



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0502446-3 A**



(22) Data de Depósito: 01/06/2005
(43) Data de Publicação: **23/01/2007**
(RPI 1881)

(51) Int. Cl⁷ .:
A61B 6/00

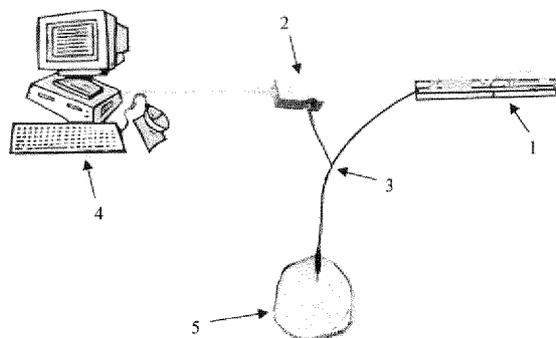
(54) Título: DETENÇÃO DE LESÕES DE PELE CAUSADAS POR ULTRAVIOLETA ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA ÓPTICA

(71) Depositante(s): Vanderlei Salvador Bagnato (BR/SP)

(72) Inventor(es): Vanderlei Salvador Bagnato, Vitoria Helena Maciel Coelho

(74) Procurador: Marcio Loreti

(57) Resumo: "DETECÇÃO DE LESÕES DE PELE CAUSADAS POR ULTRAVIOLETA ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA ÓPTICA". A presente invenção refere-se ao uso de fluorescência óptica para detecção de lesões de pele causadas por ultravioleta, tendo aplicação na área médica em diagnósticos de lesões teciduais através da Biópsia Óptica, baseada no princípio de que a luz interage de maneira diferente dependendo da composição e arquitetura do tecido investigado, tendo uma fluorescência produzida de forma distinta entre tecidos lesados e normais. Sua grande vantagem é a de ser não-invasivo e remeter resultados imediatos, avaliando se a exposição ao Ultravioleta causou danos moleculares permanentes no tecido.



DETECÇÃO DE LESÕES DE PELE CAUSADAS POR ULTRAVIOLETA ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA ÓPTICA.

Refere-se a presente invenção ao uso de fluorescência óptica para detecção de lesões de pele causadas por ultravioleta, tendo aplicação na
5 área médica em diagnósticos de lesões teciduais através da Biópsia Óptica, baseada no princípio de que a luz interage de maneira diferente dependendo da composição e arquitetura do tecido investigado, tendo uma fluorescência produzida de forma distinta entre tecidos lesados e normais. Sua grande vantagem é a de ser não-invasivo e remeter resultados imediatos, avaliando
10 se a exposição ao Ultravioleta causou danos moleculares permanentes no tecido.

Atualmente, o câncer de pele é o mais comum de todos os cânceres em pessoas de pele clara, ultrapassando a incidência de todos os outros cânceres juntos (Love et al, 1999). A exposição abusiva ao sol, fonte de
15 radiação ultravioleta, pode causar não apenas vermelhidão e posterior descamação da pele, mas também alterações significativas que podem comprometer o DNA. Estas alterações podem levar a formação de um câncer e a deficiências do sistema imunológico, pois apenas 5% da radiação ultravioleta que atinge a pele é refletida, sendo o restante
20 absorvida pelas primeiras camadas da pele (Capella M, 2005).

A absorção da radiação ultravioleta na pele é feita por cromóforos específicos, como as proteínas, ácidos nucleicos, NADH (Nicotinamida Adelina Dinucleotídeo), entre outras, acarretando alterações significativas ao tecido (Trautinger F, 2001). Essas alterações podem ser agudas ou
25 crônicas, as queimaduras são consideradas um efeito agudo da radiação ultra violeta, 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 queratinócitos, liberando citocinas como as IL-1 (Interleucina-1) e o TNF (Fator de Crescimento Tumoral). Sendo grande parte das IL-1 armazenadas no estrato córneo e na epiderme.

