



* B R 1 0 2 0 2 1 0 2 4 3 6 2 A 2 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021024362-7 A2

(22) Data do Depósito: 02/12/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
13/06/2023

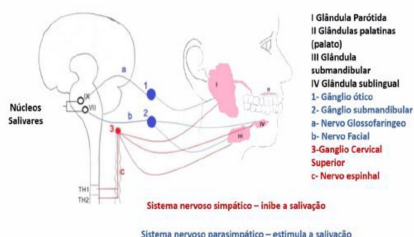
(54) **Título:** MÉTODO ÓPTICO PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER ORAL VIA SALIVA; USO DO MÉTODO E PROTÓTIPO

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/487; G01N 1/28; G01N 21/29; G01N 33/574.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO; FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC.

(72) **Inventor(es):** JANETE DIAS ALMEIDA; HERCULANO DA SILVA MARTINHO; GABRIELLE LUANA JIMENEZ TEODORO NEPOMUCENO; NAYARA DE SÁ RODRIGUES; MARIANA DE SÁ ALVES; JULIA TOLEDO FIGUEIREDO; CELSO MULLER BANDEIRA.

(57) **Resumo:** MÉTODO ÓPTICO PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER ORAL VIA SALIVA; USO DO MÉTODO E PROTÓTIPO. O presente pedido de patente consiste no desenvolvimento de uma técnica que indica que a inspeção visual direta e posterior análise das imagens em escala de cinza de micro gotas de saliva de indivíduos com e sem câncer oral tem elevado potencial de diagnóstico da patologia, com máxima exatidão (100%). Pode-se afirmar que o processo de segregação de biomoléculas em microescala dentro da área das micro gotas de saliva fornece informações suficientes para discriminar os indivíduos, desde que as condições de diluição e secagem sejam as preconizadas pelo procedimento aqui apresentado. Em resumo, as imagens ópticas obtidas de gotas secas de salivas de indivíduos saudáveis e com câncer oral, depositadas sobre substratos de Pt (discos rígidos de computadores) permitem a discriminação entre os indivíduos de modo rápido, simples, não-invasivo e de baixo custo. Ressalte-se ainda o aspecto de reaproveitamento de lixo eletrônico (disco rígido de computadores). Estimativas indicam que aproximadamente 40 milhões de toneladas de lixo eletrônico são geradas por ano no mundo, causando também efeitos colaterais ao meio ambiente e saúde.



MÉTODO ÓPTICO PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER ORAL VIA SALIVA; USO DO MÉTODO E PROTÓTIPO

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente compreende um processo de segregação de biomoléculas em microescala dentro da área de gotículas de saliva, e o uso do processo para identificação de alterações morfológicas no perfil do resíduo evaporado, que permitam diagnosticar doenças, como câncer de boca, por meio da análise de padrões de imagens.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] O presente pedido de patente de invenção compreende a área da medicina, em específico o câncer oral.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] O câncer oral é definido como uma neoplasia maligna, podendo ocorrer no lábio e/ou em mucosa de revestimento da cavidade oral. É o sexto tipo de câncer mais incidente em todo o mundo, com maior incidência em homens do que em mulheres. Em 90% dos casos, o câncer oral se origina de células escamosas, por isso é chamado como carcinoma de células escamosas, ou carcinoma espinocelular da cavidade oral.

[004] O câncer de boca é responsável por uma morte por hora, sendo diagnosticado aproximadamente 145 novos caso todos os dias nos EUA. No Brasil, o número estimado de novos casos para cada ano, de 2020 a 2022, é de 11.180 casos em homens e 4.010 em mulheres. Esse tumor maligno pode afetar a própria boca, a parte posterior da boca (orofaringe) e os lábios. Sabe-se que o uso de tabaco, incluindo tabaco sem fumaça e consumo excessivo de álcool, pode ser encontrado como a principal via que leva ao câncer de boca. Diversos estudos citam como principais causas para o surgimento do câncer oral, o tabagismo, o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, papilomavírus humano (HPV), exposição solar e até mesmo a falta de higiene bucal. O tabagismo pode contribuir para o desenvolvimento do câncer oral devido às alterações provocadas na estrutura celular da cavidade oral, além de contribuir para a deficiência no sistema imunológico do fumante, propiciando condições para a formação de um tumor, e ainda mais um tumor maligno. Já o consumo do álcool

(etanol) induz o aumento da permeabilidade da mucosa oral, dissolvendo componentes importantes da estrutura epitelial, causando atrofia e a alteração na síntese e reparo de DNA, além de ter efeitos mutagênicos, diminuição do fluxo salivar e comprometer as funções fisiológicas de órgãos que lidam com compostos carcinogênicos como o fígado.

[005] Histopatologicamente, 95% dos tumores malignos orais são classificados como carcinoma de células escamosas (CCE). O CCE é geralmente precedido por lesões conhecidas como distúrbios orais potencialmente malignos (DOPM), com uma alta tendência para transformação maligna. Sabe-se que a carcinogênese oral é um processo de várias etapas no qual o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas hereditárias ou adquiridas levam a um desequilíbrio na função dos oncogênes e genes supressores de tumores.

[006] A iniciativa chamada "The Cancer Genome Atlas" é projeto iniciado em 2005, coordenado pelo "National Cancer Institute" dos Estados Unidos, que cataloga mutações genéticas responsáveis pelo câncer, usando sequenciamento genético e bioinformática. Através de seus resultados, reconhece-se atualmente que o diagnóstico precoce é um alvo importante a ser atingido antes do início da transformação maligna.

