



Universidade de São Paulo

Biblioteca Digital da Produção Intelectual - BDPI

Departamento de Física e Ciências Materiais - IFSC/FCM

Artigos e Materiais de Revistas Científicas - IFSC/FCM

2010

Desenvolvimento e aplicação de equipamento para diagnóstico por fluorescência

Jornal Brasileiro de Laser, São Paulo : Sociedade Brasileira de Laser em Medicina e Cirurgia, v. 2, n. 14, p. 8-12, 2010
<http://www.producao.usp.br/handle/BDPI/49801>

Downloaded from: Biblioteca Digital da Produção Intelectual - BDPI, Universidade de São Paulo

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE EQUIPAMENTO PARA DIAGNÓSTICO POR FLUORESCÊNCIA

Development and Application of a Homemade Device for Fluorescence Diagnosis

- ¹ Mestre da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
² Doutora do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.
³ Professora Dra. do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.
⁴ Professor Titular do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Mardoqueu Martins da Costa¹
Cíntia Teles de Andrade²
Natalia Mayumi Inada²
Liliane Ventura²
Cristina Kurachi³
Vanderlei Salvador Bagnato⁴

Resumo

A mortalidade e morbidade devido a vários tipos de câncer podem ser reduzidas através de uma identificação precoce de células anormais. O Brasil é um país com grande dimensão e está localizado próximo da Linha do Equador, onde a incidência solar é extrema. Como resultado, a população apresenta um alto índice de câncer de pele, o principal tipo na população brasileira e que acometerá, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, Brasil), cerca de 113.850 novos casos do câncer do tipo não-melanoma e cerca de 5.930 de casos do tipo melanoma, no ano de 2010. Diante deste grande número de casos de câncer, algumas medidas devem ser tomadas para redução destes números, tais como: ações preventivas e educacionais, divulgação dos males causados pelo consumo de tabaco, álcool e pela exposição excessiva ao sol e ainda, é necessário investimentos na área de pesquisa para uma detecção mais precoce do câncer, favorecendo a um tratamento mais efetivo. A fluorescência por imagem é uma técnica que apresenta o potencial de aumentar o poder de discriminação de tecidos, podendo constituir uma importante ferramenta de detecção de lesões como câncer bucal e de pele. Ao contrário da espectroscopia, que fornece uma análise pontual, as técnicas por imagem podem contribuir para a detecção de lesões ocultas e para o delineamento das margens de lesões. Neste trabalho evidenciamos o desenvolvimento e aplicação de um sistema de fluorescência composto por iluminação à base de LEDs de alta intensidade, com uma banda de emissão entre 400-460 nm para excitação da protoporfirina IX (PpIX), e filtros para visualização da fluorescência da PpIX na região do vermelho do espectro.

Descritores: Fluorescência, Câncer de pele, Diagnóstico

Abstract

The mortality and morbidity of many cancer diseases could be reduced with an early identification of the abnormal cells. Skin cancer is the most common cancer type in Brazil. Malignant skin tumors are divided in two large groups: melanoma and non-melanoma. The National Cancer Institute in Brazil (INCA) has estimated 113,850 new cases of non-melanoma skin cancer (basal cell carcinoma and spinocellular carcinoma) as well as 5,930 of melanoma for 2010. The clinical procedure commonly used to identify the cells abnormality is invasive and in a case of an extensive lesion, is impossible to separate the region used for biopsy and the lesion itself, then the first option of treatment is the surgical excision. In this work was presented the development and application of a fluorescence system which is composed by a high intensity LED light source, with emission band between 400-460 nm, that allows for PpIX excitation, and filters that permit to observe PpIX red fluorescence emission. For fluorescence diagnosis application, 5-aminolevulinic acid solution (15%; wt/v) was used. It was topically placed onto the lesions and PpIX fluorescence production analyzed during a total of 4-6 hours post application. Applying the visual fluorescence monitoring system here is presented; it was possible to monitor PpIX generation and to study a relative new modality as a noninvasive fluorescence diagnosis technique.

Descriptors: Fluorescence imaging, Skin cancer, Diagnoses

Artigo recebido em 2/3/10 e aceito, após revisão, em 28/5/10

Endereço:

Cristina Kurashi. Av. Trabalhador São Carlense, 400 - CEP: 13566-590 - CP. 369 - São Carlos - SP. E-mail: mardoqueu.costa@usp.br

INTRODUÇÃO

O câncer é geralmente definido como um crescimento irregular e desordenado das células que têm o seu material genético modificado e que podem sofrer mutações desencadeadas por processos externos como substâncias químicas, tabagismo e radiação².

Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) o câncer é um dos principais fatores que levam a população mundial a óbito e que provocou a morte de 7,4 milhões de indivíduos em 2004, tais números continuarão crescendo e chegando a 12 milhões de pessoas em 2012. Dentre os tipos de câncer de maior frequência entre homens e mulheres são possíveis de destacar o de pulmão (1,3 milhões de mortes/ano), estômago (803.000 óbitos), colo e reto (639.000 óbitos), fígado (610.000 óbitos) e mama (519.000 óbitos). Entre os homens os tipos de câncer de maior frequência são os de pulmão, próstata, estômago, fígado, cólon e reto, e esôfago, já entre as mulheres são o de mama, pulmão, estômago, cólon e reto e cervical³⁻⁴.

Para o Brasil, segundo estimativas levantadas pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer) em 2010, o câncer terá uma incidência de quase meio milhão de pessoas, onde entre os homens, o de maior frequência será o de próstata, seguido pelo pulmão, estômago e cólon e reto. Entre as mulheres, o de maior frequência será o de mama, seguido pelo colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão⁵.

O Brasil é um país populoso e com uma dimensão quase continental, localizado próximo da linha do equador, onde a incidência solar é bastante alta. Como resultado a população apresenta um alto índice de câncer cutâneo, o principal tipo na população brasileira e que acometerá cerca de 120.000 novos casos no ano de 2010, segundo o INCA. Se levarmos em consideração a população mundial, este número ul-

trapassou a casa de mais de dois milhões de casos em 2008, segundo a OMS.

Diante deste grande número de casos de câncer, algumas medidas devem ser tomadas para redução destes números, como ações preventivas e educacionais, divulgação dos males causados pelo consumo de tabaco, álcool e pela exposição excessiva ao sol. É necessário também investimentos na área de pesquisa do câncer para uma detecção mais precoce e, desta forma, com um tratamento mais efetivo.

Atualmente, as técnicas mais empregadas para o diagnóstico do câncer de pele são: a inspeção visual, onde o profissional da saúde observa a “olho nu” aspectos anormais da pele, como manchas, pintas (nevus) e pequenas feridas; outra técnica também empregada é o uso da dermatoscópio que consiste em um equipamento, que possui a função de aumentar o tamanho da região analisada de 10 a 40 vezes, possibilitando a detecção de detalhes não perceptíveis a “olho nu”. Caso exista a suspeita de uma possível lesão de pele é realizada uma remoção de uma amostra do tecido, ou seja, é realizada a biópsia da lesão para que seja realizado o exame anatomo-histopatológico, onde esta é a técnica padrão para o diagnóstico do câncer de pele. Esta técnica possui diversos problemas, pois é invasiva e em lesões extensas, a amostra coletada para a biópsia pode não ser representativa da lesão, levando a um diagnóstico errôneo (falso positivo ou negativo); outro problema bastante relevante é a não detecção das bordas da lesão, onde não é possível distinguir se o tecido é sadio ou lesionado. Esta distinção é um fator fundamental, caso seja necessário a utilização de um procedimento para o tratamento da lesão cutânea.

Recentemente, técnicas ópticas para a detecção de neoplasias vêm sendo descritas como técnicas auxilia-

res para o diagnóstico extremamente atrativas, por apresentarem o potencial de discriminação tecidual através de uma análise segura, não-invasiva, não-destrutiva e com resposta rápida. As composições bioquímicas e estruturais influenciam nas interações da luz com o tecido biológico, assim, um tecido sadio e uma lesão neoplásica apresentarão características ópticas distintas. Alterações celulares e teciduais decorrentes do desenvolvimento maligno modificam os fenômenos ópticos e o monitoramento da fluorescência, reflectância, absorbância, podendo constituir uma importante ferramenta de detecção.

A espectroscopia de fluorescência é um exemplo de técnica óptica que tem diversas aplicações como, por exemplo, no auxílio de diagnóstico de lesões neoplásicas em tecidos⁶⁻⁷, na detecção de tecido dental cariado⁸, dentre várias outras aplicações. Em todas essas aplicações a técnica vem mostrando sensibilidade suficiente para diferenciar as variações teciduais. A fluorescência por imagem é outra técnica que apresenta o potencial de aumentar o poder de discriminação de tecidos, podendo constituir uma importante ferramenta de detecção de lesões, como no câncer bucal⁹⁻¹⁰. Ao contrário da espectroscopia que fornece uma análise pontual, as técnicas por imagem podem contribuir para a detecção de lesões ocultas (carcinoma *in situ*) e ademais para o delineamento das margens de lesões¹¹⁻¹².

