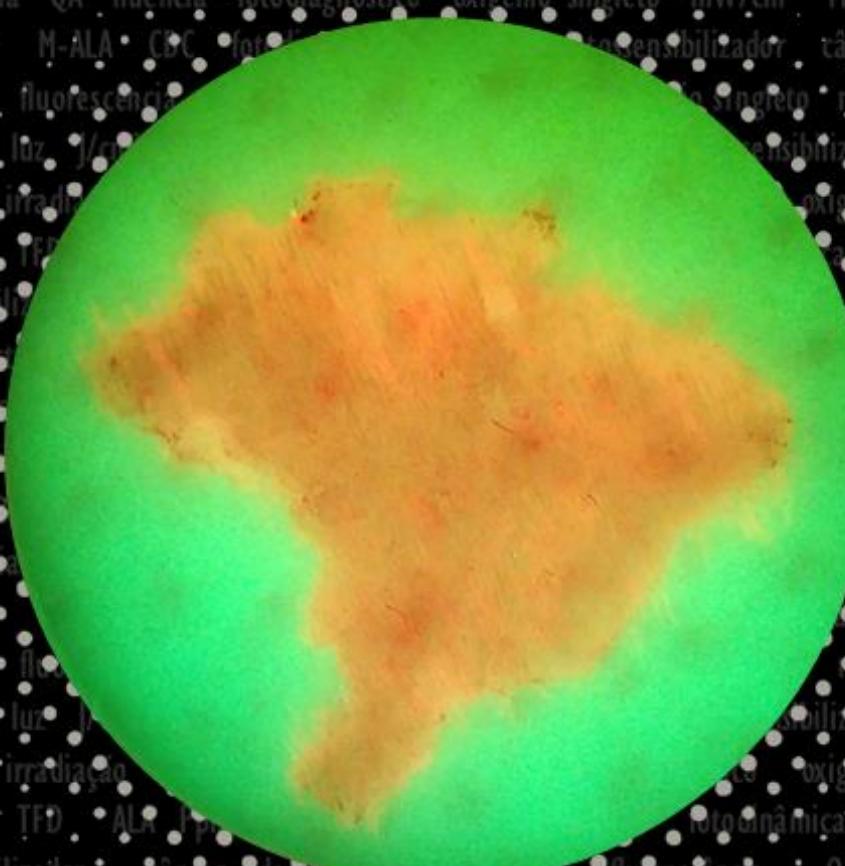


TERAPIA FOTODINÂMICA DERMATOLÓGICA

PROGRAMA TFD BRASIL

VOLUME 2

EDIÇÃO



**VANDERLEI S. BAGNATO
MICHELLE B. REQUENA**

ORGANIZADORES

Copyright© dos autores

Todos os direitos garantidos. Qualquer parte desta obra pode ser reproduzida, transmitida ou arquivada desde que levados em conta os direitos dos autores.

Vanderlei S. Bagnato e Michelle B. Requena [Organizadores]

Terapia fotodinâmica. São Carlos: Even3 Publicações Editora, 2023. 312 p.

ISBN 978-85-5722-550-3

1. Terapia fotodinâmica. 2. Câncer de pele não melanoma. 3. Lesões pré-malignas. 4. Estudo clínico. 5. Autores. I. Terapia fotodinâmica dermatológica: Programa TFD Brasil

CDD - 610

Capa: Michelle B. Requena. Mirian D. Stringasci, Lilian T. Moriyama e Dianeth Sara L. Bejar

Editor: Michelle Barreto Requena

Editora do e-book: Even3 Publicações

doi: 10.29327/terapia-fotodinamica-dermatologica-programma-tfd-brasil-309087

Princípios do uso de tempo de vida de fluorescência na caracterização e diagnóstico de lesões

Camila de Paula D'Almeida, Giancarlo de Souza, José Dirceu Vollet-Filho, Cristina Kurachi

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.

As técnicas ópticas de diagnóstico baseadas na fluorescência são as mais empregadas, principalmente devido à maior simplicidade da instrumentação, ao menor custo e à portabilidade, quando comparados a outras técnicas. Nas últimas décadas, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico por fluorescência vem sendo explorados para o diagnóstico do câncer. Este capítulo descreve de forma sucinta os fundamentos físicos da técnica de tempo de vida de fluorescência, sua detecção, a importância da taxa redox, suas metodologias e aplicações.

doi: 10.29327/terapia-fotodinamica-dermatologica-programa-tfd-brasil-309087.605429

1 Introdução

A etapa do diagnóstico clínico é essencial no exercício das diversas especialidades médicas e de grande relevância para o planejamento do tratamento e seguimento do paciente. Especialmente na área da Oncologia, o diagnóstico precoce tem direta correlação com maior taxa de sobrevida e menor morbidade associada ao tratamento do paciente. O diagnóstico do câncer em tecidos moles é inicialmente realizado através da anamnese, com o questionamento sobre o histórico clínico do paciente e da evolução da lesão, seguido pelo exame clínico e, quando da suspeita de malignidade, pela biópsia e análise histopatológica, esta considerada o método padrão-ouro. O exame clínico inclui a visualização sob luz branca (iluminação padrão) para a identificação de alterações na coloração, textura e volume, e a palpação para verificação da consistência e fixação da lesão.