[007] Uma importante causa do crescente número de casos de câncer oral está relacionada a limitações quanto ao diagnóstico precoce e preciso da doença.

[008] A maioria dos diagnósticos do CCE oral é feito quando a patologia está em estágio avançado, o que leva ao aumento da mortalidade e morbidade. É importante procurar alterações moleculares oriundas da carcinogênese oral para melhorar a triagem, as opções de tratamento e os resultados dos pacientes. A biópsia de tecido é o padrão-ouro para o diagnóstico de câncer bucal. No entanto, há importantes limitações neste método. As principais são:

- i) sua limitação espacial, pois fornece a análise de uma única região de um tumor heterogêneo, sujeito a viés de amostragem, e não pode ser obtida repetidamente;
- ii) necessita avaliação subjetiva de um profissional treinado o que não raro induz conflitos interpretativos. Os testes de triagem ou auxiliares de diagnóstico atualmente

disponíveis para o câncer bucal incluem exame oral convencional, coloração com azul de toluidina, citologia esfoliativa e biópsia acompanhado da histopatologia.

[009] A chamada biópsia líquida, é uma técnica minimamente invasiva, com alto potencial para caracterização de tumores. Ela permite o monitoramento da carga dinâmica de tumores e a vigilância ativa de recorrências de doenças. A identificação de novos biomarcadores moleculares e o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de identificá-las em tempo real (com o menor custo possível) é extremamente necessária. Uma vez que os biomarcadores que carregam assinaturas de vias patológicas específicas são identificados com precisão, o diagnóstico detalhado, individualizado, e precoce se viabiliza, bem como o desenvolvimento de drogas com alvos moleculares apropriadamente escolhidos para cada indivíduo.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[010] Este trabalho teve por objetivo responder as seguintes questões:

1. O processo de segregação de biomoléculas em microescala dentro da área das gotículas de saliva oriundas de indivíduos com e sem câncer oral, fornece informações suficientes para fornecer discriminação entre os indivíduos?
2. O controle das condições de diluição e secagem (umidade relativa, temperatura) permite controlar a segregação de biomoléculas na área das gotículas?
3. As imagens ópticas obtidas de gotas secas de salivas de indivíduos saudáveis e com câncer oral permitem a discriminação entre os indivíduos?

DESCRIÇÃO DA TECNOLOGIA

[011] A presente tecnologia refere-se a uma técnica de preparo e inspeção da saliva humana que permite a discriminação entre indivíduos com e sem câncer oral. A saliva é um biofluido corporal constituído por água e diversos tipos de proteínas; possuem biomarcadores, que trazem informações sobre o funcionamento do corpo humano. Tem-se proposto na literatura médico-científica a utilização da saliva para detecção de patologias, como por exemplo, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), diabetes, entre outras. Devido a alterações de composição bioquímica da saliva dos indivíduos com câncer comparativamente àqueles sem esta patologia, ao secar uma micro gota de saliva destes grupos de acordo com a metodologia preconizada a seguir, o padrão

formado após a evaporação é distintivo para cada grupo, permitindo a sua discriminação e diagnóstico por inspeção visual direta num microscópio óptico. A metodologia de secagem envolve depositar uma gota de 1 microlitro da saliva "in natura" sobre um substrato de platina (disco rígido inutilizado de computadores de mais de 5 anos) em condições de temperatura e umidade controladas. A imagem observada do padrão é distintiva para os pacientes com câncer oral, quando comparados aos indivíduos sem câncer. Além de seu baixo custo, a tecnologia é facilmente replicável e de rápida execução (24 horas) comparada com métodos convencionais de diagnóstico histopatológico (dias ou semanas). Possui ainda a vantagem de ser um método não-invasivo de diagnóstico, minimizando procedimentos médico hospitalares, internações e desconforto ao paciente. Por fim, permite a reutilização de um material considerado lixo eletrônico (computadores antigos) contribuindo para uma perspectiva de uso amigável ecologicamente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

[012] BIOMARCADORES EM FLUÍDOS CORPORAIS: Os biomarcadores são compostos imunorreativos encontrados nos fluídos e tecidos corporais, que contém assinaturas químicas do biofluido. Por exemplo, as proteínas presentes na saliva. Estes fluídos podem indicar função normal ou riscos de ocorrência de uma doença devido a alterações nos padrões comuns do fluido. O fluido corporal salivar tem sido utilizado como ferramenta de diagnóstico de doenças sistêmicas e crônicas como neoplasias, tendo como exemplo o câncer bucal.

[013] De acordo com o "*National Institute of Health*" dos Estados Unidos, um biomarcador é "uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos, processos patogênicos ou respostas Farmacológicas úteis para uma intervenção terapêutica". Há uma grande variedade de situações clínicas onde os biomarcadores são importantes para a identificação monitoramento e avaliação da saúde do paciente. Isso possibilita a prevenção, o tratamento e eventualmente a cura em pacientes com risco de desenvolver determinadas doenças ou com alguma patologia em fase precoce, bem como a avaliação à resposta ao tratamento e acompanhamento do quadro clínico.

