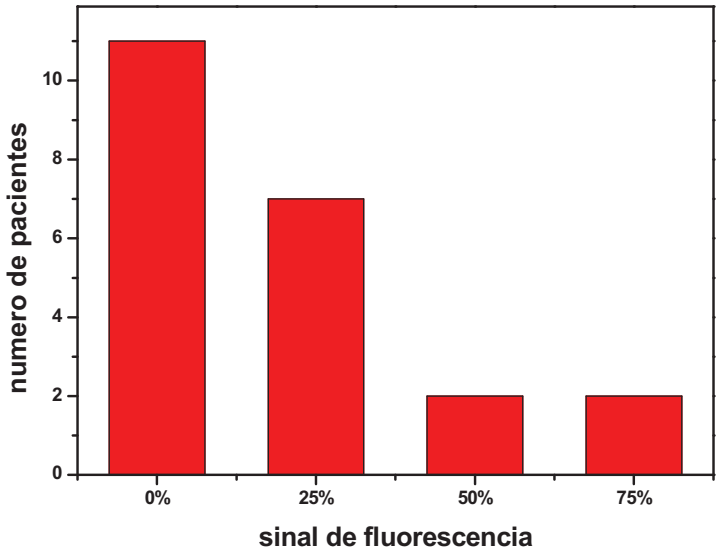

Figura 35 - Resposta da queratose actínica ao ALA 5%. Porcentagem de aumento de fluorescência obtida após 60 minutos de aplicação da solução contendo o pró-fármaco à concentração de 5%.

No gráfico que representa a resposta da queratose actínica ao ALA 5%, pode-se observar que a porcentagem de aumento de fluorescência apresentada após 60 minutos de aplicação do pró-fármaco, na maioria dos casos, foi muito pequena.

A análise estatística (avaliação intragrupo) desses resultados mostra que esse pequeno aumento não representa uma diferença significativa quando se compara a lesão antes e após a aplicação do ALA 5% ($p= 0,335408$). O mesmo ocorre quando comparamos o tecido sadio antes e após a aplicação do ALA 5% ($p= 0,779808$).

Ao avaliar a diferença entre o tecido lesionado e o tecido normal (avaliação intergrupo), antes e após se aplicar o ALA 5%, observou-se diferença significativa em ambos os casos, $p < 0,001$ para a autofluorescência do tecido normal e da lesão e $p < 0,001$ para o tecido normal e lesão com ALA.

No caso da queratose actínica, pode considerar que apenas a comparação entre os valores de autofluorescência do tecido lesionado e o tecido sadio é suficiente para diferenciá-los, uma vez que marcar a lesão não aumenta significantemente a sua intensidade de fluorescência.

Queratose Seborréica

A sequência de imagens da Figura 36 mostra a formação da PpIX ao longo do tempo em uma queratose seborréica no tórax. Essa sequência é representada de A a F, onde A é a imagem com iluminação branca da lesão e B, C, D, E e F são as imagens com os tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente, após a aplicação do ALA 5%.

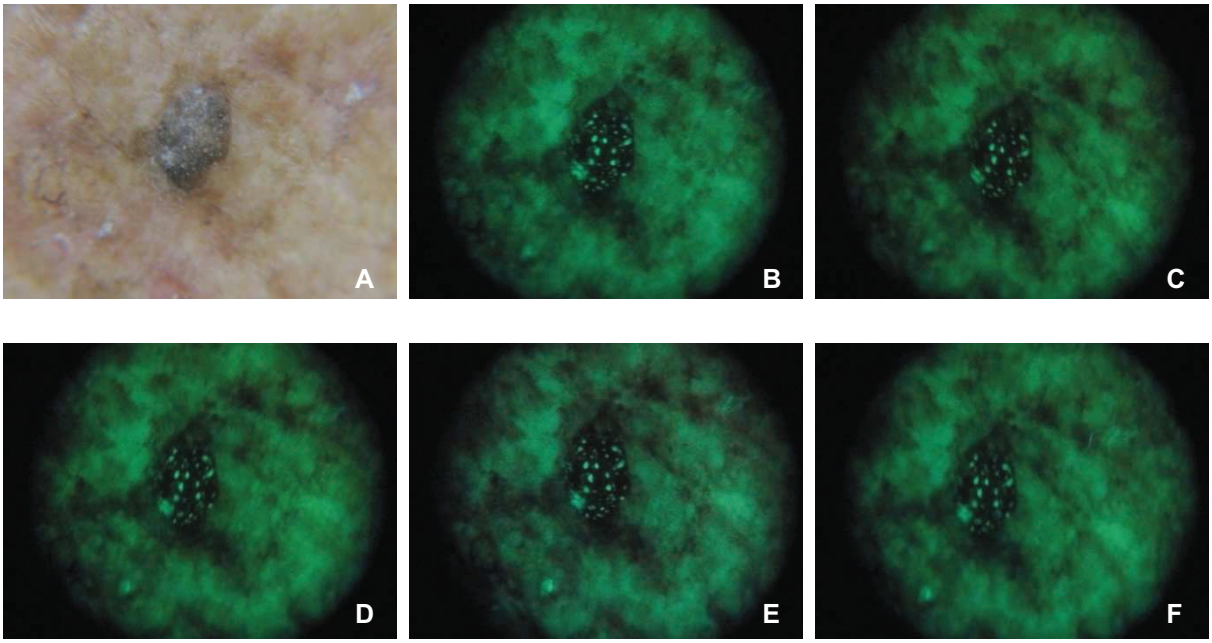

Figura 36 - Imagens da queratose seborréica no tórax ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA 5%, respectivamente[14].

Nas imagens da Figura 36 é possível observar a fluorescência do tecido normal na região do verde, porém, a lesão não fluoresce. Devido a sua alta pigmentação, a luz é altamente absorvida pela melanina e o que se vê na imagem é uma mancha escura com vários pontos fluorescentes no centro. Esses pontos são os pseudocistos córneos, que são característicos da queratose seborréica[14].

Após a análise quantitativa da intensidade de fluorescência da lesão, obteve-se o gráfico da Figura 37.

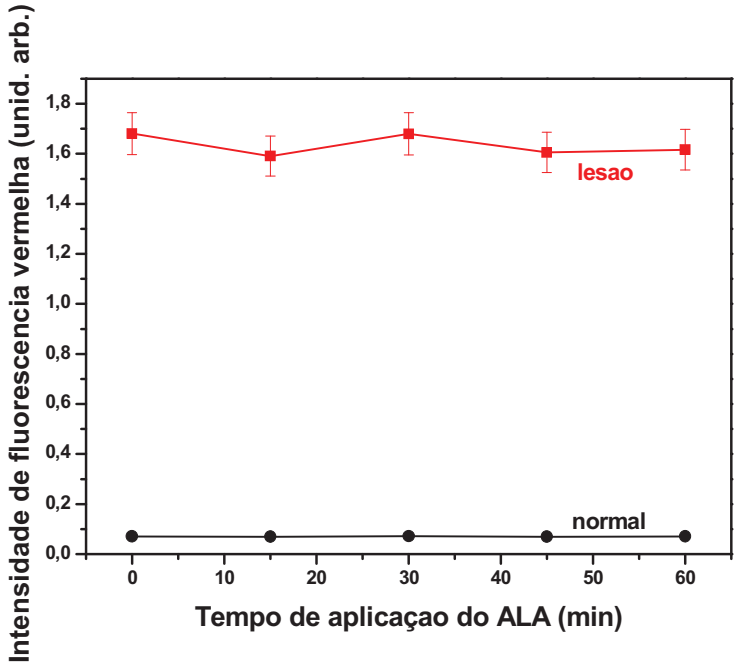

Figura 37 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido contendo células anormais de queratose seborréica.

