

Vitória Helena Maciel Coelho

***FLUORESCÊNCIA ÓPTICA NO DIAGNÓSTICO DE
LESÕES TECIDUAIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia Interunidades – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

**SÃO CARLOS
2005**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua magnitude divina transmitindo força nos momentos difíceis da vida e pelo conforto da certeza de que estás sempre comigo.

A Ti Senhor sou grata pela vida, bênçãos, ensinamentos e por tudo que sou e serei!

Ao meu irmão, minha família, que me faz querer ser melhor a cada dia, por quem luto para ser sempre um bom exemplo de caráter, dedicação e força.

Ao Danilo, pela paciência e carinho durante a minha ausência e momentos difíceis desta etapa.

Ao meu orientador pelo incentivo a pesquisa e por tornar possível a realização de um sonho.

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Marcassa em especial, pela influência ao gosto pela pesquisa, incentivo constante, por tornar realidade um grande sonho e por acreditar no meu trabalho.

A você minha imensa admiração e eterno agradecimento!

Ao Prof. Dr. Orivaldo Lopes, pelos ensinamentos e pelo carinho e paciência ao ouvir e incentivar sempre seus alunos. Agradeço a oportunidade de partilhar da sua imensa sabedoria.

Minha grande admiração e respeito a você Professor!

A amiga Prof. Dra. Alessandra Rastelli, pela amizade, carinho e apoio nos momentos difíceis desta jornada.

A amiga Andrezza, sempre disposta a ajudar.

Obrigada amiga, pela paciência, carinho e apoio na realização deste trabalho!

Aos amigos Emmanuel e Lucas, pela paciência e pelos ensinamentos através de seus conhecimentos, tornando possível a concretização desta etapa.

Aos amigos Denis, Clóvis, Luis Marcelo, Marcelo, Thaline e Vanessa, pela imensa força e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

A todos os amigos do laboratório de Biofotônica, por me acolherem e compartilharem comigo seus conhecimentos.

Aos Amigos Professores e Alunos da UNICEP, pela paciência e força durante esta etapa.

Aos meus queridos pacientes, pelo incentivo e por acreditarem no meu trabalho.

As secretarias Janete, Isabel, Benê e Heleninha, pelo carinho e apoio durante a realização deste trabalho.

E a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, por serem todos de importância única em minha vida.

“Não creio existirem ramos da ciência que apresentem maiores esperanças de grandes descobertas do que aqueles que resultaram de pesquisas envolvendo a aplicação de princípios e medidas físicas a fenômenos químicos”.

J.J.Thomson

RESUMO

COELHO, V.H.M. (2005). *Fluorescência óptica no diagnóstico de lesões teciduais*. 61p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

A espectroscopia de fluorescência é um método convencionalmente empregado no estudo de materiais para a determinação de compostos em função de bandas de emissão características. O mesmo princípio pode ser utilizado para a determinação da presença de agentes fluorescentes em tecidos biológicos, que podem ser úteis no diagnóstico e direcionamento no tratamento de lesões teciduais. Das lesões teciduais as lesões por ultravioleta e as lesões musculares merecem atenção especial devido à frequência com que ocorrem. As lesões por ultravioleta podem induzir o câncer de pele, que hoje representa o câncer de maior incidência no Brasil e as lesões músculo esqueléticas são as mais frequentes quando comparadas há outras patologias que acometem o homem, motivo este do estudo destas lesões. No entanto, apesar da espectroscopia de fluorescência se mostrar eficiente para a detecção de lesões superficiais, dúvidas permanecem a respeito da sensibilidade da técnica para lesões intersticiais (que ocorrem em profundidade), visando este estudo avaliar a eficiência e a sensibilidade da técnica na diferenciação entre o tecido normal e o tecido lesado para o diagnóstico destas lesões.

O sistema empregado para efetuarmos o diagnóstico, utiliza uma fonte laser de excitação em 442 nm (Helio-Cádmio), ponta de detecção com uma fibra central e seis periféricas para coleta da luz re-emitida pelo tecido, um monocromador e um computador. Para o trabalho foram utilizados ratos machos da raça Wistar com peso aproximado de 300 g, lesados utilizando uma lâmpada de ultravioleta e traumatizados utilizando um equipamento de trauma direto não invasivo. Os resultados foram obtidos através de análises comparativas entre os espectros do tecido normal e tecidos lesados.

Palavras-chaves: fluorescência, espectroscopia, diagnóstico, lesão por ultravioleta e lesão muscular.

ABSTRACT

COELHO, V.H.M. (2005). *Optical fluorescence in tissue injury diagnosis*. 61p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

The fluorescence spectroscopy is a conventionally used method, in the study of materials for the compound determination in function to the characteristic emission bands. The same principle can be used to determine the presence of fluorescent agents in biological tissues, which can be useful in the diagnosis, and for a better direction in the treatment of tissue injuries. From the tissue injuries, the injuries by ultraviolet and muscle injuries, they deserve a special attention due to their frequent occurrence. The injuries by ultraviolet can induce skin cancer, which nowadays represents the highest incidence in Brazil and the muscle injuries are the most common, when compared to the other pathologies that affect human beings, that is why these two kinds of injuries will be studied in this paper. Although, thus, the fluorescence spectroscopy has shown to be efficient in the detection of superficial injuries, doubts remain about the technique sensitivity for interstitial injuries (which happen deeply), this study aims to evaluate the efficiency and sensitivity of the technique in the differentiation between normal tissue and injured tissue, for the diagnosis of these injuries.

The system used to get the diagnosis uses a laser source of excitation in 442nm (Helium-Cadmium), a tip of detection with a central fiber and six peripheral ones to collect the re-emitted light from the tissue, a monochromator and a computer. For the research, Wistar rats weighting about 300g was used, which are injured using an ultraviolet lamp and traumatized, using a direct non-invasive trauma equipment. The results was be obtained through comparative analysis between the spectrums from normal tissue and injured ones.

Key words: fluorescence, spectroscopy, diagnostic, injury by ultraviolet and muscle injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de penetração da radiação UV nas camadas da pele.....	23
Figura 2 - Espectros de excitação de fluorescência de fluoróforos endógenos teciduais.....	30
Figura 3 - Espectros de emissão de fluorescência de fluoróforos endógenos teciduais.....	30
Figura 4 - Equipamento para produção do trauma direto não invasivo.....	32
Figura 5 - Imobilização do animal sobre a plataforma do equipamento para a produção do trauma.....	33
Figura 6 - Região tricotomizada para a realização da lesão por UV.....	34
Figura 7 - Exposição do animal à lâmpada de UV.....	34
Figura 8 - Aspecto da pele após a lesão por radiação UV.....	34
Figura 9 - Foto do sistema de fluorescência.....	35
Figura 10 - Desenho esquemático do sistema de fluorescência.....	35
Figura 11 - Desenho esquemático das medidas em varredura da lesão.....	37
Figura 12 - Diagrama de Jablonski – resumindo os processos de luminescência.....	40
Figura 13 - Espectro característico de um tecido animal normal.....	40

Figura 14 - Espectro característico de um tecido animal normal.....	41
Figura 15 - Espectro característico de um tecido lesado por impacto direto ao músculo sóleo.....	42
Figura 16 - Picos característicos da lesão tecidual.....	42
Figura 17 - Espectros da evolução temporal do animal submetido à lesão do músculo sóleo.....	43
Figura 18 - Espectro das médias dos animais analisados 48 horas após a lesão.....	43
Figura 19 - Relação de picos em diferentes horários após a lesão.....	44
Figura 20 - Espectro característico do tecido normal.....	45
Figura 21 - Espectro de fluorescência característico da leitura de um tecido lesado por radiação UV.....	46
Figura 22 - Foto do tecido do animal normal.....	46
Figura 23 - Foto do tecido do animal lesado.....	46
Figura 24 - Espectro da variação da intensidade da fluorescência durante as 240 horas de medida que precedem o estabelecimento da lesão por UV.....	47
Figura 25 - Ajuste do período de estabelecimento e recuperação da lesão.....	49
Figura 26 - Ajuste do período de estabelecimento e recuperação da lesão.....	49
Figura 27 - Comportamento da r_{uv} dos picos de fluorescência em função dos tempos de medida.....	50
Figura 28 - Intensidade dos picos de fluorescência nos animais avaliados.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema de horários de medida da lesão.....	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA - Ácido desoxirribonucléico

FAD - Flavina adenina dinucleotídeos

FMN - Flavina mononucleotídeos

g – gramas

HeCd - hélio-cádmio

HeNe - hélio-neônio

IL-1 - Interleucina-1

LASER – light amplification by stimulated emission of radiation (luz amplificada por emissão estimulada de radiação)

μW – micro Watts

mL – mililitros

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

Nd:YAG - cristal de itrio alumínio granado dopado com neodímio dobrado

nm – Nanômetro

RF – Riboflavina

ROS - Oxigênio reativo específico

TNF - Fator de necrose tumoral

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Lesões Musculares	17
3.2. O Câncer de Pele	21
3.3. A Espectroscopia de Fluorescência.....	26
3.3.1. Fluorescência dos Tecidos Biológicos.....	27
3.3.2. Fluoróforos.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1. Animais Utilizados.....	31
4.2. Experimento A- Lesão Muscular	31
4.2.1. Equipamento para Produção do Trauma Direto Não Invasivo.....	31
4.2.2. Lesão por Trauma Direto Não Invasivo	32
4.3. Experimento B- Lesão por Ultravioleta.....	33
4.3.1. Irradiação.....	33

4.3.2. Lesão Produzida por Lâmpada UV.....	33
4.4. Sistema de Diagnóstico.....	35
4.5. Coleta dos Dados.....	36
4.5.1. Experimento A- Coleta dos Dados Obtidos da LM.....	36
4.5.2. Experimento B- Coleta dos Dados Obtidos da LUV.....	37
4.6. Tratamento dos Dados Obtidos.....	37
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Experimento A – Lesão por Impacto Direto ao Músculo Sóleo do Animal.....	41
5.1.1. Evolução Temporal dos Espectros Obtidos.....	43
5.2. Experimento B – Lesão por UV.....	45
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO.....	55
8. REFERÊNCIA.....	56
9. ANEXO.....	69

1. INTRODUÇÃO

De um modo geral, das lesões que mais afetam a população, as lesões musculares merecem atenção devido à sua alta incidência e ao aumento constante causado por esportes competitivos, recreativos, tráfego de alta velocidade e jornadas excessivas de trabalhos. Das lesões significativas que acometem o homem, pelo menos dois terços envolvem o sistema músculo-esquelético: fraturas, luxações e lesões associadas dos tecidos moles (EITNER, 1984).

Além das lesões musculares, outra patologia que merece atenção devido a sua frequência e taxa de mortalidade é o câncer de pele. Este tipo de câncer é o mais comum em pessoas de pele clara, ultrapassando a incidência de todos os outros cânceres juntos (LOVE, 1999).

Os diagnósticos realizados atualmente utilizam ferramentas como, a ultrasonografia e ressonância nuclear magnética da região muscular lesada e a histologia do tecido alterado para as lesões de pele, o que poderia ser efetuado utilizando o diagnóstico óptico, por ser um método não invasivo e de rápido diagnóstico, pois a intervenção diagnóstica precoce com o estabelecimento de um diagnóstico preciso é a chave para a elaboração de um processo efetivo de tratamento e reabilitação, podendo diminuir a taxa de mortalidade pelo câncer de pele, proporcionar o retorno precoce do atleta e do trabalhador às suas atividades, não prejudicando o paciente e onerando o empregador (GOULD, 1993; DELISA, 2001; FITZPATRICK, 2002; LOVE, 1999 e RASSNER, 1991).

A necessidade da busca por ferramentas diagnósticas que forneçam resultados imediatos contra lesões das mais diversas etiologias, sejam elas de caráter reversível ou não, vem despertando interesse em estudos que desenvolvam ferramentas diagnósticas com informações mais precisas e rápidas para melhor direcionar o tratamento destas lesões, que mediante a um diagnóstico precoce, podem efetivar o tratamento e acelerar a recuperação do paciente.

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica que vem ganhando força como ferramenta para a análise patológica dos tecidos, mostrando-se bastante promissora na

diferenciação entre tecidos normais e lesados, já utilizada como ferramenta de diagnóstico de doenças como, a aterosclerose, displasias no cólon, câncer no esôfago, alguns tipos de câncer de pulmão e bexiga. A técnica consiste em fornecer energia a amostra, neste caso por meio da incidência de luz, em comprimentos de onda específicos e analisar sua resposta luminescente nos comprimentos de onda emitidos por esta.

