

CARACTERIZAÇÃO DE PIGMENTAÇÃO DE PELE HUMANA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Aline Travaoli¹, Arnaldo Marçal², Fernanda Castilho Leite³, Tatiana Magacho⁴, Vanildes Ribeiro⁵, prof. Dr. Renato Amaro Zangaro⁶

^{1, 2, 3, 4, 5}Mestrandos do programa de pós-graduação em Engenharia Biomédica na UNIVAP

⁶Diretor da Faculdade de Ciências da Saúde, prof. do programa de pós-graduação da UNIVAP e orientador do trabalho.

Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova – 12244-000, São José dos Campos - SP
atravaioli@hotmail.com, marcal@univap.br, fecal1_@hotmail.com, tamagacho@hotmail.com, vanildes@univap.br, zangaro@univap.br

Palavras-chave: Espectroscopia por fluorescência, biópsia óptica, nevos

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica

Resumo

O presente trabalho foi realizado na UNIVAP, no laboratório Adib Jatene, utilizando o equipamento de diagnóstico por fluorescência. A proposta do trabalho foi medir a fluorescência de três tipos de pigmentação do tecido epitelial, utilizando um espectrofluorímetro, irradiando sobre o tecido luz branca. Para coletar as amostras foi utilizado um catéter de fibras ópticas “6 em torno de 1” permitindo a irradiação e coleta simultânea da fluorescência emitida pelo tecido, conduzindo até um espectrômetro para dispersão da luz e detectada por um CCD. As amostras foram classificadas em: pele normal, pele com manchas escuras (nevos) e manchas claras. O objetivo do experimento foi obter um padrão espectral para cada tipo de pigmentação da pele e estabelecer parâmetros de comparação entre eles, a fim de criar um banco de dados que pudesse nortear futuras pesquisas para diagnosticar possíveis melanomas, carcinomas e outras patologias dermatológicas; além de ter um objetivo acadêmico de possibilitar aos alunos o contato, manuseio e aprendizado da técnica de espectroscopia por fluorescência utilizada pelo grupo. Algumas dificuldades foram encontradas para realizar a coleta dos dados, pois era preciso que voluntários com os tipos de manchas escuras e claras, participassem da pesquisa. Diante disso apenas 5 pessoas se disponibilizaram a participar, comprometendo o número de amostras impossibilitando a geração de padrões, como era o objetivo inicial do trabalho, porém, foi possível fazer comparações entre os tipos de pele de uma mesma pessoa, gerando informações relevantes para a continuação do trabalho. Foi observado que a intensidade do sinal é relevante para os diferentes tipos de tecido estudados, principalmente para os de pigmentação escura em relação ao tecido normal.

1. INTRODUÇÃO

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano, corresponde a 16% do peso corporal, desempenha certo número de funções relacionadas com sua localização na superfície do corpo: protege contra lesões físicas, químicas e biológicas; impede a perda de água; serve como grande receptor para as sensações gerais; protege contra a radiação U.V.; converte moléculas

precursoras de vitamina D; é responsável pela regulação térmica corporal; excreta substâncias através das glândulas sudoríparas (Junqueira & Carneiro; Ross; Reith; Romrell, 1993).

A pele apresenta uma constituição por camadas que se dividem em: uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme (Junqueira &

Carneiro,). Abaixo da derme fica a hipoderme, que não é considerada como parte da pele, e tem a função de apoiar e unir a pele ao resto do corpo, vide figura 1.

A epiderme é avascular e sua nutrição se faz por osmose a partir da derme papilar, sendo constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, de origem ectodérmica, além de conter ainda três tipos de células: os melanócitos e as células de Langerhans e de Merkel. Os melanócitos são células que se originam da crista neural do embrião e invadem a pele entre a 12ª e 14ª semana de vida intra-

