

Simone Karst Passos

**Terapia fotodinâmica com ácido 5-amino-levulínico
em nanoemulsão no tratamento de queratoses actínicas
e câncer de pele não melanoma: estudo clínico**

Tese submetida à Faculdade de Medicina
da Universidade de Brasília para a
obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco

Brasília – DF

2012

Índice

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução	1
1.1 Fatores de risco do câncer de pele não melanoma (CPNM)	3
1.2 Carcinoma basocelular (CBC)	4
1.3 Doença de Bowen – carcinoma epidermóide in situ grau III	5
1.4 Queratose actínica (QA)	7
1.5 Campo de cancerização	9
1.6 Tratamento do câncer de pele não melanoma e do campo de cancerização	10
1.7 Terapia Fotodinâmica (TFD)	13
1.7.1 A reação fotodinâmica	14
1.7.2 Mecanismo de ação da reação fotodinâmica	16
1.7.3 Fontes de luz	19
1.7.4 Substâncias fotossensibilizantes (FS)	22
1.8 Situação atual da TFD na oncologia cutânea	24
1.9 Nanotecnologia	26
2. Objetivos	29
3. Metodologia	31
Parte I - Lesões localizadas	32
3.1 Pacientes	32
3.2 Fármaco fotossensível (pró-fármaco)	33
3.3 Equipamento eletromagnético: Fonte de Luz	33
3.4 Fluorescência	34
3.5 Protocolo de procedimento	35
3.5.1 Avaliação da cura	36
3.5.2 Avaliação da dor	37
3.5.3 Avaliação de outros efeitos adversos	37
3.5.4 Avaliação do resultado estético	37
3.6 Análise Estatística	37

Parte II – Campo de cancerização	38
3.7 Pacientes	38
3.8 Fármacos fotossensíveis	38
3.9 Procedimento	39
3.10 Análise do campo de cancerização pelo Software	40
3.11 Análise estatística	40
4 . Resultados	41
4.1 Caracterização da amostra NanoALA	42
Parte I – Terapia fotodinâmica nas lesões localizadas	44
4.2 A amostra NanoALA e intensidade de fluorescência	44
4.3 Caracterização da amostra de pacientes e das lesões tratadas	45
4.4 Eficácia da NanoALA-TFD nos pacientes	46
4.5 Eficácia da NanoALA-TFD nas lesões	46
4.6 Caracterização da amostra das lesões de acordo com o tipo de lesão diagnosticada (QA, CBC, DB) e protocolo usado (P1, P2,P3)	48
4.7 Eficácia da NanoALA-TFD de acordo com o tempo de oclusão e fontes de luz	49
4.8 Avaliação estética	51
4.9 Cura clínica em pacientes com queratoses actínicas (QA)	52
4.10 Eficácia e localização das lesões	54
4.11 Cura Clínica em pacientes com carcinoma basocelular superficial	55
4.12 Cura clínica de Carcinoma Basocelular e Doença de Bowen segundo período de oclusão, fontes de luz,protocolos e localização	57
4.13 Resposta clínica da Doença de Bowen após NanoALA-TFD	60
4.14 NanoALA-TFD e intensidade de dor	64
4.15 Intensidade de dor localizadas na face segundo tempo de oclusão e fontes de luz	67
4.16 Intensidade de dor na primeira e segunda sessões	67
4.17 Outros efeitos colaterais	69
Parte II - TFD e Campo de Cancerização	71
5 . Discussão	78
Parte I - Lesões localizadas	79
Parte II - Campo de cancerização	96
6. Conclusão	102
7. Referências Bibliográficas	104

Lista de Abreviaturas

ALA	ácido 5 aminolevulínico
ALA-TFD	terapia fotodinâmica realizada com ácido 5 aminolevulínico
BRF-200	ácido 5 aminolevulínico em nanoemulsão a 10% desenvolvido na Alemanha
CBC	carcinoma basocelular
CBCs	carcinoma basocelular superficial
CC	campo de cancerização
CPNM	câncer de pele não melanoma
DB	doença de Bowen
LED	luz emitida por diodo
MAL	metilaminolevulinato (Metvix®)
MAL-TFD	terapia fotodinâmica realizada com metilaminolevulinato
NanoALA	ácido 5 aminolevulínico em nanoemulsão a 20%
NanoALA-TFD	terapia fotodinâmica realizada com ácido 5 aminolevulínico em nanoemulsão a 20%
QA	queratose actínica ou ceratose actínica
Spot	cabeça aplicadora com luz emitida por diodo do aparelho Multiwaves, INDUSTRA- Brasil
Spot PDT	cabeça aplicadora com luz emitida por diodo para “photodynamic therapy”
Spot RED	cabeça aplicadora com luz emitida por diodo da cor vermelha “RED ”
TFD	terapia fotodinâmica
UV	radiação ultravioleta
UVA	radiação ultravioleta A
UVB	radiação ultravioleta B

Lista de Figuras

Figura 1.1	Efeito da irradiação da luz no fotossensibilizante dentro das células	13
Figura 1.2	Biossíntese do grupo heme	15
Figura 1.3	Modo de ação da terapia fotodinâmica	17
Figura 1.4	Propagação da luz através dos tecidos	19
Figura 1.5	Espectro de absorção da PpIX	20
Figura 3.1	Fluxograma da metodologia utilizada	35
Figura 4.1	Caracterização da NanoALA	43
Figura 4.2	Demonstração da intensidade da fluorescência em uma lesão de carcinoma basocelular superficial após 4 hs de oclusão com NanoALA	44
Figura 4.3	Representação da cura por paciente com 3 e 12 meses de seguimento para todos os diagnósticos	46
Figura 4.4	Representação da cura com 3 e 12 meses de acordo com todas as lesões e com cada diagnóstico	47
Figura 4.5	Estimativas de cura para os grupos 3(P2 +P3) e 4 horas de oclusão (P1)	51
Figura 4.6	Carcinoma basocelular superficial em paciente de 80 anos, tratado com NanoALA-TFD	58
Figura 4.7	Doença de Bowen bilateral, comprometendo áreas extensas em regiões massetéricas direita e esquerda, tratada com NanoALA-TFD	62
Figura 4.8	Regiões malar e massetérica direita em detalhe. A- Antes do tratamento. B – Seis meses após tratamento	64
Figura 4.9	Regiões malar e massetérica esquerda em detalhe. A- Antes do tratamento. B – Seis meses após tratamento	63
Figura 4.10	Intensidade da dor em todas as lesões para os períodos de 3 e 4 de oclusão	64
Figura 4.11	Intensidade da dor em todas as lesões de acordo com as fontes de luz utilizadas	65
Figura 4.12	Intensidade da dor em todas as lesões de acordo com o diagnóstico	65
Figura 4.13	Intensidade da dor para as localizações	66
Figura 4.14	Comparação do efeito de dor, por tipo de fonte de luz e localização	67
Figura 4.15	Intensidade da dor para as lesões localizadas na face para os períodos de 3 e 4 horas de oclusão	68

Figura 4.16	Intensidade da dor na face de acordo com a fontes de luz utilizadas	68
Figura 4.17	Sequência de imagens de fluorescência ao longo da sequência de 4 sessões	72
Figura 4.18	Imagem digital típica de área fluorescente da face do paciente enquanto sob iluminação de Wood lâmpada A e B, com a delimitação do polígono	73
Figura 4.19	Representação gráfica da evolução das áreas fluorescentes ao longo do tempo	74
Figura 4.20	Paciente antes e 6 meses após as 4 sessões de NanoALA -TFD e MAL-TFD. Figuras (A) –hemiface direita antes da MAL-TF; (B) 6 meses após; (C) –hemiface esquerda antes da MAL-TFD; (D) 6 meses após	76
Figura 4.21	Paciente antes e 6 meses após as 4 sessões de NanoALA -TFD e MAL-TFD	77
Figura 4.21	Detalhe do aspecto do dorso nasal direito e esquerdo antes e 6 meses após as 4 sessões de NanoALA –TFD (lado esquerdo) e MAL-TFD (lado direito). Destaque para a melhora da pele da cicatriz e da pele enxertada	77