A identificação dos tecidos baseia-se na determinação das diferenças espectrais entre os fluoróforos presentes nos tecidos normais e lesados. A técnica de espectroscopia de fluorescência vem sendo denominada de "biópsia óptica", instigando grande parte dos cientistas e médicos devido ao fato de que a fluorescência pode ser gerada e coletada por meio de fibras ópticas, facilitando o diagnóstico de lesões profundas e de difícil acesso. Desta maneira, cateteres baseados em fibras ópticas podem ser facilmente introduzidos em endoscópios e outros instrumentos de inspeção, permitindo assim uma análise *in vivo* em tempo real, sem a necessidade de remoção do tecido. A denominação "biópsia óptica" advém do fato da identificação do tecido ser feita por meio da radiação luminosa, aplicabilidade particularmente interessante para detecção de alterações em tecidos biológicos. A técnica de análise espectral por meio da fluorescência fornece informações que permitirão a detecção de microorganismos, produtos resultantes de metabolismos celulares e alvos fluorescentes. A aplicação desta técnica vem sendo conduzida atualmente para a determinação dos comprimentos de onda de excitação ideais para diferenciação entre os diversos tipos de disfunções e lesões.

Portanto, a fluorescência no estudo do tecido, vem como uma proposta para auxiliar no diagnóstico de diversas lesões de pele, desde a avaliação de lesões musculares, lesões provocadas pelo fotoenvelhecimento e neoplasias, a descoberta e caracterização de outras doenças, podendo tornar-se uma grande aliada no diagnóstico destas lesões.

2. OBJETIVOS

A presente pesquisa tem por finalidade avaliar os diferentes espectros de fluorescência em lesões musculares, bem como em lesões por radiação ultravioleta, com o intuito de viabilizar e disponibilizar uma nova ferramenta diagnóstica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Lesões Musculares

As lesões musculoesqueléticas têm aumentado em frequência e não apenas em atletas de competição, que treinam continuamente para estabelecer novos records, mas também nos esportes praticados popularmente, acidentes automobilísticos e de trabalho.

Embora lesões musculoesqueléticas isoladas em indivíduos saudáveis raramente sejam fatais, elas são importantes por acarretarem afastamento do atleta e do trabalhador, perdendo dias de treinamento e de trabalho, além de predispor o risco de lesões recorrentes quando não diagnosticadas e tratadas efetivamente.

Entre os tipos de lesão, a maioria (78%) são contusões, luxações, distensões e estiramentos musculares e tendinosos. Destas, 61% acometem os membros inferiores com tempo médio perdido de trabalho de três semanas, podendo ser classificadas em: afecções congênitas, lesões traumáticas - fechadas e abertas, inflamações musculares - agudas e crônicas, atrofia muscular, degeneração muscular, hipertrofias de músculos e neoplasias, onde os mecanismos de lesão muscular mais frequentes podem ser divididos em três grupos: o primeiro por uso excessivo, devido a microtraumas repetitivos em uma estrutura anatômica em particular; o segundo, por contato direto (impacto brusco e direto sobre uma determinada estrutura); e o terceiro mecanismo por insuficiência de partes moles, geralmente causadas por uma contração violenta única ou um esforço sobre uma determinada estrutura, tensionando-a (EITNER, 1989).

O sistema muscular esquelético é muito susceptível a traumas. Vários trabalhos avaliaram o efeito da contusão em diferentes músculos esqueléticos do rato, tais como, *gastrocnemius* (FISHER et al, 1990; CRISCO et al, 1994) e *sóleo* (MINAMOTO,

1997). Estes trabalhos mostraram que o músculo esquelético do rato apresenta capacidade de regeneração após lesão induzida por contusão direta.

O período de estabelecimento e recuperação da lesão faz parte do processo de resposta inflamatória, onde o processo de reparo começa imediatamente após a lesão e termina quando há neutralização do agente agressor e restauração tissular. Durante o processo de reparo há regeneração das células danificadas e ou substituição por tecido fibroso cicatricial.

Os elementos da resposta inflamatória são constituídos de:

- plasma e células circulantes como: neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, plasmócitos e plaquetas;
- células do tecido conjuntivo: mastócitos, fibroblastos e macrófagos e
- células da matriz extracelular: proteínas fibrosas estruturais (colágeno e elastina), glicoproteínas e proteoglicanas.

Já a cura do processo inflamatório, ou seja, o reparo da lesão implica no desaparecimento do exudato, dos sinais locais e sistêmicos da inflamação (dor, rubor, calor e perda de função), e na regeneração e substituição do tecido lesado por tecido normal, sendo que a cura por completo dependerá da capacidade de regeneração das células lesadas. As células lábeis (com intensa atividade proliferativa) como o tecido estratificado se regeneram com maior facilidade e rapidez, já as células estáveis e as células permanentes não apresentam essa facilidade.

A regeneração muscular é um processo bem documentado (CARLSON e FAULKNER, 1983; GROUNDS, 1991; BODINE-FOWLER, 1994), onde o desenvolvimento embrionário da musculatura esquelética pode ser acompanhado, mostrando os estágios de diferenciação celular, desde o desenvolvimento básico da lâmina basal a formação dos miotubulos.

Embora seja necessário elucidar algumas questões relacionadas à regeneração muscular, principalmente com relação aos mecanismos envolvidos na ativação das células satélites, a seqüência de respostas celulares envolvidas no mecanismo de regeneração muscular já está bem estabelecida, e independem da utilização de diferentes modelos de indução de lesão muscular, pois estes não influenciam na seqüência da regeneração (BODINE-FOWLER, 1994; TIDBALL, 1995).

De modo geral, a resposta regenerativa envolve a revascularização tecidual, infiltração celular, fagocitose do material necrosado, proliferação e fusão de células precursoras miogênicas e finalmente, a reinervação (GROUNDS, 1991).

Entretanto, a duração e o sucesso da regeneração muscular esquelética são dependentes de alguns fatores, ou seja, a seqüência morfológica da regeneração é praticamente a mesma, mas pode haver uma alteração no tempo de duração de cada fase do processo regenerativo.

Carlson e Faulkner (1983), descrevem em seus estudos, um diagrama histológico após a lesão do músculo de ratos associado aos dias da lesão. Segundo os autores após 1 dia da lesão a necrose isquêmica já se encontra instalada; 3 dias após a lesão a fibra muscular é invadida por macrófagos que fagocitam o citoplasma necrótico, e após 5 dias, os mioblastos e novos miotubos com a lâmina basal dão origem a novas fibras musculares. Com 30 dias, a fibra muscular apresenta-se regenerando em processo de maturação, e passados 60 dias da lesão a fibra muscular apresenta-se em seu estado normal.

Já segundo Rantanen (1999), a regeneração muscular em ratos Wistar sob ação do ultra-som terapêutico apresentou uma seqüência básica de eventos celulares, tais como:

- a) regeneração da fibra lesada observada entre 6 a 24 horas após a lesão;
- b) ativação das células satélites e intensa inflamação entre 24 a 48 horas após a lesão e
- c) ativação de fibroblastos depois de 24 a 36 horas da lesão.

Fisher et al (1990) estudou a regeneração do músculo *gastrocnêmio* em ratos após trauma. Estes foram observados com 14, 21 e 30 dias após a lesão. O músculo apresentou-se aparentemente cicatrizado, sem anormalidades ultra-estruturais por volta do 14º dia, porém, 21 dias após, a reposição completa de proteína não havia sido alcançada e áreas com fibroses residuais estavam presentes.

Crisco et al (1994), realizaram estudos histológicos, biomecânicos e fisiológicos do músculo *gastrocnêmio-sóleo-plantar* em 40 ratos Wistar machos, provocando uma lesão no músculo, observando sua evolução por 2, 7 e 24 dias após a

lesão, denotando que aos 24 dias da lesão, histologicamente a regeneração apresentava-se completa e normal na fibra muscular, quando comparado ao grupo controle.

Allbrook (1962) estudou a regeneração da fibra muscular do músculo tibial anterior e fibular de coelhos, utilizando a microscopia eletrônica para a investigação do músculo em variados dias após a lesão, verificando que o processo regenerativo 6 dias após a lesão encontrava-se bem instalado, com presença de muitos leucócitos e linfócitos e após 15 dias, as miofibrilas apresentam-se bem desenvolvidas e as fibras de colágenos estavam presentes em grande número no espaço extracelular do tecido. Verificando também, no estudo histológico que a reconstituição do tecido estava completa após 21 dias da lesão.

3.2 O Câncer de Pele

A exposição abusiva ao sol, fonte de radiação UV pode causar não apenas vermelhidão e posterior descamação da pele, mas também alterações significativas que podem comprometer o DNA (DIFFEY, 1991). Estas alterações podem levar a formação de um câncer e a deficiências do sistema imunológico, pois apenas 5% da radiação UV que atinge a pele é refletida, sendo o restante absorvida pelas primeiras camadas da pele.

A absorção da radiação UV na pele é feita por cromóforos específicos, como as proteínas, ácidos nucléicos, NADH, entre outras, acarretando alterações significativas ao tecido (TRAUTINGER, 2001). Essas alterações podem ser causadas por pequenas quantidades de radiação podendo ser agudas ou crônicas. As queimaduras são consideradas um efeito agudo da radiação UV, já os efeitos crônicos podem ser observados através do fotoenvelhecimento e da carcinogênese (TAYLOR, 2002).

Estes danos causados à pele incluem uma cascata de eventos bioquímicos que vão desde os efeitos diretos aos queratócitos, liberando citocinas como a IL-1 e o TNF, sendo grande parte das IL-1 armazenadas no estrato córneo e na epiderme.

Além dos queratócitos, as células fagocitárias secretadas pelas citocinas aumentam ainda mais o recrutamento das células inflamatórias, essas células fagocitárias recrutadas são ativadas pelas citocinas gerando ROS como parte do mecanismo de defesa.

Em síntese, essa cascata de eventos acarreta desde alterações superficiais na pele e alterações no DNA à ativação do sistema neuroendócrino, culminando em imunossupressão e liberação de mediadores inflamatórios. Estes aumentam a permeabilidade dos capilares levando a infiltração de neutrófilos que produzem grande quantidade de ROS, que possui um importante papel na modulação da resposta inflamatória (PILLAI et al, 2005).

No Brasil, índices estatísticos revelam o câncer como quarta maior causa de morte (8,2%), precedido por doenças circulatórias (25%), causas externas (9,3%), ou seja, mortes por violência, envenenamentos e acidentes, e as doenças infecciosas e parasitárias (9,2%). Dentre os cânceres que mais atingem a população brasileira, estão o

câncer de colo de útero, mama e pele para as mulheres (50%), e cânceres de pele, pulmão e boca para homens (40%). Estas estatísticas apresentam uma variação significativa entre as diferentes regiões do país, devido a problemas de dificuldade de acesso à população de baixa renda ao tratamento de saúde, dificultando assim a obtenção de dados abrangentes (DERGHAN et al, 2004).

Ainda dentre os tipos de cânceres que atingem a população brasileira, o câncer mais freqüente é o de pele, correspondendo à cerca de 25% de todos os tumores diagnosticados em todas as regiões geográficas.

A radiação UV natural proveniente do sol é o seu maior agente etiológico. De acordo com o comprimento de onda, os raios UV são classificados em UV-A (320-400nm), UV-B (280-320nm) e UV-C (200-280nm). Em decorrência da destruição da camada de ozônio, os raios UV-B, que estão intrinsecamente relacionados ao surgimento do câncer de pele, aumentado progressivamente sua incidência sobre a terra. Da mesma forma, tem ocorrido um aumento da incidência dos raios UV-C, que são potencialmente mais carcinogênicos do que os UV-B. Já os raios UV-A independem desta camada, e causam câncer de pele por exposição em horários de alta incidência de luz solar, continuamente e ao longo de muitos anos. Pessoas de pele clara, que vivem em locais de alta incidência de luz solar apresentam maior risco, como mais de 50% da população brasileira têm pele clara e se expõem muito e descuidadamente ao sol, seja por trabalho ou lazer, e o país situa-se geograficamente numa zona de alta incidência de raios UV, nada mais previsível e explicável do que a alta ocorrência do câncer de pele entre os brasileiros (CAPELLA, 2005).

As radiações UV-A e UV-B penetram em diferentes níveis da pele. A UV-A penetra até a derme, enquanto que a UV-B penetra até a epiderme (figura 1). A partir do momento em que penetra na pele, qualquer uma das duas formas de luz será absorvida pelas moléculas da pele. Esta energia precisa ser dissipada, o que se dá por um processo que leva à produção de radicais livres — formas altamente instáveis de moléculas de oxigênio, tais como peróxidos e peróxidos lipídicos. Estes radicais livres ligam-se a células sadias da pele, provocando ruptura ou alteração das suas rotas metabólicas. O processo de envelhecimento da pele está intimamente relacionado à formação de

radicais livres. E em casos mais graves, estas células modificadas podem transformar-se em células neoplásicas, como o melanoma (MARTINS, 1987).