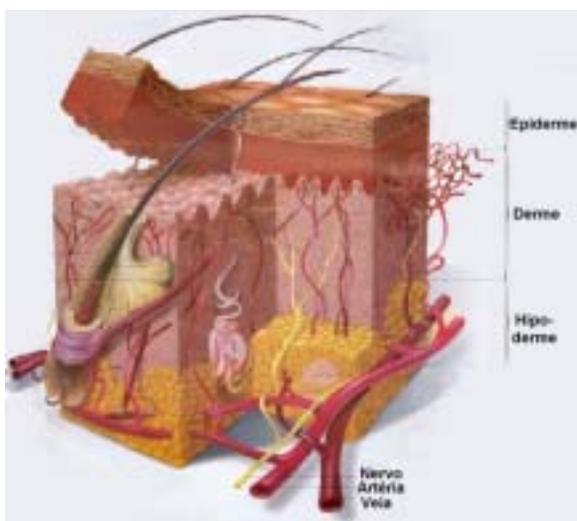


Figura 1 – Camadas da Pele ¹

Nevos

Os melanócitos encontram-se disseminados por toda a parte inferior da epiderme e produzem *melanina*. Quando a pele é exposta ao sol, os melanócitos produzem mais pigmento, causando o bronzeamento ou escurecimento da pele.

Em algumas ocasiões, grupos de melanócitos circundados por tecido formam uma estrutura não cancerosa denominada NEVO.

uterina. Essas células produzem um pigmento chamado melanina (Junqueira & Carneiro,).

A derme é rica em fibras colágenas e elásticas que conferem à pele sua capacidade de distender-se quando tracionadas, voltando ao estado original desde que cesse a tração. Ricamente irrigada, com extensas redes capilares, esta camada mostra elevações (papilas dérmicas) que se projetam na epiderme fazendo com que estas, na superfície, apresentem uma série de cristas separadas por sulcos (Dângelo; Fattini, 1988).

A palavra nevo (originada do latim), significa marca ou defeito, denominado popularmente de pinta, é uma proliferação benigna de células, e podem estar presentes desde o nascimento (congénito) ou surgir durante a vida (adquirido).

Os nevos podem ter diversos aspectos clínicos no que se refere à cor (cor da pele, róseos, azuis, acastanhados ou negros), forma (redondos, ovais ou irregulares), tamanho, relevo (manchas, nódulos achatados ou elevados), superfície (lisa ou enrugada) e ainda pode ocorrer a presença de pêlos.

Apresentam diferentes padrões de evolução – podem apresentar alterações de cor, aumentar, diminuir ou até desaparecer. Essas alterações podem não ter qualquer importância ou representar risco de malignização. Quando removidos cirurgicamente, geralmente não retornam.

1



Figura 2 – (a) nevo melanocítico intradérmico:lesão acastanhada, distribuição da pigmentação de modo uniforme, limites nítidos precisos e sobrelevada; (b) nevo melanocítico juncional:mancha acastanhada e enegrecida,sem relevo

Espectroscopia por Fluorescência

A técnica de espectroscopia de fluorescência baseia-se na excitação da amostra por radiação em comprimentos de onda curtos (ultravioleta e visível) e a observação da resposta luminescente da amostra em comprimentos de onda longos (visível). A identificação dos tecidos baseia-se na determinação das diferenças espectrais entre os fluoróforos presentes nos tecidos normais e displásicos.

A Espectroscopia de Fluorescência induzida por laser (ZÂNGARO et al., 1996), também conhecida como biópsia ótica (THOMSEN, 1998), é uma técnica que permite o diagnóstico de determinadas patologias (aterosclerose, displasias no cólon, câncer no esôfago, alguns tipos de câncer do pulmão e bexiga) através da emissão de fluorescência de tecidos biológicos, por esse motivo vem sendo utilizada em diversas modalidades das ciências biomédicas, devido principalmente, às margens que lhe são conferidas no que diz respeito à não invasividade (DENISOV; GRIFFIN, 1998; JÖNSSON et al., 1998; KATZ et al., 1998; ABUGO; GRYCZYNSKI; LAKOWICZ, 1999; ANDERSSON- ENGELS et al., 2000), alta sensibilidade e obtenção dos dados em tempo real (JOHANSSON et al., 1997; CAMPOLAT; MOURANT, 2000; POWELL, 2000) produzindo ótimos resultados clínicos e científicos.