Lista de Tabelas

Tabela 1.1	Fontes de luz utilizadas na terapia fotodinâmica	21
Tabela 1.2	Principais formulações do ALA	24
Tabela 3.1	Especificações técnicas das cabeças aplicadoras (spots) do equipamento eletrônico gerador de luz	34
Tabela 3.2	Descrição dos protocolos de acordo com o tempo de oclusão, tipo de fonte de luz, irradiância, fluência, tempo de exposição e distância das lâmpadas	36
Tabela 4.1	Parâmetros físico-químicos de nanocápsulas vazias (NC) e nanocápsulas contendo ALA (NC-ALA)	43
Tabela 4.2	Distribuição dos pacientes de acordo com a idade e sexo e distribuição das lesões de acordo com o diagnóstico e localização	45
Tabela 4.3	Resposta clínica ao NanoALA-TFD de todas as lesões e de acordo com o diagnóstico, e o seguimento de 3 e 12 meses .	48
Tabela 4.4	Distribuição das lesões dos pacientes de acordo com os protocolos submetidos e o diagnóstico	49
Tabela 4.5	Frequência de cura de acordo com os tempos de oclusão, e as fontes de luz aos 3 meses após TFD para todos os diagnósticos.	50
Tabela 4.6	Frequência de cura de acordo com os tempos de oclusão, e as fontes de luz aos 12 meses após TFD para todos os diagnósticos	50
Tabela 4.7	Distribuição dos pacientes portadores de queratoses actínicas de acordo com a idade, tipo de pele, e, das lesões de acordo a distribuição nos protocolos, localização e tamanho.	52
Tabela 4.8	Resposta clínica das queratoses actínicas a TFD no período de 3 meses de acordo com cada protocolo e o correspondente valor do p (95% de intervalo de confiança).	53
Tabela 4.9	Resposta clínica das queratoses actínicas a TFD no período de 12 meses de acordo com cada protocolo e o correspondente valor do p (95% de intervalo de confiança	54
Tabela 4.10	Resposta clínica das queratoses actínicas a TFD no período de 3 meses de acordo de acordo com a localização	54
Tabela 4.11	Resposta clínica das queratoses actínicas a TFD no período de 12 meses de acordo de acordo com a localização	55
Tabela 4.12	Distribuição dos pacientes portadores de CBCs de acordo com a idade, tipo de pele, e, das lesões de acordo a distribuição nos protocolos, localização e tamanho.	56

Tabela 4.13	Resposta clínica das lesões de CBCs e DB a NanoALA-TFD no período de 3 meses de acordo com cada protocolo e o correspondente valor do p (95% de intervalo de confiança).	57
Tabela 4.14	Resposta clínica das lesões de CBCs e DB a NanoALA-TFD no período de 12 meses de acordo com cada protocolo e o correspondente valor do p (95% de intervalo de confiança)	59
Tabela 4.15	Resposta clínica das lesões CBCs e DB de acordo com a localização para o período de 3 meses de seguimento e o correspondente valor do p (95% de intervalo de confiança).	59
Tabela 4.16	Resposta clínica das lesões CBCs e DB de acordo com a localização para o período de 12 meses de seguimento e o correspondente valor do p (95% de intervalo de confiança).	60
Tabela 4.17	Distribuição dos pacientes portadores de doença de Bowen de acordo com a idade e sexo, e, das lesões de acordo o diagnóstico e localização.	61
Tabela 4.18	Intensidade do edema das lesões de acordo com a localização, tempo de oclusão e fonte de luz	70
Tabela 4.19	Intensidade do edema das lesões de face logo após e 1 semana depois da primeira e segunda sessões	70

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) hoje está bem estabelecida como uma opção terapêutica para o câncer de pele não melanoma. Na tentativa de minimizar algumas das limitações da TFD relativas a sua penetração na pele, uma nova formulação do fotossensibilizante ácido aminolevulínico (ALA) foi desenvolvida: uma nanoemulsão (NanoALA) em que a concentração do ALA é 20%. Foram dois os objetivos deste estudo: i) investigar a resposta terapêutica e a tolerabilidade à TFD realizada com NanoALA (NanoALA-TFD) no tratamento das queratoses actínicas (QA), carcinoma basocelular superficial (CBCs) e doença de Bowen (DB); ii) realizar a avaliação temporal das áreas fluorescentes do campo de cancerização (CC) da face de três pacientes, estudo intra-indivíduo, comparando, o NanoALA ao recomendado metilaminolevulinato (MAL), usando um software especialmente desenvolvido para esse propósito. Para atender ao primeiro objetivo, foram tratados 65 pacientes e 184 lesões. O percentual de cura aos 3 e 12 meses foram de 95 e 86,5% para as QA (n=120), 91 e 97,3% para o CBCs (n=45) e 89,4% e 100% para a DB (n=19). O tempo de oclusão, fonte de luz, fluências, diagnóstico e localização não influenciaram na resposta clínica aos 12 meses de seguimento. A dor foi significativamente mais intensa na face quando comparada com os membros superiores e tronco. A NanoALA-TFD mostrou ser eficaz e ter boa tolerabilidade no tratamento das QA, CBCs e DB, além de excelentes resultados cosméticos. No que se refere ao segundo objetivo, com o software desenvolvido, observou-se que as constantes de tempo de decaimento (meia-vida), associada com a redução da área gravada luminescente demonstraram que o MAL apresentou meia-vida de 34,3 dias e o NanoALA, de 43,3 dias. Observou-se maior difusão (45%) e redução da área do campo de cancerização ligeiramente mais elevada (10%) durante a utilização de NanoALA em vez de MAL. Esses resultados mostram que NanoALA tem potencial para diagnosticar o campo de cancerização, mas, devido ao pequeno número de pacientes (n=3), não é possível afirmar que apresenta resposta clínica superior à do MAL no tratamento do CC.

Palavras chave: terapia fotodinâmica, queratose actínica, carcinoma basocelular, doença de Bowen, câncer de pele não melanoma, campo de cancerização, ácido 5-aminolevulínico, nanoemulsão, metilaminolevulinato (MAL)

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is now well established as a treatment option for nonmelanoma skin cancer. In an attempt to minimize some of the limitations of PDT related to its penetration into the skin, a new formulation of the photosensitizer aminolevulinic acid (ALA) has been developed: a nanoemulsion (NanoALA) where the concentration of ALA is 20%. There were two objectives of this study: i) to investigate the therapeutic response and tolerability of PDT performed with NanoALA (NanoALA-PDT) in the treatment of actinic keratosis (AKs), superficial basal cell carcinoma (BCC) and Bowen's disease (BD), ii) to perform an evaluation of the temporal fluorescent areas of the field cancerization (FC) of the face from 3 patients, an intra-individual study, comparing, metilaminolevulinato (MAL) and NanoALA, using a software specially developed for this purpose. To achieve the first objective, 65 patients and 184 lesions were treated. The clearance rate at 3 and 12 months were 95% and 86.5% for AK(n = 120), 91 and 97.3% for BCC (n = 45) and 89.4% and 100% for BD (n = 19). The occlusion time, light source, fluence, diagnosis, and location of lesions did not influence the clinical response at 12 months follow-up. The pain was significantly more intense in the face when compared to the upper limbs and trunk. The NanoALA-PDT proved to be effective and had good tolerability in the treatment of AK, BCC and BD, and excellent cosmetic results. For the second objective, with the developed software, it was observed that the time constants of the decay (half-life) associated with the reduction in luminescence recorded area showed that MAL had a half-life of 34.3 days while NanoALA 43.3 days. There was a higher diffusion (45%) and slightly higher reduction (10%) in the area of the field of cancerization when using NanoALA instead of MAL. These results show that NanoALA has the potential to diagnose the field cancerization, but due to the small number of patients (n=3), it is not possible to state that NanoALA presents clinical response higher than the MAL in the treatment of CC.

Keywords: photodynamic therapy, actinic keratosis, basal cell carcinoma, Bowen's disease, non-melanoma skin cancer, field cancerization, 5-aminolevulinic acid, nanoemulsion, methyl aminolevulinato (MAL)

1. Introdução

O câncer de pele não melanoma (CPNM), dentre todos os tipos de câncer, é o que ocorre em maior número e aquele cuja incidência mundial tem aumentado mais rapidamente nas últimas décadas (DIEPGEN & MAHLER, 2002; HOEY et al, 2007). Um aumento anual de 3-8% na incidência do CPNM tem sido relatado desde 1960, em todo o mundo (GREEN, 1992, GLASS & HOOVER, 1989). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012), em 2012, no Brasil, este tipo de câncer terá, tanto para homens, quanto para mulheres, as maiores taxas de incidência, com estimativas de 134.170 novos casos. No momento atual, a região Centro-Oeste apresenta maiores taxas de incidência, sendo mais incidente nos homens (124/100 mil habitantes), seguido pela região Sul (80/100 mil). Nas mulheres, CPNM é o mais frequente em todas as regiões, exceto para a região Sudeste onde é o segundo em taxas de risco. Enquanto para a região Centro-Oeste o risco é de 109/100 mil, na região Sudeste é de 91/100 mil habitantes (INCA, 2012).

Para explicar o aumento de incidência relatado, fatores importantes estão relacionados ao aumento da exposição solar devido à mudança de hábitos, o advento dos transplantes e uso de novas drogas imunossupressoras (DIEPGEN & MAHLER, 2002; HOEY et al, 2007). Está bem estabelecido que o dano solar à pele causado pela radiação ultravioleta (UV) inclui um espectro de alterações que progridem do dano solar à pele (fotodano) para queratoses actínicas (QA), carcinoma epidermóide *in situ* (CEC *in situ*) também chamado de doença de Bowen e, finalmente, para carcinoma epidermóide cutâneo (CEC) invasivo (GLOGAU, 2000).

Como câncer de pele não melanoma (CPNM) são agrupados o carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma epidermóide, também chamado espinocelular (CEC), os quais representam cerca de 70% e 25%, respectivamente, de todos os cânceres da pele. O melanoma maligno corresponde a 4% e a frequência de 1% restante corresponde às outras neoplasias cutâneas malignas (CASTRO et al, 1996; ALMEIDA & NAI, 2010). Embora agrupados como CPNM, os carcinomas CBC e CEC apresentam diferenças em suas características biológicas, etiopatogenia, evolução clínica e estratégias de gestão (MADAN, LEAR, SZEIMIES, 2010).