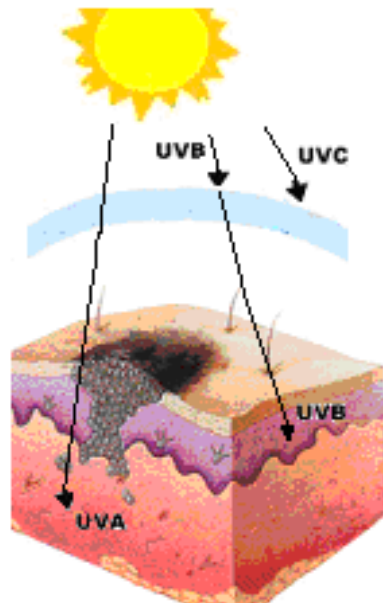


Figura 1. Esquema de penetração da radiação UV nas camadas da pele.

Fonte: Gray (1997).

Dentre os cânceres de pele, o melanoma é o câncer de maior agressividade, caracterizado por uma pinta de crescimento progressivo, que tenha mudado alguma de suas características de modo repentino ou no decorrer de um período.

Em algumas regiões do mundo, especialmente entre os países do Ocidente, o número de pessoas que desenvolvem o melanoma está aumentando mais rapidamente que qualquer outro tipo de câncer. Nos Estados Unidos, por exemplo, a incidência de melanoma tem mais do que duplicado nos últimos 20 anos. No Brasil, a estimativa de casos novos/ano e taxa bruta de incidência de melanoma é respectivamente 3.850 e 2,4%, com discreta prevalência em mulheres (1:1,4) (MARTINS, 1991).

O melanoma pode ocorrer em qualquer superfície da pele. Em homens, é freqüentemente encontrado no tronco ou na cabeça e pescoço e em mulheres, o

melanoma freqüentemente se desenvolve nas regiões inferiores da perna. O melanoma é raro em pessoas negras e pardas. Quando se desenvolve em indivíduos de pele escura, tende a ocorrer embaixo das unhas ou sobre as palmas das mãos ou sola dos pés. A probabilidade de desenvolver o melanoma aumenta com a idade, mas esta doença pode afetar pessoas de todas as idades, sendo um dos cânceres mais freqüentes em adultos jovens.

Freqüentemente, o primeiro sinal de melanoma é uma alteração no tamanho, forma ou coloração de um nevo existente. A maioria dos melanomas apresenta uma área escura ou azulada, podendo surgir como um nevo novo, escuro e anormal.

O “ABCD” da dermatologia é bastante utilizado para diagnosticar lesões suspeitas sendo na pele:

- **A**ssimetria – a forma de uma metade não é igual à outra.
- **B**ordos – os bordos da lesão são freqüentemente imperfeitos, chanfrados, pouco nítidos ou irregulares no seu contorno, o pigmento pode estender-se para a pele circunvizinha.
- **C**oloração – a cor não é uniforme. Tonalidades escuras, marrons e bronzeadas podem estar presentes. Áreas brancas, cinzas, vermelhas, róseas ou azuis também podem ser encontradas.
- **D**iâmetro – há uma modificação no tamanho, geralmente um aumento, sendo os melanomas geralmente maiores que 5 mm.

Os melanomas têm uma grande variabilidade em seu aspecto, muitos mostram todos os aspectos do ABCD. Entretanto, alguns podem apresentar alterações ou anormalidades em apenas uma ou duas das características do ABCD (ZACHARIAS, 1994).

Os melanomas iniciais podem ser encontrados quando um nevo pré-existente apresenta uma discreta alteração, tal como uma nova área escura formada. Outros achados freqüentes são: a formação recente de finas escamas ou a presença de prurido

em um nevo, ou um melanoma mais avançado, onde há alteração da textura que pode tornar-se endurecida ou protuberante. Embora os melanomas possam ter um aspecto

diferente e os tumores avançados possam coçar, transpirar ou sangrar, os melanomas geralmente não provocam dor.

O melanoma pode ser curado se diagnosticado e tratado em estágios iniciais, isto é, quando o tumor ainda é superficial e não invade o tecido profundamente. Entretanto, se o melanoma não for retirado nos estágios iniciais, as células neoplásicas podem crescer a partir da superfície da pele em direção às camadas inferiores, invadindo o tecido sadio. Quando o melanoma se torna espesso e profundo, a doença freqüentemente se dissemina para outras regiões do corpo, tornando-se difícil de ser controlada.

Um outro tipo de câncer de pele é o carcinoma basocelular, que corresponde a cerca de 80% de todos os casos de câncer de pele. Caracteriza-se por um nódulo róseo, endurecido, de crescimento lento, porém progressivo (LOVE, 1999).

Já o carcinoma espinocelular, segundo tipo mais freqüente de câncer de pele, é caracterizado por um nódulo de crescimento progressivo, que freqüentemente apresenta uma úlcera na sua superfície. Caracteriza-se também por uma mancha de crescimento progressivo, podendo disseminar-se através dos linfonodos, predispondo metástases, necessitando de diagnóstico precoce para evitar a evolução da doença (LOVE, 1999).

O exame da pele faz parte dos exames de rotina que devem ser realizados periodicamente, alterações na pele ou em um nevo ou verruga devem ser precocemente relatadas ao médico.

No caso de suspeita de um melanoma, o paciente será submetido a uma biópsia, sendo a única forma de realização de um diagnóstico definitivo. Neste procedimento o médico tenta retirar toda a lesão de aspecto suspeito, que quando muito extensa pode ser completamente retirada e enviada ao patologista que examina o tecido através de um microscópio para verificar a presença ou não de células neoplásicas.

Na maioria das vezes é importante que mais de um patologista observe o tecido para determinar a presença do melanoma. Caso o diagnóstico seja confirmado, o médico precisa conhecer a extensão ou estágio da doença antes de iniciar o tratamento, no entanto, embora o melanoma seja o mais perigoso dentre os tipos de câncer de pele,

quando diagnosticado precocemente e corretamente tratado, pode apresentar índices de cura acima dos 90%, assim como os demais tipos de cânceres de pele (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2005).

3.3 A Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é um método óptico que vem sendo usualmente empregado na identificação de elementos químicos em materiais, mas recentemente vem sendo aplicada na área médica no diagnóstico de lesões teciduais. Assim, através da Biópsia Óptica, baseada no princípio de que a luz interage de maneira diferente dependendo da composição e arquitetura do tecido investigado, teremos uma fluorescência produzida de forma distinta entre tecidos lesados e normais.

A fluorescência é um importante processo de emissão em que átomos ou moléculas são excitados por absorção de radiação eletromagnética. As espécies excitadas relaxam para seu estado fundamental, liberando sua energia na forma de luz, ou seja, a luz com determinado comprimento de onda - comprimento de onda de excitação é absorvida pelo tecido e reemitida em um segundo comprimento de onda maior (comprimento de onda de emissão), que apresenta menor energia. No processo de fluorescência a energia absorvida é sempre maior do que a emitida, uma vez que existem outras formas não radioativas de perda de energia (WEST e HOLLER, 1997).

Das etapas não radioativas de perda de energia temos:

- relaxação vibracional, onde em uma solução a energia em excesso é perdida como consequência de colisões entre as moléculas da espécie excitada e as do solvente;
- conversão interna, que descreve processos intermoleculares pelos quais uma molécula passa para um estado eletrônico de energia menor, sem emissão de radiação, onde esta conversão parece eficiente quando dois níveis eletrônicos de energia estão próximos o suficiente, para que haja uma superposição de níveis de energia vibracionais;

- conversão externa, que envolve a interação e transferência de energia, entre a molécula excitada e o solvente e outros solutos, incluindo o efeito marcante exercido pelo solvente sobre a intensidade de fluorescência e

- cruzamento intersistema, processo no qual o spin de um elétron excitado é invertido, resultando em uma mudança na multiplicidade da molécula, sendo comum em moléculas que contêm átomos pesados, pois a interação spin-órbita se torna maior na presença destes átomos, facilitando a mudança de spin.

Alguns estudos demonstram que a fluorescência pode ser empregada no estudo e identificação de substâncias endógenas presentes na lesão por UV e em estudos para diagnóstico de diversas doenças de pele (ANDERSON, 1989; ZENG et al, 1995), apresentando como vantagem o fato de ser mais rápida e mais sensível quando comparada ao estudo histológico para avaliar lesões causadas por UV (TIAN et al, 2001).

A geração de fluorescência de neoplasias tem sido mostrada desde 1957, e com a melhoria dos equipamentos a observação da fluorescência tem estado clinicamente disponível desde 1964, apresentando-se útil na detecção de tumores de cabeça e pescoço, laringe, cervix, bexiga, pulmão e esôfago (RAMANUJAM, 1996), câncer de mama (ALFANO et al, 1989; THOMSEN e TATMAN, 1998) e aterosclerose (MEIRONG et al, 1997).

Ademais, outros estudos têm mostrado o completo uso desta ferramenta diagnóstica em lesões de estômago e colo uterino, levando a um acúmulo de experiência considerável em examinar lesões neoplásicas e não-neoplásicas em geral, demonstrando com isso o sucesso da Biópsia Óptica empregada nos mais diversos tipos de lesão.

3.3.1 Fluorescência dos Tecidos Biológicos

Quando utilizamos a Biópsia Óptica para diagnosticarmos alterações teciduais, observamos as diferenças espectrais sofridas por pequenas alterações bioquímicas nas moléculas.

Estas alterações são responsáveis pela emissão da fluorescência nos tecidos investigados e ocorre quando um fóton, unidade elementar da luz é absorvido por uma molécula e os elétrons dessas moléculas são excitados, passando do estado fundamental para o um estado de maior energia. Como os elétrons não possuem tendência em permanecer no estado de excitação, devido à própria instabilidade deste estado, a relaxação ocorre quase que imediatamente e esta energia que foi absorvida é irradiada ao ambiente. A fluorescência ocorre quando esta energia é irradiada na forma de luz (WEST e HOLLER, 1997).

O processo de geração de fluorescência pode então ser descrito em dois passos: o primeiro por excitação com absorção de energia e o segundo por subsequente emissão de fótons. O grupo molecular no qual estas transições eletrônicas são possíveis é chamado de cromóforo e o grupo no qual as transições resultam em fluorescência é chamado de fluoróforo (SILVEIRA JR., 1996).

3.3.2. Fluoróforos

Os fluoróforos são elementos associados com a matriz estrutural dos tecidos como o colágeno e a elastina, ou estão envolvidos nos processos metabólicos celulares como a NADH e as flavinas, além dos aminoácidos aromáticos, triptofano e fenilalanina e várias porfirinas e lipopigmentos com os ceróides e a lipofuscina (WAGNIERES et al, 1998). Espectros de excitação e emissão fluorescente de vários fluoróforos endógeno teciduais são demonstrados na figura 2 e 3.

O colágeno e a elastina são proteínas estruturais do tecido, o colágeno pode ser encontrado em grande quantidade nos tecidos conectivos e osso, com emissão na região do violeta e a elastina nos tecidos conectivos de estruturas elásticas, com emissão também na região do violeta, no entanto com intensidade menor do que a apresentada pelo colágeno.

O NADH é liberado como uma coenzima de biomoléculas, sendo um fluoróforo de alta intensidade de fluorescência, com emissão na região do azul.

A Flavina (Vitamina B2) encontrada na literatura como RF, FMN e FAD, são coenzimas de diversas desidrogenases aeróbicas encontradas em vários alimentos, como

vegetais, fígado, trigo, leite e ovos, com espectro fluorescente na região amarelo-verde. Já as Porfirinas são pigmentos largamente encontrados na natureza, importantes para a espectroscopia na forma de hematoporfirinas, que vêm sendo bastante utilizadas para a terapia fotodinâmica como elemento exógeno de identificação e marcação de tumores.

A identificação das bandas de emissão dos fluoróforos citados acima é de grande importância na interpretação dos resultados encontrados através do diagnóstico por Biópsia Óptica, auxiliando na identificação das alterações teciduais sofridas pelo tecido. No entanto, é importante ressaltar que cada tecido contém uma mistura de vários fluoróforos com diferentes concentrações, e que estes não estão uniformemente distribuídos no tecido, variando de acordo com a profundidade, apresentando diferentes contribuições de acordo com as camadas do tecido (THOMSEN e TATMAN, 1998).