[014] Diagnóstico de Patologias via Fluido Salivar: Embora alguns fluídos biológicos como amostras de sangue e urina, possuam disponibilidade e repetibilidade de amostragem, a análise de outros fluídos biológicos necessita de procedimentos invasivos, o que limita o seu uso na prática clínica. Um exemplo é o líquido cefalorraquidiano que exige uma punção lombar para a coleta. Outro exemplo a ser citado é o procedimento de biópsia de um tumor. O fluído salivar tem diversas vantagens sobre o sangue entre outros fluídos corporais. A sua coleta é não-invasiva e indolor, não trazendo incômodo aos pacientes, ao contrário da coleta de sangue, por exemplo. Além disso, a coleta do fluído salivar tende a ser um procedimento mais econômico, já que é facilmente obtida, transportada e armazenada.

[015] Estudos têm demonstrado que na saliva podem encontrar-se biomarcadores para doenças bucais, além da existência de biomarcadores inflamatórios que estão associados a problemas sistêmicos. Cada vez mais se identificam, por exemplo, moléculas específicas de doenças como câncer de mama, males cardiovasculares e vírus da imunodeficiência humana (HIV) nesse tipo de fluído corporal.

[016] A SALIVA: A saliva é um fluído homogêneo proveniente de três pares de glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual) e de outras glândulas que estão localizadas em várias regiões da mucosa bucal, como os lábios, a língua, as bochechas, o palato, a faringe, exceto nas gengivas e na região anterior do palato duro. A Figura 1 (Desenho esquemático das glândulas salivares) apresenta o esquema da produção de saliva no corpo humano que é realizada por diversas glândulas, e em especial pela glândula parótida.

[017] As glândulas salivares (I-IV na Fig.1) controlam a produção de saliva no corpo humano. O sistema nervoso simpático (gânglio cervical superior e nervo espinhal, 3 e c, respectivamente na Fig. 1), tem a função de inibir a produção de saliva enquanto o sistema nervoso parassimpático (1,2, a e b na Fig. 1) estimula a produção de saliva.

[018] As glândulas salivares humanas são capazes de produzir em média 1,5 litros de fluído salivar diariamente. A saliva compõe-se basicamente de água, sais, e uma grande quantidade de moléculas do sangue e um grupo de proteínas salivares. As proteínas mais relevantes são a α -amilase, histatinas, cistatinas, lactoferinas, lisozimas,

mucinas e proteínas ricas em prolina, ou derivadas do plasma sanguíneo como a albumina, a imunoglobulina e a transferrina.

[019] SECAGEM DE MICRO-GOTAS: Há um grande interesse na busca por novas tecnologias que permitam a caracterização rápida, não-invasiva e de baixo custo de sistemas biológicos. Essa necessidade é mais evidente no campo biomédico, onde o diagnóstico rápido combinado com baixo custo é um fator decisivo na redução da mortalidade. Tecnologias fotônicas têm sido empregadas para fins de diagnóstico de modo bastante promissor para, por exemplo, fornecer o diagnóstico precoce de cânceres e a avaliação em tempo real da septicemia.

[020] As alterações em proteínas, lipídeos, entre outras composições de um tecido ou amostra biológica são marcadores importantes para a comparação entre amostras de pacientes saudáveis e amostras de pacientes com algum tipo de patologia, como, por exemplo, tecidos com presença de células tumorais. Estas características composicionais podem originar características distintas. Como reportado por Cameron e colaboradores (J. M. Cameron *et al.*, *Analyst* 144, 6736, 2019), gelatinização parcial, formação de trincas, gradiente de concentração e heterogeneidades diversas podem ser observadas em micro gotas de biofluidos depois de secas. O processo de secagem, a diluição e as condições ambientais impactam no padrão formado após secagem. Tal padrão se torna importante para diversas aplicações como em processos industriais em triagem de medicamentos, bioensaios de impressão de DNA e também na área de espectroscopia vibracional, principalmente para utilização de biofluidos corporais para diagnóstico.

[021] Depois que a evaporação da micro gota se inicia, três comportamentos diferentes associados a transições de fase específicas podem ser identificados: transição sol-gel, cristalização de sal ou macromoléculas, e a transição de cristalização e transição vítrea em gotículas coloidais. Por conta destes processos, podem ser buscas assinaturas na mancha seca, como a forma e o tamanho dos cristais formados, a morfologia dos agregados cristalinos ou a morfologia dos padrões de trincas no resíduo deixado após a secagem.

[022] Por exemplo, Bahmani, Neysari e Maleki (L. Bahmani, M. Neysari, e M. Maleki, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 513, 66, 2017) estudaram a formação de padrões de gotas oriundas de amostras de sangue total de indivíduos normais e de acometidos por talassemia. A Figura 2 (Imagens da deposição final da gota de sangue de (a) um homem saudável de 31 anos, (b) um homem de 19 anos com talassemia e (c) um bebê masculino com icterícia, onde a barra de escala é de 1 mm), exemplifica os padrões observados em fotografias obtidas das gotas de sangue seco de (a) uma pessoa saudável, (b) uma pessoa com talassemia e (c) um recém-nascido com icterícia. A formação do padrão de trincas é muito distinta entre os grupos. As diferenças de nível e pressão de bilirrubina devido à viscosidade de cisalhamento da dispersão no sangue, fração de volume de partículas em embalagem próxima e espessura inicial do filme foram invocadas pelos autores para explicar seus resultados.