1.1 Fatores de risco do câncer de pele não melanoma (CPNM)

O principal fator de risco para o CPNM é a radiação ultravioleta (UV), incluindo a exposição terapêutica, UVA e UVB (Puvaterapia e Narrow Band). O dano ao DNA causado pelo UV, constatado por meio de primeiras alterações moleculares, se inicia na infância. Em consequência da exposição crônica e prolongada ao longo da vida, ocorre um acúmulo de mutações que culminarão com fotoenvelhecimento, lesões cutâneas pré-cancerígenas, como as QA, e cancerígenas, como o CEC e CBC (SVOBODOVA, WALTEROVA, VOSTALOVA, 2006).

São dois os mecanismos pelos quais a UV agride a pele. O primeiro é de forma direta pela absorção dos cromóforos da pele, especialmente os ácidos nucleicos, enquanto o segundo, de forma indireta, por fotossensibilização. Na forma direta a radiação ultravioleta B (UVB), a principal responsável, causa dano diretamente ao DNA celular. Na forma indireta, efetuada principalmente pela radiação ultravioleta A (UVA), o dano ocorre por via indireta, por meio dos fotossensibilizantes endógenos/exógenos que absorvem a radiação UV (SVOBODOVA, WALTEROVA, VOSTALOVA, 2006).

A exposição crônica ao UVB causa danos ao DNA através da formação de dímeros e de fotoprodutos (RODUST et al, 2009). Esses dímeros são frequentemente observados na mutação do gene P53 de CEC. Já a radiação UVA causa a geração de radicais livres, como os radicais reativos de oxigênio (ROS). Ao longo dos anos, com a exposições crônicas ocorre um acúmulo de mutações e estresse oxidativo causando inflamação, imunossupressão, fotoenvelhecimento e carcinogênese (JONASON et al, 1996; TOREZAN, 2011). A ação sinérgica do UVA e UVB gera uma grande cascata de eventos com infiltrado inflamatório, aumento da produção de prostaglandinas, liberação de várias interleucinas, aumentado a produção de ROS (JONASON et al, 1996; TOREZAN, 2011). A prostaglandina PGE₂ induz a proliferação celular e inibe a apoptose (SVOBODOVA, WALTEROVA, VOSTALOVA, 2006).

Uma vez induzida, a liberação de ROS ativa genes reguladores da produção de enzimas (RODUST et al, 2009; ROOS & KANIA, 2006). Quando ativadas, as cascatas enzimáticas contribuem para a liberação de interleucinas e metaloproteinases da matriz extracelular que são responsáveis por mais inflamação, carcinogênese e envelhecimento cutâneo (ISSA et al, 2009).

Embora a radiação UV seja o fator de risco mais importante para a patogênese de ambos CBC e CEC, o efeito sobre o risco de CEC é maior (KRICKER et al, 1995a). A exposição ao sol cumulativa ao longo da vida tem uma forte associação dose-resposta com o CEC, enquanto que a exposição intermitente ao sol e durante a infância parecem ser mais importantes para o CBC (KRICKER et al, 1995b; ROSSO et al, 1996).

Outros fatores de risco importantes são as alterações genéticas, o fenótipo (pele clara, fototipos I a III de Fitzpatrick (ver anexo 1), doenças hereditárias, doenças inflamatórias, inflamação crônica, imunossupressão e agentes mutagênicos como radiações ionizantes e arsênico (ROEWERT-HUBER, STOCKFLETH, KER, 2007; STOCKFLETH & KERL, 2006; SIDOROFF & THALER, 2010).

A imunossupressão, inflamação crônica e HPV costumam estar mais relacionados ao CEC, apesar de, em menor escala, também estarem associados ao aumento do CBC (LAMPROS et al, 1998). O aumento do risco após transplantes de órgãos sólidos ao longo do tempo é exponencial para o CEC, sendo linear para o CBC (LAMPROS et al, 1998).

O surgimento de CEC em imunossuprimidos, incluindo crianças, também tem sido associado ao uso de drogas, como o antimicótico voriconazole (COWEN et al, 2010). Os inibidores de BRAF, como vemurafenibe e dabrafenib, podem em 15 a 30% dos pacientes desencadear o surgimento de CEC ou queratoacantomas em indivíduos imunossuprimidos, incluindo crianças (SU et al, 2012).

Este conjunto de fatores de risco está, portanto, de uma forma ou outra, envolvido na indução dos CPNM, como CBC e CEC *in situ* ou Doença de Bowen e também nas queratoses actínicas e campo de cancerização.

1.2 Carcinoma basocelular (CBC)

O CBC é um tumor epitelial que em geral apresenta crescimento lento e afeta predominantemente caucasianos. As metástases são extremamente raras (LO et al, 1991, TING, KASPER, ARLETTE, 2005) e a morbidade resulta da invasão e destruição local, em particular na face, cabeça e pescoço (CIGNA et al, 2011).

Aproximadamente 70% dos CBC ocorrem na face, consistente com o papel etiológico da radiação solar. Quinze por cento deles estão presentes no tronco e só

raramente são diagnosticados em áreas como o pênis, vulva ou pele perianal. A apresentação clínica e a morfológica são diversas. Existem cinco tipos clínico-histológicos principais: nodular, superficial, micronodular, infiltrativo e esclerodermiforme (HABIF, 2005). Os subtipos nodular e superficial são os mais freqüentes correspondendo a 60% e 30% dos casos respectivamente e são os de melhor prognóstico. O subtipo CBC superficial ocorre com mais frequência no tronco e extremidades, podendo ocorrer também na face e pescoço (COLGAN et al, 2011).

A origem do CBC é controversa. Algumas teorias sugerem que têm como origem: (i) células basais da epiderme; (ii) células basais da epiderme e ocasionalmente do infundíbulo e bainha externa do folículo piloso; (iii) células germinativas epiteliais primordiais dormentes; (iv) células epiteliais pluripotenciais da camada basal que persistem ao longo da vida; (v) células da unidade pilosebácea; (vi) células de outras estruturas de apêndices cutâneos (RIGEL et al, 2005).

Tipicamente a lesão do CBC superficial (CBCs) é plana, rósea ou vermelha. Podem estar presentes leve descamação, borda translúcida elevada na periferia, áreas de regressão espontânea caracterizadas por atrofia e hipopigmentação. O diâmetro da lesão pode variar de poucos milímetros a vários centímetros. Múltiplas lesões podem estar presentes. O CBCs apresenta um crescimento predominantemente horizontal, o que justifica o grande tamanho dessas lesões. Margens laterais extensas subclínicas contribuem para as altas taxas de recorrência após a excisão de rotina (RIGEL et al, 2005).

Histologicamente, o CBCs mostra nódulos de células basais atípicas distribuídas horizontalmente na derme papilar com amplas conexões com a epiderme. Os focos de células basais contactam a epiderme. Não há extensões para a derme média ou profunda, mas sim um crescimento centrífugo superficial. Lóbulos de células basais mostram paliçada com as células basais periféricas e com as demais células dos outros tipos de CBC (RIGEL et al, 2005).

1.3 Doença de Bowen – carcinoma epidermóide in situ grau III

A doença de Bowen (DB) é uma manifestação clínica do carcinoma espinocelular intraepidérmico (*in situ*), originalmente descrito em 1912 (SIDOROFF & THALER,

2010). Ela compromete toda a epiderme, porém não invade a membrana basal da epiderme e, conseqüentemente, não invade a derme. Tende a crescer lentamente, aumentando ao longo do curso de anos (SIDOROFF & THALER, 2010). Ao contrário das desordens inflamatórias que podem preceder o surgimento de CEC, as lesões são usualmente assintomáticas. É encontrado com mais frequência em áreas expostas, como cabeça, pescoço e extremidades (SIDOROFF & THALER, 2010). Em 2007, foi classificada como carcinoma espinocelular *in situ* grau III (ROEWERT-HUBER et al, 2007)

A DB ou CEC *in situ* (ou CEC *in situ* grau III), se manifesta clinicamente como uma pápula ou placa descamativa, de margens bem definidas. As lesões são frequentemente eritematosas, mas podem ser da cor da pele normal ou pigmentadas. Dependendo da localização das lesões, achados histológicos análogos são denominados eritroplasia de Queyrat (área genital masculina), neoplasia intra-epitelial vulvar (VIN) e papulose bowenóide (ambos os sexos) (COX, EEDY, MORTON, 2007).

Estudos anteriores relataram que cerca de 30-50% dos indivíduos com DB tem histórico de CPNM antes ou após o surgimento do DB (REIZNER et al, 1994; FOOTE et al, 2001). DB tem uma taxa de progressão para o carcinoma invasivo de 5-8% (COX, EEDY, MORTON, 2007; JAEGER et al, 1999), possivelmente maior (até 10%) em eritroplasia de Queyrat (COX, EEDY, MORTON, 1999). Uma vez invadida a derme, as metástases podem ocorrer em mais de 1/3 dos pacientes (MAIZE & RASMUSSEN, 1979 apud LEE, ELMA, BARON, 2011).

O exame histopatológico da DB revela displasia queratinocítica envolvendo toda a espessura da epiderme sem infiltração das células atípicas na derme. Os queratinócitos são pleomórficos com núcleos hipercromáticos e numerosas mitoses estão presentes. Frequentemente existe espessamento da epiderme (acantose), assim como hiperqueratose e paraqueratose do estrato córneo (RIGEL et al, 2005; COLGAN et al, 2011).