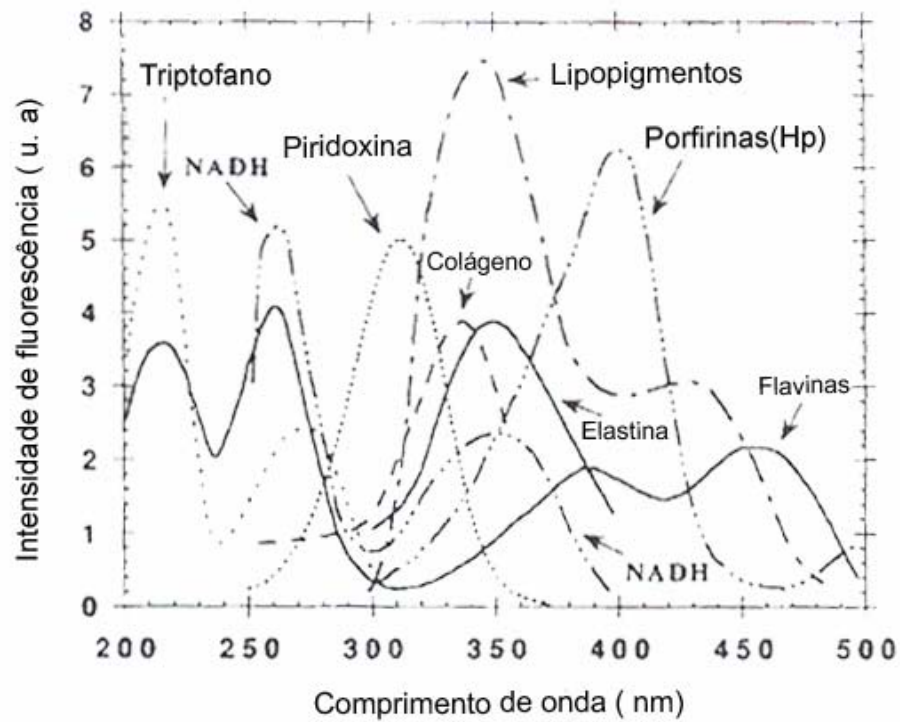


Figura 2. Espectros de excitação de fluorescência de fluoróforos endógenos teciduais.
 Fonte: Wagnieres (1998).

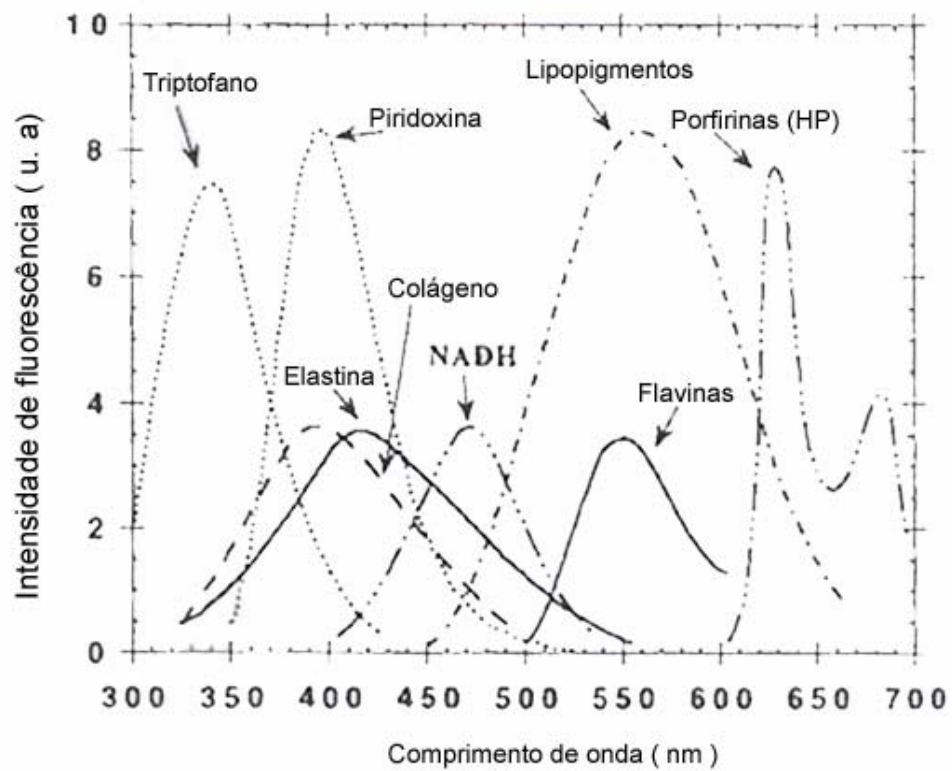


Figura 3. Espectros de emissão de fluorescência de fluoróforos endógenos teciduais.
 Fonte: Wagnieres (1998).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais Utilizados:

O trabalho foi dividido em dois experimentos distintos pelo mecanismo de lesão, utilizando para o experimento A, 10 ratos machos da raça Wistar, com peso aproximado de 320 g, e para o experimento B, cinco ratos machos da raça Wistar, com peso aproximado de 250 g. Ambos provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em um alojamento para animais no laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo. O alojamento possui quatro filtros para a entrada de ar e um exaustor para a saída do ar, com temperatura mantida variando entre 23 a 25 °C e ciclos controlados de claro e escuro. Os animais foram separados em gaiolas de polietileno com tampas metálicas e assoalho forrado com serragem, permanecendo cinco animais por gaiola.

Os animais foram tratados diariamente com água filtrada e ração comercial específica para roedores da marca Primor[®] à vontade.

O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, protocolo n^o 008/2005.

4.2. Experimento A: Lesão Muscular

4.2.1. Equipamento para Produção do Trauma Direto Não Invasivo:

O equipamento utilizado para a produção do trauma foi desenvolvido pela oficina mecânica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo,

segundo modelo proposto por Minamoto, 1997. Consiste de uma haste metálica com superfície de impacto de 0,75 cm, área de impacto de 0,442 cm² pesando 240g, com orifícios confeccionados para graduação da altura feitos a cada 4 cm onde é possível graduar a carga e a altura em que será liberada a carga, em uma determinada superfície corporal.

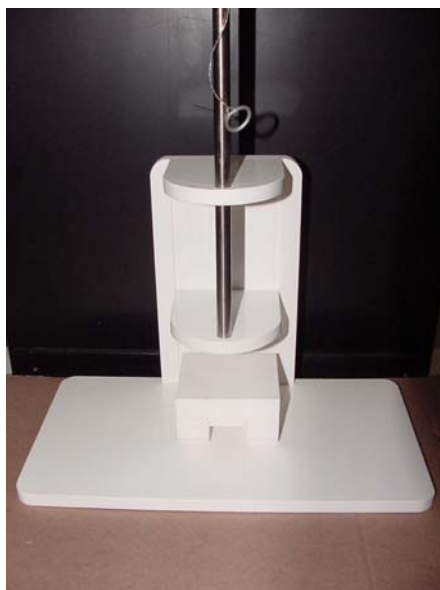


Figura 4. Equipamento para produção do trauma direto não invasivo.

4.2.2. Lesão por Trauma Direto Não Invasivo:

O trauma foi realizado com o animal previamente anestesiado com uma solução anestésica por injeção intramuscular de 0.4 ml/100g de *cloridrato de ketamina* (Vetanarcol-König®) e 0.2 ml/100g de *xylasina* (Coopazine-Coopers®), relaxante muscular. Os animais foram tricotomizados no local da lesão, imobilizados em decúbito lateral, com a articulação coxofemoral em extensão, em contato com a plataforma do equipamento, rotação máxima da articulação coxofemoral, extensão máxima de joelho e dorsi-flexão de 90° da pata. Os animais foram imobilizados manualmente sob a plataforma, e em todos os animais a imobilização foi feita pelo mesmo manipulador. O trauma foi produzido com uma carga de 240g liberada de uma altura de 16cm sobre o músculo sóleo do animal a 1 cm da inserção do tendão aquileu, por dois impactos consecutivos, segundo modelo proposto por Minamoto (1997).



Figura 5. Imobilização do animal sobre a plataforma do equipamento para a produção do trauma.

4.3. Experimento B: Lesão por UV

4.3.1. Irradiação:

Foi utilizada uma lâmpada de UV com potência de $200\mu\text{W}$, fixada em uma caixa, isolada com cartolina preta onde foi realizado um orifício de 1,5 cm para focalizar melhor o feixe de luz e evitar o espalhamento da radiação no local do experimento. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal a uma distância de 5 cm da lâmpada, coincidindo o orifício confeccionado com a área tricotomizada para a realização da lesão, permanecendo sob exposição a radiação UV por um período de três horas.

4.3.2. Lesão Produzida com Lâmpada de UV:

A lesão por UV foi realizada com o animal previamente anestesiado com solução anestésica por injeção intramuscular de 0.4 ml/100g de *cloridrato de ketamina* (Vetanarcol-König®) e 0.2 ml/100g de *xylasina* (Coopazine-Coopers®), relaxante muscular, tricotomizado na região dorsal onde foi realizada a lesão.



Figura 6. Região tricotomizada para a realização da lesão por UV.

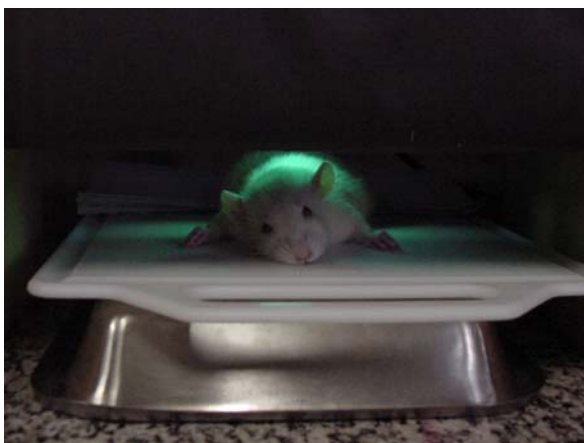


Figura 7. Exposição do animal à lâmpada de UV.

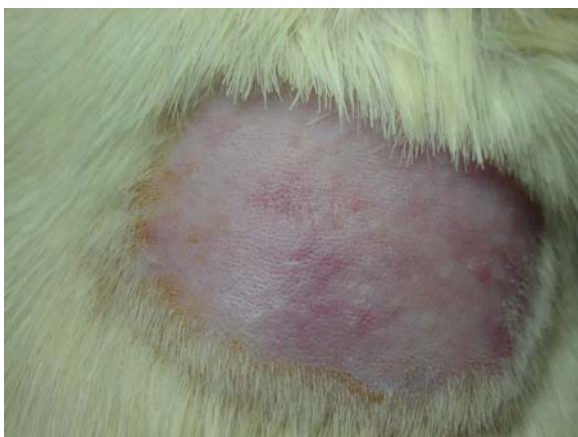


Figura 8. Aspecto da pele após a lesão por radiação UV.

4.4. Sistema de Diagnóstico:

O sistema de diagnóstico (Cluster LTD e Mettem-Proizvodstvo LTD, Moscou – Rússia) utilizado para avaliação da lesão muscular é composto por três lasers para excitação do tecido, sendo um proveniente de uma fonte de HeCd (hélio-cádmio) de 442nm, um de 532 nm de uma fonte de Nd:YAG (cristal de ítrio alumínio granado dopado com neodímio dobrado) e um de 632 nm fornecido por um laser de HeNe (hélio-neônio), um monocromador, um explorador óptico e um computador.

A luz proveniente do laser é conduzida até o tecido a ser investigado através de uma sonda de aplicação. Essa sonda é do tipo y com uma fibra central que conduz o laser de excitação e seis fibras periféricas que tem por função captar a fluorescência. A fibra central conduz a luz do laser até o tecido e as fibras periféricas conduzem a fluorescência do tecido investigado ao monocromador, que seleciona a faixa de frequência de interesse, acoplado a um computador que armazena os dados, computador este dotado de um software (LightView) que nos permite o processamento e armazenamento dos dados.



Figura 9. Foto do sistema de fluorescência.

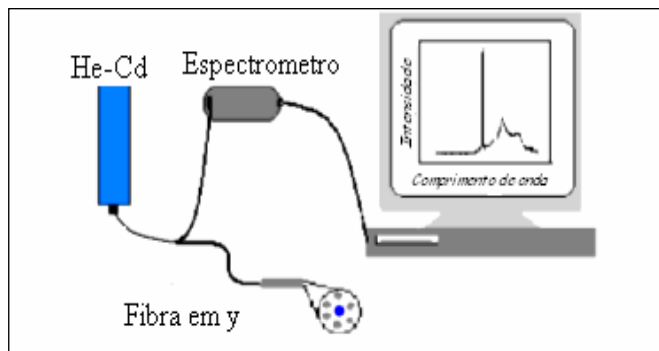


Figura 10. Desenho esquemático do sistema de fluorescência.

4.5. Coleta dos Dados

4.5.1. Experimento A: Coleta dos Dados Obtidos da Lesão Muscular

Para o diagnóstico da lesão muscular foi utilizado o LASER de HeCd de 442 nm. A leitura da fluorescência foi realizada pontualmente no tecido investigado, estas foram realizadas durante 21 dias consecutivos com intervalos de tempos variados de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Esquema de horários de medida da lesão.

<i>Dias após a indução da lesão</i>	<i>1º dia</i>	<i>2º dia</i>	<i>3º dia</i>	<i>4º -21º dia</i>
Intervalo entre as medidas	1 hora	3 horas	6 horas	12 horas

Os animais foram imobilizados manualmente para a realização das medidas, não necessitando de anestesia, tricotomizados a cada três dias, para que não houvesse interferência dos pêlos durante a medida.

As medidas foram feitas com a sonda perpendicular à área medida, em contato direto com a região lesada. As medidas foram efetuadas pontualmente varrendo toda a área.

A cada coleta de dados foram realizadas cinco leituras varrendo a região lesada, conforme mostrado na figura 11, que nos forneceram espectros da região de interesse. Estas leituras foram armazenadas no computador através do próprio sistema de diagnóstico para serem tratadas com o intuito de fornecer dados quantitativos dos resultados obtidos, após uma comparação com espectros característicos de tecidos normais.