As maiores limitações do diagnóstico clínico advêm da similaridade das características das lesões de câncer em estágios iniciais, com alterações benignas e/ou lesões de componente inflamatório, condições bem mais incidentes, e da subjetividade associada à identificação dos aspectos de malignidade dependente da experiência e formação do profissional de saúde. Adicionalmente, a escolha do sítio da biópsia incisional também é uma etapa crítica do diagnóstico clínico, uma vez que a lesão de carcinoma, principal tipo de câncer dos tecidos moles, pode apresentar diferentes padrões histológicos, inclusive de alterações apenas hiperplásicas ou de displasias entremeando o câncer, havendo assim a chance de um diagnóstico falso caso essas regiões forem coletadas para a análise histológica.

As técnicas ópticas são apontadas como ferramentas auxiliares atrativas para o diagnóstico por serem métodos objetivos não-invasivos e não-destrutivos com especificidade para alterações bioquímicas e/ou estruturais associadas ao câncer, e para obtenção de resposta rápida [1–3]. As técnicas ópticas baseadas na fluorescência são as mais empregadas,

principalmente devido à maior simplicidade da instrumentação, ao menor custo e à portabilidade, quando comparados a métodos baseados na coerência óptica ou espalhamento Raman, por exemplo. Nas últimas décadas, o desenvolvimento e a validação de métodos de diagnóstico por fluorescência vem sendo explorados para o diagnóstico do câncer. [4–14]

Nas próximas seções descreveremos os fundamentos físicos da técnica de tempo de vida de fluorescência e, na sequência, suas aplicações.

2 Princípios do fenômeno de fluorescência

Para descrever adequadamente as características únicas da técnica de tempo de vida de fluorescência, é preciso observar alguns detalhes físicos da geração desse processo.

Quando a luz interage com a matéria, os fótons podem ser espalhados ou absorvidos. No processo de espalhamento, a luz emitida tem comprimento de onda igual (reflexão) ou bastante próximo (Raman) da radiação incidente. Já no processo de absorção de luz, a molécula sofre um aumento de energia que a leva a um estado quântico excitado e, quando isso ocorre, a molécula pode retornar ao estado de menor energia através de processos radiativos ou não radiativos. No último, a energia é dissipada por relaxação vibracional ou transferência energia a outras moléculas presentes no ambiente. Já nos processos radiativos, há a emissão de fótons de energias menores e comprimentos de onda maiores do que a luz incidente, a estes processos radiativos é dado o nome de luminescência. Às moléculas apenas absorvedoras de luz, dá-se o nome de cromóforos, mas se essa molécula converte a energia da luz absorvida em luminescência, ela é denominada um fluoróforo.

Os processos de luminescência podem ainda ser divididos em dois tipos, dos quais dependem do tempo médio entre a absorção e a emissão de fótons: *fluorescência*, que ocorre sem a alteração do estado de *spin* dos elétrons de valência (ocorrendo entre singuleto-singuleto ou triplete-triplete), e que implica em processos de emissão rápidos (“quase instantâneos”, com

duração da ordem de nanossegundos) e *fosforescência*, que ocorre de forma a mudar a configuração de *spin* dos elétrons de valência (ocorrendo entre singuleto-triplet ou triplet-singuleto) e implicando em processos mais lentos (podendo demorar de milissegundos a minutos) [15, 16]. O diagrama de Jablonski simplificado (Figura 1) ilustra, em função dos níveis quânticos, o processo de absorção e conversão de energia sofrido por uma molécula.

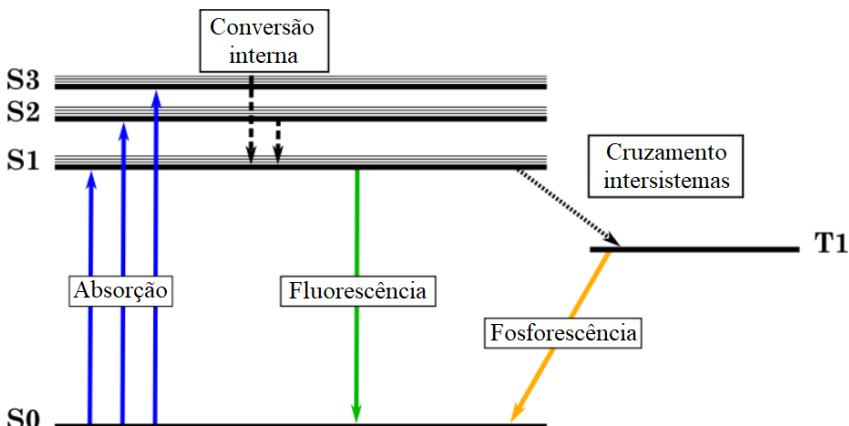


Figura 1. Diagrama de Jablonski simplificado, no qual a distância entre os estados representa a diferença de energia entre os mesmos. Primeiramente, a molécula absorve um fóton e é levada de um estado fundamental singuleto (S_0) a um dos estados excitados da forma singuleto. Há conversão interna até atingir o menor nível de energia do estado excitado singuleto. Na fluorescência, ocorre a emissão de um fóton a partir desse estado de energia. Já na fosforescência, ainda ocorre cruzamento intersistema, levando a molécula a um estado excitado de multiplicidade de spin diferente (no caso, triplet) o que, por fim, leva à emissão de um fóton a partir desse último estado de energia após um tempo mais prolongado que na fluorescência.