A grande maioria dos casos de utilização da fluorescência para o diagnóstico leva somente em consideração a informação da fluorescência dos fluoróforos endógenos presentes na região lesada, o que pode não ser suficiente para o diagnóstico. Uma possibilidade é a utilização de marcadores fluorescentes, como por exemplo, o ácido aminolevulínico (ALA), que é o precursor na biossíntese do fotossensibilizador (Protoporfirina IX (PpIX)),

que revela um acúmulo preferencial nas regiões lesionadas¹³. Este acúmulo pode ser evidenciado através de sua intensa fluorescência na região do vermelho.

Assim, o objetivo deste trabalho é implementar uma nova técnica de diagnóstico por fluorescência marcada, detectando a formação da (PpIX) induzida por ALA tópico, em lesões malignas ou pré-malignas de pele, utilizando um sistema de fluorescência portátil e de fácil manuseio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o estudo da técnica de diagnóstico por fluorescência marcada foi incluído pacientes com lesões de pele, atendidos no Departamento de Pele do Hospital Amaral Carvalho do Programa de Prevenção do Melanoma, que foram submetidos à cirurgia, sob supervisão da médica dermatologista Dra. Ana Gabriela Sálvio. Os pacientes/acompanhantes foram orientados de forma verbal e escrita e, posteriormente, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A medicação utilizada foi o Ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), FSUESCC “NIOPIIK” B SADAVAYAd. 1K4, Moscou, Rússia, manipulado em solução de água Milli Q contendo 3% de DMSO (agente que facilita a penetração do ALA) e 1 mM de EDTA (composto que inibe a enzima ferroquelatase, permitindo maior concentração da PpIX). A solução de ALA foi mantida em temperatura ambiente, ao abrigo da luz até o momento de ser aplicada.

O aparelho (protótipo) utilizado para o diagnóstico por imagem de fluorescência 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). O equipamento denominado “MARDOS-

scope”, composto de uma iluminação com emissão centrada em 400 nm com intensidade de 50 mW/cm² e um arranjo de filtros ópticos que está otimizado para visualização da fluorescência na região do verde e vermelho¹¹. Na figura 1 é apresentado o sistema de diagnóstico por fluorescência, onde em painel A é possível observar a parte frontal do equipamento e em painel B, a peça de manuseio, podendo se obter as imagens de fluorescência.

Para o registro das imagens de fluorescência foi utilizada uma câmera fotográfica (SONY H50) acoplada ao sistema de diagnóstico. Todas as imagens foram obtidas com uma lente macro de 74 mm e utilizou-se o aumento óptico da câmera de 6x. Como consequência deste aumento, o campo de visão foi de apenas 2,0 cm. Os pacientes permaneceram durante o procedimento em sala escura com o objetivo de se evitar a fotodegradação da PpIX formada e ainda para se evitar interferências de luminosidades externas que podem vir a mascarar as imagens de fluorescência.

Para realizar o procedimento de diagnóstico, a solução de ALA foi espalhada nas lesões (no centro e nas bordas) com o auxílio de um algodão/gases. Também foi feita aplicação da solução no antebraço esquerdo, em região sem lesão, como controle experimental e possíveis ações alérgi-

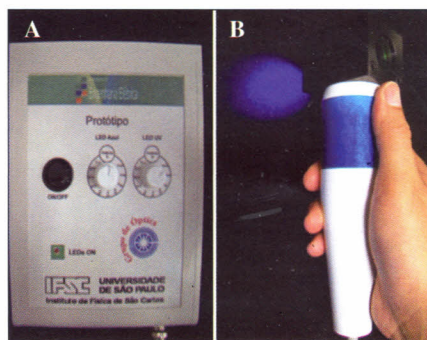


Figura 1 - Sistema de diagnóstico por imagem de fluorescência: A) sistema de controle; B) peça de mão para visualização da fluorescência.