De acordo com o gráfico, a intensidade de fluorescência na região do vermelho da lesão permanece praticamente inalterada, as pequenas variações observadas devem-se ao fato da resolução das imagens serem alteradas pela movimentação do paciente ao longo dos 60 minutos de espera. Nesse caso, não foi possível observar a fluorescência devido à alta absorção da melanina.

Foram analisadas 11 lesões nesse grupo, e 5 delas apresentaram, quantitativamente, uma maior intensidade de fluorescência. Isso se deve ao fato de que algumas lesões apresentam tecido alterado ao redor, e é esse tecido que aumenta sua fluorescência (Figura 38).

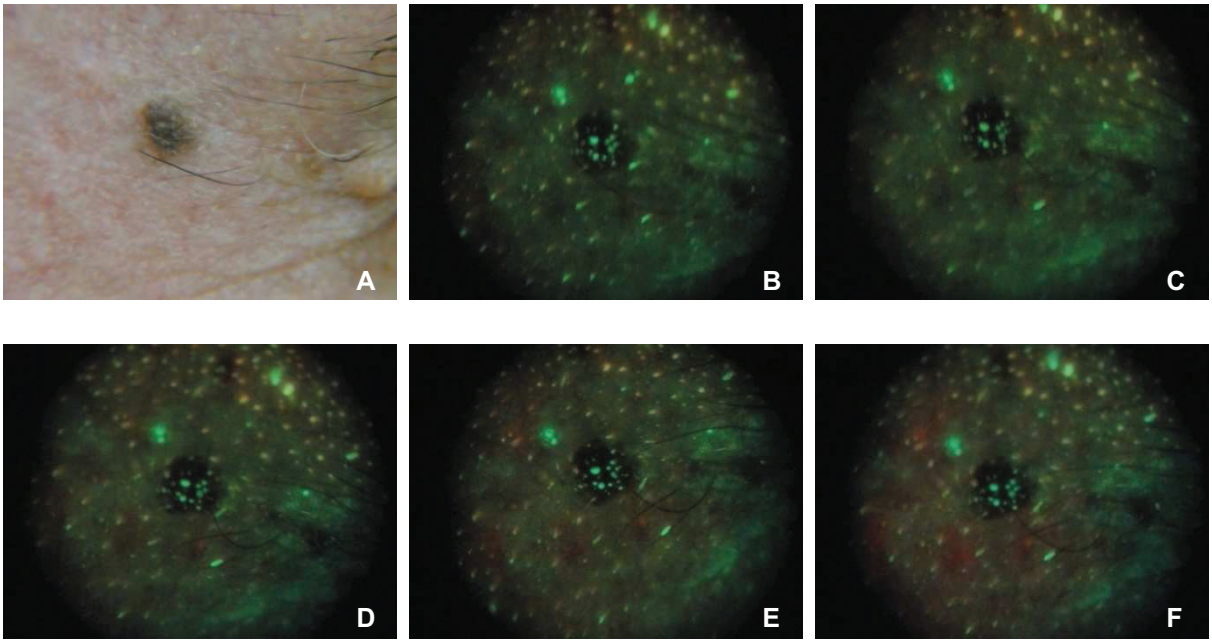

Figura 38 - Imagens da queratose seborréica temporal direita ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente.

A sequência de imagens da Figura 38, representada de A a F, onde A é a imagem com iluminação branca da lesão e B, C, D, E e F são as imagens com os tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente, após a aplicação do ALA 5% é um exemplo de queratose seborréica que apresentou um aumento da intensidade de fluorescência. O gráfico da Figura 39 é a análise quantitativa da resposta desta queratose seborréica ao ALA 5%.

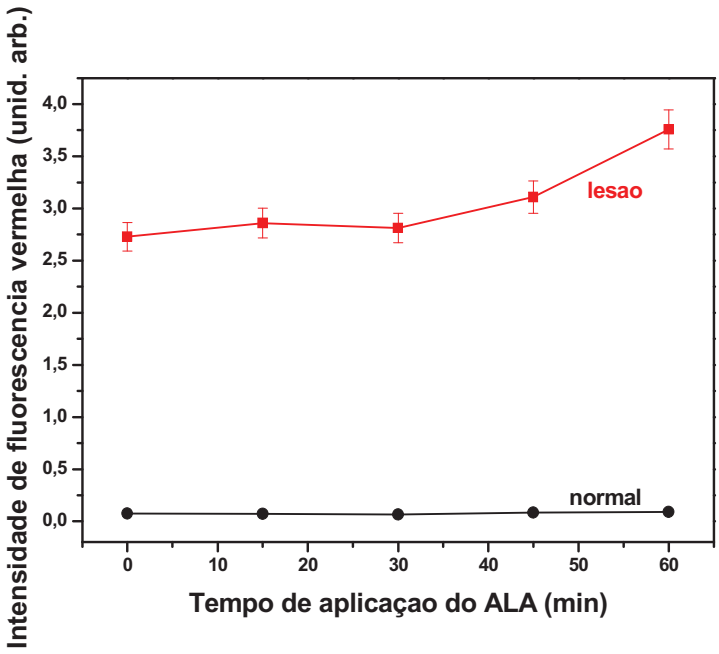

Figura 39 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido contendo células anormais de queratose seborréica.

O gráfico apresenta, quantitativamente, a resposta da queratose seborréica mostrada na Figura 38 ao ALA 5%: aumento da intensidade de fluorescência devido ao aumento da quantidade de protoporfirina IX na região alterada ao redor da lesão.

Nota-se do gráfico representado na Figura 40 que a maioria das lesões que apresentaram um acréscimo da fluorescência após a aplicação do ALA 5% não teve uma resposta maior que 25%, o que é pouco para ser considerado significativo, como é mostrado na avaliação estatística.

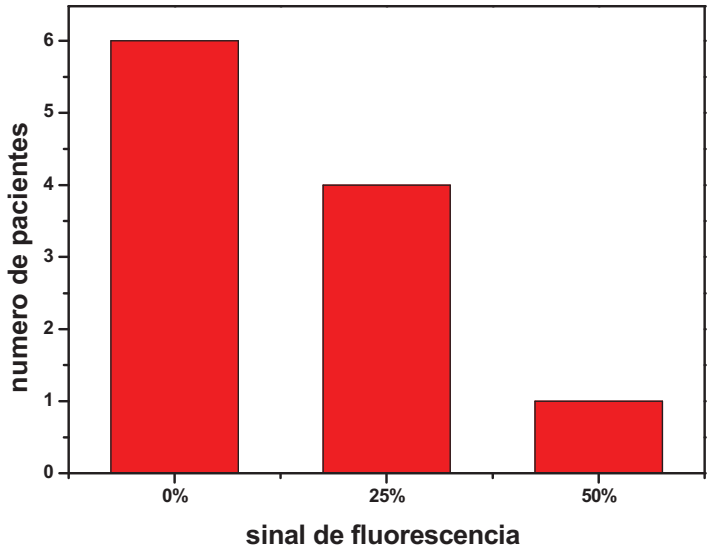

Figura 40 - Resposta da queratose seborréica ao ALA 5%. Porcentagem de aumento de fluorescência obtida após 60 minutos de aplicação da solução contendo o pró-fármaco à concentração de 5%.

A avaliação intragrupo realizada não apresentou resultado significativo ao comparar a lesão antes e após a aplicação do ALA 5% (p= 0,073691), bem como não apresentou diferença significativa em tecido normal antes e após a aplicação do ALA 5% (p= 0,076378). Já a avaliação intergrupo, que compara tecido lesionado com tecido normal, apresentou diferença significativa antes (p= 0,004277) e após (p= 0,003897) a aplicação do ALA 5%.

No caso das queratoses seborréicas, assim como no das queratoses actínicas, pode considerar que apenas a comparação entre a autofluorescência do tecido lesionado e o tecido sadio é suficiente para diferenciá-los, uma vez que marcar a lesão não aumenta significantemente a sua discriminação pela fluorescência marcada.