Além dos queratinócitos, as células fagocitárias secretadas pelas
5 citocinas aumentam ainda mais o recrutamento de células inflamatórias. As células fagocitárias recrutadas são ativadas pelas citocinas gerando oxigênio reativo específico (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
10 neuroendócrino, culminando em imunossupressão e liberação de mediadores inflamatórios. Esses 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, 2004).

15 As ferramentas freqüentemente empregadas para a obtenção do diagnóstico de uma lesão de pele é feito através da biópsia do tecido investigado e exige do clínico um vasto conhecimento para identificar lesões suspeitas (Love, et al, 1999).

A fluorescência é um importante processo de emissão em que
20 moléculas são excitadas por absorção de radiação eletromagnética. As espécies excitadas relaxam para seu estado fundamental, liberando sua energia na forma de luz (WEST M; HOLLER FJ, 1997). Em termos simples, a luz com um determinado comprimento de onda (comprimento de onda de excitação) é absorvida pelo tecido e reemitida em um segundo
25 comprimento de onda maior (comprimento de onda de emissão) que representa 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.

Alguns estudos demonstram que a fluorescência pode ser empregada no estudo e identificação de substâncias endógenas presentes na lesão por ultravioleta e em estudos para diagnóstico de diversas doenças de pele (Anderson, 1889; 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 ultravioleta (Tian et al, 2001).

Portanto a fluorescência no estudo do tecido é proposta como meio de auxiliar no diagnóstico de diversas lesões de pele, desde a avaliação do fotoenvelhecimento à lesões cancerígenas até a descoberta da caracterização de outras doenças (Utz et al, 1993).

Com o intuito de solucionar estes problemas e de superá-los desenvolveu-se a presente invenção que consiste no uso da fluorescência óptica para detecção de lesões de pele causadas por ultravioleta, tendo aplicação na área médica em diagnósticos de lesões teciduais, através da Biópsia Óptica, com as vantagens de não ser invasivo e remeter resultados imediatos, avaliando se a exposição ao ultravioleta causou danos a nível molecular permanentes no tecido.

A invenção poderá ser melhor compreendido através da descrição abaixo em consonância com as figura, onde:

A **figura 1** representa um esquema do sistema de diagnóstico por fluorescência utilizado para avaliação da lesão.

A **figura 2** representa um gráfico com o espectro de fluorescência característico da leitura de um tecido normal.

A **figura 3** representa um gráfico com o espectro de fluorescência característico da leitura de um tecido lesado; As setas assinalam as bandas de emissão características de uma lesão após 24 horas, que podem ser observadas ao redor de 630 nm e 670 nm.

A **figura 4** representa um gráfico com a variação espectral da intensidade da fluorescência durante 240 horas de medida de evolução de resposta da lesão.

A **figura 5** representa a intensidade da fluorescência em função dos
5 tempos de medida após lesão ter sido causada.

A detecção de lesões através da fluorescência é composto de um laser para excitação do tecido (1), podendo ser proveniente de uma fonte de HeCd de 442nm ou 532 nm de uma fonte de Nd:YAG dobrado ou de 632 nm fornecido por um laser de HeNe, ou outra fonte laser capaz de causar
10 fluorescência, um monocromador (2), uma fibra óptica (3) e um computador (4).

A luz proveniente do laser (1) é conduzida até o tecido (5) a ser investigado através de uma sonda de aplicação (3), essa sonda é do tipo y com uma fibra central que conduz o laser de excitação e seis fibras
15 periféricas que tem por função captar a fluorescência. Esta fibra central (3) que conduz a luz do laser (4) até o tecido (5) e as fibras periféricas conduzem a fluorescência do tecido (5) investigado ao monocromador (2) ligado a ao computador (4). Esse computador apresenta um software que nos permite o processamento e armazenamento dos dados.

20 Para o diagnóstico das lesões por ultravioleta é utilizado um laser de 442 nm. A leitura para a obtenção do espectro é realizada pontualmente em contato com o tecido investigado.

Cada ponto coletado produz um espectro que é arquivado no computador, através de leituras. Esses dados são tratados e comparados ao
25 espectro de um tecido normal para avaliação e conclusão do diagnóstico por espectroscopia de fluorescência.