cas da droga. As imagens foram coletadas em intervalos regulares de tempo de 15 minutos, num tempo total de 2 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 2, painéis A, B e C, observamos uma sequência de imagens de um Carcinoma Basocelular (CBC) cervical multicêntrico. Na figura 2-A é possível visualizar a imagem utilizando “iluminação branca”, ou seja, somente com a iluminação da sala. Já na figura 2-B evidenciamos a imagem utilizando o sistema de diagnóstico por fluorescência, ou seja, iluminando com luz ultravioleta e após 15 minutos de contato da lesão e sua borda com a solução de ALA. Nesta imagem é possível observar a fluorescência do tecido normal, caracterizado pela fluorescência na região do verde e a fluorescência na região do vermelho, caracterizando a fluorescência da PpIX acumulada em tecidos anormais. Na figura 2-C é apresentado uma imagem de fluorescência após 60 minutos da aplicação da solução de ALA, onde é possível comprovar um incremento significativo da fluorescência da PpIX, evidenciando que ocorreu um aumento de sua formação.

A fluorescência da PpIX é bem evidente com a utilização da solução de ALA, onde é possível observar, através das imagens de fluorescência, seu acúmulo preferencial na região neoplásica, evidenciando seu uso no auxílio clínico para o diagnóstico. Outro fator de extrema relevância é a identificação das bordas da lesão, onde esta é de fundamental importância para o tratamento eficaz e seguro, já que a borda externa delimita uma região sadia de uma região lesada.

Na figura 3 é apresentado imagens de uma lesão de Queratose Actínica, onde na figura 3-A observa-se

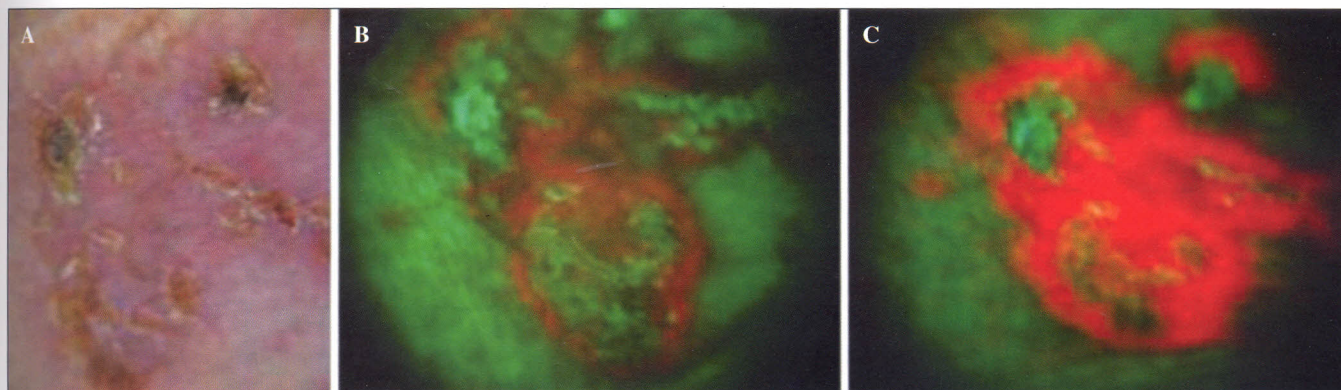


Figura 2 - Imagem de CBC cervical multicêntrica: A) Imagem utilizando iluminação branca; B) Imagem de fluorescência, 15 minutos após aplicação do ALA; C) Imagem de fluorescência, 60 minutos após aplicação do ALA.

uma imagem utilizando “iluminação branca”. Na figura 3-B a imagem foi coletada utilizando o sistema de diagnóstico por fluorescência após 60 minutos de permanência da solução de ALA. Nesta imagem é possível notar uma fluorescência do PpIX localizada na região central e pequenas regiões com PpIX nas bordas da imagem, indicadas com duas setas brancas na imagem. Neste caso, pode-se evidenciar que estas pequenas regiões são tecidos com células anormais, o que não é perceptível nas bordas da figura 3-A, onde somente é possível encontrar uma Queratose vista “à olho nu” e localizada na região central da imagem. Na grande maioria dos casos, o médico somente faria o tratamento da Queratose localizada na região central, o que leva ao tratamento ineficaz deste tipo de lesão, levando o paciente a recidivas e a sofrimento desnecessário.

CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa piloto demonstram que a aplicação da técnica utilizando um dispositivo portátil e de baixo custo poderá permitir o diagnóstico de lesões devido a célu-

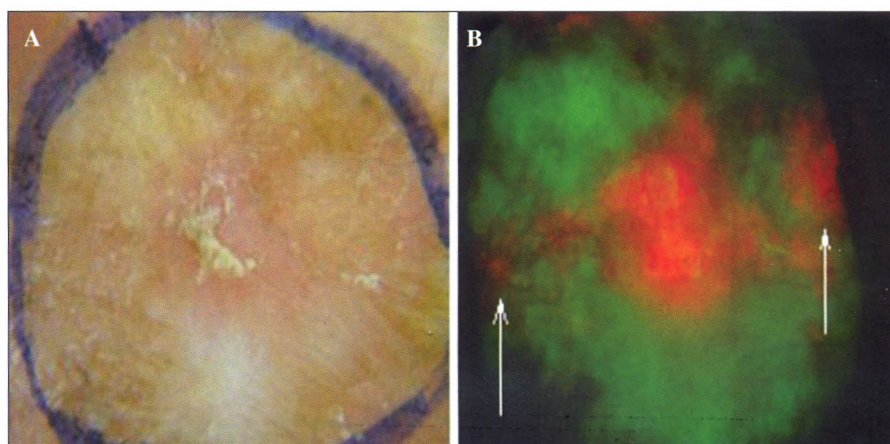


Figura 3 - Imagem de Queratose Actínica: A) Imagem utilizando iluminação branca; B) Imagem de fluorescência 60 minutos após aplicação do ALA.

las neoplásicas ou não, com grande sensibilidade e especificidade.

O fácil manuseio e a resposta imediata após fotossensibilização do local são fatores que tornam esta técnica interessante para auxiliar no diagnóstico precoce de padrões teciduais patológicos, favorecendo a adesão pelo médico especialista, seja como método principal de diagnóstico, ou como método auxiliar aos já estabelecidos na rotina hospitalar ou ambulatorial. A associação com as técnicas convencionais de diagnóstico, como por exemplo, a biópsia e o uso do dermatoscópio são realizados para

comparação com os resultados obtidos por fluorescência, a fim de se validar esta nova técnica.

Os estudos estão avançando para maior e melhor classificação dos padrões teciduais aplicáveis e confiáveis para diagnóstico, bem como da escolha do melhor protocolo clínico para esta investigação. A determinação da cinética de produção da PpIX, e de sua localização tecidual, também estão em investigação para se definir as limitações da técnica, que poderiam ser fatores de exclusão na escolha para sua futura aplicação.

REFERÊNCIAS

1. Inca - Instituto Nacional de Câncer [homepage]. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil. [acesso 12 Out 2007]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home>
2. Bertolini WLHM. (2009). A influência do D-limoneno como promotor de absorção de ácido 5-aminolevulínico para terapia fotodinâmica do câncer de pele: avaliação in vitro e in vivo da permeação e retenção cutâneas, in **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP)**. Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto. p.73.
3. Boyle P, Levin B. **World Cancer Report**. (2008). Lyon: IARCPress.
4. Stewart BW, Kleihues P. **World Cancer Report**. (2003) Lyon: IARCPress.
5. Inca, Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. (2009). Rio de Janeiro: INCA.1998.
6. Badizadegan K et al. Spectroscopic diagnosis and imaging of invisible pre-cancer. **Faraday Discuss**. (2004) 126:265-79; Discussion 303-11.
7. Wagnieres GA, Star WM, Wilson BC. (1998). In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. **Photochem Photobiol**, 68(5):603-32.
8. Meller C et al. (2006). A new in vivo method for measuring caries activity using quantitative light-induced fluorescence. **Caries Res**, 40(2):90-6.
9. Roblyer D et al. (2008). Multispectral optical imaging device for in vivo detection of oral neoplasia. **J Biomed Opt**, 13(2):024019.
10. Pierce MC, Javier DJ, Richards-Kortum R. (2008). Optical contrast agents and imaging systems for detection and diagnosis of câncer. **Int J Câncer** 123(9):1979-90.
11. Costa MM. (2010). Desenvolvimento de um Sistema por Imagem de fluorescência Óptica para uso Médico-Odontológico, in **Departamento de Engenharia de Materiais**. Universidade de São Paulo: São Carlos. p.96.
12. Poh CF et al. (2006). Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral câncer patients. **Clinical Câncer Research**, 12(6):6716-6722.
13. Fotinos N et al. (2006). 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: characteristics, application and perspectives. **Photochem Photobiol**, 82(6):994-1015.