A autofluorescência da queratose seborréica é muito importante para ajudar a diferenciá-la do melanoma, tipo mais agressivo de câncer de pele, já que a queratose seborréica apresenta os pseudocistos córneos, que se tornam visíveis em suas imagens de autofluorescência[14].

3.2.2 ALA 10%

Com o objetivo de verificar se, além das dificuldades de penetração do ALA devido às células mortas presentes na superfície da lesão, a concentração do pré-fármaco também influenciou no problema da formação de PpIX em CBCs e queratoses actínicas, investigamos algumas lesões com a concentração do ALA aumentada para 10% e as análises da sessão anterior foram repetidas com essas novas lesões.

Carcinoma Basocelular

A sequência de imagens da Figura 41 mostra a formação da PpIX ao longo do tempo em um CBC cervical. Essa sequência é representada de A a F, onde A é a imagem com iluminação branca do tumor e B, C, D, E e F são as imagens com os tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente, após a aplicação do ALA 10%.

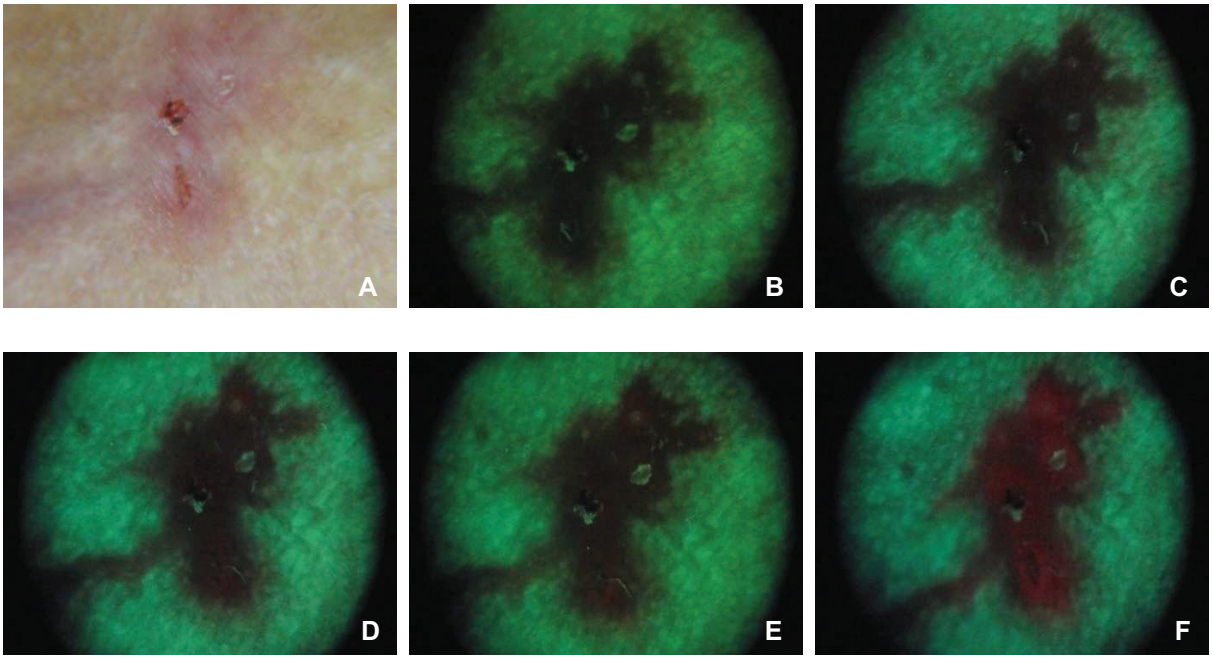

Figura 41 - Imagens da formação da PpIX ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente[14].

Na Figura 41 é possível observar o tecido sadio pela sua fluorescência na região do verde, o tecido tumoral com sua fluorescência mais escura e a fluorescência na região do vermelho devido à PpIX formada preferencialmente em tecido com lesão. Na sequência de imagens da Figura 41 nota-se o aumento da fluorescência da PpIX, evidenciando sua formação e aumentando o contraste entre o tecido sadio e o tumoral, o que facilita a identificação das bordas da lesão e proporciona um tratamento mais eficaz.

O gráfico apresentado na Figura 42 é a representação da análise quantitativa da intensidade de fluorescência do CBC mostrado na Figura 41 em função do tempo, comparando o tecido sadio com o tecido lesionado.

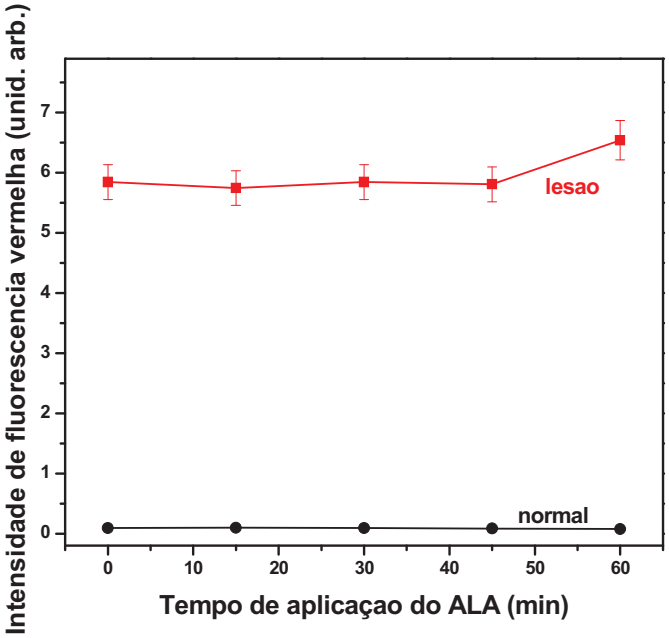

Figura 42 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido tumoral.

Observa-se no gráfico que a diferença existente entre o tecido normal e o tecido lesionado ocorre mesmo antes da aplicação do ALA 10% e posterior formação da PpIX (tempo 0), fato que mostra que o tecido lesionado fluoresce diferente do tecido sadio. Com o passar do tempo a diferença entre os tecidos fica mais evidente devido a acumulação da PpIX preferencialmente nos tecidos com lesão.

Apesar do aumento na concentração do ALA para 10%, na maioria das lesões ainda não houve formação suficiente da PpIX, o que reforça a idéia de que as células mortas e a queratina na superfície da lesão impedem a penetração do pró-fármaco. O gráfico da Figura 43 mostra que, apesar de aparentemente todas as 8 lesões analisadas nesse grupo ter apresentado um aumento da fluorescência da PpIX, essa formação não foi acima de 25%.

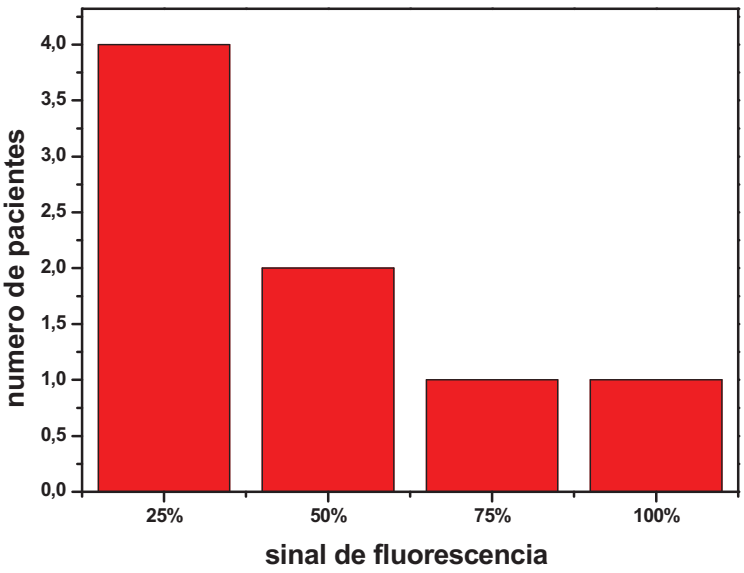

Figura 43 - Resposta do carcinoma basocelular ao ALA 10%. Porcentagem de aumento de fluorescência obtida após 60 minutos de aplicação da solução contendo o pró-fármaco à concentração de 10%.