A partir dos resultados obtidos para cada leitura, obtém-se o espectro característico da lesão por ultravioleta, possibilitando diagnosticá-las.

O gráfico da figura 2 demonstra um exemplo dos dados obtidos de um tecido normal, representando a intensidade de luz em função do comprimento de onda.

O gráfico da figura 3 demonstra o espectro de fluorescência característico da leitura de um tecido lesado. As setas assinalam as bandas de emissão características de uma lesão após 24 horas, que podem ser observadas ao redor de 630 nm e 670 nm.

Os espectros são normalizados pelo pico de retro espalhamento que ocorre no comprimento de onda de excitação, sendo este o primeiro pico observado (Fig.2 e 3) posicionado em 442 nm (comprimento de excitação). O segundo pico observado representa o pico de fluorescência característico do tecido analisado, onde observamos dois picos, sendo um deles na região do 630 nm e o outro na região do 670 nm (Fig. 3), que nos fornece a informação de que substâncias diferentes das presentes no tecido normal foram detectadas. Estas substâncias estão associadas à alteração causada pelo ultravioleta no tecido.

No entanto, outras observações são realizadas durante 240 horas de medida de evolução de resposta da lesão, verificando variações na intensidade dos espectros medidos (fig. 4).

Esta variação da intensidade é observada apresentando um padrão crescente nas primeiras 24 horas da lesão, decaindo em seguida, sugerindo um padrão de comportamento da lesão por ultravioleta.

Observando este comportamento, os dados são modelados realizando um fitting através de duas funções. Nas primeiras 24 horas da lesão observa-se um padrão crescente, onde é utilizado uma função exponencial, demonstrada a seguir:

Função exponencial crescente dada por: $y = y_0 + A1 \cdot (1 - e^{-bx})$.

Após 24 horas da lesão este comportamento apresenta alterações importantes, adotando um comportamento de decaimento. Para este comportamento é adotado uma função exponencial de decaimento que pode ser observada a seguir:

5 Função exponencial de decaimento dada por: $y = y_0 + A_1 \cdot e^{-(x-x_0)/t_1}$.

O gráfico da figura 5 demonstra a intensidade da fluorescência em função dos tempos de medida após a observância de uma lesão, onde utilizou-se as funções demonstradas anteriormente.

COMPROVAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICO

10 Foi utilizado ratos machos da raça Wistar. Foi realizado uma lesão no animal previamente anestesiado com uma solução de 0.4 ml de ketamina (anestésico) e 0.2 ml de xylasina (relaxante muscular), tricotomizado na região dorsal onde foi realizada a lesão. O animal foi imobilizado em decúbito ventral, permanecendo sob a exposição da luz
15 ultravioleta por um período de três horas. Os resultados obtidos foram demonstrados acima.

Após a análise obtida, observou-se diferenças significativas entre os espectros obtidos dos tecido normais quando comparados aos espectros obtidos dos tecidos lesados com o surgimento inclusive de novos picos de
20 fluorescência. O comportamento desses espectros sugere possivelmente a presença de cromóforos no processo inflamatório.

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
25 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, quando da saída do tecido. 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.

5 Observando o comportamento dos espectros sugestivos de um processo inflamatório verificou-se o comportamento crescente apresentado nas primeiras 24 horas após a lesão, possivelmente devido a presença de neutrófilos, células predominantes no processo inflamatório principalmente durante as primeiras 6-24 horas após a lesão.

10 Após 24 horas observa-se um comportamento de decaimento da curva, que sugere um processo de reparo e regeneração 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 com maior facilidade, o que pode
15 explicar o comportamento da curva de decaimento.

Durante o processo de reparo e cicatrização substâncias como o colágeno estão em atividade, cromóforo este presentes no processo de reparo.

REIVINDICAÇÕES

1) **DETECÇÃO DE LESÕES DE PELE CAUSADAS POR ULTRAVIOLETA ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA ÓPTICA** caracterizado por utilizar fluorescência óptica para detectar lesões de pele
5 causadas por radiação ultravioleta, tendo aplicação na área médica.