O processo de absorção de energia típico ocorre em intervalos de tempo da ordem de 10^{-15} segundos (femtossegundos). Uma vez em estados excitados mais energéticos que o primeiro estado excitado singuleto, ocorrem conversões internas que dissipam energia através de vibrações moleculares, colisões ou transferência de energia com outras moléculas. Este processo demora um intervalo de tempo da ordem de 10^{-12} segundos

(picossegundos).

A conversão de energia do primeiro estado excitado para o estado fundamental através de fluorescência pode ocorrer através da fluorescência ou fosforescência. O *tempo de vida de fluorescência*, isto é, o intervalo de tempo que a molécula permanece no estado excitado antes de emitir um fóton a partir do primeiro estado excitado singuleto (ou triplete) é da ordem de 10^{-9} segundo (nanossegundos), mas é altamente dependente do microambiente da molécula, podendo ser alterado por interações intermoleculares ou com as características do meio no qual a molécula está presente, como pH e temperatura. Já a fosforescência tem tempo de vida da ordem de 10^{-3} segundos (milissegundos), devido às conversões intersistemas e mudanças de *spin* que ocorrem antes da emissão do fóton.

A fluorescência pode ser detectada em termos da sua intensidade, das diferenças de comprimento de onda, da anisotropia (relacionada com a heterogeneidade de características do meio), do tempo e da sua modulação de fase (Figura 2). Através destas informações é possível determinar diferenças entre moléculas.

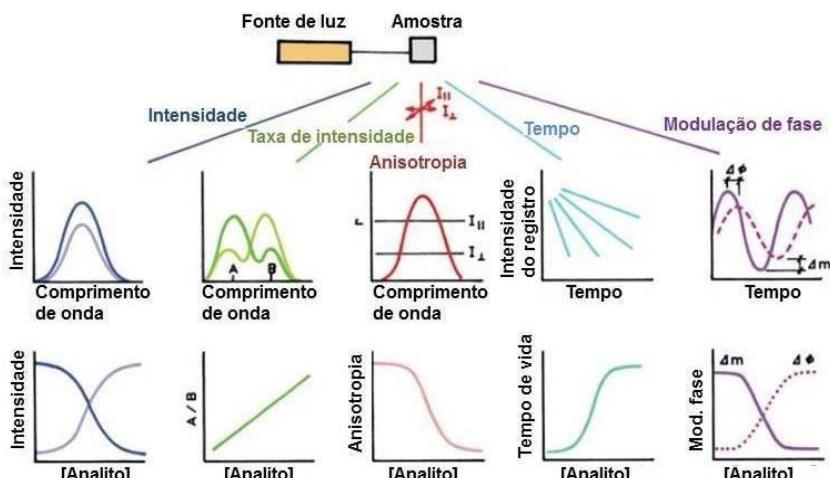


Figura 2. Técnicas de detecção de fluorescência. Da esquerda para a direita: detecção utilizando intensidade, razão entre picos, anisotropia, tempo de vida de fluorescência, e modulação de fase. Os “analitos” representam as moléculas investigadas. Fonte: Adaptado de Lakowicz [15].

A intensidade de fluorescência e a forma de seu espectro é resultado de um conjunto de diversos fatores, tais como: eficiência quântica da reação de fluorescência (\mathcal{E}), concentração do fluoróforo (C), energia do fóton incidente ($h \cdot v$, onde h é a constante de Planck e v é a frequência da onda eletromagnética), eficiência de coleta da fluorescência pelo sistema (E), coeficiente de extinção molar do fluoróforo (ϵ) e intensidade da radiação de excitação (Φ), além das condições do solvente ou material em que o fluoróforo está presente, como pH e temperatura. Desse modo, a intensidade de fluorescência não dependente do tempo (F_{t-i}) é relacionada com os parâmetros através da equação 1:

$$F_{t-i} = \frac{\Phi \cdot E \cdot \epsilon \cdot \mathcal{E} \cdot C}{h \cdot v} \quad (1)$$

Da mesma forma, pode-se mensurar a intensidade de fluorescência dependente do tempo baseada no número de moléculas excitadas ($n(t)$) em função do tempo (t). Essa relação é dada pela equação 2:

$$\frac{dn(t)}{dt} = (\Gamma + k_{nr}) \cdot n(t) \quad (2)$$

sendo Γ a taxa de emissão e k_{nr} é a taxa decaimento não radiativo. Como a emissão do fóton é aleatória, a solução da equação 2 é um decaimento exponencial para a população de moléculas excitadas: $n(t) = A \cdot e^{-t/(\Gamma+k_{nr})}$.

Portanto, as duas formas de realizar a medida de fluorescência (estacionária ou resolvida no tempo) podem ser usadas como ferramenta de análise de amostras e tecidos biológicos. Nos próximos tópicos serão abordadas técnicas e moléculas alvo para o uso da fluorescência como ferramenta de diagnóstico.

3 Fluorescência endógena (fluoróforos e cromóforos)

Nos tecidos biológicos como a pele, a absorção de luz ocorre através de moléculas como melanina, proteínas estruturais, lipídios, hemoglobinas e água. As duas primeiras possuem capacidade de absorção de luz principalmente nos comprimentos de onda da radiação ultravioleta e do espectro visível; a água possui capacidade de absorção da luz principalmente em comprimentos de onda do espectro infravermelho; e as hemoglobinas apresentam absorção da luz de um amplo espectro de comprimentos de onda [17, 18].