A sequência da Figura 44, que é representada de A a F, onde A é a imagem com iluminação branca do tumor e B, C, D, E e F são as imagens com os tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente, após a aplicação do ALA 10%, é um exemplo de lesão que, quantitativamente, teve sua intensidade de fluorescência aumentada, mas quando se observa a imagem, nota-se que foi sua borda que apresentou esse aumento já que o tumor apresentava um grande número de células mortas em sua superfície.

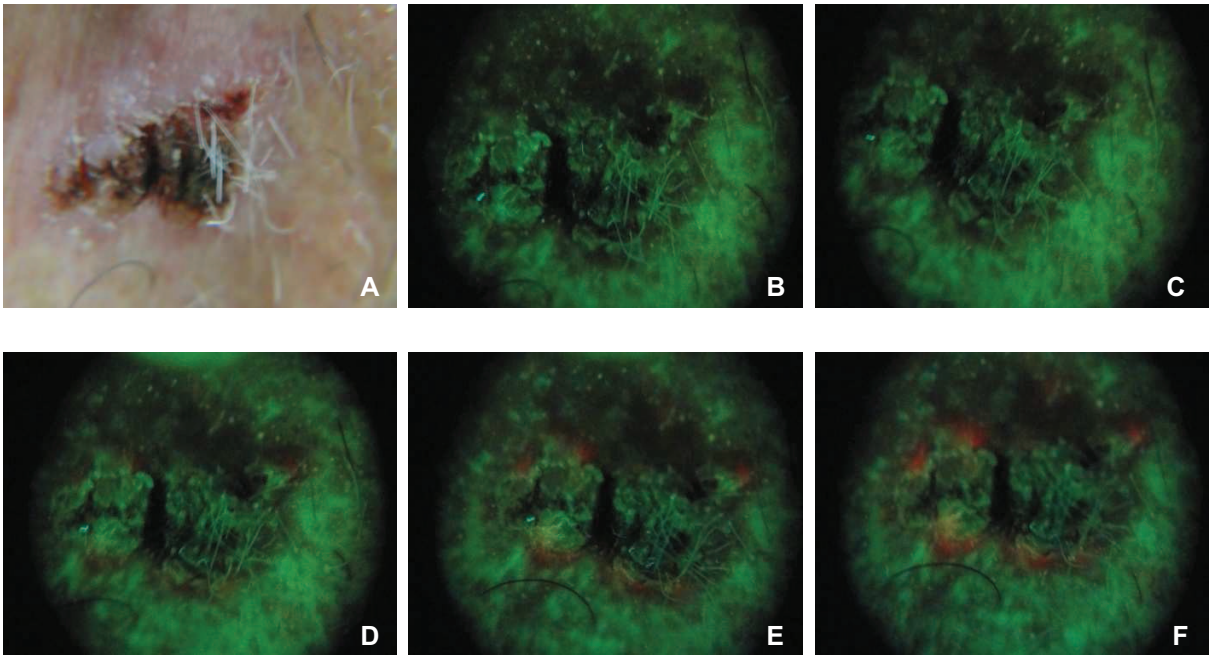

Figura 44 - Imagens da formação da PpIX ao longo do tempo. A - Iluminação Branca do tumor. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente.

A análise quantitativa dessa lesão é mostrada no gráfico da Figura 45, que apresenta a intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido lesionado.

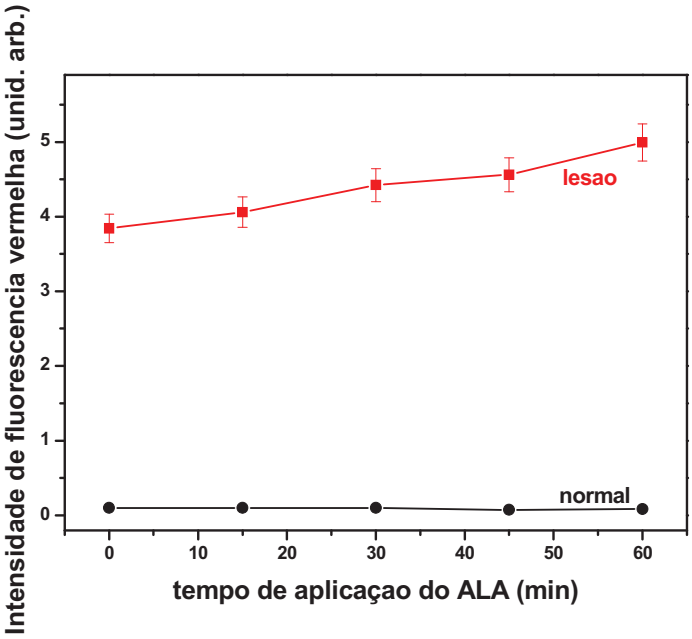

Figura 45 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido tumoral.

Devido a baixa quantidade de PpIX formada após a aplicação do ALA 10%, a avaliação estatística intragrupo não apresentou diferença significativa entre a autofluorescência da lesão e a sua fluorescência marcada após os 60 minutos de espera (p=0,055889). O mesmo ocorreu quando a avaliação intragrupo foi usada para comparar o tecido normal antes e após a aplicação do ALA 10% (p=0,982976). Já a avaliação intergrupo entre o tecido tumoral e o tecido normal apresentou diferença significativa tanto entre a autofluorescência (p=0,004988) quanto entre seus tecidos marcados com o ALA 10% (p=0,004548).

Os CBCs marcados com ALA 5% apresentaram diferença significativa entre a autofluorescência das lesões e sua fluorescência após 60 minutos de aplicação do pré-fármaco, já os CBCs marcados com ALA 10% não apresentaram essa diferença, isso pode ser explicado pelo maior número de lesões com muita célula morta em sua superfície, já que a seleção para os grupos foi arbitrária.

Queratose Actínica

Na Figura 46 tem-se uma sequência de imagens que mostra a formação da PpIX ao longo do tempo em uma queratose actínica na região parietal. Essa sequência é representada de A a F, onde A é a imagem com iluminação branca do tumor e B, C, D, E e F são as imagens com os tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente, após a aplicação do ALA 10%.