MATERIAIS E MÉTODOS

OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

[023] A coleta das amostras utilizadas foi coordenada pela Profa. Dra. Janete Dias Almeida, do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal UNESP, Campus de São José dos Campos (UNESP-SJC). A metodologia foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP-SJC (protocolo no 1.033.312/2015 PH/CEP). Após serem esclarecidos sobre a proposição e condições deste trabalho, os pacientes que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram considerados critérios de não inclusão: pacientes que já foram submetidos a qualquer tipo de tratamento oncológico, quer seja cirurgia, radio ou quimioterapia em qualquer órgão ou sistema, bem como casos de CCE de lábio.

[024] As amostras foram constituídas por saliva de pacientes consecutivos que deram entrada para diagnóstico e tratamento no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Municipal José Carvalho de Florence na cidade de São José dos Campos/SP, do Hospital e Maternidade Celso Pierro da Pontifícia Universidade Católica de Campinas/SP (PUC-Campinas) e do Hospital Municipal Mario Gatti de Campinas/SP, com diagnóstico de CCE bucal com idade acima de 18 anos. Após a coleta, as

amostras foram imediatamente armazenadas em tubos criogênicos devidamente identificados e numeradas e mantidos sob refrigeração em nitrogênio líquido durante o transporte. Após, foram imediatamente armazenadas em ultra-freezer (-80°C). As amostras de salivas foram separados em dois grupos rotulados como CA (pacientes com a patologia) e CN (grupo controle).

CONDIÇÕES DE PREPARO

[025] Os principais parâmetros a serem considerados para garantir reprodutibilidade nos padrões de secagem são diluição da amostra, temperatura de secagem e umidade relativa durante a secagem. As diluições testadas foram 1:2; 1:5; 1:10; 1:15; 1:20; 1:30; 1:35, além da amostra sem diluição. Estas diluições foram testadas a partir resultados reportados na literatura.

[026] Trabalhos publicados envolvendo outros biofluidos indicam que a melhor condição envolve secagem em ambiente com umidade relativa 70%. Assim, para garantir as condições de preparo da saliva foi criado um ambiente estável com solução salina de NaCl (cloreto de sódio) que foi colocada dentro do dessecador mantido em equilíbrio por 24 horas, permitindo umidade relativa de 80%. A temperatura do ambiente foi controlada em 20°C.

[027] Após a estabilização do sistema as amostras foram retiradas do ultra-freezer, descongeladas em temperatura ambiente a 25°C e após pipetados 1 µL de saliva nos substratos. As gotas foram preparadas em triplicata. Os substratos contendo as salivas foram colocados no dessecador para a secagem em umidade relativa controlada como descrito acima. Os substratos permaneceram no dessecador por 24 horas.

[028] Os substratos ideais devem ser resistentes mecanicamente, possibilitarem boas imagens por reflexão no microscópio óptico e não oxidarem sob ação dos constituintes da saliva. A opção recai então sobre substratos revestidos de metais nobres como a platina. Optamos por reutilizar discos rígidos de computadores antigos (> 10 anos) por possuírem uma tênue camada de Pt em sua superfície. Atualmente estes objetos são considerados sucata eletrônica e representam um problema importante de gestão de resíduos. Os discos rígidos foram de 3,5 polegadas.

IMAGENS DO MICROSCÓPIO ÓPTICO

[029] Os substratos de platina contendo as salivas secas foram então levados para inspeção visual no microscópio óptico do laboratório da Central Experimental Multiusuário da Universidade Federal do ABC (UFABC). Foram utilizadas as objetivas com aumento de 5X, 10X e 20X. As imagens foram tratadas utilizando os softwares livres Imagem J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) e GIMP (<https://www.gimp.org/>). As imagens obtidas foram transformadas em escala de cinza 8 bits. Os histogramas de "grayscale" para cada gota foram posteriormente comparados. As etapas da metodologia estão resumidas na Figura 3 (Esquema de preparação de amostra de saliva, em que as salivas (1) contidas no tubo criogênico (2) foram diluídas em outro tubo criogênico (3) nas proporções indicadas no texto usando micropipeta (4); alíquotas de 1 µL foram então transferidas para o substrato de Pt (5), em que tal substrato foi acondicionado num dessecador (6) instalado em sala com temperatura controlada; uma solução saturada de NaCl (7) garantiu o controle da umidade relativa em 80%; após o tempo de secagem, as gotas foram inspecionadas no microscópio óptico (8), as imagens foram salvas e seguiram para processamento e análise).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

[030] A Figura 4 mostra o disco rígido de computador (3,5 polegadas) utilizado como substrato para as amostras. As gotas foram depositadas sequencialmente em triplicada para os indivíduos com câncer (CA, à esquerda) e sem câncer (CN, à direita), apresenta as imagens dos discos rígidos contendo as gotas das amostras CA e CN após submetidas ao processo de secagem. Como se evidencia na sequência, o ambiente com alta umidade relativa propicia a secagem da amostra de forma gradativa, permitindo que os componentes bioquímicos secassem homoganeamente.

[031] A diluição em várias proporções foi realizada a fim de obter a amostra com maior homogeneidade, como já discutido na seção III. As imagens relativas às diversas diluições são apresentadas na Figura 5 (Testes de diluição. Imagens ópticas com aumento de 5X para diluições 1:35 (A), 1:30 (B), 1:20 (C), 1:15 (D), 1:10 (E), 1:5 (F), 1:2 (G), sem diluição (H) para algumas salivas do grupo CN.) A inspeção visual direta permite inferir que as amostras com concentração crescente possuem menor dispersão de manchas e granulosidades em sua área.