Algumas moléculas presentes no tecido biológico possuem, ainda, a capacidade de emitir luz através do processo de fluorescência. Os principais fluoróforos são o triptofano, o dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH), o dinucleótido de flavina e adenina (FAD), a elastina, o colágeno, as porfirinas e a melanina [17].

A Figura 3 mostra o espectro de absorção de algumas moléculas presentes em tecidos biológicos.

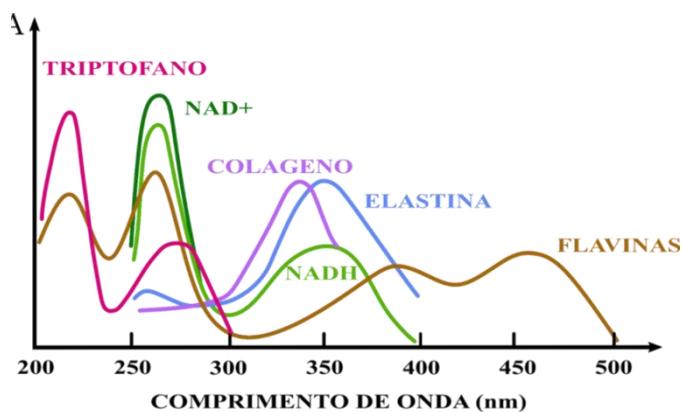


Figura 3. Espectro de absorção de importantes cromóforos presentes em tecidos biológicos. Adaptado de Yang Pu, Robert R. Alfano, 2015 [19].

O triptofano é um aminoácido fluorescente que está presente em todas as formas de vida por se tratar de um bloco de construção essencial para formação de proteínas e, portanto, é o maior responsável pela

Técnicas ópticas para diagnóstico e processamento de dados

fluorescência advinda de proteínas. O NADH e o FAD são coenzimas que protagonizam papéis de carreadores de elétrons e estão diretamente envolvidos na cadeia respiratória celular podendo, desse modo, ser utilizados para monitoramento de taxas metabólicas de um tecido. As porfirinas presentes nas estruturas da hemoglobina são responsáveis pelo transporte de gases nos processos respiratórios, sendo assim, podendo ser alvo de estudo para monitoramento da oxigenação em tecidos; por fim, o colágeno e a elastina são proteínas estruturais responsáveis pela elasticidade e estruturação dos tecidos biológicos.

Os espectros de emissão de fluorescência de alguns fluoróforos são mostrados na Figura 4. Os outros pigmentos fluorescentes presentes são a melanina e a lipofuscina. A melanina é produzida pelos melanócitos sendo responsável pela coloração da pele e tem uma função importante de fotoproteção [17, 20].

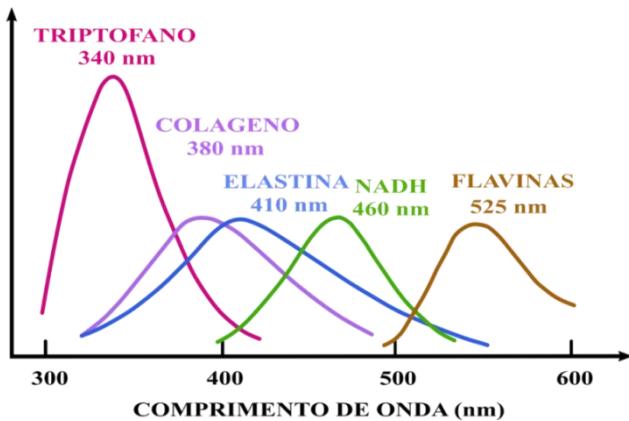


Figura 4. Espectro de emissão de fluorescência de importantes moléculas presentes em tecidos biológicos. Adaptado de Yang Pu, Robert R. Alfano, 2015 [19].

Para o estudo de sistemas vivos, a autofluorescência, ou seja, a fluorescência nativa destas moléculas supracitadas é a melhor forma de adquirir informações de uma amostra, pois através dela é possível realizar medidas de forma não invasiva, em tempo real e sem a interferência da adição de marcadores externos. Em tecidos biológicos, a contribuição de

todos os fluoróforos, assim como as quantidades relativas de cada um e a presença de absorvedores, resultará na fluorescência nativa detectada.

4 Técnicas de detecção de fluorescência

As técnicas de espectroscopia de fluorescência podem se basear em medidas de fluorescência estacionária ou fluorescência resolvida no tempo. As primeiras são mais comuns e demandam equipamentos mais simples, e são feitas expondo a amostra a um comprimento de onda específico (excitação) e coletando a intensidade de luz emitida (emissão). As medidas resolvidas no tempo, por sua vez, requerem uma instrumentação mais complexa, que permite verificar o decaimento da intensidade de fluorescência em um curto intervalo de tempo após a excitação da amostra e, com isso, determinar o tempo de vida de fluorescência [15, 21–23].

As informações obtidas por meio da espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo são complementares às que são medidas com fluorescência estacionária e, ao contrário dessa última técnica, o tempo de vida de fluorescência não depende da concentração de fluoróforos por detectar uma informação que é característica das moléculas fluorescentes. Além disso, é menos suscetível a variações causadas pelo espalhamento, não uniformidade da iluminação e comprimento de onda de excitação [24].

Os dois tipos de espectroscopia de fluorescência apresentados (estacionária e resolvida no tempo) podem ser mensurados de forma pontual ou por imagem. No caso das imagens, estas podem ser microscópicas ou de campo amplo.