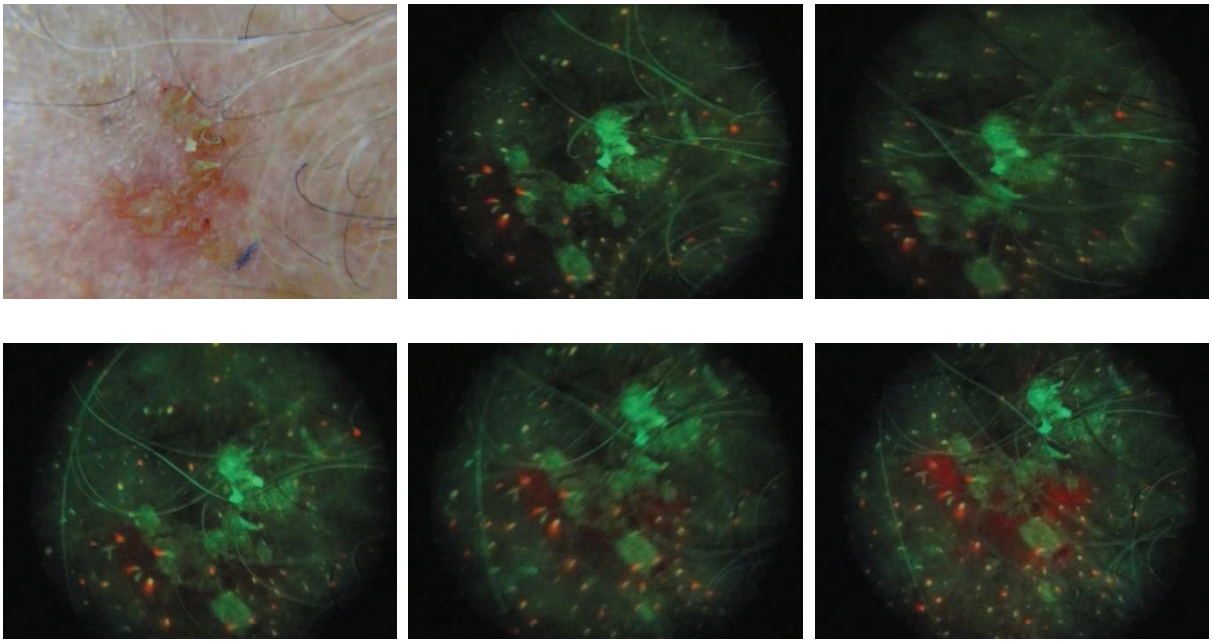

Figura 46 - Imagens da formação da PpIX ao longo do tempo. A - Iluminação Branca da lesão. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente.

Nas imagens da Figura 46 é possível observar a fluorescência do tecido normal na região do verde, a fluorescência do tecido lesionado em um tom mais escuro e a fluorescência brilhante devido ao excesso de queratina formada nesse tipo de lesão. Essa queratina dificulta a penetração do ALA 10%. Assim, só é possível notar o surgimento da fluorescência na região do vermelho, característica

da formação da PpIX, nas bordas da lesão, onde ainda é possível a penetração do pré-fármaco.

Ao fazer a análise quantitativa dessa queratose actínica, observa-se no gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo um aumento na diferença de intensidade entre tecido lesionado e tecido sadio, o que é devido a esse acumulo de PpIX nas bordas da lesão (Figura 47).

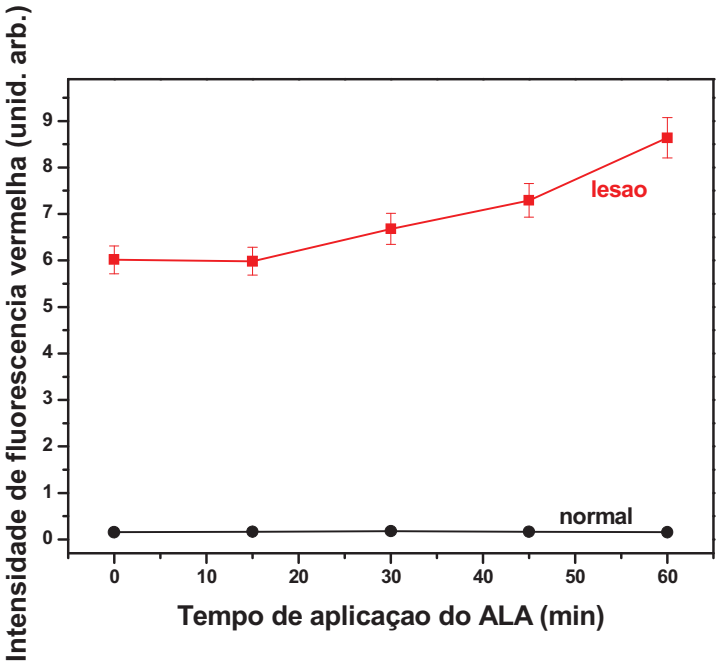

Figura 47 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido formado por células pré-malignas.

Um fator importante observado nas análises das queratoses actínicas é que a localização é um fator importante na facilidade de penetração do ALA. Quando as lesões (que são a maioria) são localizadas no braço e antebraço, elas geralmente apresentam uma camada mais espessa de queratina em sua superfície atrapalhando a penetração do pré-fármaco do que quando se localiza na região da cabeça e pescoço. Nesses casos, é mais difícil se observar acumulo de PpIX até nas bordas da lesão (Figura 48).

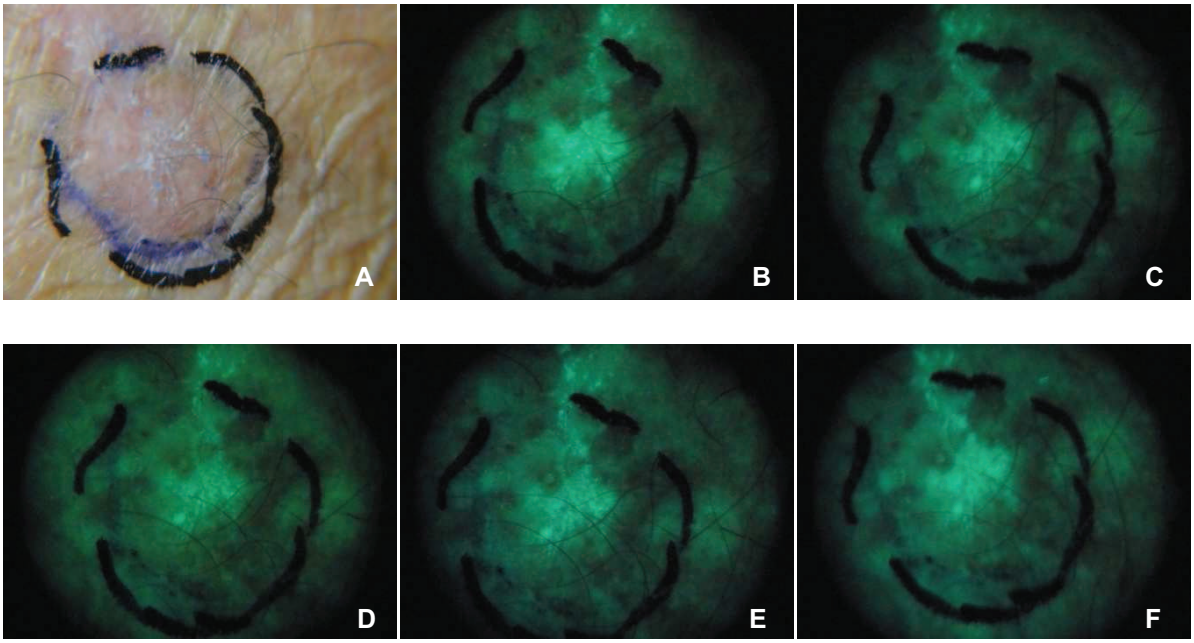

Figura 48 - Imagens da formação da PpIX ao longo do tempo. A - Iluminação Branca da lesão. B, C, D, E e F – Imagens de fluorescência, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a aplicação do ALA, respectivamente.

Como pode ser observado na sequência da Figura 48, que é representada de A a F, onde A é a imagem com iluminação branca do tumor e B, C, D, E e F são as imagens com os tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente, após a aplicação do ALA 10%, a queratose actínica no antebraço direito não apresentou formação de PpIX nas bordas da lesão. Esse tipo de lesão aumenta naturalmente a quantidade de queratina presente nesse tecido anormal, o que impede a penetração do ALA 10%.

O gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo, para tecido lesionado e para tecido normal (Figura 49), mostra a análise quantitativa da lesão da Figura 48, onde as pequenas diferenças observadas são devido à resolução das imagens serem alteradas pela movimentação do paciente ao longo dos 60 minutos de espera.