A DB apresenta algumas características que apontam para a necessidade de que seja tratada: (i) potencial de transformação; (ii) grande tamanho das lesões, podendo atingir vários centímetros de diâmetro, ainda que o crescimento seja lento; (iii) localização que pode dificultar abordagens cirúrgicas. Por estes motivos ganha

relevância o aspecto cosmético e a facilidade de cicatrização que a TFD proporciona (BRAATHEN et al, 2007).

1.4 Queratose actínica (QA)

Dentro do espectro do CEC, deve ainda ser levada em consideração a queratose actínica (QA), classicamente considerada uma lesão pré-cancerígena, e, atualmente considerada CEC *in situ* grau I e II, em acordo com nova classificação (ROEWERT-HUBER et al, 2007).

A QA representa uma das lesões de pele mais frequentes em todo o mundo, sendo observada em aproximadamente 60% das pessoas acima dos 40 anos com fototipos I-II pela classificação de Fitzpatrick (Anexo I). A população idosa de pele I-III que habita em latitudes baixas representa o grupo de maior risco (FROST, GREEN, WILLIAMS, 1998; FROST & GREEN, 1994; ANWAR et al; 2004; SIDOROFF & THALER, 2010). As QA surgem em peles cronicamente expostas ao sol, fotoenvelhecidas, com discromias, melanoses solares, rugas (BRAAKUIS et al, 2003).

Queratose actínica, também chamada de queratose solar, é uma lesão cutânea que resulta da proliferação atípica dos queratinócitos restrita à camada basal, podendo se estender com atipia em toda a espessura até o ponto de diferenciação da doença de Bowen (DE BERKER, MCGREGOR, HUGHES, 2007). As QA possuem um risco de 0,025% a 16% por ano de progressão para o CEC (GLOGAU, 2000; DE BERKER, MCGREGOR, HUGHES, 2007), considerado de até 20% segundo outros autores (CALLEN, BICKERS, MOY, 1997). É impossível distinguir clinicamente qual QA possui potencial de invasão (GLOGAU, 2000; ACKERMAN 2003; QUAEDVLIEG et al, 2006). Entretanto, é significativo o fato de que 60% dos CEC são originados de QAs (SIDOROFF & THALER, 2010). Quanto mais fotodanificada a pele, mais fotoenvelhecida, maior o risco de desenvolvimento de CEC.

Clinicamente surgem como máculas ou placas eritematosas com descamação discreta, isoladas e/ ou confluentes, podendo ser numerosas, localizadas em áreas cronicamente expostas a luz UV. O efeito cumulativo do UV é extremamente importante, assim como histórico de queimaduras solares. Com frequência são assintomáticas, mas ocasionalmente podem ser pruriginosas (DE BERKER,

MCGREGOR, HUGHES, 2007). São mais frequentes em face, calva, extremidades distais de membros superiores e membros inferiores.

As alterações histológicas e citopatológicas vistas nas células individuais de QA e CEC invasivo são idênticas e não se distinguem entre si. Ambas mostram queratinócitos atípicos com perda da polaridade, pleomorfismo nuclear, maturação desordenada, mitoses mais frequentes, muitas delas atípicas (ACKERMAN, 2003). Vários autores têm tentado classificar as QA do ponto de vista clínico e histopatológico. Partindo do princípio de que a QA já seria um CEC, ROEWERT-HUBER, , STOCKFLETH, KERL (2007) propuseram CEC *in situ*, dividido em três categorias, de acordo com o grau de atipia:

(i) CEC *in situ* Tipo QA I (leve) - queratinócitos atípicos são encontrados nas camadas basais e suprabasais da epiderme. Os núcleos são hiper Cromáticos, de tamanho variável e têm irregularidades leves em contorno nuclear;

(ii) CEC *in situ* Tipo QA II (moderado) - queratinócitos atípicos estendem-se a dois terços inferiores da epiderme, alternando com zonas de epiderme normal;

(iii) CEC *in situ* Tipo QA III (severo) - queratinócitos atípicos estendem-se por mais de dois terços da espessura total da epiderme e envolve os epitélios do folículo piloso, infundíbulo e acrosíngio, sendo equivalentes ao CEC *in situ* ou DB.

Clinicamente as QA actínicas possuem três possibilidades de evolução: (i) regressão espontânea (até 25%), (ii) persistência, ou (iii) progressão para um câncer invasivo (GLOGAU, 2000). O desconhecimento de qual QA poderá evoluir CEC e o acometimento de grandes áreas dificultam a abordagem terapêutica. Vários autores e diretrizes indicam o tratamento das QA para prevenir invasões possíveis, metástases e até mesmo mortalidade (GLOGAU, 2000; MARKS, 1988; ROEWERT-HUBER, STOCKFLETH, KERL, 2007; SIDOROFF & THALER, 2010; QUAEDVLIEG et al, 2006). Pacientes com QA geralmente possuem lesões múltiplas em pele muito fotodanificada e fotoenvelhecida, refletindo o dano actínico em áreas extensas.

1.5 Campo de cancerização

O termo campo de cancerização é, hoje, amplamente utilizado como “um processo onde as células de um determinado tecido ou órgão são transformadas, mas, ainda que geneticamente alteradas, apresentam aparência histológica normal; estas células alteradas precedem o surgimento de neoplasia ou coexistem com células malignas, independentemente de clonalidade” (DAKUDO et al, 2006). Este modelo foi proposto para explicar o desenvolvimento de tumores primários múltiplos e a recorrência local de câncer. Na dermatologia, o termo pode ser definido como uma área de pele cronicamente fotodanificada com múltiplas lesões pré-malignas e malignas. Clinicamente, grandes áreas do corpo podem ser afetadas, como a calva (couro cabeludo), toda a face, tronco, membros superiores e inferiores, sendo, por essa razão, muito difícil o tratamento e o controle clínico dos pacientes acometidos. Estes passam a apresentar lesões recorrentes de QA ou CPNM em áreas previamente submetidas ou não à cirurgia e/ou outros tratamentos.

SLAUGHTER e colaboradores (1953) usaram o termo “campo de cancerização”(CC) para descrever a existência de carcinógenos induzindo mudanças genéticas precoces no epitélio com a ocorrência de múltiplas lesões independentes, levando ao desenvolvimento de tumores multifocais. O coalescimento desses múltiplos focos tumorais explicariam, parcialmente, o crescimento lateral dos CEC. Estudos mais recentes usando várias análises genéticas forneceram evidência inequívoca ao trabalho de Slaughter e colaboradores (BRAAKHUIS et al, 2003).

A origem clonal das lesões tumorais ainda não está bem estabelecida, permanecendo duas teorias, a policlonal e a monoclonal (VATVE et al, 2007).

Segundo a teoria policlonal, um carcinógeno induziria múltiplos eventos genéticos distintos em diferentes sub-populações celulares, resultando em lesões pré-neoplásicas policlonais em um tecido tumoral (TABOR et al, 2002; BRAAKHUIS et al, 2003). Por outro lado, pela teoria monoclonal, um simples evento genético ocorreria em um tumor somático cuja célula tronco se expande clonalmente e se espalha lateralmente para repor o epitélio normal, criando uma grande área de epitélio pré-neoplásico, de onde surgem múltiplos tumores, que se desenvolvem depois de adquirir danos genéticos adicionais (SIMON et al, 2001; BOUDEWIJN et al, 2005).

A presença de campo de cancerização indica uma população de alto risco com doença subclínica invisível, múltiplos tumores primários, recorrências locais e alterações pré-malignas, que requerem tratamentos repetidos e causam significativa morbidade. O tratamento consiste em seguimento regular e tratamentos específicos de acordo com a manifestação clínica presente. Todavia, em 25% dos tumores, as margens ressecadas apresentam, histologicamente, a presença de QA, que por sua vez possuem alterações genéticas, que podem ser responsáveis pelas recorrências locais (BRAAKHUIS, BRAKENHOFF, LEEMANS, 2005). O campo comprometido pode chegar até a 7 cm de área ao redor do tumor, resultando em tumores secundários, que são geneticamente similares.

O tratamento deve abranger toda a área comprometida para reduzir o risco de desenvolvimento de outras queratoses actínicas, tumores secundários e recorrência local.

1.6 Tratamento do câncer de pele não melanoma e do campo de cancerização

O tratamento de escolha para o câncer da pele é a exérese cirúrgica (HACKER, BROWDER, RAMOS CARO, 1993). Entretanto, outras modalidades terapêuticas foram desenvolvidas, uma vez que grande número de pacientes apresenta mais de um tumor e, dependendo do tipo de neoplasia e localização, as mutilações cirúrgicas podem ser grandes (RIGEL et al, 2005). Além disso, o câncer da pele incide preferencialmente na população mais idosa, em que, devido às condições clínicas, a cirurgia tradicional é muitas vezes contra-indicada. Outros tratamentos para o câncer da pele consistem em eletrocoagulação e curetagem, criocirurgia com nitrogênio líquido, radioterapia, cirurgia micrográfica de Mohs, quimioterapia tópica e terapia fotodinâmica (TFD). A escolha do tratamento depende do tipo histológico da neoplasia, localização, idade, condições clínicas, número de tumores encontrados em um mesmo indivíduo e das condições e equipamentos da unidade de saúde onde o paciente é tratado (HACKER, BROWDER, RAMOS CARO, 1993, RIGEL et al, 2005, NGUYEN & HO, 2002, SIDOROFF & THALER, 2010).