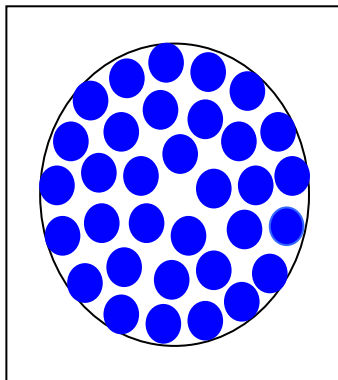


Figura 11. Desenho esquemático das medidas em varredura da lesão.

4.5.2. Experimento B: Coleta dos Dados Obtidos da Lesão por UV.

Para o diagnóstico das lesões por UV foi utilizado o LASER de HeCd de 442 nm. A leitura espectral foi realizada novamente de maneira pontual no tecido investigado, perpendicular a este. Os animais ficaram imobilizados manualmente para a medida, não necessitando de anestesia.

Cada ponto coletado produziu um espectro que foi arquivado no computador, através de leituras diárias realizadas durante 10 dias (240 horas) após a lesão. Os dados obtidos foram tratados e comparados ao espectro de um tecido normal para avaliação e conclusão do diagnóstico por fluorescência óptica.

4.6. Tratamento dos Dados Obtidos em ambos os experimentos:

Os dados dos espectros obtidos foram armazenados em um software (LightView), e transferidos para um editor gráfico. Os dados foram tratados efetuando a normalização pelo pico de excitação (442nm) dos espectros, esse procedimento nos permite uniformizar os espectros, procurando remover efeitos de distância ou angulação entre a ponta de prova e o tecido alvo.

A normalização consistiu na divisão de todos os pontos do espectro pelo pico de excitação. As médias dos espectros foram realizadas para minimizar os erros das possíveis variações do próprio tecido biológico, e as razões das intensidades dos picos obtidos foram efetuadas selecionando nos comprimentos de onda de interesse os picos de intensidade, para que pudéssemos melhor diferenciar e quantificar as diferenças entre os espectros do tecido lesado em comparação ao tecido normal, observando a melhor razão efetuada.

5. RESULTADOS

A partir dos dados fornecidos em cada leitura, buscamos obter os espectros característicos das lesões teciduais provocadas por impacto direto ao músculo sóleo do animal (lesão muscular) e por exposição excessiva a radiação UV (lesão de pele), buscando viabilizar o diagnóstico de tais lesões através desta nova tecnologia.

Para melhor entendermos a fluorescência, alguns conceitos devem ser expostos:

A fluorescência é a emissão de radiação resultante do decaimento de uma molécula dos estados excitados singletes S_1 e S_2 para o estado singlete fundamental S_0 , conforme apresentado no diagrama da figura 12. É chamado de estado singlete o estado eletrônico molecular nos quais todos os spins eletrônicos estão emparelhados. A excitação das moléculas em seu estado fundamental pode ser feita pela absorção da radiação centrada em um comprimento de onda específico. Resultando este processo de excitação na conversão da molécula em qualquer dos estados excitados vibracionais.

Uma molécula excitada pode voltar ao seu estado fundamental por uma combinação de várias etapas, duas dessas etapas, fluorescência e a fosforescência envolvem a emissão de um fóton de radiação, sendo as outras etapas processos não reativos.

A fluorescência e a fosforescência são similares, no entanto, a fluorescência difere da fosforescência pelo fato de que as transições eletrônicas responsáveis pela fluorescência não envolvem mudança de spin eletrônico, conseqüentemente apresentando um tempo de vida curto, sendo a trajetória favorecida para o estado fundamental aquela que minimiza o tempo de vida do estado excitado (WEST e HOLLER, 1997).

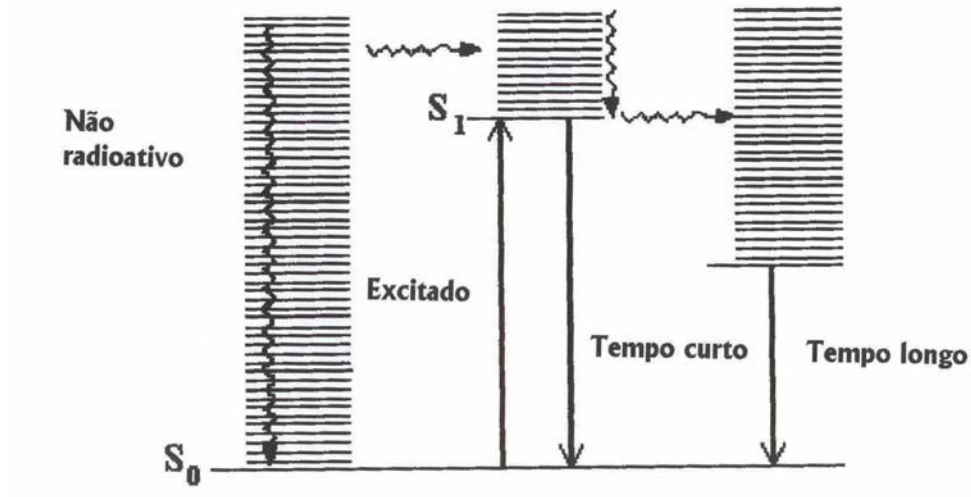


Figura 12. Diagrama de Jablonski – resumindo os processos de luminescência.

Fonte: MYCEC e POGUE (2003)

Ao observarmos o espectro característico de um tecido animal normal, (figura 13), verificamos dois picos peculiares. O primeiro deles, o pico estreito ocorre exatamente no mesmo comprimento de onda de excitação, sendo o espalhamento proveniente da reflexão do laser usado para excitar o tecido; denominado de retro-espalhamento e advém da reflexão e da difusão da luz que retorna neste comprimento de onda. Já a região espectral de fluorescência consiste na somatória da resposta que advém da contribuição de diversos fluoróforos presentes no tecido.

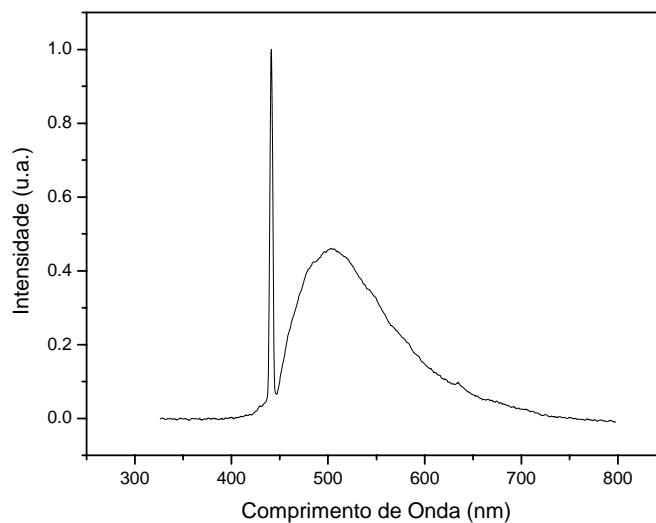


Figura 13. Espectro característico de um tecido animal normal.

5.1. Experimento A – Lesão por Impacto Direto ao Músculo Sóleo do Animal

Os resultados obtidos através da leitura de um tecido normal, figura 14, quando comparado ao espectro de um tecido lesado por impacto direto na musculatura do animal podem ser observados na figura 15, apresentando diferenças nos picos de fluorescência que caracterizam a lesão tecidual.

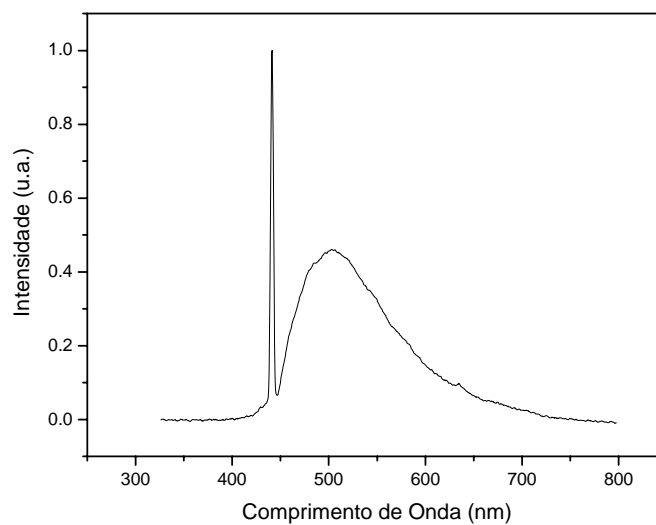


Figura 14. Espectro característico de um tecido animal normal.

Todos os espectros obtidos foram tratados, pois em cada ponto coletado da medida obtivemos um espectro, sendo efetuados cinco pontos de coleta em cada animal em diferentes horários de medida. Os espectros obtidos foram normalizados pelo pico de excitação, do qual uma parte é retro espalhada, sendo este o primeiro pico observado na figura 13 e 14, posicionado em 442 nm.

Os outros picos observados representam os picos de fluorescência característicos do tecido analisado, o primeiro deles na região do 635 nm e o segundo na região do 675 nm, os quais nos fornecem informações de que alterações bioquímicas presentes no tecido lesado foram detectadas.

A presença dos picos de fluorescência na região do 635 nm e 675 nm, ocorrem em todos os tecidos lesados avaliados, no entanto a intensidade e o comportamento durante a evolução do processo de regeneração tecidual foram distintos.

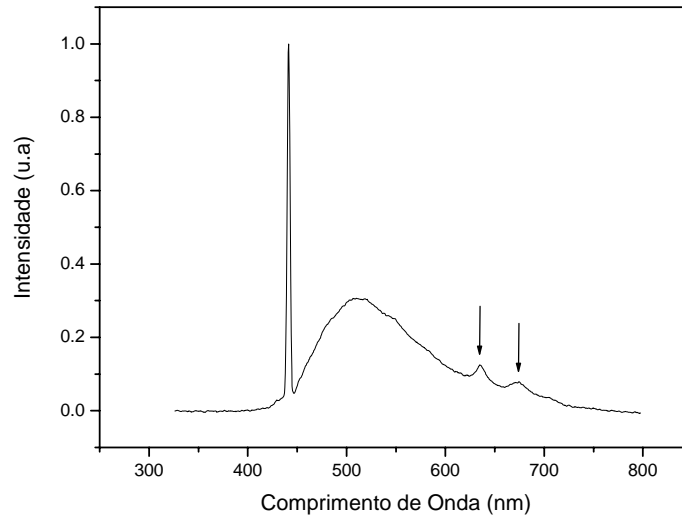


Figura 15. Espectro característico de um tecido lesado por impacto direto ao músculo sóleo.

A figura 16 apresenta a diferença entre os espectros do tecido lesado e normal, evidenciando os novos picos característicos da lesão no intervalo de comprimento de onda de interesse. O procedimento para obtenção dos resultados apresentados na figura 16 foi realizado através da subtração do espectro do tecido normal do tecido lesado.

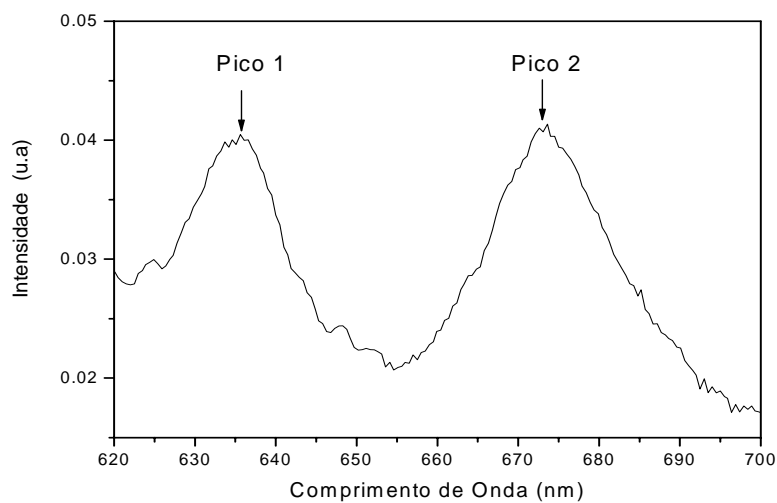


Figura 16. Picos característicos da lesão tecidual.

5.1.1. Evolução Temporal dos Espectros Obtidos

Em todos os animais avaliados foram observadas alterações de intensidade dos picos de fluorescência (figura 17) que ocorreram durante os diferentes horários de medida. Para podermos analisar estas diferenças de intensidade dos picos característicos da lesão muscular, realizamos uma média dos espectros obtidos em cada horário para os cinco animais avaliados.