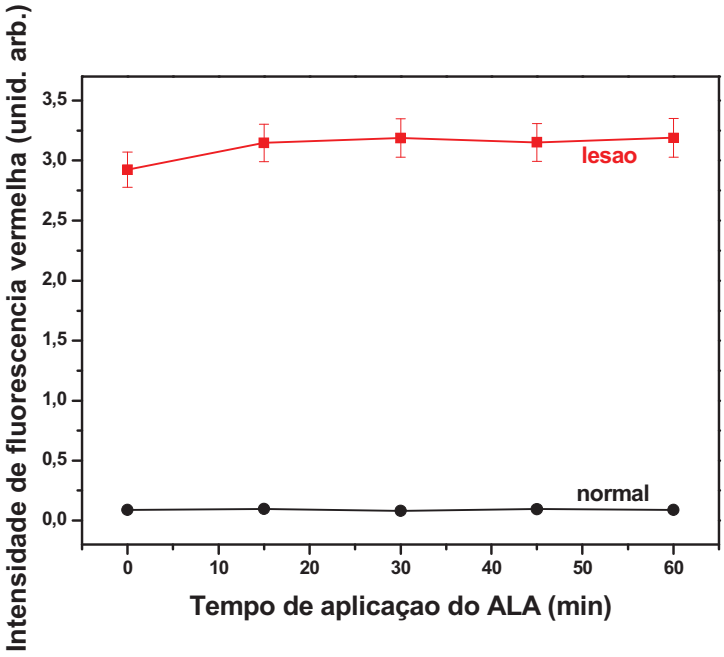

Figura 49 - Gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo para tecido normal e tecido formado por células pré-malignas.

Das 9 lesões analisadas nesse grupo, 4 apresentaram aumento na intensidade de fluorescência causada pela formação de PpIX nas bordas (Figura 50). Esse acréscimo não passa dos 25% na maioria das lesões, o que, como já discutido anteriormente, não é suficiente para apresentar diferença significativa na fluorescência da lesão devido à aplicação do ALA 10%, como mostra a avaliação intragrupo do teste estatístico.

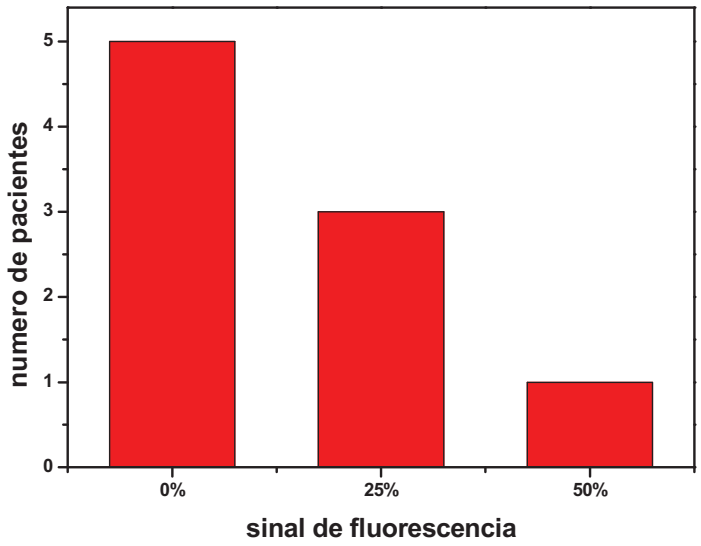

Figura 50 - Resposta da queratose actínica ao ALA 10%. Porcentagem de aumento de fluorescência obtida após 60 minutos de aplicação da solução contendo o pró-fármaco à concentração de 10%.

A avaliação intragrupo, para comparar tecido lesionado antes e após a aplicação do ALA 10%, não apresentou resultado significativo (p= 0,349310), também não apresentou resultado significativo (p= 0,051367) a comparação entre tecido normal antes e após a aplicação do ALA 10%. A comparação feita entre o tecido lesionado e o tecido normal (avaliação intergrupo), antes e após a aplicação do ALA 10%, apresentou resultado significativo para ambos os casos, p= 0,000380 e p= 0,002837, respectivamente.

Como foi observado, o aumento da concentração do pró-fármaco, de 5% para 10%, não melhorou sua penetração, uma concentração muito acima dessas utilizadas seria inviável para o diagnóstico devido ao maior custo do medicamento. Outro ponto discutido nessa sessão diz respeito à grande quantidade de células mortas presentes na superfície dos CBCs e, principalmente, das queratoses actínicas, o que dificulta a penetração do ALA. A solução para este problema é a curetagem da lesão antes da aplicação do pré-fármaco, esse procedimento já é feito na Terapia Fotodinâmica (TFD), mas, no presente protocolo isso não foi aprovado pela médica dermatologista responsável. A estratégia, então, foi de analisar lesões

que foram preparadas (curetadas) para receber o tratamento por TFD. A Figura 51 compara a fluorescência de um CBC curetado e a de CBCs não curetados, parte do estudo para o diagnóstico fotodinâmico, que utilizou ALA 5% e ALA 10%, respectivamente.

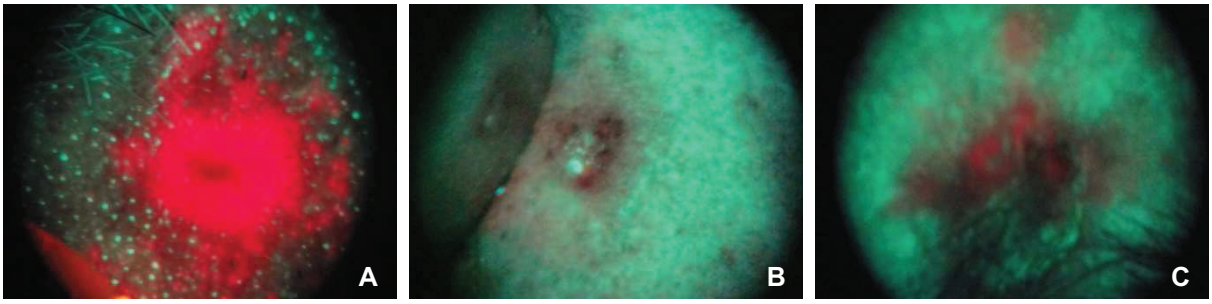

Figura 51 - (A) CBC curetado, submetido à TFD, (B) e (C) CBCs não curetados, partes do estudo para o diagnóstico, com ALA 5% e 10%, respectivamente.

4 CONCLUSÃO

O estudo *in vitro*, utilizando o *phantom* de pele, mostrou que os comprimentos de onda sofrem modificações diferentes em meio túrbido, e que são os menores comprimentos de onda que sofrem uma maior atenuação. Para o arranjo experimental empregado, essa variação mostrou-se pequena. As propriedades de espalhamento e absorção do meio utilizado para simular a pele não refletiram em grandes variações do coeficiente de atenuação total, usado para avaliar a propagação da luz no tecido, nos comprimento de onda dentro do pequeno intervalo investigado (região do visível).

Apesar das limitações de excitação/coleta, foi possível identificar padrões de variação da intensidade de fluorescência em função da profundidade e do tempo.

Com base nestes resultados, o maior limitante para a detecção da fluorescência é a luz de excitação, que deve chegar com uma intensidade suficiente para ser absorvida pelo centro fluorescente. No caso da fluorescência emitida, a luz também deve percorrer o meio túrbido até ser detectada na superfície, sofrendo modificações que interferem igualmente no sinal coletado.

A fluorescência usada para o diagnóstico de CBC consegue diferenciar significantemente tecido normal de tecido tumoral devido ao acúmulo preferencial da PpIX em regiões da pele com lesão. Esse acúmulo aumenta o contraste entre o tecido sadio e o tecido lesionado, que permite identificar as bordas da lesão, e proporciona um tratamento mais eficaz.