[032] Uma maneira de quantificar esta dispersão é transformando as imagens em escala de cinza e comparando o perfil dos histogramas formados. Estes perfis estão mostrados na Figura 6 (Histogramas para as imagens ópticas com aumento de 5X para diluições 1:35 (A), 1:30 (B), 1:20 (C), 1:15 (D), 1:10 (E), 1:5 (F), 1:2 (G), sem diluição (H) para algumas salivas do grupo CN) para as todas as diluições. É claro o alargamento do histograma quando se compara a amostra mais diluída (A) com a amostra mais concentrada (H). Esta última possui valores não nulos para escala de cinza em todo o intervalo de cor da imagem, havendo um deslocamento para tons de 80, mais escuros. Esta condição apresenta-se como a mais homogênea.

[033] Outro aspecto a ser verificado é formação de gradiente de concentração nas bordas, também chamado na literatura de “*coffeering*”. A Figura 7 (Imagens ópticas com aumento de 20X para diluições 1:35 (A), 1:30 (B), 1:20 (C), 1:15 (D), 1:10 (E), 1:5 (F), 1:2 (G), sem diluição (H) para algumas salivas do grupo CN), apresenta imagens das mesmas amostras discutidas anteriormente agora com aumento de 20X. É nítida a ausência de “*coffeering*” para as amostras F, G e H. Por conta da facilidade de preparo, dispensando diluição, concluímos a condição H é a mais adequada.

[034] A Figura 8 (Imagens ópticas com aumento de 5X para salivas grupo controle CN (painel superior) a CA (painel inferior) sem diluição), apresenta a imagens ópticas com aumento de 5X para salivas grupo controle CN (painel superior) a CA (painel inferior) sem diluição. À primeira vista as imagens do grupo CA distinguem-se das do grupo CN por uma maior uniformidade e escurecimento. Cabe comentar que àquelas imagens mais escuras (G e I em CN, por exemplo) referem-se a indivíduos fumantes. Ainda, trincas específicas (como em CA-B) ocorrem nas amostras CA que não ocorrem em CN. Outro aspecto característico das imagens do grupo CA é a similaridade com terreno acidentado, um aspecto mais sólido e denso.

[035] Estas características qualitativas podem ser objetivamente analisadas comparando-se os histogramas de todas as imagens para os grupos CA e CN. A Figura 9 (apresenta o box plot para a escala de cinza para os grupos CA (preto) e CN (vermelho). As curvas sólidas representam as médias e as barras verticais os desvio-padrão das contagens para cada tom de cor) para ambos os grupos. O aspecto global

das curvas é bastante distinto para CA (preto) e CN (vermelho). A discriminação entre CA e CN é de 100% para tons abaixo de 15 e acima de 170. Para o restante dos tons, a discriminação é 80%.

PROPOSTA DE PROTÓTIPO

[036] A figura 10 ((1) Tampa rosqueável (2) Janela óptica (3) Disco rígido de computador ou outro substrato de mesma dimensão (4) Superfície porosa (5) Meio dessecante), apresenta a versão de protótipo a ser produzida com dimensões adequadas para substituir o estágio translator / platina de um microscópio óptico convencional.

DIFERENCIAL

[037] Baixo custo, rapidez e conforto ao paciente, pela dispensa da coleta da biópsia.

PROBLEMA

[038] Permitir diagnóstico não-invasivo (sem remoção de biópsia) e comparativamente mais rápido (24 horas) de câncer bucal. O padrão ouro de diagnóstico atualmente (histopatologia) envolve a remoção de uma biópsia de tecido, o pré-processamento da mesma e observação que dura, em média, algumas semanas.

ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO

[039] As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas sob a supervisão da professora Janete Dias Almeida do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal UNESP, Campus de São José dos Campos, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética (protocolo nº1.033.312/2015 PH/CEP). Assim, a aluna do programa de pós-graduação em Nanociências e Materiais Avançados Gabrielle Luana Jimenez Teodoro Nepomuceno, iniciou seu mestrado no terceiro quadrimestre de 2018. O tema de sua pesquisa foi diagnóstico de câncer de boca, utilizando tais amostras de saliva de pacientes com câncer de boca e pacientes do grupo controle, para tanto, testou-se alguns tipos de substratos para depositar tais tipos de amostras e prosseguir o estudo. Após seis meses de sua pesquisa foi desenvolvido o estudo de evaporação das amostras de saliva. Tal estudo pretendeu-se avaliar a formação do efeito chamado “*coffee-ring*” nas amostras, e qual a metodologia de evaporação/secagem das amostras que não obtivessem tal efeito. Realizou-se após os estudos de evaporação,

os testes de diluição das amostras de saliva, a fim de avaliar quais as diluições que não obtivessem o efeito “*coffee-ring*” obtendo então o fator de diluição mais homogêneo. Assim que os testes de diluição foram realizados, analisados e foi feita a escolha da metodologia de preparo das amostras, foi feito o preparo das amostras, as imagens de microscópio, os histogramas e os demais experimentos necessários, que demonstraram os resultados de separação dos grupos de estudo que foram apresentados no exame de qualificação. A partir do exame de qualificação foram realizadas as demais análises dos grupos de estudo e a defesa de mestrado da aluna em dezembro de 2020.