Imagens de campo amplo de fluorescência apresentam intensidades de emissão dentro de uma faixa espectral e, por isso, não possuem informações espectrais detalhadas (como intensidade em função do comprimento de onda). Mesmo sendo menos quantitativa e de menor correlação bioquímica que a espectroscopia, essa técnica tem um maior potencial de translação clínica pela maior familiaridade da informação diagnóstica para o clínico, além de ter uma instrumentação de menor

custo e maior portabilidade [25, 26].

Uma aplicação clínica das imagens de campo amplo de fluorescência é voltada para análise de queilite actínica, que é uma lesão potencialmente malignizável de lábio, causada por ação cumulativa e prolongada da radiação ultravioleta solar. Usualmente, a queilite actínica acomete toda extensão do lábio, principalmente o inferior, com heterogeneidade de aspectos clínicos e histopatológicos, podendo variar de normal a quadros de displasia leve, moderada e severa, inclusive na mesma lesão.

O manejo da queilite actínica depende do grau de displasia presente. Para a displasia leve, apenas o acompanhamento clínico e histológico da lesão é indicado. Já nos casos de displasia moderada ou severa, o tratamento deve ser realizado para evitar a progressão da lesão para carcinoma. Desta forma, a seleção do sítio de biópsia de um lábio com queilite actínica tem grande influência na prevenção do câncer de lábio e preservação do paciente.

Para casos de queilite actínica, as imagens de fluorescência de campo amplo apresentam claramente um aumento do contraste na visualização das heterogeneidades do lábio com queilite actínica quando comparado às imagens feitas sob iluminação branca. Essa diferença pode ser observada nas Figuras 5a e 5b. Para otimizar a análise, esse padrão pode ser verificado com a classificação dos *pixels* em função da intensidade de fluorescência detectada, podendo ser gerado um algoritmo de discriminação entre tecido normal e lesão [7].

Outro exemplo da aplicação de imagem de fluorescência é na discriminação do melanoma cutâneo. Apesar de não apresentar alta incidência, o melanoma é o tipo de câncer de pele que requer maior atenção devido à pobre resposta aos tratamentos convencionais, especialmente quando diagnosticado em estágios avançados, resultando em baixa taxa de sobrevida. Em estágios iniciais, o melanoma pode ser clinicamente semelhante a uma alteração benigna bastante incidente: a queratose seborreica pigmentada, o que potencializa o atraso do

diagnóstico correto, em especial, em regiões do país em que o acesso a médicos especialistas é limitado.

Nesse contexto, a técnica de fluorescência aplicada a imagens de campo amplo é uma ferramenta que auxilia na classificação das lesões. Nas imagens de fluorescência, é evidente a discriminação do melanoma cutâneo pela ausência de estruturas altamente fluorescentes no interior da lesão, como é possível ver por comparação das Figuras 5c e 5d. Essas estruturas podem ser associadas ao pseudocisto córneo, sendo a grande quantidade de queratina responsável pela alta emissão da fluorescência na região espectral entre 450-550 nm quando excitada entre 400-450 nm [27].

A visualização é em tempo real e pode ser utilizada para observação rápida de grandes áreas do corpo humano. Nesse caso, a triagem dos pacientes pode ser facilmente executada por profissionais da enfermagem ou agentes de saúde e, em casos de identificação do melanoma, o paciente pode ser mais rapidamente encaminhado para o atendimento especializado.

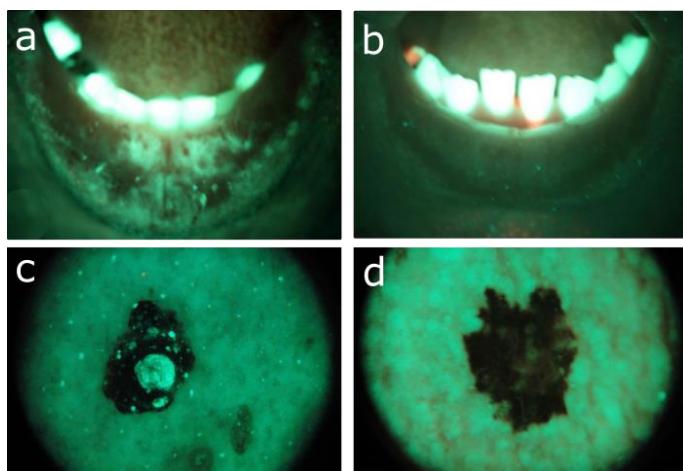


Figura 5. Imagens de fluorescência de campo amplo de a) lábio de paciente com queilite actínica, b) lábio saudável de outro paciente, c) queratose seborreica e d) melanoma.