O uso desta técnica para a caracterização do material biológico *in vivo* e

in vitro baseia-se na interação laser-tecido, possibilitando que parte da radiação absorvida pelas moléculas do corante seja reemitida na forma de luz (fluorescência) evidenciando a localização destas moléculas fluorescentes (fluoróforos) presentes nos tecidos ou estruturas celulares. Desta forma, através da distribuição espacial e temporal da fluorescência, pode-se determinar informações sobre a concentração e dinâmica de substâncias do tecido, em tempo real (FURUZAWA et al., 1999; WANG; YEUNG, 1999).

Várias linhas de pesquisa vêm sendo desenvolvidas em função dessas vantagens, principalmente, no que diz respeito aos estudos sobre câncer, tem-se como exemplos, estudos da fluorescência de câncer na árvore brônquica (ZELLWEGER et al., 2001), na cavidade oral (MAJUNDER; GUPTA, 2000), carcinomas (ANDERSON-ENGELS et al, 2000), entre outros tipos. Tem-se ainda, outras linhas que estudam fluorescência de componentes musculares (XU; WILLIAMS; THOMPSON, 2000) e fluorescência de lesões em pele.

STAVEREN et Al. (2001), realizaram um estudo utilizando a espectroscopia de fluorescência para diferenciar tecido normal e pré-maligno, utilizaram os modelos animais de lesão pré-maligna em pele de ratos induzida por radiação UVB, tumor sólido transplantado para pele de ratos e lesão pré-maligna em mucosa palatina de ratos. Os espectros de fluorescência foram registrados *in vivo*, sendo que, a obtenção dos mesmos

deu-se por um corante não tóxico denominado Ethyl Nile Blue A (600 nm excitação, 665-900 nm emissão), o qual , permitiu a identificação das regiões em estudo em tempos distintos.

BRANCALEON et al. (2001), estudaram a fluorescência in vivo de pacientes diagnosticados com melanoma de pele, e compararam com a fluorescência da pele normal. Verificaram emissão de fluorescência do triptofano, a qual, foi mais intensa no tumor do que no tecido (pele) normal, provavelmente, devido ao maior espessamento e/ou hiperproliferação que esta apresenta. Observaram, ainda, fluorescência de colágeno, o qual, apresentou-se reduzido ao tumor, quando comparado com o tecido normal circundante, devido à liberação de enzimas, pelo tumor, que degradam o tecido conjuntivo.

simultânea da intensidade de fluorescência emitida pelo tecido em um ambiente escuro (sem nenhuma luz ambiente), onde a luz proveniente do espectrofluorímetro foi calibrada através de uma composição de pó de giz contida em um tubo de ensaio.

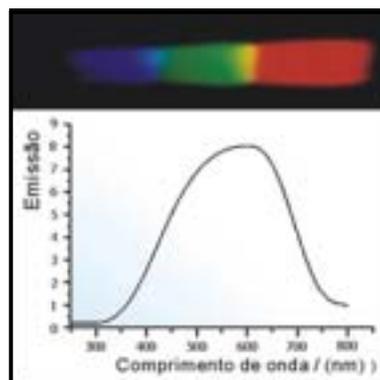


Figura 3 – Diagrama do espectro da luz branca

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O sistema desenvolvido por ZÂNGARO et al. (1996 b), é composto por uma lâmpada com luz branca, “que caracterizam o conjunto dos comprimentos de onda correspondentes ao espectro de emissão de uma lâmpada de tungstênio-halogênio (luz branca)” emitindo radiação em um largo espectro. A radiação da luz foi conduzida via um catéter de fibras ópticas que permite a irradiação e a coleta

Este catéter utiliza a configuração “6 em torno de 1”, onde a fibra central é responsável pela excitação do tecido e as seis fibras externas pela coleta do sinal gerado pelo mesmo. Este sinal é guiado até um monocromador que dispersa a luz e é detectado por um CCD intensificado (1024x256 pixels) da Princeton Instruments. O diagrama representando o sistema está ilustrado na figura abaixo.