REIVINDICAÇÕES

1. **MÉTODO ÓPTICO PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER ORAL VIA SALIVA**, o dito método óptico **caracterizado por** compreender a técnica de preparação da saliva humana em um ambiente estável com solução salina de NaCl (cloreto de sódio) que foi colocada dentro do dessecador mantido em equilíbrio por 24 horas, permitindo umidade relativa de 80% em que temperatura do ambiente foi controlada em 20°C; em que micro gotas de saliva (1 microlitro) foram preparadas e os substratos contendo as salivas foram colocados no dessecador para a secagem em umidade relativa controlada com os substratos permanecendo no dessecador por 24h.
2. **MÉTODO ÓPTICO PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER ORAL VIA SALIVA**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelos** principais parâmetros a serem considerados para garantir reprodutibilidade nos padrões de secagem que são tipo de substrato (platina), temperatura de secagem (25°C), umidade relativa (80%) e tempo de espera para secagem (24 horas) durante a secagem.
3. **USO DO MÉTODO ÓPTICO PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER ORAL VIA SALIVA**, o dito uso **caracterizado por** ser utilizado para o diagnóstico do câncer oral via saliva, de acordo com o descrito nas reivindicações 1 e 2.
4. **PROTÓTIPO caracterizado por** compreender: (1) tampa rosqueável; (2) janela óptica; (3) disco rígido de computador ou outro substrato de mesma dimensão (4); superfície porosa; (5) meio dessecante e em que apresenta a versão de protótipo a ser produzida com dimensões adequadas para substituir o estágio translator / platina de um microscópio óptico convencional.