5 Tempo de vida de fluorescência e a taxa redox óptica

O tempo de vida de fluorescência (τ) é o tempo médio que os elétrons excitados das moléculas fluorescentes demoram para decair para o estado fundamental de energia, emitindo luz. Esse tempo médio representa o tempo em que a maioria dos elétrons sofreu esse decaimento, sendo, portanto um parâmetro estatístico. Também é definido no formalismo matemático como o inverso da soma das constantes de todos os caminhos possíveis para esse decaimento, que envolvem transições radiativas (k_r) e não radiativas (k_{nr}), de acordo com a equação 3. Isso quer dizer que cada transição que ocorra entre dois estados que gera ou não fluorescência afeta o tempo médio de decaimento. Como essas diferentes transições são afetadas por suas interações com outras moléculas circundantes, esse parâmetro é dependente não só da molécula-alvo, mas também da sua conformação e microambiente, já que a presença de outras moléculas próximas pode interferir nas taxas de decaimento, por possibilitar mais caminhos para que ela volte ao estado de menor energia [15].

$$\tau = \frac{1}{\sum(k_r + k_{nr})} \quad (3)$$

No caso de se ter somente um tipo de molécula em uma amostra homogênea, o decaimento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo pode ser descrito por uma equação mono-exponencial (ou seja, um decaimento exponencial simples) tendo, portanto, somente um parâmetro de tempo de vida que representa a amostra. No entanto, variações de conformação e microambiente alteram esse decaimento, adicionando mais parâmetros ao ajuste teórico da curva de decaimento, como mostrado na equação 4.

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (4)$$

Esta equação simplesmente soma os efeitos e pesos desses fatores, tal que α_i são as amplitudes de cada fator exponencial (os “pesos”) e τ_i são os tempos de vida de cada fluoróforo (ou de um mesmo, em diferentes condições).

Para o caso de haver mais de uma componente exponencial, pode-se calcular um tempo de vida médio (τ_m) para a amostra, de acordo com a Equação 5. O uso dessa média é conveniente principalmente em casos em que há pequenas diferenças de τ para condições semelhantes, e em determinadas condições, o tempo de vida obtido é de fato a média de efeitos dificilmente distinguíveis.

$$\tau_m = \sum_i \alpha_i \tau_i \quad (5)$$

Para detecção de mudanças metabólicas, os principais fluoróforos investigados em tecidos são o NADH e o FAD. Cada um deles possui tempos de vida de fluorescência característicos em suas formas livres ou ligadas. Além disso, esses tempos de vida variam de acordo com as alterações metabólicas do tecido e, por isso, podem contribuir para investigações clínicas não invasivas, como no caso de lesões de pele e mucosas acessíveis pelas sondas de investigação.

Quando medidos separadamente, o NADH e o FAD possuem um decaimento temporal de fluorescência que é bem descrito por uma equação bi-exponencial, ou seja, a função que melhor descreve a curva de decaimento da intensidade de fluorescência possui duas componentes e, portanto, dois tempos de vida. Para o NADH o menor tempo de vida está relacionado ao estado livre da molécula, enquanto o maior está associado ao estado ligado. Já para o FAD, o menor tempo de vida se refere ao estado ligado e o maior ao estado livre. Sendo assim, os coeficientes e tempos de vida associados ao decaimento de fluorescência dessas duas moléculas são parâmetros bastante importantes para monitorar o metabolismo celular, uma vez que assim se pode medir a porcentagem de NADH ligado,

Técnicas ópticas para diagnóstico e processamento de dados

associado à fosforilação, e NADH livre, envolvido na glicólise. Usualmente o aumento na quantidade de NADH é observado em tecidos neoplásicos [28, 29].

Apesar de as técnicas de fluorescência resolvidas no tempo serem de grande importância para acessar as taxas metabólicas, as medidas de fluorescência estacionária são mais amplamente usadas para isso. Um método óptico muito utilizado para avaliação metabólica é a avaliação da taxa de oxirredução ou taxa redox óptica. Essa taxa é definida como a razão entre a intensidade de fluorescência do NADH e do FAD. Esse parâmetro fornece uma variação relativa das intensidades de NADH e FAD, e é sensível a mudanças nas taxas metabólicas e suprimento de oxigênio vascular [29–33]. O aumento na atividade celular observado em células está usualmente relacionado a um aumento da taxa redox.

6 Técnicas de tempo de vida de fluorescência

O acesso a informações de microambiente celular permite o entendimento de dinâmicas biológicas e processos bioquímicos em células e tecidos. Com isso, é possível investigar quais processos estão envolvidos em determinadas alterações biológicas, além de avaliar a eficiência de tratamentos aplicados. Além disso, sendo a emissão de fluorescência característica da configuração eletrônica e *spintrônica* das moléculas e de suas conformações, a combinação de suas características servem como uma espécie de “impressão digital”, que permite identificar e monitorar alterações dessas biomoléculas e dos tecidos constituídos por elas. Como as técnicas de fluorescência resolvida no tempo podem ser empregadas de forma não destrutiva e não invasiva, elas têm um grande potencial para serem usadas em aplicações biológicas e médicas.

Além da capacidade da técnica empregada, outro fator relevante que facilita seu uso em ambientes clínicos é a portabilidade do equipamento. Pensando nisso, o Grupo de Óptica do IFSC/USP desenvolveu um sistema portátil de fluorescência que faz medidas espectrais e de tempo de vida,

interrogando as amostras de forma pontual com auxílio de uma ponteira, como mostrado nas Figuras 6a e 6c. O sistema foi montado com dois lasers de excitação, com emissões um em 378 nm e o outro em 445 nm, visando à absorção por relevantes fluoróforos endógenos presentes nos tecidos biológicos, principalmente mucosas e pele.

Esse equipamento foi utilizado para investigar melanoma em modelo animal, analisando preferencialmente o sinal do NADH e FAD, e apresentou um grande potencial de distinção entre melanoma e tecido saudável. Foram observados valores maiores de tempo de vida de fluorescência em melanoma, comparado com o tecido normal, caracterizando a diferença na composição e no microambiente das biomoléculas destes tecidos [22].