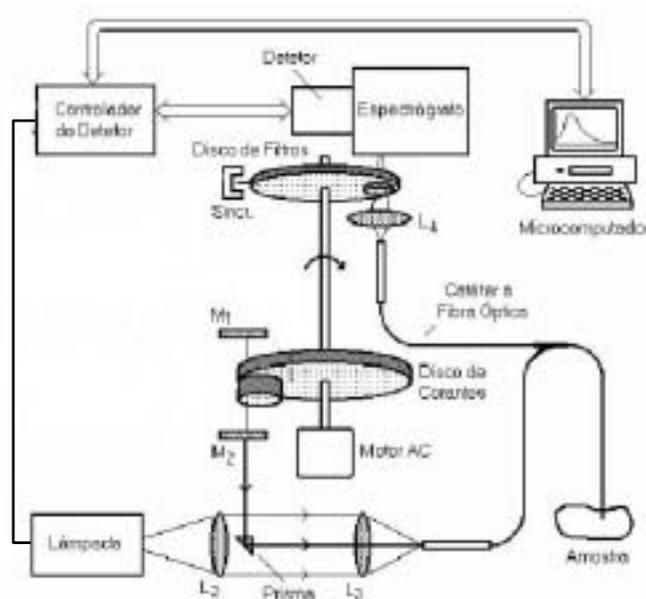


Figura 4 – Diagrama do sistema de aquisição: Espectrofluorímetro

Descrição do Sistema de Excitação

Os feixes de luz são acoplados em um catéter que utiliza uma fibra óptica de 200µm de diâmetro como fibra de excitação.

A geometria básica utilizada, já citada e explicada acima, é vista na figura abaixo:

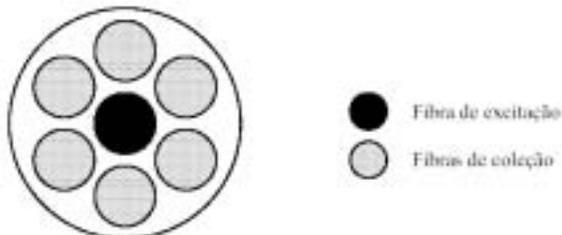


Figura 5 - Geometria das fibras de excitação e coleção. Na extremidade proximal da coleção, as fibras são arranjadas em linha, uma ao lado da outra, facilitando desta maneira o acoplamento da luz coletada pelo catéter na entrada tipo fenda do espectrógrafo.

Descrição do Sistema de Detecção

“O sinal coletado pelo conjunto de fibras ópticas transmitem a fluorescência emitida pela amostra até o detector CCD. Como mencionado anteriormente, a extremidade proximal de coleção do catéter de fibras ópticas é arranjada em linha, de forma a permitir maior ganho no acoplamento da radiação coletada à fenda do espectrógrafo. Utiliza-se uma lente com distância focal de 16 mm entre a extremidade do catéter e a entrada do espectrógrafo. A luz, ao chegar ao espectrógrafo, é dispersada atingindo a superfície do detector. Pela utilização de um espectrógrafo, obtemos vantagens com relação ao tempo de aquisição dos espectros refletidos, pois a dispersão permite que todos os pontos do