O 5-fluorouracil (5-FU) tem sido largamente usado no tratamento das QA desde

a década de 60. É um quimioterápico que inibe a timidilato sintetase, enzima crítica para a síntese de DNA. No tratamento com 5-FU, as recidivas são freqüentes, além do fato de que as reações inflamatórias e ardência durante o tratamento (3-6 semanas) costumam causar muito desconforto, levando freqüentemente à interrupção do mesmo (SAMPAIO & RIVITTI, 1998; NEVES, LUPI, TALHARI, 2001). Uma metanálise comparando o imiquimode com 5-FU no tratamento de múltiplas QA na cabeça e no pescoço mostrou uma taxa média de tratamento (clareamento) de 52% para 5-FU comparado com uma taxa de 70% de tratamento com imiquimode (VATVE et al, 2007).

O Imiquimode é um imunomodulador que age aumentando a produção de TNF α e outras citocinas pró-inflamatórias da pele. Além do seu papel como modulador imune, recentes dados experimentais e clínicos indicam que o imiquimode confere atividade pró-apoptótica direta contra tumores benignos e de origens diferentes, incluindo a pele (VATVE et al, 2007). O seu uso está bem indicado não apenas nas QA (LEVY, FURST, CHERN, 2001; GUPTA, DAVEY, MCPHAIL, 2005; HADLEY, DAVEY, MCPHAIL, 2006) e campo de cancerização, mas também na DB e nos CBCs. Todavia o tempo de tratamento pode levar até 16 semanas e o paciente deve sempre ser monitorado.

As desvantagens do 5-FU e do imiquimode são o longo período de tratamento e os fenômenos inflamatórios que ocorrem durante este tempo, podendo causar grande desconforto, como ardência, prurido e irritação intensa, com eritema, vermelhidão, crostas. Esses pacientes ficam mais sujeitos a infecções devido ao período de tratamento prolongado e à presença de irritações (SIDOROF & THALER, 2010).

A criocirurgia (nitrogênio líquido) e a curetagem com eletrocoagulação costumam deixar cicatrizes inestéticas. Ambas não tratam o campo de cancerização. A criocirurgia possui um período longo de cicatrização, principalmente em áreas localizadas fora da face, onde pode levar de 3 a 6 semanas. Quando usado para lesões tumorais as áreas de necrose são profundas, o paciente fica mais sujeito a infecções e as cicatrizes são bastante evidentes.

Para as QA, várias modalidades de tratamento têm sido propostas e a escolha do tratamento depende principalmente do tamanho e número de lesões. As lesões isoladas podem ser tratadas com curetagem e criocirurgia (SIDOROF & THALER, 2010). Para

lesões mais numerosas estão indicados, além do nitrogênio líquido utilizado isoladamente em cada uma das lesões, o 5-fluorouracil (5-FU) e o imiquimode. Outros medicamentos têm sido usados mais recentemente, como diclofenaco, ainda que com menos eficácia (SMITS & MOOR, 2009). Quanto ao campo de cancerização, as grandes áreas dificultam o tratamento com criocirurgia e impossibilitam o uso de eletrocoagulação. Essas áreas correspondem às regiões fotodanificadas, com comprometimento da face completa e toda a superfície de extensão de antebraços e pernas. Os tratamentos mais utilizados são 5-FU e imiquimode. Todavia, os efeitos adversos desses medicamentos, associados ao longo período de tratamento dificultam a adesão do paciente. O tratamento da face completa pode causar sérias dificuldades no trabalho, às vezes impossibilitando o exercício das atividades laborais durante o período de tratamento.

A DB e o CBCs são tumores de crescimento lento com tendência inicial a um crescimento horizontal, levando muitos anos para atingir maiores dimensões. As lesões podem alcançar muitos centímetros de tamanho, e, em especial a DB, tem predileção pelas pernas e extremidades, locais de difícil tratamento. Quando o DB e CBCs surgem na face, o tratamento cirúrgico pode resultar em mutilações, e não raramente o paciente se recusa a fazê-lo. Acrescenta-se que essas patologias surgem em pacientes com idade mais avançada, muitas vezes sem condições clínicas, contra-indicando tratamento cirúrgico (SIDOROF & THALER, 2010; MORTON et al, 2001). O 5-FU e, com mais eficácia, o imiquimode, são utilizados nessas duas patologias cujo efeitos indesejáveis já foram citados acima. Além disso, o fato de que quando utilizados o 5-FU e o imiquimode, múltiplos tratamentos podem ser necessários (SIDOROF & THALER, 2010).

Por muitas décadas a radioterapia tem sido uma opção para o CPNM, quando outras modalidades de tratamento falham ou não podem ser usadas. Todavia, os efeitos adversos das radiações ionizantes, como atrofias, cicatrizes e predisposição ao surgimento de novos cânceres, são bem conhecidos. Estão contra-indicados em pacientes em uso de imunossupressores. Por essas razões, o seu uso e quantidade de sessões é limitada (SIDOROF & THALER, 2010).

Muitas das limitações das terapias apresentadas são superadas pela TFD que apresenta as vantagens do tratamento ser realizado em uma ou duas sessões, com uma semana de período de recuperação, melhora da qualidade do tecido, e diagnóstico e tratamento do campo de cancerização (BRAATHEN et al, 2007; TOREZAN, NIWA, NETO, 2009b).

1.7 Terapia Fotodinâmica (TFD)

A TFD envolve a ativação de um fotossensibilizante pela luz visível, que, na presença de oxigênio cria espécies de oxigênio citotóxicas e radicais livres que seletivamente destroem as células que proliferam mais rapidamente (Fig.1.1).

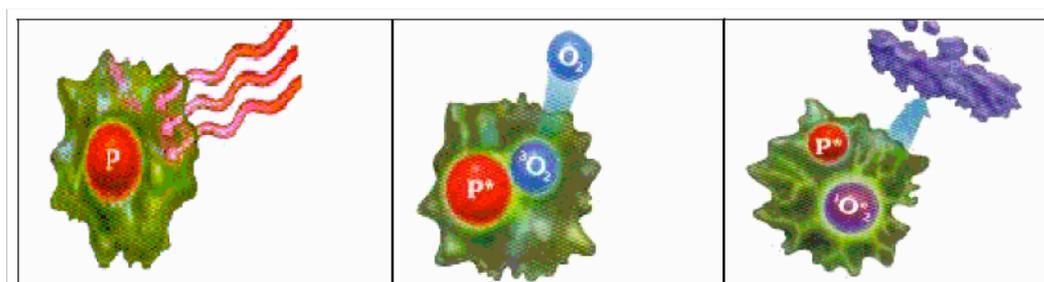


Figura 1.1 - Efeito da irradiação da luz no fotossensibilizante dentro das células (REGO, 2008). O agente fotossensibilizante (P) no interior da célula, na presença de luz e oxigênio (O_2), desencadeia reação fotodinâmica com produção de oxigênio singlete e radicais livres, levando à morte celular (CALVAZARA-PINTON, VENTURINI, SALA, 2007).

Embora o conceito de TFD remonte há mais de 4000 anos, época em que os egípcios combinavam a administração oral de extrato de uma planta *Amni majus* e exposição ao sol (ALLISON, MOTA, SIBATA, 2004; CHOUDARY, NOURI, ELSAIE, 2009), somente no início do século XX, um estudante de medicina alemão Oscar Raab, observou que o corante laranja acridina na presença de luz era letal para o *Paramécio caudatum* (ALLISON, MOTA, SIBATA, 2004. Em 1900, Von Tappeiner (REGO, 2008), publicou um artigo sobre a descoberta de Raab, relatando que o consumo de certos materiais fluorescentes poderia ter aplicações clínicas. Em 1903 Von Tappeiner, em cooperação com Jesionek, utilizaram eosina e luz para tratar doenças

como lupus vulgar, sífilis, psoríase e câncer de pele. Cerca de 60 anos mais tarde é que a TFD foi novamente utilizada para tratar tumores malignos, com Lipson, em 1966 (REGO, 2008). O uso clínico da TFD só foi realizado pela primeira vez por DOUGHERTY e colaboradores em 1978, com relato de sucesso no tratamento do câncer cutâneo e outras malignidades.

Na TFD, as drogas de primeira geração, os derivados de hematoporfirina, são de uso sistêmico e, apesar de eficientes em quase todos os tipos de tumores, apresentam elevada retenção dérmica e ocular, com conseqüente fotossensibilização cutânea pelo período de 4 a 8 semanas, tempo necessário para a eliminação do fármaco pelo organismo (REGO, 2008).