Essa mesma avaliação óptica também foi realizada em lesões de queilite actínica, e demonstrou capacidade de discriminação entre displasia leve, moderada/severa e tecido normal em função do tempo de vida de fluorescência das amostras.

Em outro ensaio clínico, foram investigados, com esse mesmo equipamento, diferentes tipos de neoplasias cutâneas (carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular e melanoma), lesões potencialmente malignizável (queratose actínica) e alterações benignas com características clínicas similares (queratose seborreica pigmentada, nevus hipocrômico, dentre outras). Foi possível observar que as amplitudes dos fatores das exponenciais resultaram em uma maior separação dos tipos teciduais quando comparados com os próprios valores de tempo de vida de fluorescência.

Também foi desenvolvido um equipamento de imagem multiespectral de tempo de vida de fluorescência (FLIm, do inglês *multiespectral Fluorescence Lifetime Imaging* [34]) para uso clínico. O sistema conta com um campo de visão de 8,65 x 8,65 mm² e leva aproximadamente 2 segundos para fazer uma imagem, o que permite que seja inserido em rotinas clínicas e possibilita análise de áreas inteiras de lesões. A escolha

Técnicas ópticas para diagnóstico e processamento de dados

do laser de excitação em 335 nm e das regiões espectrais de detecção foram baseadas na literatura científica disponível na área de diagnóstico de câncer para investigar algumas biomoléculas-alvo, especialmente NADH, FAD, colágeno, elastina e melanina. Imagens deste equipamento são apresentadas nas Figuras 6b e 6d [35].

A partir das medidas obtidas com esse equipamento FLIm, é possível analisar imagens que contém informações de fluorescência em cada ponto, como: intensidade absoluta, intensidade normalizada, tempo de vida médio, tempo de vida longo e o peso da componente do tempo de vida.

Esses biomarcadores ópticos foram usados para diferenciar diferentes tipos de lesões de pele, sendo algumas alterações teciduais que apresentam pares clinicamente semelhantes: nevo intradérmico e carcinoma basocelular; queratose seborreica pigmentada e melanoma; carcinoma espinocelular. Os resultados deste ensaio clínico mostraram efetividade das imagens resultantes desse equipamento associadas a métodos de classificação utilizando aprendizado de máquina no diagnóstico do câncer de pele [34].

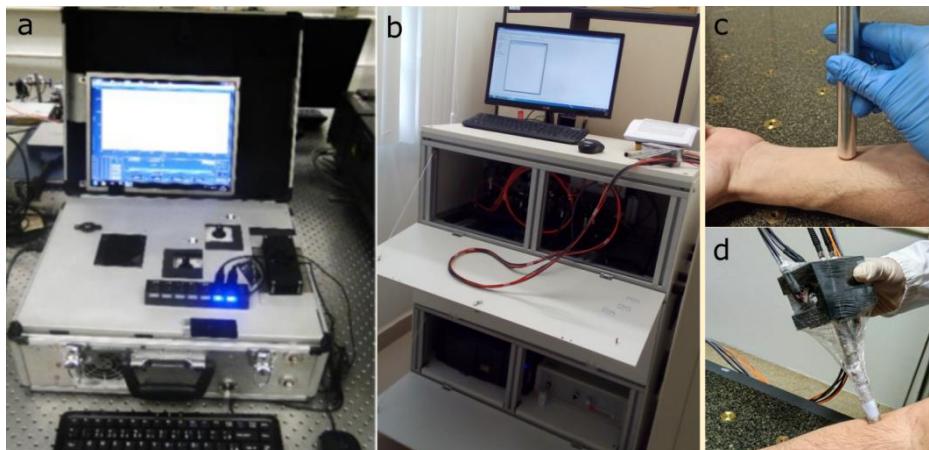


Figura 6 - Fotos de equipamentos portáteis de uso clínico para medidas de tempo de vida de fluorescência (a) pontual e (b) por imagem, com suas respectivas ponteiras, apresentadas em (c) e (d).

7 Perspectivas

O uso das características de emissão de fluorescência tecidual para o diagnóstico e o monitoramento de alterações teciduais é um campo crescente a ser explorado. O desenvolvimento de ferramentas de detecção portáteis e o aprofundamento na compreensão de como diferentes condições clínicas e bioquímicas podem modificar os tempos de vida de fluorescência das biomoléculas presentes no tecido deverão permitir contribuições cada vez mais relevantes para o diagnóstico clínico, possibilitando a criação de instrumentos e bancos de dados que tornem possível distinguir lesões e monitorar alterações de tecidos, com consequências importantes para o auxílio no diagnóstico oncológico e de lesões pré-malignas.

Referências bibliográficas

- [1] Tuan Vo-Dinh. *Biomedical Photonics Handbook, 3 Volume Set.* 2014.
- [2] Wilson BC, Jermyn M, Leblond F. Challenges and opportunities in clinical translation of biomedical optical spectroscopy and imaging. *J Biomed Opt* 2018; 23: 1.
- [3] J. Mobley, T. Vo-Dinh VVT. *Biomedical Photonics Handbook, Second Edition: Fundamentals, Devices, and Techniques.* 2014.
- [4] Pires L, Nogueira MS, Pratavieira S, et al. Time-resolved fluorescence lifetime for cutaneous melanoma detection. *Biomed Opt Express* 2014; 5: 3080–9.
- [5] Campos CP, D’Almeida CP, Nogueira MS, et al. Fluorescence spectroscopy in the visible range for the assessment of UVB radiation effects in hairless mice skin. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2017; 20: 21–27.
- [6] Cosci A, Nogueira MS, Prataviera S, et al. Time-resolved fluorescence spectroscopy for clinical diagnosis of actinic cheilitis: erratum. *Biomed Opt Express* 2018; 9: 648.
- [7] Takahama Junior A, Kurachi C, Cosci A, et al. Usefulness of tissue