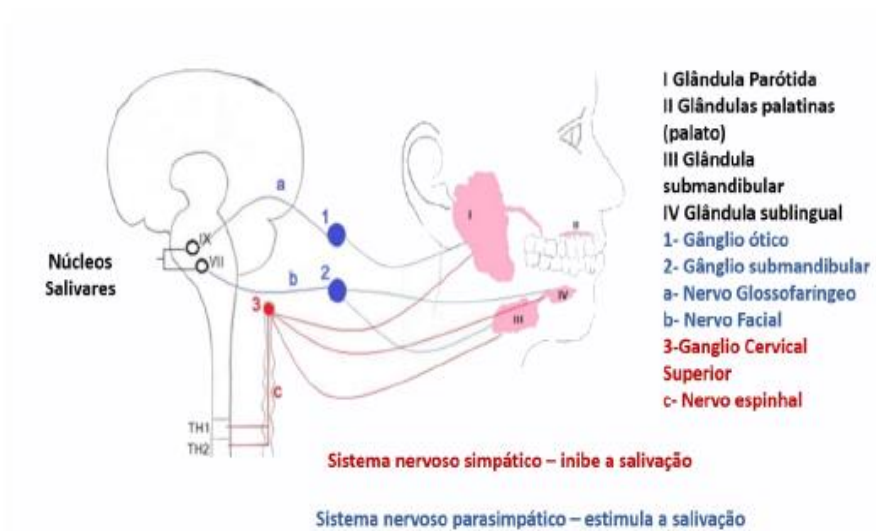


FIGURA 1

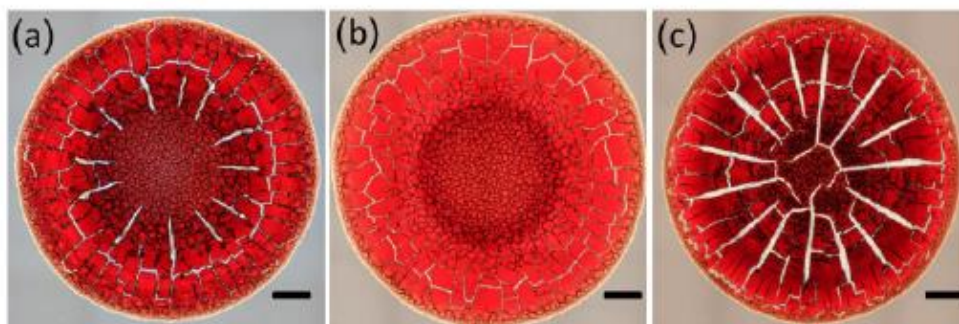


FIGURA 2



FIGURA 3

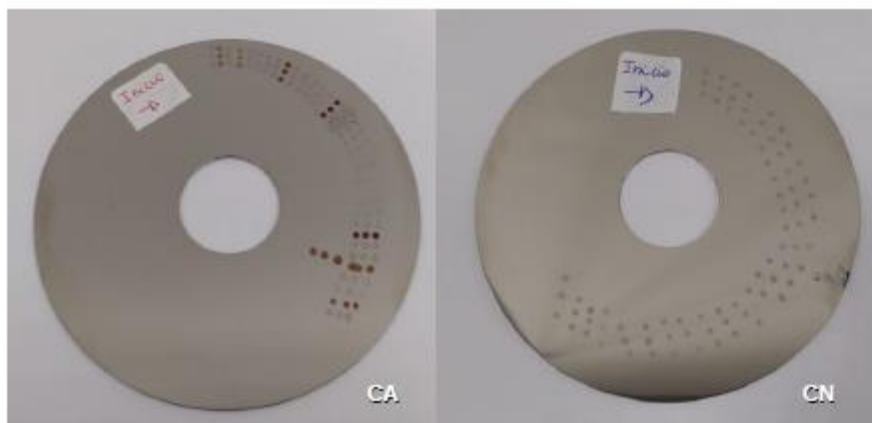


FIGURA 4

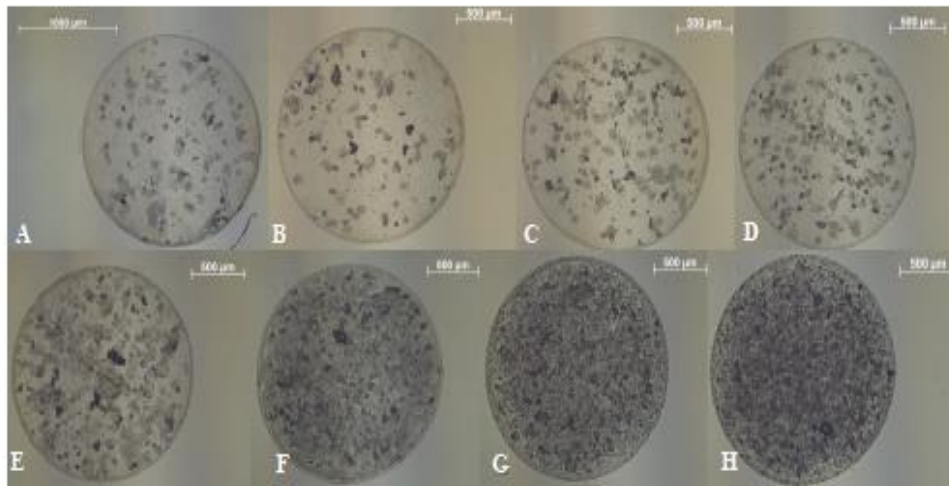


FIGURA 5

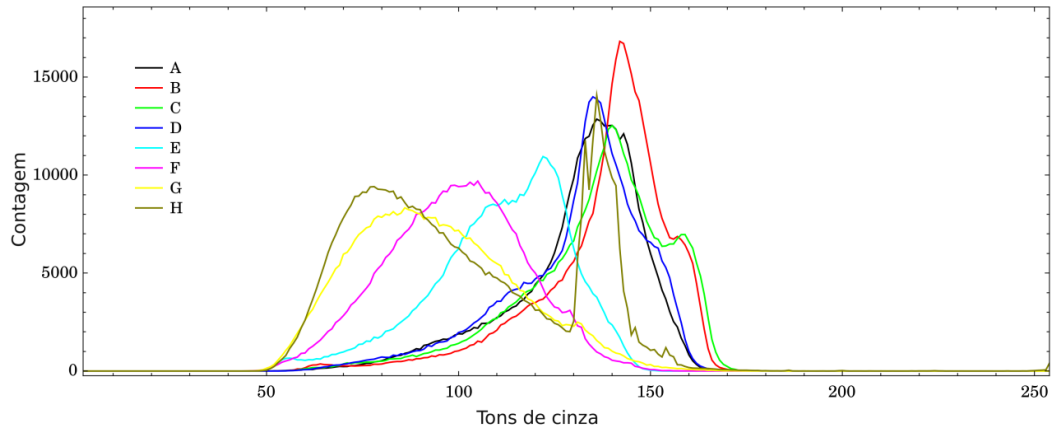


FIGURA 6

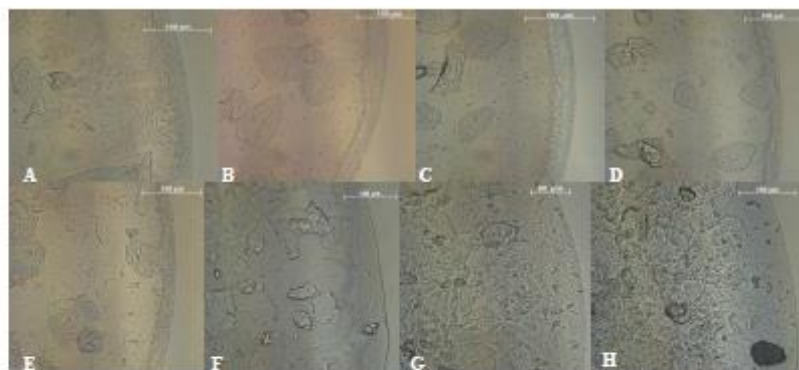


FIGURA 7

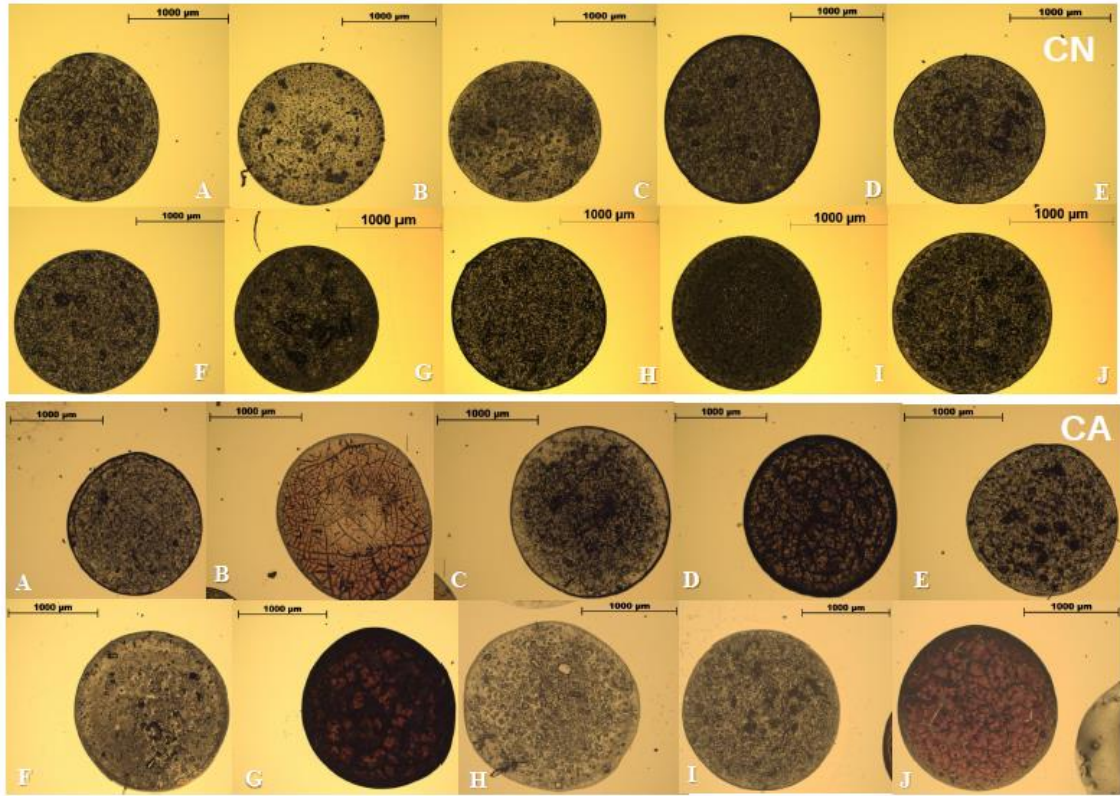


FIGURA 8

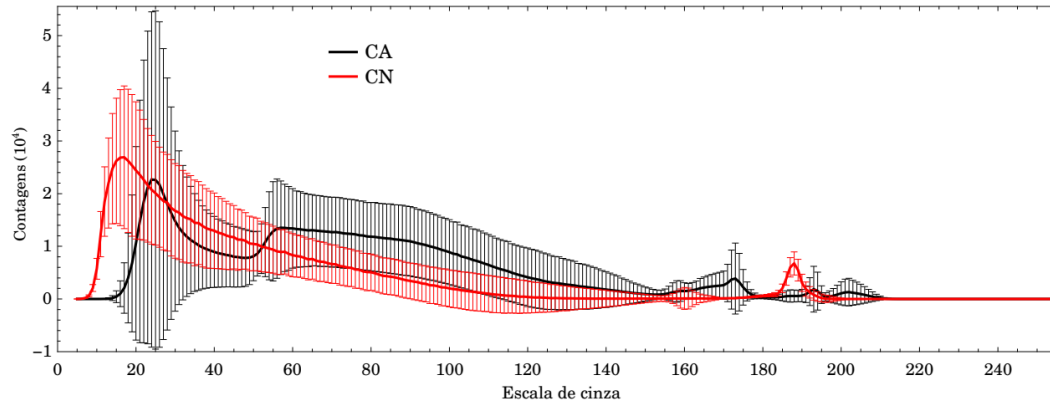


FIGURA 9

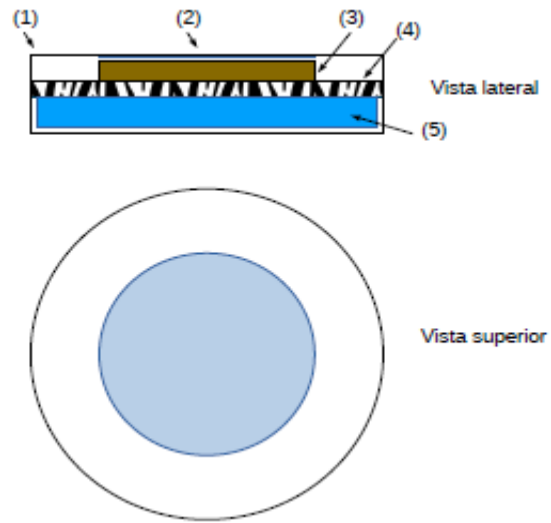


FIGURA 10

RESUMO

MÉTODO ÓPTICO PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER ORAL VIA SALIVA; USO DO MÉTODO E PROTÓTIPO.

O presente pedido de patente consiste no desenvolvimento de uma técnica que indica que a inspeção visual direta e posterior análise das imagens em escala de cinza de micro gotas de saliva de indivíduos com e sem câncer oral tem elevado potencial de diagnóstico da patologia, com máxima exatidão (100%). Pode-se afirmar que o processo de segregação de biomoléculas em microescala dentro da área das micro gotas de saliva fornece informações suficientes para discriminar os indivíduos, desde que as condições de diluição e secagem sejam as preconizadas pelo procedimento aqui apresentado. Em resumo, as imagens ópticas obtidas de gotas secas de salivas de indivíduos saudáveis e com câncer oral, depositadas sobre substratos de Pt (discos rígidos de computadores) permitem a discriminação entre os indivíduos de modo rápido, simples, não-invasivo e de baixo custo. Ressalte-se ainda o aspecto de reaproveitamento de lixo eletrônico (disco rígido de computadores). Estimativas indicam que aproximadamente 40 milhões de toneladas de lixo eletrônico são geradas por ano no mundo, causando também efeitos colaterais ao meio ambiente e saúde.