Para a detecção das lesões de pele não malignas, queratose actínica e queratose seborréica, apenas as suas imagens de autofluorescência mostraram-se suficientes, o que é muito importante para se obter um diagnóstico precoce. No caso da queratose actínica, devido ao excesso de queratina na superfície da lesão, o ALA não consegue penetrar adequadamente no tecido para formar a PpIX. Já para as queratoses seborréicas, que absorvem a luz e não fluoresce, sua imagem de

autofluorescência apresenta os pseudocistos córneos, que são característicos desse tipo de lesão, por esse motivo, auxiliam no diagnóstico.

Para os casos de CBC e queratose actínica, a concentração do ALA foi aumentada de 5% para 10% e isso mostrou que a baixa formação da PpIX não era devido a concentração e sim devido a limitação da penetração da solução do pró-fármaco.

A curetagem prévia deve resolver o problema de penetração do ALA e conseqüente formação da PpIX, tanto em CBC quanto em queratose actínica. Esse procedimento já é feito nas lesões que serão submetidas à Terapia Fotodinâmica. A curetagem retira as células mortas e a camada de queratina que estão na superfície da lesão, facilitando a penetração do pré-fármaco e a posterior formação da PpIX.

A imagem de fluorescência de campo amplo é uma potencial ferramenta auxiliar no diagnóstico de lesões cutâneas. A técnica de detecção fotodinâmica mediada por ALA pode aumentar o contraste visual dos carcinomas basocelulares. O entendimento da propagação da luz em meios túrbidos é essencial para aumentar o poder de resolução da localização do centro fluorescente em profundidade no tecido.

REFERÊNCIAS

1 INCA - Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro, 2011. Ações nacionais integradas para prevenção e controle do câncer. Disponível em: <www.inca.gov.br >. Acesso em: 14 nov. 2011.

2 CÂNCER de pele não-melanoma. São Paulo, 2011. Disponível em <http://www.hcanc.org.br/index.php?idTipoCancer=28&page=14>. Acesso em: 08 set. 2011.

3 INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ações de prevenção primárias e secundárias no controle de câncer. Rio de Janeiro. 2008. p. 139-150.

4 TRATAMENTO bem sucedido da ceratosa actínica. 2009. Disponível em: <http://www.dermatologia.net/medicos_nova/mednews/news2006_11b.shtml>. Acesso em: 15 set. 2009.

5 NEVES, R.; LUPI, O.; TALHARI, S. **Câncer da pele**. Ed. Medsi, 2001.

6 SCHWARTZ, R.A. **Skin cancer recognition and management**. 2nd ed. New York: Blackwell Publishing, 2008.

7 FITZPATRICK; ALL, E. **Dermatology in general medicine**. 7th ed. New York: Mc Graw Hill Medical, 2008.

8 CURETAGEM. 2009. Disponível em: <http:www.plasticaedermatologia.com.br/d6.htm>. Acesso em: 15 set 2009.

9 COSTA, M. M.; ANDRADE, C. T.; INADA, N. M.; VENTURA, L.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Desenvolvimento e aplicação de equipamento para diagnóstico por fluorescência. **Jornal Brasileiro de Laser**, v. 2, n., p. 8-12, 2010.

10 FRITSCH, C.; BECKERWEGERICH, P.M.; MENKE, H.; RUZICKA, T.; GOERZ, G.; OLBRISCH, R.R. Successful surgery of multiple recurrent basal cell carcinomas guided by photodynamic diagnosis. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 21, n. 6, p. 437-439, 1997.

11 ZENG, H.S.; LUI, H.; MCLEAN, D.I.; MACAULAY, C. Fluorescence spectroscopy and imaging for skin cancer detection and evaluation. **Biomedical Topical Meetings, TECHNICAL DIGEST**, v. 38, p. 18-20, 2000. Disponivel em: < http://www.opticsinfobase.org/abstract.cfm?URI=BOSD-2000-SuB4>. Acesso em: 20 Out. 2010.

12 RYKALA, J.; PESZYNSKI-DREWS, C.; WITMANOWSKI, H.; KRUK-JEROMIN, J. Photodynamic diagnosis of skin cancers - own experiences. **Postepy Dermatologii I Alergologii**, v. 26, n. 4, p. 197-200, 2009.

13 NIEMZ, M.H. **Laser-tissue interactions:** fundamentals and applications. 3rd ed. Heidelberg: Springer, 2003.

14 PRATAVIEIRA, S.; ANDRADE, C. T. D.; SALVIO, A. G.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Optical imaging as auxiliary tool in skin cancer diagnosis. In: La PORTA, C. A. M. (Ed). **Skin cancers** - risk factors, prevention and therapy. InTech Open Access Publisher, 2011. p. 159-171. Disponivel em: <http://www.intechopen.com/source/pdfs/23034/InTech Optical_imaging_as_auxiliary_tool_in_skin_cancer_diagnosis.pdf >. Acesso em: 02 Nov. 2011.

15 LACOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 2nd ed. New York: Plenum, 1999.

16 ATKINS, P. **Físico-Química**. 8a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

17 VOLLET-FILHO, J. D. **Identificação e quantificação de fotossensibilizador em tecido hepático por espectroscopia de fluorescência e sua importância na terapia fotodinâmica.** 2007. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

18 GRECCO, C. **Avaliação da resposta fotodinâmica em fígado normal de ratos utilizando fonte de luz pulsada no regime de femtossegundos**. 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

19 COELHO, A. L. **Desenvolvimento de procedimento de derivatização fotoquímica para dois glicocorticóides sintéticos (prednisolona e triancinolona acetonido) visando à analise espectrofluorimetrica de formulações farmacêuticas**. 2004. 110 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química, Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

20 ISHIMARU, A. Diffusion of light in turbid material. **Applied Optics**, v. 28, n. 12, p. 2210-2215, 1989.

21 MULLER, M. G.; GEORGAKOUDI, I.; ZHANG, Q. G.; WU, J.; FELD, M. S. Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption. **Applied Optics**, v. 40, n. 25, p. 4633-4646, 2001.

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

23 COSTA, M. M. D. **Desenvolvimento de um sistema por imagem de fluorescência óptica para uso médico-odontologico**. 2010. 96 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

24 TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; FESTANETO, C. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 445-459, 2009.

25 POTTLER, R.; KRAMMER, B.; BAUMGARTINER, R.; STEPP, H. **Phodynamic Therapy with ALA**: a clinical handbook. Europa. RCS Publishing. 2006.

26 SMITS, T.; VAN LAARHOVEN, A. I. M.; STAASSEN, A.; VAN DE KERKHOF, P. C. M.; VAN ERP, P. E. J.; GERRITSEN, M. J. P. Induction of protoporphyrin IX by aminolaevulinic acid in actinic keratosis, psoriasis and normal skin: preferential porphyrin enrichment in differentiated cells. **British Journal of Dermatology**, v. 160, n. 4, p. 849-857, 2009.

27 VALENTINE, R. M.; IBBOTSON, S. H.; BROWN, C. T. A.; WOOD, K.; MOSELEY, H. A quantitative comparison of 5-aminolaevulinic acid- and methyl aminolevulinateinduced fluorescence, photobleaching and pain during photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 1, p. 242-249, 2011.

28 LIU, B. C.; FARRELL, T. J.; PATTERSON, M. S. A dynamic model for ALA-PDT of skin: simulation of temporal and spatial distributions of ground-state oxygen, photosensitizer and singlet oxygen. **Physics in Medicine and Biology**, v. 55, n. 19, p. 5913-5932, 2010.

29 VALENTINE, R. M.; BROWN, C. T. A.; MOSELEY, H.; IBBOTSON, S.; WOOD, K. Monte Carlo modeling of in vivo protoporphyrin IX fluorescence and singlet oxygen production during photodynamic therapy for patients presenting with superficial basal cell carcinomas. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 4, p. 048002, 2011.

30 ATIF, M.; KHAN, A.; IKRAM, M. Modeling of light propagation in turbid medium using monte carlo simulation technique. **Optics and Spectroscopy**, v. 111, n. 1, p. 107-112, 2011.