A partir dos anos 90, o ácido 5-delta aminolevulinico (ALA) foi utilizado topicamente pela primeira vez (KENNEDY, POTTIER, PROSS, 1990; KENNEDY & POITIER, 1992). No fim da mesma década, foi produzido um derivado lipofílico do ALA, o metil-éster do ALA (metilaminolevulinato-MAL), e hoje, ambas as drogas são utilizadas topicamente na TFD. São drogas de segunda geração, substâncias precursoras da hematoporfirina endógena. O ALA pode ser aplicado sistemicamente ou de forma tópica na pele em tumores CBC (KENNEDY, POTTIER, PROSS, 1990), onde ocorre acúmulo de fotossensibilizante protoporfirina IX (PpIX). A PpIX é eliminada do organismo 24 horas após a administração de ALA exógeno, seja por vias tópica, oral ou endovenosa (BABILAS et al, 2010). Riscos de fotossensibilidade prolongada são considerados ausentes ou desprezíveis com o uso tópico ou sistêmico de ALA ou MAL. Ao se expor o tumor fotossensibilizado a uma fonte de luz adequada, a PpIX é rapidamente fotoativada, permitindo alta dose total de energia sem os riscos de reações fototóxicas relevantes para o tecido perilesional (KALKA, MERK, MUKHTAR, 2000).

1.7.1 A reação fotodinâmica

O ALA não é um fotossensibilizador propriamente dito, mas sim um precursor metabólico da protoporfirina IX (PpIX) na via intrínseca do heme celular (Fig. 1.2). No interior da célula, a síntese normal de ALA é controlada pela enzima ALA sintetase, sendo inibida (*feedback negativo*) quando ocorre acúmulo de heme (TOREZAN, 2009).

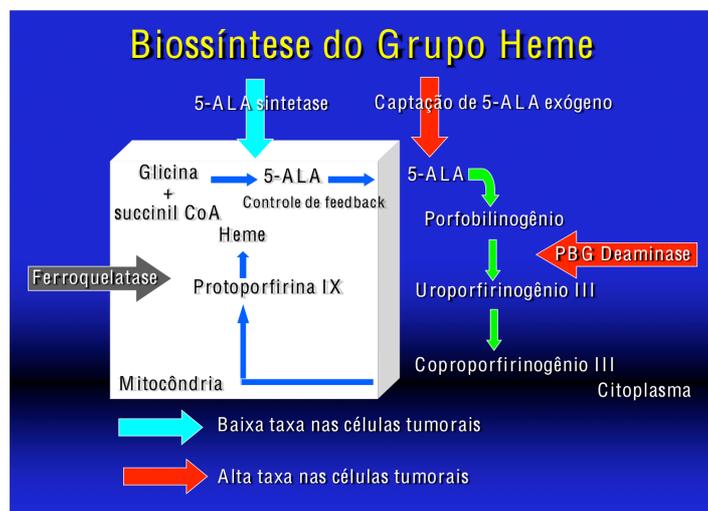


Fig 1.2. Esquema da biossíntese do grupo Heme, capturação do 5-ALA e sua metabolização. PBG= porfobilinogênio, CoA= coenzima A. O ALA é sintetizado na via de biossíntese do grupo heme, a partir de glicina e succinil-CoA, no interior da mitocôndria. Essa reação é catalisada pela enzima ALA sintetase. O ALA vai para o citoplasma onde forma o porfobilinogênio(PBG), seguido pelo uroporfirinogênio III, sendo então convertido em coproporfirinogênio III. Este último volta para o interior da mitocôndria, se transforma em protoporfirinogênio IX, que é convertido em protoporfirina IX (PpIX), pela ação da protoporfirinogênio oxidase. Adaptado de TOREZAN, 2011.

Ao ser aplicado topicamente, o ALA exógeno passa rapidamente através da epiderme anormal, sofrendo, em seguida, a cascata de reações bioquímicas (Fig. 1.2) que levam ao acúmulo de PpIX no interior da mitocôndria. Como a conversão da PpIX para heme é lenta, a grande concentração de PpIX resulta em sua difusão para o retículo endoplasmático e membrana celular, alvos finais do dano celular induzido pela TFD (REGO, 2008, TOREZAN, 2011).

A PpIX é um intermediário porfirínico com atividade fotodinâmica e quando ativada por luz azul emite fluorescência vermelho coral intensa. O grupo heme não emite fluorescência e não possui atividade fotodinâmica (KENNEDY, POTTIER, PROSS, 1990; KENNEDY & POITIER, 1992). Durante a reação fotodinâmica ocorre a fotoinativação do agente fotossensibilizante. No caso do ALA e do MAL este agente fotossensibilizante é a PpIX. Uma vez aplicado topicamente o MAL é rapidamente

demetilado a ALA, sofrendo o mesmo processo de metabolização do ALA (PENG et al, 2001). A PpIX quando iluminada com a luz de Wood, como já comentado, apresenta-se corada em vermelho coral. Logo após a exposição à luz ocorre o desaparecimento dessa coloração, fenômeno esse chamado de “photobleaching”, ou fotobranqueamento, ao que corresponde o início do desencadeamento da cadeia de reações que levam à destruição do tumor.

1.7.2 Mecanismo de ação da reação fotodinâmica

Quando a reação fotodinâmica ocorre, o fotossensibilizador presente nos tecidos é ativado e transfere energia para o oxigênio molecular, resultando em espécies reativas de oxigênio, entre elas o oxigênio singlete, que induzem a morte das células (HENDERSON & DOUGHERTY, 1992), conforme representado na Fig. 1.3.

As moléculas no estado triplete podem sofrer dois tipos de reação: reação tipo I e reação tipo II. Na reação tipo I, as moléculas reagem diretamente com substratos biológicos para formar radicais livres, como os radicais superóxido, hidroxila e peróxido. Por outro lado, na reação tipo II, a predominante na TFD, as moléculas transferem sua energia diretamente ao oxigênio intracelular, formando o oxigênio singlete (1O_2), altamente reativo, de meia vida curta e responsável pela morte celular. As espécies reativas geradas a partir da interação do estado excitado do fotossensibilizador e oxigênio (singlete e ânion radical superóxido) e as resultantes dos processos secundários (radicais livres e outras espécies carregadas) tendem a se difundir na vizinhança do tecido afetado, iniciando uma cadeia de reações bioquímicas, que resulta em danos de diferentes proporções à célula tumoral, podendo levá-la à morte. O oxigênio singlete constitui o principal agente fototóxico na TFD. Estudos por microscopia de fluorescência sugerem que a mitocôndria seria a principal causa de morte celular induzida pela TFD (KESSEL & LUO, 1996). O oxigênio singlete tende a reagir com sítios ativos presentes nas células alvo, como por exemplo, a guanina, cadeias laterais de aminoácidos, ligações duplas de esteróides e lipídeos insaturados. Lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas, sendo alvos subcelulares destruídos pela TFD. Essas reações resultam em perda da integridade da membrana acarretando alterações da permeabilidade e do

transporte entre os meios intra e extracelulares (BONNET, 1995). Assim a TFD causa inativação das enzimas de membrana, falência respiratória e lise celular (DOUGHERTY, 2002).

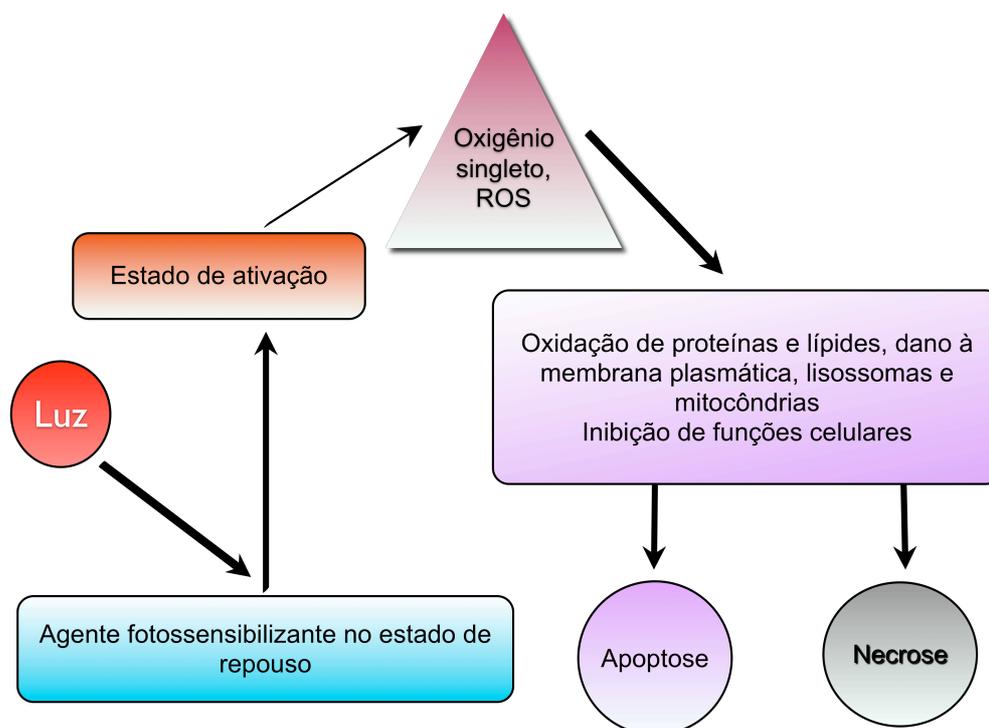


Figura 1.3 – Modo de ação da terapia fotodinâmica. O agente fotossensibilizante (FS) encontra-se nos tecidos no estado de repouso. O elétron do FS é excitado pela luz passando para o estado de ativado de meia vida curta. As moléculas podem voltar ao estado de repouso, emitindo energia em forma de fluorescência por meio da liberação de fótons ou progredir na cascata de reações químicas até atingir o estado triplete de meia vida mais longa. Do estado triplete as moléculas podem seguir a reação tipo I ou tipo II, onde ocorre a liberação de radicais livres e oxigênio singleto, levando à oxidação de proteínas e lipídios, danos à membrana plasmática, mitocôndrias, lisossomas e morte celular por apoptose ou necrose (KENNEDY & POITIER, 1992; TOREZAN, 2009).