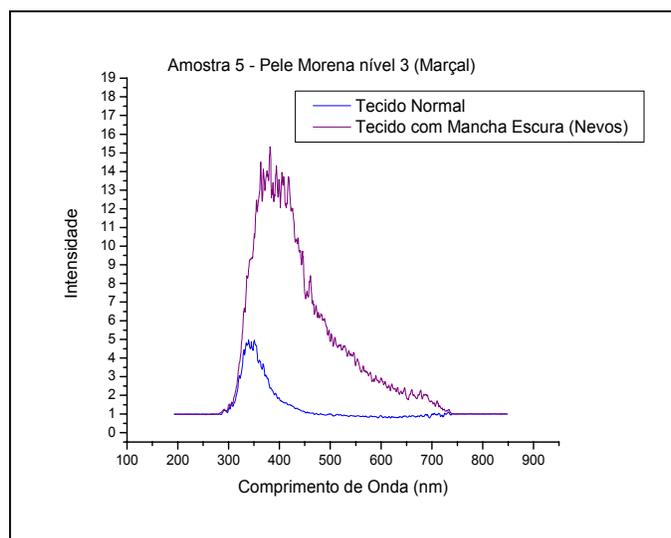
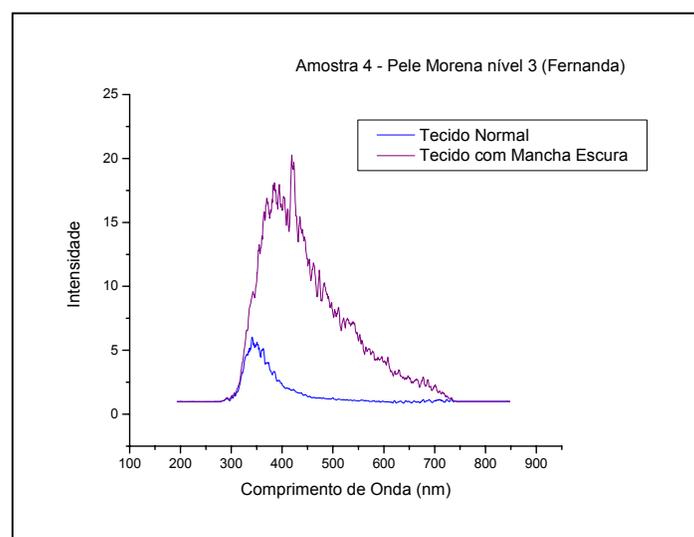
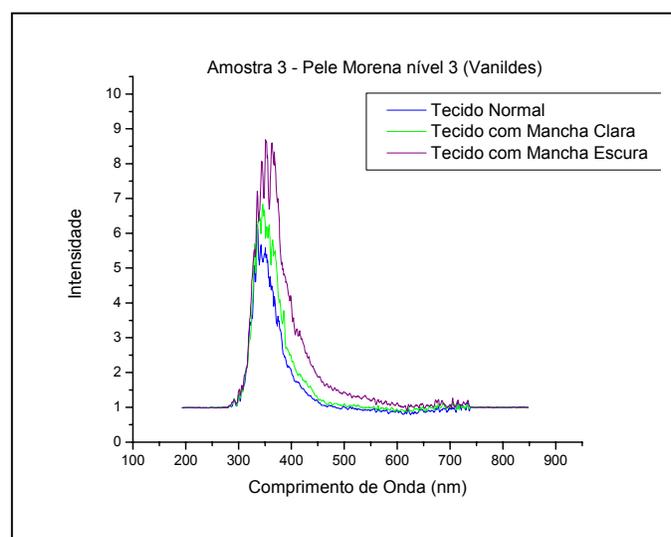
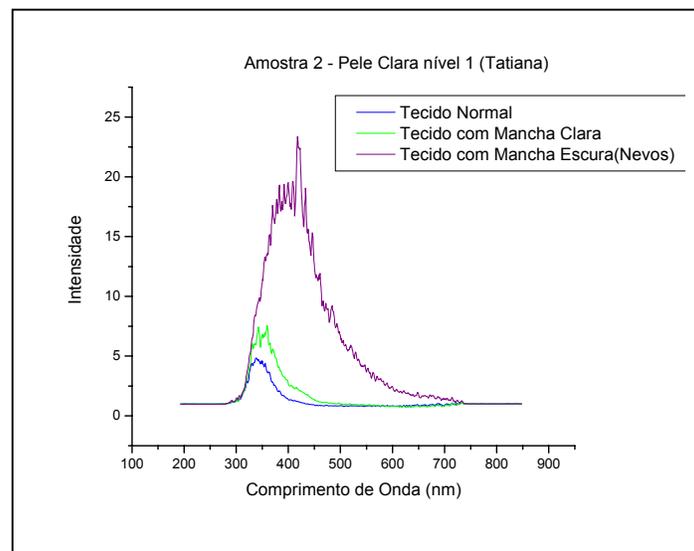
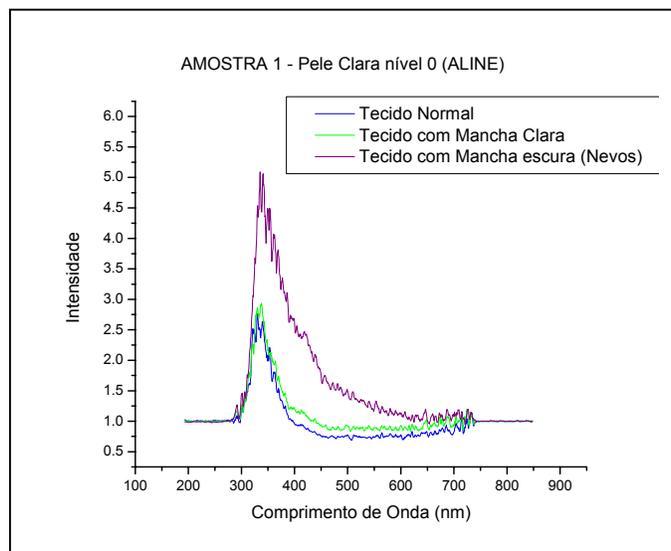
espectro de fluorescência sejam adquiridos de uma única vez, pela varredura do detector.