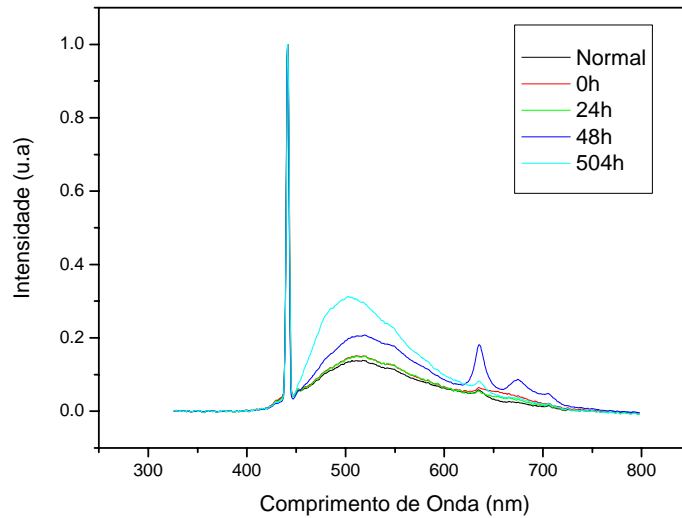


Figura 17. Espectros da evolução temporal do animal submetido à lesão do músculo sóleo.

A figura 18 apresenta o espectro das médias obtidas dos cinco animais avaliados, 48 horas após a lesão, onde podemos observar claramente o primeiro pico de fluorescência na faixa de 635 nm e o segundo pico na faixa de 675 nm, característicos do tecido lesado e cuja amplitude é dependente do tempo após a lesão.

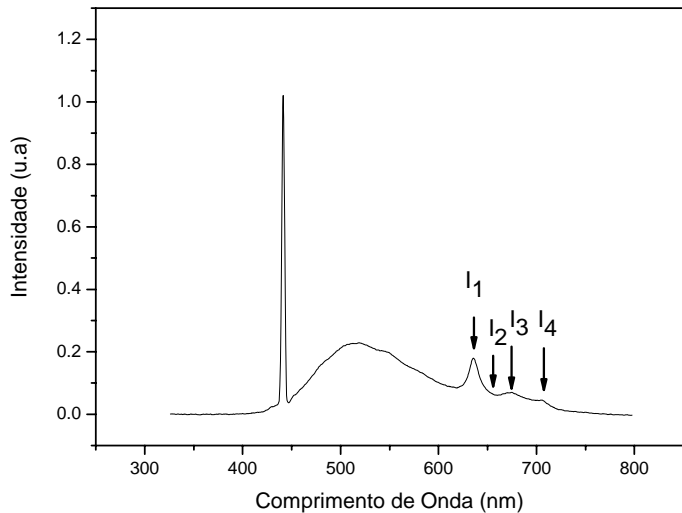


Figura 18. Espectro das médias dos animais avaliados 48 horas após a lesão.

Após estes procedimentos objetivamos quantificar as alterações espectrais encontradas. Para isso, definimos alguns intervalos de comprimento de onda de interesse, e efetuamos as razões das intensidades dos picos nestes intervalos. Para efetuarmos este procedimento foram selecionados os seguintes comprimentos de onda:

- 635nm (intensidade do pico 1 no comprimento de onda de 635nm - I_1);
- 657nm (intensidade do pico 2 no comprimento de onda de 657nm - I_2);
- 675nm (intensidade do pico 3 no comprimento de onda de 675nm - I_3) e
- 705nm (intensidade do pico 4 no comprimento de onda de 705nm - I_4).

Para realizarmos as razões:

$$r_1 = I_1 / I_3$$

$$r_2 = I_3 / I_2$$

$$r_3 = I_4 / I_2$$

As razões foram efetuadas com o objetivo de quantificar a intensidade dos picos de fluorescência durante o processo de estabelecimento e recuperação da lesão.

Utilizamos para isso diversas razões buscando observar qual a mais sensível para evidenciarmos essa evolução.

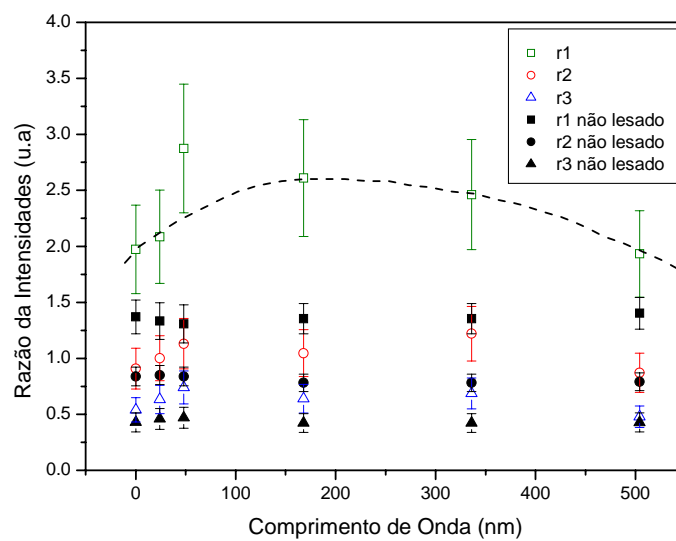


Figura 19. Relação de picos em diferentes horários após a lesão.

5.2 Experimento B – Lesão por UV

O espectro mostrado a seguir apresenta a intensidade de luz em função do comprimento de onda utilizado para a excitação do tecido. A figura 20 corresponde ao espectro característico do tecido normal, onde podemos observar o pico de retro espalhamento e a fluorescência do tecido investigado.

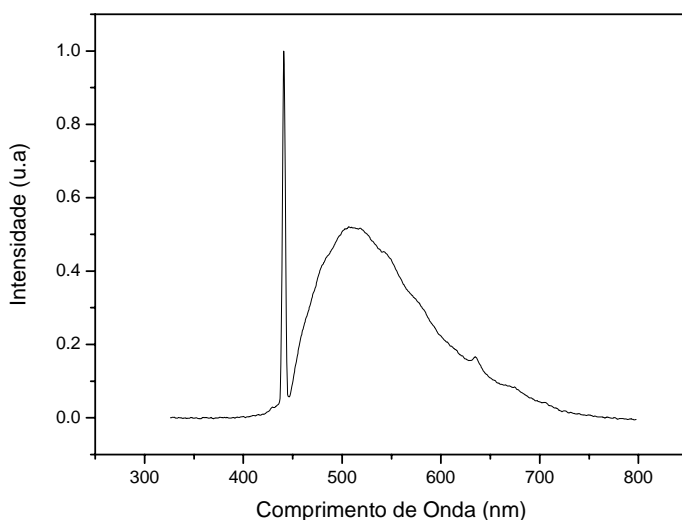


Figura 20. Espectro característico do tecido normal.

Quando comparamos o espectro de fluorescência característico da leitura de um tecido lesado (figura 21) por exposição à radiação UV ao espectro do tecido normal (figura 20) podemos observar alterações significativas entre os espectros, não apenas pelos picos característicos do tecido lesado ao redor dos 635 nm e 675 nm, como também pela observação da inversão do pico de retro espalhamento quando comparado ao tecido normal, que pode ser justificado pelas alterações na pigmentação do tecido exposto à radiação UV, onde observamos alterações da camada superficial da pele (figura 23) quando comparada a figura 22.

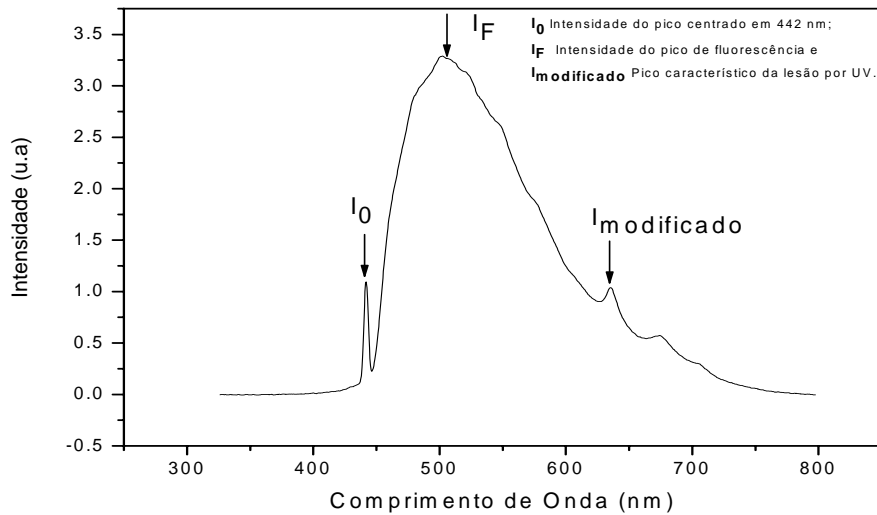


Figura 21. Espectro de fluorescência característico da leitura de um tecido lesado por radiação UV.



Figura 22. Foto do tecido do animal normal.



Figura 23. Foto do tecido do animal lesado.

As setas inseridas na figura 21 assinalam bandas características deste espectro após 24 horas da lesão, onde nomeamos de I_0 o pico centrado em 442 nm, sendo o pico de retro espalhamento, I_F localizado na região do 502 nm como pico de fluorescência e $I_{\text{modificado}}$ localizado na região do 635 nm sendo o pico característico da lesão por UV, evidenciados para podermos melhor acompanhá-los no decorrer do processo de estabelecimento e recuperação da lesão.

Os espectros obtidos em cada leitura foram adquiridos efetuando cinco medidas em pontos distintos da lesão, portanto cada leitura forneceu cinco espectros similares, onde foi efetuada uma média destes espectros coletados para obtermos uma melhor aproximação dos espectros característicos dos dados coletados.

No entanto, outras observações foram realizadas durante as 240 horas de experimento, verificando variações na intensidade dos espectros medidos (figura 24).

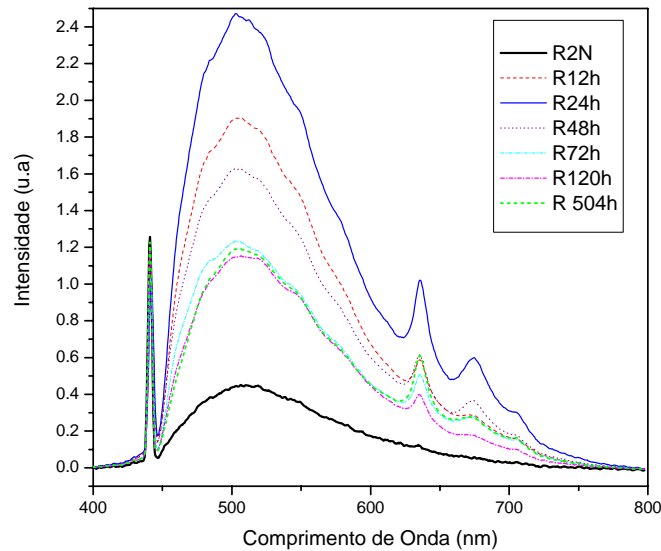


Figura 24. Espectro da variação da intensidade da fluorescência durante as 240 horas de medida que precedem o estabelecimento da lesão por UV.

As variações observadas no espectro de fluorescência apresentam um padrão crescente nas primeiras 48 horas da lesão, decaindo em seguida, sugerindo um padrão de comportamento da lesão por UV.

Observando este comportamento, os valores da intensidade de $I_{\text{modificado}}$ foram modelados realizando um ajuste da curva através de duas funções exponenciais. Nas primeiras 48 horas da lesão observamos um padrão crescente, onde utilizamos uma função exponencial.

Função exponencial crescente dada por:

$$I_{\text{modificado}} = I_0 + A \cdot (1 - e^{-t/\tau}) \quad (1)$$

Onde:

I_0 : valor inicial

A: variação máxima do pico

t/τ : tempo característico da variação da intensidade

Esta escolha foi feita devido ao fato de que as alterações ocorridas não progredirem indefinidamente, devendo estacionar durante o processo de recuperação da lesão.

Após 48 horas da lesão este comportamento apresentou alterações importantes, adotando um comportamento de decaimento. Para este comportamento adotamos uma função exponencial de decaimento, cuja escolha baseou-se no fato de que ocorra a recuperação da lesão com o passar do tempo.

A Função exponencial de decaimento é dada por:

$$I_{\text{modificado}} = I_f + A \cdot e^{-(x-t/\tau)} \quad (2)$$

Onde:

I_f : valor final

A: variação máxima do pico

t/τ : tempo característico da variação da intensidade

As figuras 25 e 26 apresentam a intensidade da fluorescência em função do tempo de medida utilizando um ajuste para dois animais do mesmo grupo, pois todos os animais lesados apresentaram comportamentos espectrais semelhantes.