2) **DETECÇÃO DE LESÕES DE PELE CAUSADAS POR ULTRAVIOLETA ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA ÓPTICA** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser não-invasivo, remeter resultados imediatos e avaliar se a exposição ao ultravioleta causou danos
10 biomoleculares permanentes ao tecido.

3) **DETECÇÃO DE LESÕES DE PELE CAUSADAS POR ULTRAVIOLETA ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA ÓPTICA** caracterizado por constituir-se de um laser para excitação do tecido (1), podendo ser proveniente de uma fonte de HeCd de 442nm ou 532 nm de
15 uma fonte de Nd:YAG dobrado ou de 632 nm fornecido por um laser de HeNe, ou outra fonte laser capaz de causar fluorescência, um monocromador (2), uma fibra óptica (3) e um computador (4); A luz proveniente do laser é conduzida até o tecido (5) a ser investigado através de uma sonda de aplicação, essa sonda é do tipo y com uma fibra central
20 que conduz o laser de excitação e seis fibras periféricas que tem por função captar a fluorescência; A fibra central que conduz a luz do laser até o tecido e as fibras periféricas conduzem a fluorescência do tecido investigado ao monocromador ligado a um computador; Esse computador apresenta um software que nos permite o processamento e armazenamento dos dados
25 coletados.

4) **DETECÇÃO DE LESÕES DE PELE CAUSADAS POR ULTRAVIOLETA ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA ÓPTICA** de acordo com a reivindicação 3 caracterizado por permitir avaliar o nível de

radiação ultravioleta que tecidos biológicos podem ser expostos antes que alterações nocivas possam ocorrer.

Fig.1

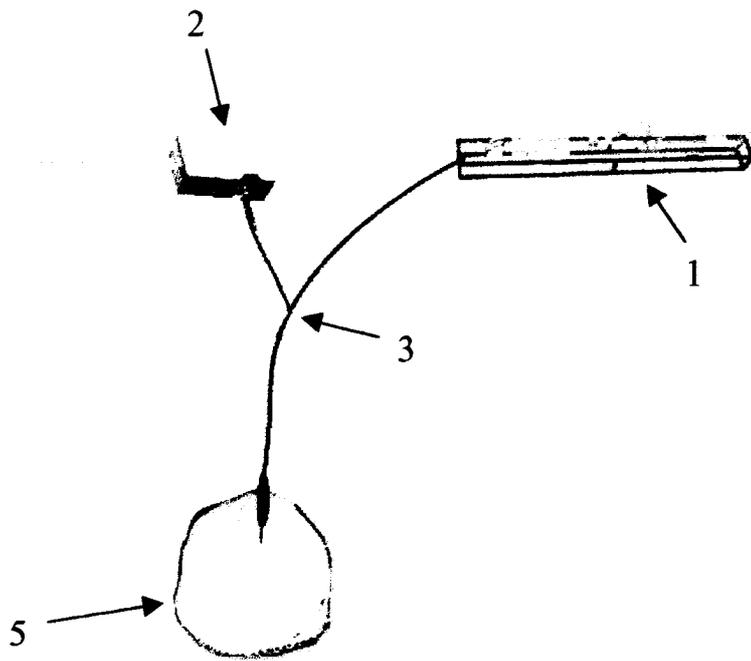
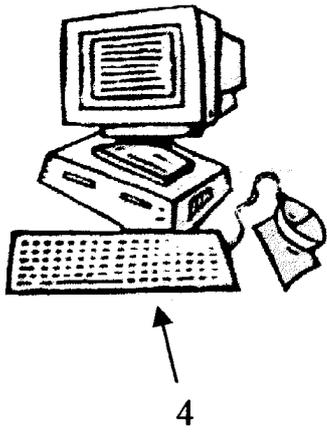