31 KIM, A.; ROY, M.; DADANI, F. N.; WILSON, B. C. Topographic mapping of subsurface fluorescent structures in tissue using multiwavelength excitation. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 6, p. 066026, 2010.

32 MCLOONE, N.; DONNELLY, R. F.; WALSH, M.; DOLAN, O. M.; MCLOONE, S.; MCKENNA, K.; MCCARRON, P. A. Aminolaevulinic acid diffusion characteristics in 'in vitro' normal human skin and actinic keratosis: implications for topical photodynamic therapy. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 24, n. 4, p. 183-190, 2008.

33 WILSON, R. H.; MYCEK, M. A. Models of light propagation in human tissue applied to cancer diagnostics. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 10, n. 2, p. 121-134, 2011.

34 BRANCALEON, L.; DURKIN, A.J.; TU, J.H.; MENAKER, G.; FALLON, J.D.; KOLLIAS, N. In vivo fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 2, p. 178-183, 2001.

35 DE LEEUW, J.; VAN DER BEEK, N.; NEUGEBAUER, W.D.; BJERRING, P.; NEUMANN, H.A.M. Fluorescence Detection and Diagnosis of Non-Melanoma Skin Cancer at an Early Stage. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 2, p. 96-103, 2009.

36 BAGNATO, V.S.; KURACHI, C.; DE CASTRO-E-SILVA, O. New perspectives for optical techniques in diagnostic and treatment of hepatic diseases. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 214-216, 2010.

37 KURACHI, C.; FERREIRA, J.; MARCASSA, L.G.; FILHO, G.A.C.; SOUZA, C.S.; BAGNATO, V.S. Clinical experience of PDT in Brazil: a 300 patient overview. **Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XIV**, v. 5689, p. 218-226, 2005.

38 VOLLET-FILHO, J.D.; GRECCO, C.; MENEZES, P.F.C.; MORIYAMA, L.T.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Correlation between photosensitizer degradation and depth of necrosis in PDT: Possibility for real time dosimetry. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE AMERICAN-SOCIETY-FOR-LASER-MEDICINE AND SURGERY, 28., 2008, Kissimmee. **Resumos …** Kissimmee **:** ASLMS, ,2008. p. 9.

39 LIPOFUNDIN. Indonésia, 2011. Disponível em: <http://www.bbraun.co.id/index.cfm?0E9182739CF946FAAFF0B8EED491348C>. Acesso em: 03 nov. 2011.

40 KEPSHIRE, D.; DAVIS, S. C.; DEHGHANI, H.; PAULSEN, K. D.; POGUE, B. W. Fluorescence tomography characterization for sub-surface imaging with protoporphyrin IX. **Optics Express**, v. 16, n. 12, p. 8581-8593, 2008.

41 CASTRO-E-SILVA, O.; SANKARANKUTTY, A. K.; CORREA, R. B.; FERREIRA, J.; VOLLET-FILHO, J. D.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Autofluorescence spectroscopy in liver transplantation: Preliminary results from a pilot clinical study. **Transplantation Proceedings**, v. 40, n. 3, p. 722-725, 2008.

42 KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H. Endogenous Protoporphyrin-Ix, a Clinically Useful Photosensitizer for Photodynamic Therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-**biology, v. 14, n. 4, p. 275-292, 1992

43 PENG, Q.; WARLOE, T.; BERG, K.; MOAN, J.; KONGSHAUG, M.; GIERCKSKY, K. E.; NESLAND, J. M. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy - Clinical research and future challenges. **Cancer**, v. 79, n. 12, p. 2282-2308, 1997

44 PAVLOVA, I.; WILLIAMS, M.; EL-NAGGAR, A.; RICHARDS-KORTUM, R.; GILLENWATER, A. Understanding the biological basis of autofluorescence imaging for oral cancer detection: High-resolution fluorescence microscopy in viable tissue. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 8, p. 2396-2404, 2008

45 ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Photodiagnosis for cutaneous malignancy: a brief clinical and technical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 5, n. 4, p. 247-250, 2008.

APÊNDICE 1

FUNDAÇÃO AMARAL CARVALHO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Fundação Hospital Amaral Carvalho
Rua Dr. Miranda Junior, 16, Jardim Alvorada – CEP 17.210-300 – Jaú / SP - ☎ (014) 3602-1194 – Ramal - 1552

Parecer CEPFHAC – 123/10.
Projeto de Pesquisa:
"Identificação de Lesões de Pele por Detecção Fotodinâmica Mediada por Ácido Aminolevulínico"
Documentos Analisados:
✓ Projeto de Pesquisa.

Responsável pelo Estudo:

Autoria: Cíntia Teles de Andrade – Pós-graduanda de Física Aplicada Biomolecular – Instituto de Física de São Carlos / Universidade de São Paulo
Orientação – Ana Gabriela Sálvio – Médica dermatologista do Hospital Amaral Carvalho

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospital Amaral Carvalho analisou os documentos supracitados na 63ª reunião ordinária realizada no dia 29 de outubro de 2010. Segue abaixo as considerações feitas pelo relator:

"O objetivo do presente projeto é utilizar a técnica de diagnóstico por fluorescência não marcada de lesões malignas ou pré-malignas de pele, com fator de exclusão no diagnóstico do melanoma. Através de equipamento específico para este fim. O medicamento utilizado para fluorescência marcada será o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA). Os pacientes incluídos serão triados pela dermatologista do departamento de pele do HAC. Serão realizadas imagens das lesões e os pacientes receberão orientações verbais e escrita.

O projeto contém a autorização do chefe do serviço de social da Fundação Amaral Carvalho e declaração de que não envolverá ônus financeiro para a instituição.

O TCLE apresentado é redigido em linguagem simples e com informações detalhadas sobre o estudo.

Frente ao exposto sugiro aprovação do projeto."

Diante do exposto, manifestamo-nos pela aprovação sem restrições dos documentos avaliados.

Informamos que os referidos documentos são rubricados pelo colaborador do CEPFHAC, Ricardo Augusto Sartori, e que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou da votação.

Aproveito para recordar-lhe do compromisso de enviar relatórios semestrais referentes à evolução do estudo.

Jaú, 29 de outubro de 2010.

Dr. Éderson Roberto de Mattos
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hospital Amaral Carvalho

APÊNDICE 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro, para os devidos fins, que fui devidamente informado(a) sobre a pesquisa de detecção de lesões de pele através do **diagnóstico fotodinâmico (PDD)** utilizando um sistema de diagnóstico desenvolvido no Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Estou ciente de que esse diagnóstico é feito de forma gratuita, não havendo despesas ou ônus de qualquer natureza da minha parte.

Fui informado(a) sobre o processo de aplicação da solução, devendo permanecer com o local coberto pelo período de uma ou duas horas , de acordo com este estudo. Serão tiradas imagens das minhas lesões e logo após estarei apto a voltar pra casa.

Minha participação é voluntária, livre de qualquer coação ou obrigação. Ficam-me assegurados os seguintes direitos: liberdade para interromper a participação a qualquer momento do estudo, de acordo com a minha vontade. Também me é assegurada a confidência de qualquer dado pessoal, assim como o sigilo de minha identidade.

Declaro ainda que fui certificado de que os resultados obtidos poderão ser utilizados em publicações e estudos futuros. Autorizo a publicação das fotografias das lesões sem que meu nome seja divulgado.

Eu, _____, RG nº _____, após ter lido e entendido as informações esclarecido minhas dúvidas **concordo voluntariamente** em participar deste estudo, podendo receber informações adicionais com a pesquisadora abaixo referida.

_____ Paciente

_____ Pesquisadora Cintia Teles

_____

Profª Drª Ana Gabriela Salvio

Telefones para contato: (14) 3602 – 1374 ou (14) 3602 – 1375

Departamento de Pele do Hospital Amaral Carvalho de jaú