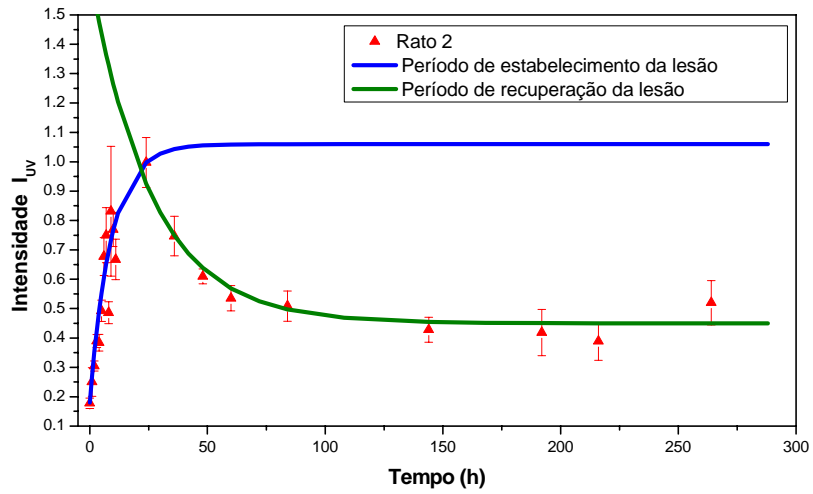


Figura 25. Ajuste do período de estabelecimento e recuperação da lesão.

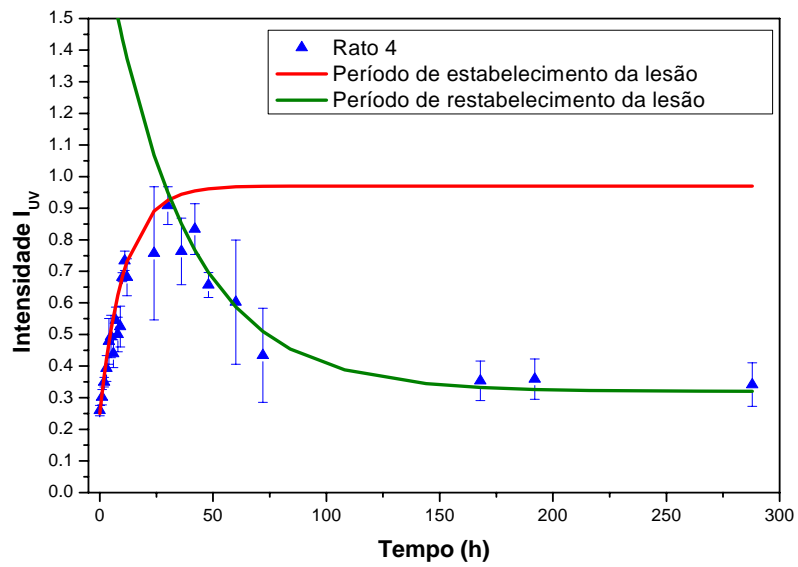


Figura 26. Ajuste do período de estabelecimento e recuperação da lesão.

O uso do ajuste de uma função exponencial foi apropriado para definir o tempo característico, tanto para o estabelecimento da lesão quanto para a sua recuperação.

Para melhor visualizarmos este comportamento de variação das intensidades dos picos encontrados durante o estabelecimento e recuperação da lesão, efetuamos uma média da razão (r_{uv}) (figura 27) efetuada entre a intensidade do pico de fluorescência (I_F), pela intensidade do pico de retro espalhamento (I_0) (figura 21). Observando nas primeiras 24 horas da lesão um aumento na intensidade do pico de fluorescência e após esse período uma diminuição e estabelecimento dessa intensidade, comportamento característico de um processo inflamatório, onde nas primeiras horas da lesão observamos intensa alteração tecidual, seguida de diminuição dessa alteração, durante a fase de recuperação do processo.

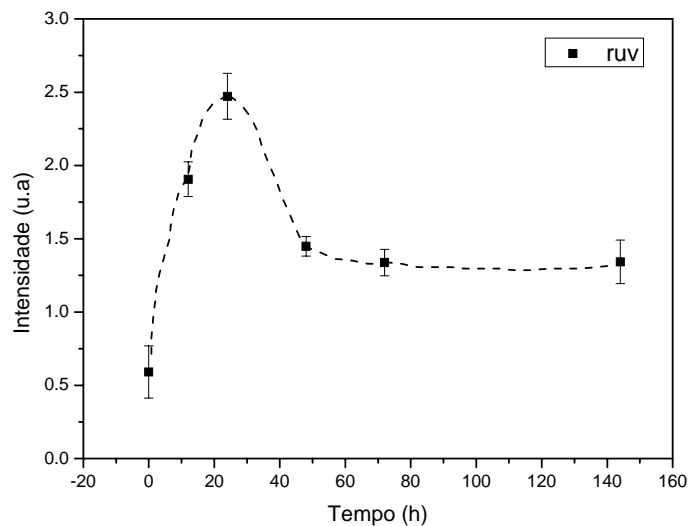


Figura 27. Comportamento da r_{uv} dos picos de fluorescência em função dos tempos de medida.

Finalizando nossas análises, apresentamos na figura 28 o comportamento da variação da intensidade do pico característico da lesão $I_{\text{modificado}}$ (figura 21) em função do tempo em todos os animais avaliados, utilizando os dados dos espectros obtidos 24 horas após a lesão. Os espectros escolhidos, obtidos 24 horas após a lesão foram selecionados devido ao pico característico da lesão por UV apresentar maior intensidade neste horário de medida, objetivando mostrar a reprodutividade do comportamento espectral obtido de cada animal avaliado.

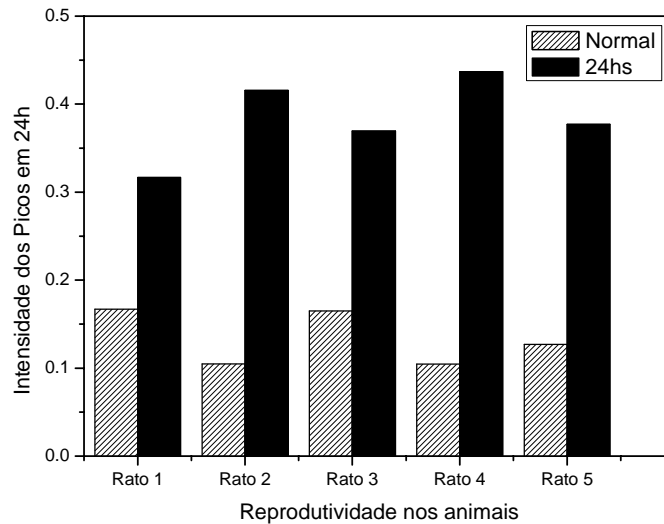


Figura 28. Intensidade dos picos de fluorescência nos animais avaliados.

Com os resultados obtidos neste trabalho podemos observar que em ambos os experimentos realizados o Diagnóstico por Fluorescência Óptica mostrou-se válido e sensível às alterações encontradas entre o tecido lesado e o tecido normal quando excitados em 442 nm. Podendo constatar a partir deste estudo que:

- Os picos observados na faixa de 635 nm e 675 nm caracterizam as lesões teciduais avaliadas.
- A evolução da intensidade dos picos durante o processo de estabelecimento e recuperação da lesão podem ser acompanhados utilizando essa técnica, possibilitando correlacionar os níveis de lesão através da evolução da intensidade dos picos de fluorescência.

6. DISCUSSÃO

Através dos procedimentos realizados para avaliação dos dados obtidos, observamos além do surgimento de novos picos de fluorescência nos espectros analisados, variações das intensidades dos mesmos nos diferentes tempos após a realização da lesão, permitindo nos um acompanhamento destas lesões.

Quando analisamos o comportamento da variação dos picos no tecido normal verificamos que não ocorrem alterações na intensidade dos picos durante os diferentes horários de medida, ou seja, o tecido não apresentou alterações bioquímicas, a não ser pequenas flutuações, que podem ser apenas pequenas diferenças do tecido biológico em questão, no entanto, no tecido lesado essas alterações apresentaram um aumento de intensidade, que pode ser observado logo após a lesão, com o aumento significativo da amplitude do pico de fluorescência, nas primeiras 48 horas com maior intensidade na lesão muscular e nas primeiras 24 horas do processo inflamatório na lesão por UV, crescendo gradativamente durante as primeiras 24 horas no experimento B (figura 25) e durante as primeiras 48 horas no experimento A (figura 17), após estes períodos diminuindo gradualmente, até o momento em que se observou uma intensidade relativamente igual a do tecido normal, em ambos os experimentos.

Este comportamento, embora visto em todas as razões estabelecidas, foi melhor visualizado quando efetuamos a razão r_1 (figura 19), onde verificamos um período de estabelecimento da lesão e um período de recuperação após 48 horas e na r_{UV} (figura 27), onde verificamos um período de estabelecimento nas primeiras 24 horas da lesão e em seguida um período de recuperação.

Esta evolução vista através da Biópsia Óptica, também pode ser observada em estudos histológicos quando avaliamos o tecido muscular, onde segundo Carlson e Faulkner (1983), logo nas primeiras 24 horas após a lesão a necrose isquêmica já encontra se instalada, e posteriormente um período de intensa ativação de células satélites e fibroblastos principalmente entre 24 e 48 horas após a lesão pode ser observado.

Segundo os estudos de Fisher (1990), o restabelecimento de uma lesão muscular pode ser visto inicialmente a partir de 48 horas, mantendo o período de regeneração do tecido até aproximadamente 21 dias da lesão, ou seja, 504 horas da lesão, onde em nosso experimento observamos um declínio na intensidade dos picos, caracterizando um período de restabelecimento quase completo da lesão. Achados histológicos de Allbrook (1962) e Crisco (1994), confirmam este comportamento, observando esta evolução nos mesmos períodos descritos anteriormente.

Em ambos os experimentos realizados, o comportamento destes espectros sugeriu a contribuição de fluoróforos que atuam no processo inflamatório, como o sangue, no período inicial da lesão e o colágeno e elastina na fase de reparação do tecido.

A presença e a quantidade dos compostos fluorescentes endógenos variam em função da atividade metabólica dos tecidos. Os principais compostos relacionados à fluorescência dos tecidos biológicos são o colágeno, a elastina, o NADH, o FAD, o triptofano e as porfirinas. Alguns absorvedores, como as proteínas e hemoglobina também afetam o espectro de fluorescência, uma vez que a fluorescência emitida pode ser reabsorvida por essas biomoléculas. Isso pode ser constatado em algumas regiões do espectro onde se formam vales ou depressões. A fluorescência analisada do tecido é resultado da somatória da emissão dos diversos componentes fluorescentes e dos fenômenos de espalhamento e absorção.

Observando o comportamento dos espectros em ambos os experimentos, podemos acompanhar o processo inflamatório relacionando a presença de fluoróforos durante o processo de estabelecimento e recuperação da lesão. Verificando um comportamento crescente da intensidade dos picos de fluorescência nas primeiras 24 horas após a lesão, possivelmente devido a presença de neutrófilos, células predominantes no processo inflamatório (CARLSON E FAULKNER, 1983).

Após 24 horas observamos um comportamento de decaimento dessas intensidades analisadas, o que sugere um processo de regeneração da lesão, onde a cura por completo dependerá da capacidade de regeneração das células lesadas. As células epiteliais estratificadas da pele são células que estão continuamente se proliferando, portanto se regeneram mais facilmente. Este fato explica o comportamento da

intensidade dos espectros dos tecidos observados na lesão muscular e o comportamento da curva de decaimento vista na lesão por UV.

Atentando para os fluoróforos citados, podemos justificar a fase inicial do processo inflamatório e o aumento da intensidade dos picos característicos da lesão pelo extravasamento de sangue, característico do exsudado inflamatório nas fases iniciais da lesão, com pico característico de fluorescência na faixa dos 610 nm quando excitado em 442 nm, absorvido durante a evolução do processo de recuperação da lesão (WAGNIERES, 1998).

Já na fase de recuperação da lesão, temos a presença de proteínas estruturais como o colágeno com pico característico de fluorescência na região dos 605 nm, quando excitado em 442nm.

Esta correlação entre o processo inflamatório e os fluoróforos presentes fundamenta melhor nossos estudos, no entanto, o número de fluoróforos caracterizados com picos de fluorescência determinados na literatura ainda é restrito, quando relacionamos aos fluoróforos presentes no processo inflamatório. Ademais, para otimização dos estudos realizados há necessidade de considerarmos algumas características importantes para interpretação dos resultados obtidos como:

- diferenças entre o espectro de excitação e emissão para cada fluoróforo observado e
- contribuição de vários fluoróforos com diferentes concentrações em cada tecido estudado, que variam de acordo com a arquitetura do tecido.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra a viabilidade da inserção do uso dessa nova técnica de Diagnóstico Óptico como uma inovadora e viável ferramenta de diagnóstico clínico de estados patológicos em início de desenvolvimento, possibilitando estudos da autofluorescência dos mais diferentes tipos de tecidos, estabelecendo relação entre a patologia estudada e o espectro observado.

No entanto, o aperfeiçoamento da técnica utilizada com os animais apresenta necessidade de maiores estudos, no sentido de melhor caracterizarmos os fluoróforos específicos presentes em cada fase do processo inflamatório e através da comparação com estudos histológicos acompanharmos a evolução do processo de estabelecimento e recuperação da lesão com o objetivo de enriquecer os resultados obtidos.