“O sistema é controlado pelo software Andor ICCDs. que faz a interface entre o computador e o controlador do detector. Este software possui uma série de comandos do tipo linguagem dedicada para o controle de suas principais funções. Estes comandos de controle podem ser introduzidos nos experimentos permitindo virtualmente o controle de todas as funções do sistema e conseqüentemente, a realização de qualquer tipo de experimento. O software faz a aquisição de todos os espectros em seqüência, e mostra no monitor do microcomputador todos os dados adquiridos.”. (ZÂNGARO et al., 1996 b). O software exporta os dados em formato ASCII, facilitando o processamento posterior o qual foi realizado no software Origin



Figura 6
Sistema de Aquisição: Espectrofluorímetro

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO



Os resultados obtidos, conforme os gráficos apresentados, sugerem maiores investigações na diferença entre as intensidades obtidas nos tipos de pigmentação utilizados no experimento. Naturalmente cores claras têm um fator de refletância superior as cores escuras, porém observa-se no experimento, que em tecido normal a intensidade de luz irradiada é consideravelmente inferior a intensidade do tecido com pigmentos escuros. A composição do tecido com pigmentação escura, os nevos, apresentam coeficiente de absorção menor que o tecido normal, para a faixa espectral utilizada para excitação, entre 300 nm e 700 nm, gerando assim uma reflexão mais intensa que em pigmentação mais clara.

A criação de um banco de dados contendo amostras de tecidos que caracterizam as diversas patologias do tecido, é um ponto de partida para que seja traçado um perfil espectral, com o objetivo de otimizar o processo de diagnóstico.

4. CONCLUSÃO

O comportamento espectral da pele apresenta variações devido a não homogeneidade do coeficiente de absorção.

Os nevos apresentam coeficiente de absorção menor que a pele normal, evidenciando nos resultados obtidos através da fluorescência, o que é relevante é a constituição histológica do tecido e não a pigmentação.

É possível diferenciar tecidos biológicos através da técnica de espectroscopia por fluorescência, possibilitando diagnóstico de patologias dermatológicas de modo não invasivo, e principalmente caracterizando-as em tempo real. O diagnóstico deverá ser feito em patologias com a mesma caracterização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUGO, O. O.; GRZYCZYNSKI, Z.; LAKOWICZ, J. R. Preliminary studies on the use of modulation sensing for non-invasive monitoring of drug compliance. In: **Advances in Fluorescence Sensing Technology, 4: Proceedings**. Bellingham: SPIE, 1999, v.3602, p.297-308.

ANDERSSON-ENGELS, S. et al. Preliminary evaluation of two fluorescence imaging methods for the detection and the delineation of basal cell carcinomas of the skin. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.26, p.76-82, 2000.

BRACALEON, L. et al. *In vivo* fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer. **Photochemistry and Photobiology**. v.73, n.2, p.178-183, 2001.

CANPOLAT, M.; MOURANT, J. R. Monitoring photosensitizer concentration by use of a fiber-optic probe with a small source-detector separation. **Applied Optics**. v.39, n.34, p.6508-6514, 2000.

DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Básica**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. P. 173-176.

DENISOV, N. A.; GRIFFIN, S. E. Contact fiber probes for *in vivo* optical spectroscopy comparative analysis. In : **Optical Biopsy, 2: Proceedings**. Bellingham: SPIE, 1998, v.3250, p.44-55.

FURUZAWA, S. K. et al. Distribution of Protoporphyrin IX (PPIX) induced by aminolevulinic acid (5-ALA) in the skin and liver of rats. In : **Optical Methods for Tumor Treatment and Detection Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy, 8: Proceedings**. Bellingham: SPIE, 1999, v.3592, p.89-93.

JOHANSSON, J. et al. Laser-induced fluorescence studies of normal and malignant tumour tissue of rat following intravenous injection of δ - amino levulinic acid. **Lasers**

in Surgery and Medicine. v.20, p.272-279, 1997.

JÖNSSON, A. et al. Quantification of burn induced extravasation of Evan's blue albumin based on digital image analysis. **Computers in Biology and Medicine.** v.28, p.153-167, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 303-314.

KATZ, A. et al. Fluorescence ratio mapping system for tissues diagnosis. In: **Optical Biopsy, 2: Proceedings.** Bellingham: SPIE, 1998, v.3250, p.64-67.

MAJUMDER, S. K.; GUPTA, P. K. Synchronous luminescence spectroscopy for oral cancer diagnosis. **Lasers in the Life Sciences.** v.9, p.143-152, 2000.

Melo, Milene da Silva; Análise da Dinâmica de Edemas Agudos em Pele de Ratos utilizando Espectroscopia de Fluorescência; UNIVAP, 2002.

POWELL, P. N. Spectroscopy provides real-time optical biopsy. **Laser Focus World.** v.36, n.5, p.52-56, 2000.

ROSS, M. H.; REITH, E. T.; ROMRELL, L. J. **Histologia: Texto e Atlas.** 2.ed. São Paulo: Médica Panamericana, 1993. p. 347-377.

SILVEIRA JÚNIOR, L. **Projeto e Desenvolvimento de um Espectrofluorímetro e Obtenção de Matrizes de Excitação/Emissão: Diagnóstico de Displasias do Trato Gastrointestinal.** 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica – Lasers e Instrumentação Opto Eletrônica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba. 1996.

STAVEREN, H. J. et al. Fluorescence imaging and spectroscopy of ethil Nile blue A in animal models of (pre) malignancies. **Photochemistry and Photobiology.** v.73, n.1, p.32-38 2001.

THOMSEN, S. Anatomic na Physiologic factors influencing transcutaneous optical diagnosis of deep-seat lesions. In: **Optical Biopsy, 2: Proceedings.** Bellingham, SPIE, 1998, v.3250, p.130-139.

WANG, Z.; YEUNG, E. S. Fluorescence imaging of glutamate release in neurons. **Applied Spectroscopy.** v. 53, p.1502-1506, 1999.

XU, M. G.; WILLIAMS, E. D.; THOMPSON, E. W. Effect of handling and fixation processes on fluorescence spectroscopy of mouse skeletal muscles under two-photon excitation. **Applied Optics.** v.39, n.34, p.6312-6317, 2000.

ZÂNGARO, R. A. et al. Rapid multiexcitation fluorescence spectroscopy system for *in vivo* tissue diagnosis. **Applied Optics.** v.35, p.5211-5219, 1996 b.

ZELLWEGER, M. et al. *In vivo* autofluorescence spectroscopy of human bronchial tissue to optimize the detection and imaging of early cancers. **Journal of Biomedical Optics.** v.6, n.1, p.41-51, 2001.

ZWEIMAN, B. Mediators of allergic inflammation in the skin. **Clin Allergy.** v.18, n.5, p.419-433, 1988.

Sites consultados

<http://www.hefc.org.br/melanoma.htm>

<Http://www.saudetotal.com/publico/orienta/evos.htm>

<http://www.saudeparavoce.com.br/pintanapele/anatomia.htm>