Fig.2

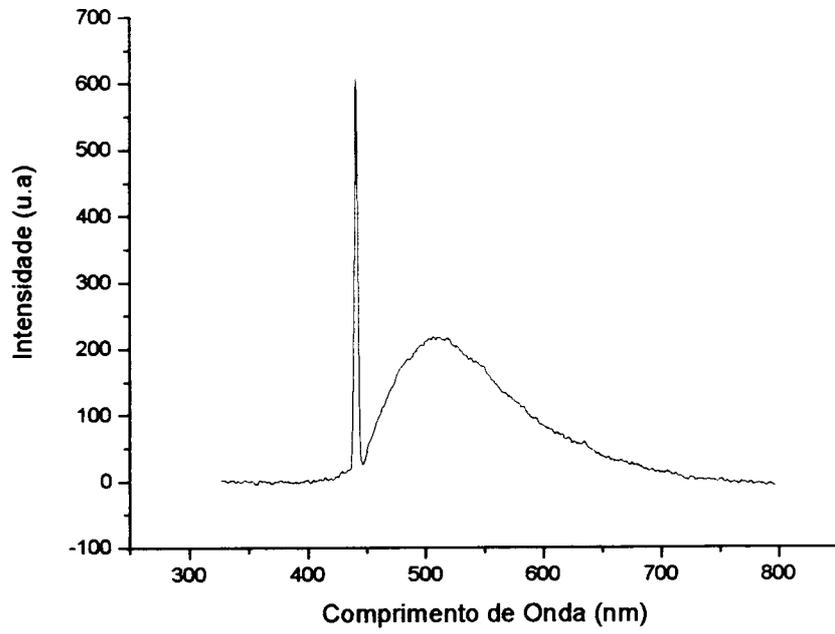


Fig.3

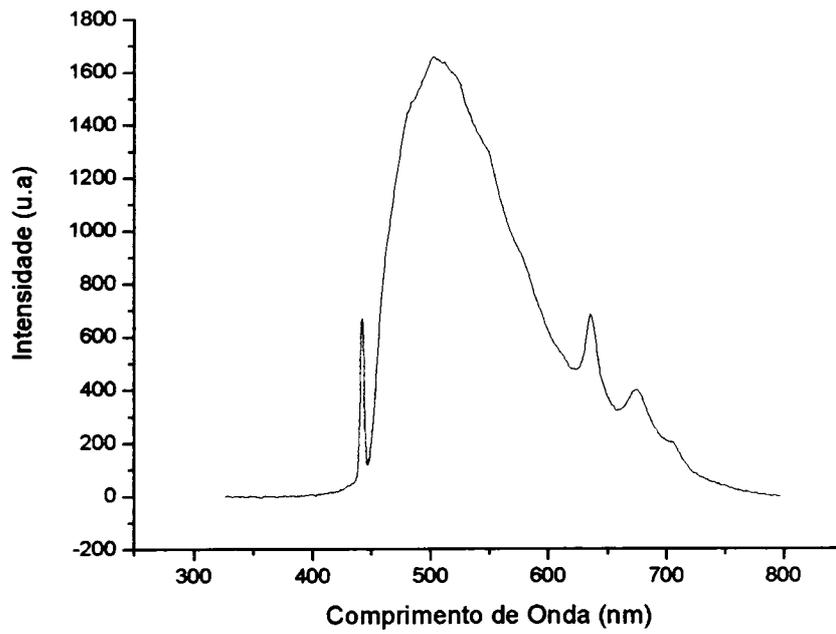


Fig.4

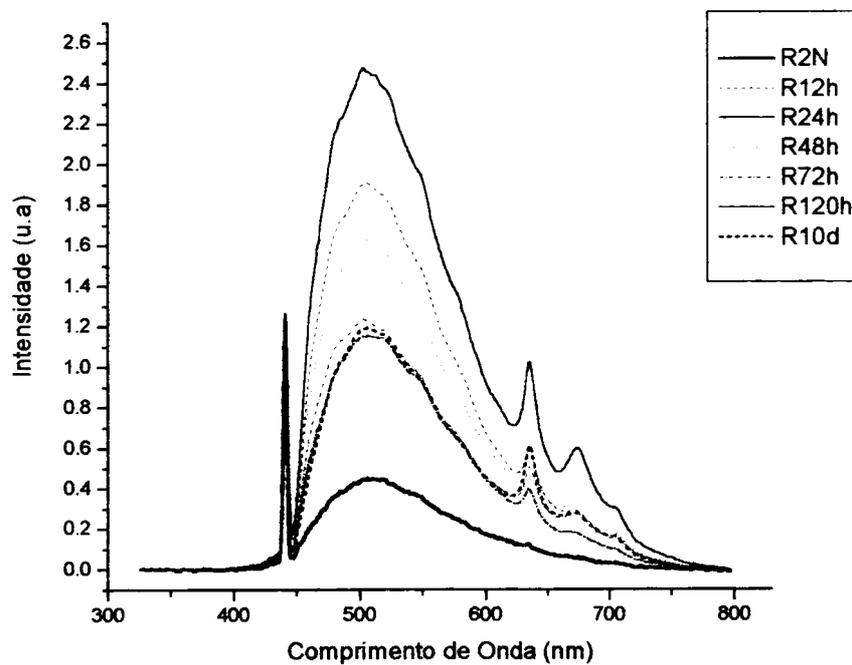
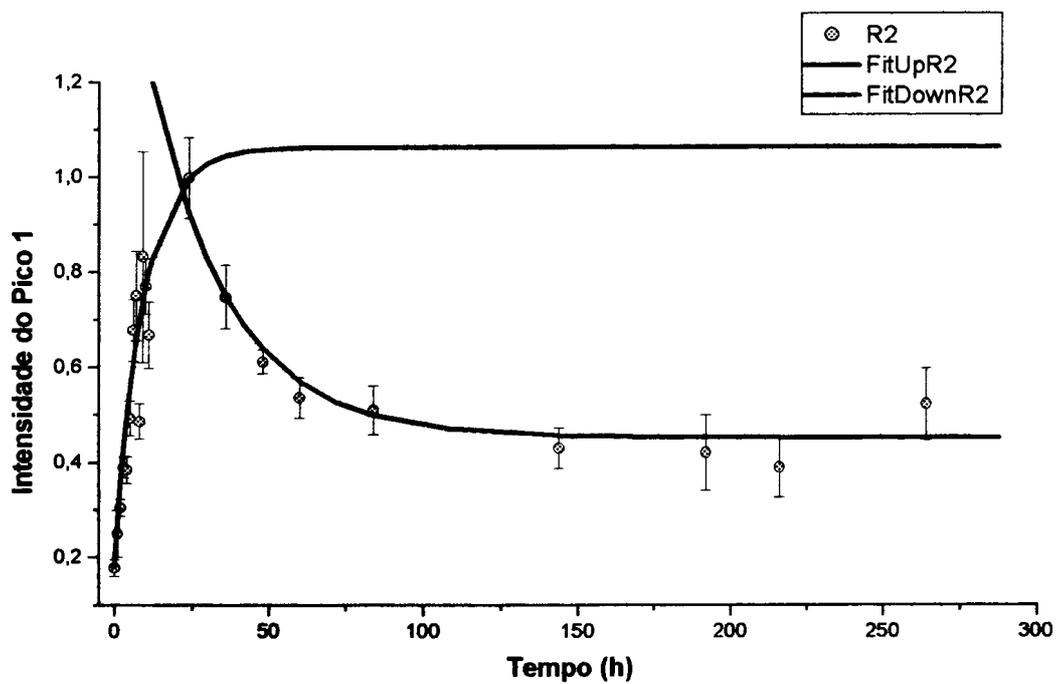


Fig.5



RESUMO**DETECÇÃO DE LESÕES DE PELE CAUSADAS POR ULTRAVIOLETA ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA ÓPTICA.**

A presente invenção refere-se ao uso de fluorescência óptica para
5 detecção de lesões de pele causadas por ultravioleta, tendo aplicação na
área médica em diagnósticos de lesões teciduais através da Biópsia Óptica,
baseada no princípio de que a luz interage de maneira diferente dependendo
da composição e arquitetura do tecido investigado, tendo uma fluorescência
10 produzida de forma distinta entre tecidos lesados e normais. Sua grande
vantagem é a de ser não-invasivo e remeter resultados imediatos, avaliando
se a exposição ao Ultravioleta causou danos moleculares permanentes no
tecido.