Concluindo portanto que este trabalho alcançou o objetivo proposto, mostrando a sensibilidade da técnica na diferenciação dos tecidos, propiciando um grande estímulo a novas pesquisas que permitirão avaliar a extensão e o grau das lesões teciduais e desenvolvimento de estudos clínicos visando à implementação dessa nova tecnologia conjuntamente com outras técnicas de diagnóstico, otimizando o diagnóstico dos mais diversos tipos de lesão tecidual, em especial as alterações relacionadas ao desenvolvimento do câncer de pele.

8. REFERÊNCIAS

ANDERSON, R.R. (1989). In vivo fluorescence of human skin. **Archives Dermatology**, n.125, p. 999-1002.

ALFANO, R.R.; PRADHAN, A.; TANG, G.C. (1989). Optical spectroscopy diagnosis of cancer and normal breast tissue. **Journal Optical Society of America**, v.6, n.5, p.1015-1023.

ALLBROOK, D. (1962). An electron microscopic study of regenerating skeletal muscle. **Journal anatomy**, London, n.96, p. 137-152.

BADIZADEGAN, K. et al. (2004). Spectroscopy diagnosis and imaging invisible pre-cancer. **Faraday Discussions**, Cambridge, v.126, p.265-279.

BEST, M.T.; HUNTER, K.D. (2000). Muscle injury and repair. **Scientific Principles of Sports Rehabilitation**, v.11, n.2, p.251-267.

BODINE-FOWLER, S. (1994). Skeletal muscle regeneration after injury: overview. **Journal of Voice**, Saint Louis, v.8, n.1, p.53-62.

CAPELLA, M.A.M. (2005). **Efeitos biológicos da radiação solar.**

Disponível em: <<http://hps.infolink.com.br/uvsolar/>>. Acesso em: 2 Jan .

CARLSON, M.B.; FAULKNER, J.A. (1983). The regeneration of muscle fibers following injury: a review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v.15, n.3, p.187-198.

CHEONG, W.F. et al. (1990). A review of the optical properties of biological tissues. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, New York, v.26, n.12, p.2166-2185.

CHIASSON, R.B. (1994). **Laboratory anatomy of white rat.** 5thed. Dubuque: W.C.Brown.

COOKE, M.S. et al. (2003). Immunochemical detection of UV-induced DNA damage and repair. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.280, n.1/2, p.125-133, Sept.

CRISCO, J. et al. (1994). A muscle contusion injury model. **The American Journal of Sports Medicine**, Columbus, v.22, n.5, p.702-710, Sept.

DaCOSTA, R.S. et al. (2003). Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.78, n.4, p.384-392.

DELISA, J.A. (2001a). **Medicina de reabilitação**: princípios e prática. 2.ed. São Paulo: Manole. p.969-985.

_____. (2001b). **Tratado de medicina de reabilitação**: princípios e prática. 3.ed. São Paulo: Manole.

DERGHAN, M. et al. (2004). Câncer de pele. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.79, n.5, p.555-559.

DIFFEY, B.L. (1991). Solar ultraviolet radiation effects of biological systems. **Physics in Medicine and Biology**, Bristol, v.36, n.3, p.299-328, Mar.

DYER, J.R. (1965). **Aplicação da espectroscopia de absorção dos compostos orgânicos**. São Paulo: Edgard Blucher.

EITNER, D. et al. (1984a). **Fisioterapia nos esportes**. São Paulo: Manole. p.2-5; 202-212.

_____. (1989). _____. São Paulo: Manole.

FISHER, B.D. et al. (1990). Ultrastructural events following acute muscle trauma. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v.22, n.2, p.185-193.

FITZPATRICK, F.B. et al. (2002). **Dermatologia** – atlas e textos. 4.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill.

FUSARO, R.M. (2000). Public health preventive behavior and ultraviolet exposure. **Dermatologic Surgery**, Hamilton, v.26, n.11, p.991-993, Nov.

GASPARI, A.A.; SAUDER, D.N. (2003). Immunotherapy of basal cell carcinoma: evolving approaches. **Dermatologic Surgery**, Hamilton, v.29, n.10, p.1027-1034, Oct.

GILLIES, R. et al. (2000). Fluorescence excitation spectroscopy provides information about human skin in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v.115, n.4, p.704-707, Oct.

GONÇALVES, A.L. (2003). **Aspectos histológicos da reparação tecidual em ratos wistar submetidos à atividade física moderada**. 73p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biciências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

GOTTLIEB, O.R. (1968). **Introdução à espectrometria de massa das substâncias orgânicas**. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

GOULD III, J.A. (Ed.). (1993). **Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte**. Tradução de Alfredo Jorge Cherem. 2.ed. São Paulo: Manole.

GRANSTEIN, R.D.; MATSUI, M.S. (2004). UV radiation-induced immunosuppression and skin cancer. **Cutis**, New Jersey, v.74, suppl.5, p.4-9, Nov.

GRAY, J. (1997). *The world of skin care*. Cincinnati: P&G Beauty Science. Cap.4, p.72. Disponível

em:<http://www.pg.com/science/skincare/Skin_tws_punchline_1.htm>. Acesso em: 16 Nov. 2005.

GROUNDS, M.D. (1991). Towards understanding skeletal muscle regeneration.

Pathology, Research and Practice, Stuttgart, v.187, p.1-22.

GRUIJL, F.R. et al. (2001). UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**, Lausanne, v.63, n.1/3, p.19-27, Oct.

ITAI, Y.; KARIYA, Y.; HOSHIO, Y. (2004). Morphological changes in rat hindlimb muscle fibers during recovery from disuse atrophy. **Acta Physiologica Scandinavica**, Oxford, v.181, n.2, p.217-224, June.

JARVINEN, M. (1976). Healing of a crush injury in rat striated muscle. **Acta Chirurgica Scandinavica**, Stockolm, v.142, p.47-56.

KNEELAND, J.B. (1997). MR imaging of muscle and tendon injury. **European Journal of Radiology**, Amsterdam, v.25, n.3, p.199-208, Nov.

LEE, E.H. et al. (2004). Dietary lutein reduces ultraviolet radiation-induced inflammation and immunosuppression. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v.122, n.2, p.510-517, Feb.

LEFAUCHEUR, P.J.; SÉBILLE, A. (1995). The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. **Neuromuscular Disorders**, Oxford, v.5, n.6, p.501-509.

LOSCHENOV, V.B. et al. (2000). Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics. **Laser Physics**, Birmingham, v.10, n.6, p.1188-1207.

LOVE, R. (1999). **Manual de oncologia clínica**. 6.ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo.

MALM, C. (2001). Exercise-induced muscle damage and inflammation: factor fiction. **Acta Physiologica Scandinavica**, Oxford, v.171, n.3, p.233-239, Mar.

MANNICK, J.A. et al. (2001). The immunologic response to injury. **Journal of the American College of Surgeons**, Chicago, v.193, n.3, p.237-244, Sept.

MARTINS, J.E.C. (1987). Fotodermatoses. In: BARROS, O.L. **Atualização terapêutica**. São Paulo: Artes Médicas. p.641-642.

_____. (1991). Importância das radiações solares na frequência do melanoma. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.66, n.5a, p.25-26.

MCARDLE, A. (1998). Free radical activity following contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.26, n.9/10, p.1085-1091, May.

MEIRONG, L. et al. (1997). Study of diagnosis criteria for pathological tissues by laser-induced fluorescence. **Applied Spectroscopy**, v.51, n.8, p. 1113-1117.

MINAMOTO, V.B. (1997). **Um modelo de contusão no músculo soleus de rato: lesão e regeneração após trauma recorrente único e recorrente**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1997.

MOOLER, J.S. et al. (2004). Skin autofluorescence as a biological UVR dosimeter. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, Copenhagen, v.20, n.1, p.33-40, Feb.

MYCEC, M.A.; POGUE, B.W. (2003). *Handbook of biomedical fluorescence*. New York: Marcel Dekker.

NARICI, M. (1999). Human skeletal muscle architecture studied in vivo by non-invasive imaging techniques functional significance and applications. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, Amsterdam,. v.9, n.2, p.97-103, Apr.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (2005). Disponível em:<www.hci.hih.gov/cancer_types/melanoma.shtml>. Acesso em: 20 Jan.

NAYLOR, M.F.; FARMER, K.C. (2005). **Sun damage and prevention**. Disponível em:<<http://www.telemedicine.org/sundam2.4.1.html>>. Acesso em: 10 Jan.

NGHIEM, D.X. et al. (2002). Mechanisms underlying the supression of established immune responses by ultraviolet radiation. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v.119, n.3, p.600-608, Sept.

NIRMALA, R. (2000). Fluorescence spectroscopy in vivo. In: MEYERS, R.A. (Ed.). **Encyclopedia of analytical chemistry**. Chichester: John Wiley. p.20-56.

NOSAKA, K.; CLARKSON, P.M. (1994). Muscle damage following repeated bouts a high force eccentric exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v.27, n.9, p.1263-1269.

PALMER, G.M. et al. (2002). Optical methods for fluorescence and diffuse reflectance measurements of tissue biopsy samples. **Lasers in Surgery and Medicine**, Hoboken, v.30, n.3, p.191-200, Mar.

PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v.27, n.1, p.17-34, Feb.

RAMANUJAM, N. et al. (1996). Spectroscopy diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia in vivo using laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths. **Laser in Surgery and Medicine**, v.19, p.63-74.

RANTANEN, J. et al. (1999). Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle. **American Journal of Sports Medicine**, Columbus, v.27, n.1, p.54-59, Jan./Feb.

RASSNER, G. et al. (1991). **Dermatologia** – atlas. 3.ed. São Paulo: Santos.

ROBERTS, S.C. et al. (2002). Review article diagnostic ultrasonography: applications in orthopedic surgery. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, n.401, p. 248-264, Aug.

SALTER, R.B. (1985). **Distúrbios e lesões do sistema músculo esquelético**. 2.ed.

Rio de Janeiro: Medsi. p.332-333; 396-397.

SCHMORANZER, H. et al. (2001). Photon-induced fluorescence spectroscopy (PIFS).

Nuclear Instruments and Methods in Physics Research – A, Amsterdam, v.467/468, pt.2, p.1526-1528, July.

SILVEIRA JR, L. (1996). **Projeto de desenvolvimento de um espectrofluorímetro e**

obtenção de matrizes de excitação/emissão: diagnóstico de displasias do trato

gastrointestinal. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 1996.

SILVERTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORVILL, T.C. (1979). **Identificação**

espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: Guanabara.

SKOOG, D.A.; HOLLER, R.J.; NIEMAN, T.A. (2002). **Princípios de análise**

instrumental. 5.ed. Porto Alegre: Bookman. p.322-341.

TAYLOR, S.C. (2002). Skin of color: biology, structure, function, and implication for dermatologic diseases. **Journal American Academy Dermatologic**, v.46, p.41-62.

THOMSEN, S.; TATMAN, D. (1998). Physiological and pathological factors of human breast disease that can influence optical diagnosis. **Annals New York Academy of Science**, v.838, n.9, p.171-193.

TIAN, W.D. et al. (2001). Aging and effects of ultraviolet an exposure may be quantified by fluorescence excitation spectroscopy in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v.116, n.6, p.840-845, June.

TIDBALL, J.G. (1995). Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v.27, n.7, p.1022-1032.

TRAUTINGER, F. (2001). Mechanisms of photodamage of skin and its functional consequences for skin ageing. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v.26, n.7, p.573-577, Oct.

TRICOLI, V. (2001). Mecanismos envolvidos na etiologia da dor muscular tardia. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, São Caetano do Sul, v.9, n.2, p.39-44.

URBACH, F. (1997). Ultraviolet radiation and skin cancer of humans. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**, Lausanne, v.40, n.1, p.3-7, Aug.

WAGNIÉRES, G.A. et al. (1998). In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.68, n.5, p.603-632.

WARDEN, S.J. (2003). A new direction for ultrasound therapy in sports medicine. **Sports Medicine**, Auckland, v.33, n.2, p.95-107.

WEST, M.; HOLLER, F.J. (1997). Molecular fluorescence spectroscopy. In: SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. **Fundamentals of analytical chemistry**. 7thed. Fort Worth: Saunders College. p.601-610.

WINTER, S. et al. (2001). Solar-simulated skin adaptation and its effect on subsequent UV-induced epidermal DNA damage. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v.117, n.3, p.678-682, Sept.

ZACHARIAS, D.P.M. (1994). **Câncer de pele**. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo.

ZECHIN, M.A V. (2003). **Estudo experimental do efeito do ultra-som modo contínuo, sobre o processo de regeneração do tecido conjuntivo e tecido muscular esquelético, em ratos wistar**. 90P. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

ZENG, H. et al. (1995). Spectroscopic and microscopic characteristics of human skin autofluorescence emission. **Photochemistry and Photobiology**, v.61, p. 639-645.

ZULUAGA, A.F. et al. (1999). Fluorescence excitation emission matrices of human tissue: a system for in vivo measurement and method data analysis. **Applied Spectroscopy**, Bound Brook, v.53, n.3, p.303-311, Mar.