A TFD causa a morte celular por apoptose, necrose, isolada ou simultaneamente, dependendo da concentração das substâncias fotossensibilizadoras utilizadas e das condições de tratamento (DOUGHERTY, 2002). Produz inflamação aguda, com estresse oxidativo que culmina na destruição de membranas celulares e estruturas citoplasmáticas. As células que são lesionadas produzem sinais de perigo que são amplificados pelas células apresentadoras de antígeno, as células dendríticas e pelo

recrutamento de linfócitos T. O microambiente tumoral é alterado pelo estímulo da liberação ou expressão de vários mediadores de resposta aguda pró-inflamatória, os quais incluem proteínas do complemento, proteínas de choque térmico (HSPs), derivados de ácido araquidônico, quimiocinas e citocinas como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1) (HADJUR et al, 1996). Ocorre acúmulo de neutrófilos e estímulo à destruição tumoral (AGOSTINIS et al, 2011). O complemento não só atua como mediador, mas também estimula as células a liberarem mediadores secundários incluindo as citocinas IL-1 β , TNF-alfa, IL-6, IL-10, fator estimulante de colônias de granulócitos (TGF-G), prostaglandinas, leucotrienos, histamina e fatores de coagulação. Macrófagos podem mostrar citotoxicidade preferencial contra células tumorais tratadas com dose subletal de TFD (AGOSTINIS et al, 2011).

Alguns estudos demonstram aspectos relevantes da complexa cadeia de reações ocasionadas pela TFD:

- O sinal de perigo das células dendríticas pode ser prejudicado pelos mecanismos de escape do tumor, em particular pelo acúmulo de células reguladoras intratumorais (MOAN et al, 1989 apud AGOSTINIS et al, 2011).
- Células mortas por apoptose podem não desencadear a resposta imune anti-tumoral (KESSEL, 2002), todavia, sob certas condições, podem fazê-lo (VANLANGENAKKER et al, 2008). Neste caso, há grande liberação de DAMPS, moléculas intracelulares normalmente escondidas em células vivas, que possuem propriedades diferentes, como imunoestimulação após exposição ou secreção por indução súbita e desorganizada de células danificadas (MROZ et al, 2011).

Estudos recentes demonstraram que a TFD pode induzir uma resposta imune sistêmica antígeno-específica altamente potente, capaz de causar a regressão em tumores distantes já estabelecidos que não receberam a luz (FRIEDBERG et al, 2004).

Assim a TFD constitui uma terapêutica que induz respostas celulares e imunológicas importantes. Sendo o oxigênio, a luz e os agentes fotossensibilizantes os principais responsáveis pelo sucesso da TFD, a seguir serão vistos detalhes sobre as fontes de luz e fotossensibilizantes utilizados em TFD.

1.7.3 Fontes de luz

Para realizar a TFD é necessário uma fonte de luz que emita luz em comprimentos de onda que esteja dentro do espectro de absorção do fotossensibilizante. A absorção da luz vai depender de: (i) comprimento de onda, (ii) energia ou intensidade da luz, (iii) cromóforos no tecido. Em geral, quanto maior o comprimento de onda, maior a penetração da luz (TOREZAN, 2009a). A Fig. 1.4 mostra os principais comprimentos de onda utilizados em TFD e o seu alcance na pele em milímetros.

No comprimento de onda de 630nm, a luz penetra mais de 5mm, enquanto em 700-800nm deve atingir 2 cm (Fig. 1.4) (ZELICKSON, 2008). A região entre 600 e 1200nm é frequentemente chamada de janela óptica do tecido. Comprimentos de onda acima de 800nm, apesar de penetrarem mais, não possuem energia suficiente para iniciar a reação fotodinâmica (AGOSTINIS et al, 2011). Na TFD os comprimentos de 633 \pm 65nm são os mais utilizados. A maioria das fontes de luz em TFD estão no espectro de luz visível ou próxima ao infravermelho. A fonte de luz azul está indicada no tratamento das QA, e não nas lesões tumorais, devido a sua menor penetração.

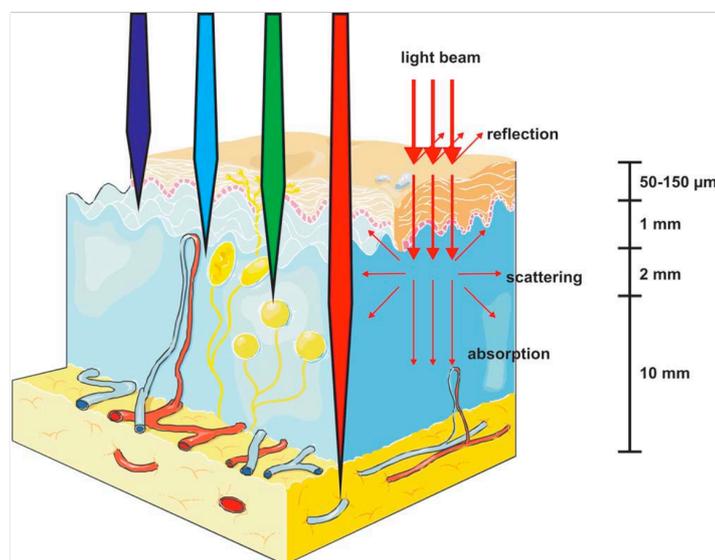


Figura 1.4: Propagação da luz através dos tecidos. A luz azul penetra menos eficazmente nos tecidos, enquanto a luz vermelha e o infravermelho penetram mais profundamente. Adaptado de AGOSTINIS et al, 2011.

Outro fator na escolha das fontes de luz é o conhecimento preciso do espectro de emissão de uma fonte de luz que deve ser ótimo para a absorção do espectro do fotossensibilizantes utilizados (KLEIN et al, 2008). A Fig. 1.5 mostra a representação dos picos de absorção da luz pela PpIX.

Existe uma grande variedade de fontes de luz utilizadas na TFD, cada uma com diferentes parâmetros, sem condições de serem comparadas entre si devido a grande variedade de comprimentos de onda e irradiância. São lâmpadas de xenônio, lâmpadas halógenas, lasers, luz intensa pulsada e luz emitida por diodo. Na tabela 1.1 estão descritas as principais fontes de luz utilizadas.

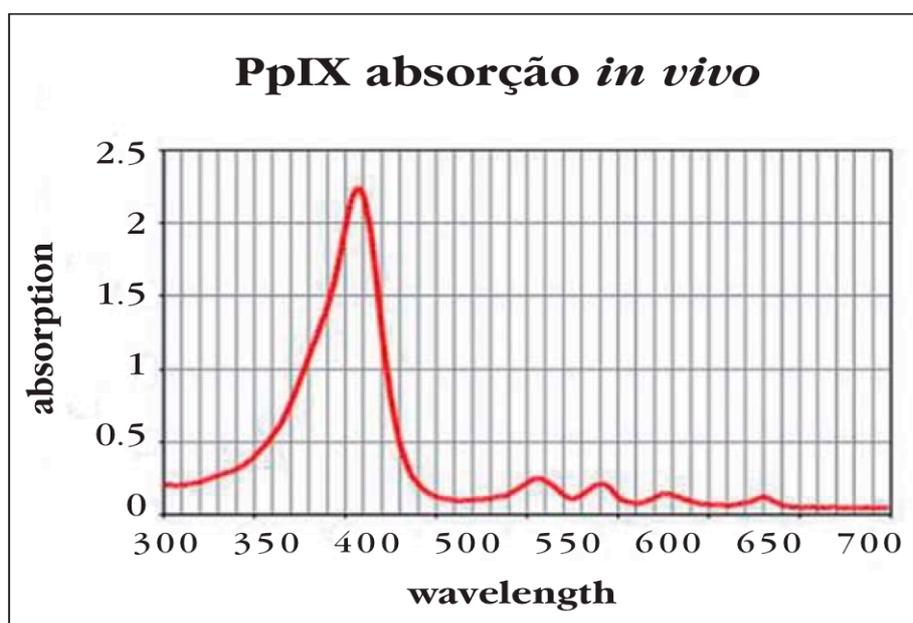


Figura 1.5 - Espectro de absorção da PpIX (TOREZAN et al, 2009b). Observa-se um pico de absorção maior em 405nm, denominada banda de Soret, correspondente à luz azul. Aparecem outros picos menores chamados bandas Q, em 510, 545, 580, 630, 670 e 700nm. Apesar dos picos de 620 a 630 serem menores, são os mais utilizados em TFD devido a maior penetração no tecido pela luz vermelha, otimizando a TFD para lesões mais profundas. Fontes de luz azul e verde são utilizadas para lesões mais superficiais (KALKA, MERK, MUKHTAR, 2000).