Técnicas ópticas para diagnóstico e processamento de dados

- autofluorescence imaging in actinic cheilitis diagnosis. *J Biomed Opt* 2013; 18: 076023.
- [8] Saito Nogueira M, Cosci A, Teixeira Rosa RG, *et al.* Portable fluorescence lifetime spectroscopy system for in-situ interrogation of biological tissues. *J Biomed Opt* 2017; 22: 1.
- [9] Roblyer D, Kurachi C, Stepanek V, *et al.* Comparison of multispectral wide-field optical imaging modalities to maximize image contrast for objective discrimination of oral neoplasia. *J Biomed Opt* 2010; 15: 066017.
- [10] Cosci A, Takahama A, Correr WR, *et al.* Automated algorithm for actinic cheilitis diagnosis by wide-field fluorescence imaging. *J Med Imaging* 2016; 3: 044004.
- [11] Roblyer D, Richards-kortum R, Sokolov K, *et al.* NIH Public Access. 2014; 13: 1–19.
- [12] Roblyer D, Kurachi C, Stepanek V, *et al.* Objective detection and delineation of oral neoplasia using autofluorescence imaging. *Cancer Prev Res* 2009; 2: 423–431.
- [13] Nogueira MS. *Fluorescence lifetime spectroscopy for diagnosis of clinically similar skin lesions*. 2016.
- [14] Pratavieira S. *Montagem e caracterização de um microscópio óptico não linear para imagens de tecidos biológicos*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2014.
- [15] Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer International Publishing, 2006.
- [16] Valentine RM, Ibbotson SH, Wood K, *et al.* Modelling fluorescence in clinical photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci* 2013; 12: 203–213.
- [17] Prasad P. *Introduction to Biophotonics*. John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [18] Marcu L, French P ED. *Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging Principles and Applications in Biomedical Diagnostics*. Taylor & Francis Inc., 2014.

- [19] Pu Y, Alfano RR. Optical biopsy - a new armamentarium to detect disease using light. *Opt Biopsy XIII Towar Real-Time Spectrosc Imaging Diagnosis* 2015; 9318: 93180U.
- [20] Niemz MH. *Laser-Tissue Interactions*. Springer International Publishing, 2007.
- [21] Campos CP, D'Almeida CP, Nogueira MS, et al. Fluorescence spectroscopy in the visible range for the assessment of UVB radiation effects in hairless mice skin. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2017; 20: 21–27.
- [22] Pires L, Nogueira MS, Pratavieira S, et al. Time-resolved fluorescence lifetime for cutaneous melanoma detection. *Biomed Opt Express* 2014; 5: 3080.
- [23] Morphology TC. Biophotonics, Tryptophan and Disease.
- [24] Suhling K, Hirvonen LM, Levitt JA, et al. Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments. *Med Photonics* 2015; 27: 3–40.
- [25] Pratavieira S, Andrade, CT, Salvio, AG, et al. Optical Imaging as Auxiliary Tool in Skin Cancer Diagnosis. In: *Skin Cancers - Risk Factors, Prevention and Therapy*. 2011. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.5772/25465.
- [26] Kurachi C, Moriyama LT, Cosci A. Laser and antimicrobial photodynamic therapies in cancer patients Optical diagnosis of cancer and potentially malignant lesions.
- [27] Sálvio AG, Inada NM, Bagnato VS, et al. The use of light-emitting diode imaging as exclusion criterion for melanoma diagnosis. *J Am Acad Dermatol* 2019; 80: e49–e50.
- [28] Skala MC, Riching KM, Bird DK, et al. *In vivo* Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging of Proteinbound and Free NADH in Normal and Pre-cancerous Epithelia. *J Biomed Opt* 2007; 12: 1–19.
- [29] Skala MC, Riching KM, Gendron-Fitzpatrick A, et al. *In vivo* multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 19494–19499.

Técnicas ópticas para diagnóstico e processamento de dados

- [30] Chance B, Schoener B, Oshino R, *et al.* Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem* 1979; 254: 4764–4771.
- [31] Ramanujam N, Richards-Kortum R, Thomsen S, *et al.* Low Temperature Fluorescence Imaging of Freeze-trapped Human Cervical Tissues. *Opt Express* 2001; 8: 335.
- [32] Drezek R, Brookner C, Pavlova I, *et al.* Autofluorescence Microscopy of Fresh Cervical-Tissue Sections Reveals Alterations in Tissue Biochemistry with Dysplasia¶. *Photochem Photobiol* 2001; 73: 636.
- [33] Gulledge CJ DM. Tumor oxygenation: a matter of supply and demand. *Anticancer Res* 1996; 16: 741–749.
- [34] Romano RA, Teixeira Rosa RG, Salvio AG, *et al.* Multispectral autofluorescence dermoscope for skin lesion assessment. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2020; 30: 101704.
- [35] Rosa RGT. *Assembly, characterization, and validation of a fluorescence lifetime rigid endoscope for clinical imaging of skin lesions*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2018.