Tabela 1.1- Fontes de luz utilizadas na TFD

Lâmpadas incoerentes	Laser	Outras
Lâmpadas de xenônio (600-720 nm)	Laser de corante pulsado(pulsed dye laser) (585 nm)	Luz intensa pulsada(LIP) (500-1200nm)
Lâmpadas halógenas (600-800 nm)	Laser de corante pulsado longo (long pulsed dye laser) (595 nm)	LED (633 +- 5nm)
	Laser de argônio(488,514 nm)	Sistemas de diagnóstico fluorescentes(Luz azul)
	Laser de diodo (800-1000nm)	Luz solar

Não existe padronização para fonte de luz e nenhuma delas é a ideal para todas as indicações de TFD, nem mesmo para um mesmo fotossensibilizante (FS). A escolha da luz vai ser baseada na absorção do FS (fluorescência de excitação e espectro de ação), doença (localização, tamanho das lesões, acessibilidade e características do tecido) e custo.

As lâmpadas de xenônio e halógenas, são muito utilizadas na Europa e possuem um custo bastante acessível (KLEIN et al, 2008).

A luz intensa pulsada (LIP) por si só é muito utilizada e popularizada no tratamento do fotorejuvenescimento e tem sido usada na TFD com o objetivo de melhorar os resultados (KLEIN et al, 2008) no tratamento da acne e mais restritamente nas QA. As LIP possuem um espectro maior, muitas vezes contendo todo o espectro da luz visível, quase toda a luz visível e o infravermelho. A aplicação é bastante rápida, mas não é indicada para o tratamento de tumores (KLEIN et al, 2008; TOREZAN, 2011).

O laser, caracterizado como um feixe de luz homogênea com comprimento de onda específico emite alta fluência de luz monocromática que corresponde ao pico de absorção do agente. É de rápida aplicação, porém os equipamentos iluminam pequenas áreas, não são portáteis, são caros e exigem muita assistência técnica.

Os aparelhos de luz emitida por diodo, ou LEDs, produzem fonte de luz de alta

potência em faixas estreitas de bandas de luz (entre 20-50 nm), podendo proporcionar iluminação homogênea em uma superfície ampla. Estas propriedades são interessantes, uma vez que no tratamento de tumores de grande extensão, a distribuição de luz deve ser homogênea por toda a área. São de fácil uso, custo mais acessível e de meia vida longa (BABILAS et al, 2010). No Brasil estes equipamentos estão sendo os mais utilizados para a realização de TFD em lesões tumorais e tratamento de campo de cancerização.

A eficácia clínica da TFD depende da dosimetria, isto é, da dose total de energia, do tempo de exposição à luz e do modo de liberação da luz, ou seja, se simples ou fracionada. A fluência também pode afetar a resposta a TFD (HENDERSON, BUSCH, SNYDER, 2006).

As energias utilizadas normalmente variam de 50 a 150mw/cm². Quando as energias são mais baixas, o tempo de exposição à luz pode ser muito longo, enquanto que em energias mais altas pode ocorrer um efeito térmico aditivo (TOREZAN, 2011).

A presença de oxigênio molecular no tecido a ser tratado é crítica para a morte celular foto induzida. Estudos mais recentes têm demonstrado que a TFD pode levar à criação de resposta heterogênea limitada pela hipóxia (depleção química do oxigênio molecular devido à geração do oxigênio singlete) durante a iluminação que pode ser controlada, em parte, por meio da taxa de fluência de iluminação (FOSTER et al 1991, HENDERSON, BUSCH, SNYDER, 2006; SHESADRI et al, 2008; BUSCH et al, 2009).

1.7.4 Substâncias fotossensibilizantes (FS)

Para a reação fotodinâmica, além da luz e de O₂, é essencial a presença do FS. Atualmente são dois os agentes precursores da PpIX disponíveis no mercado: o ALA e o MAL, que é um ester do ALA.

O ALA é carregado principalmente por mecanismos de transporte ativo, que requerem energia. Esses sistemas dependem de pH e temperatura, são lentos e saturáveis, mas encontram-se levemente acelerados em células tumorais (KALKA, MERK, MUKHTAR, 2000; TOREZAN, 2009a). As peles lesionadas possuem um aumento da permeabilidade. Assim a indução e síntese encadeada pelo ALA é maior em

células malignas e pré-malignas, se comparado a condições normais (DATTA et al, 1998, apud REGO, 2008). Entretanto, o ALA é extremamente instável, difícil de ser estabilizado. Por outro lado, o MAL possui um caráter lipofílico, é estável e transportado por aminoácidos apolares através de difusão passiva, mecanismo que não precisa de energia (KALKA, MERK, MUKHTAR, 2000).

Em estudo da penetração do ALA a 20% em creme sob oclusão através da microscopia de fluorescência (SZEIMIES, SASSY T, LANDTHALER, 1994), verificou-se que enquanto nas glândulas sebáceas e porções superiores dos folículos pilosos era detectada fluorescência leve, na epiderme lesada e área perilesional, folículos pilosos, ductos sudoríparos e glândulas sebáceas, após 12 horas, a fluorescência era intensa. Além disto a fluorescência nos CBCs superficiais e nodulares era homogênea. Nos CBCs esclerodermiformes, a fluorescência era heterogênea e leve, mesmo nas partes mais superficiais do tumor, evidenciando uma resposta menor, provavelmente pela presença de tecido fibroso que dificulta a penetração do fármaco. Este estudo reforça a necessidade de se melhorar a penetração dos pro-fármacos e/ou FS.

A penetração do ALA na pele sofre interferência de fatores como concentração, tipo de veículo utilizado na sua preparação, tempo de aplicação e uso de coadjuvantes que favoreçam o acúmulo de PpIX no tecido alvo. Os melhores resultados terapêuticos foram utilizados na concentração de 10-20%. (KALKA, MERK, MUKHTAR, 2000; KENNEDY & POITIER, 1992; PIACQUADIO et al, 2001; PENG et al, 2001; TOUMA et al, 2004). Para aumentar direta ou indiretamente a penetração do ALA têm sido adicionados agentes inibidores da enzima ferroquelatase, como a desferoxamina, ou que aumentem a penetração do ALA, como o etilenodiaminotetratetracético (EDTA) e o dimetilssulfóxido (DMSO). Mais recentemente tem sido utilizado laser de CO₂, imediatamente antes da aplicação de MAL para facilitar sua penetração (WHITAKER et al, 2007).

Na Tabela 1.2 estão descritas as principais formulações do ALA (nome dos produtos, composição), o tempo de oclusão e indicações respectivas. No Brasil, apenas o MAL (Metvix®, Galderma) encontra-se no mercado. Este FS é produzido na Europa, enquanto o Levulan Kerastik® é fabricado nos EUA. Estudos em fase II/III estão sendo

realizados com o ALA a 20% em bandagens oclusivas e em preparações lipossomais e nanocoloidais para o tratamento de QA.

Tabela 1.2: Principais formulações do ALA e MAL

Preparações do ALA		
Nome do produto	Ingredientes (composição)	Tempo de oclusão e indicações
Preparações magistrais	5-ALA a 20% gel/creme/emulsão	4 h oclusão QA, CBC superficial, DB, CBCn
Levulan kerastik®	20% ALA hidrocloreto	14-18h oclusão QA
Metvix®	Metilaminolevulinato a 16%	3 h oclusão QA, CBC superficial, DB, CBC nodular
PD P 506 (photonamic GmbH Co KG, Wedel, germany)*	5-ALA a 20% em bandagem (bandage ou patches)	4 h oclusão QA
BF-200 ALA (Biofrontera AG, Leverkusen, Germany)*	5-ALA a 10% nanoemulsão em gel	3h oclusão QA

* - ainda não aprovado para uso clínico

1.8 Situação atual da TFD na oncologia cutânea

A TFD já tem sido utilizada em fase clínica há mais de 30 anos em vários países (DOUGHERTY et al., 1978; KALKA et al., 2000; MARMUR et al., 2004), inclusive no Brasil (DE ROSA et al. 2000, 2003, PIERRE et al. 2001a, 2001b). Os estudos iniciais da TFD de uso tópico foram realizados com o ALA, e, no fim da mesma década,

foi desenvolvido o seu derivado, o MAL. O ALA e o MAL são as drogas hoje aprovadas como precursores fotossensibilizantes tópicos.

As primeiras publicações com o ALA tópico indicaram boa resposta clínica e excelentes resultados cosméticos em QA, doença de Bowen e tumores superficiais cutâneos, incluindo carcinomas de células escamosas *in situ* e carcinomas basocelulares superficiais (FIJAN, HONIGSMANN, ORTEL, 1995, KORMEILI, YAMAUCHI, LOWE, 2004). Numerosos estudos têm sido publicados no tratamento também de lesões tumorais múltiplas da pele e em tratamentos paliativos (ROBERT & CAIRNDUFF, 1995; SVANBERG et al., 1994; KARRER et al., 1995; MORTON et al., 2001). A associação de técnicas também tem sido relatada para aumentar a eficiência do tratamento em CBC nodulares múltiplos (THISSEN, SCHROETER, NEUMANN, 2000; MARMUR et al., 2004). Existem também numerosas publicações com o MAL (PIACQUADIO et al, 2004; TOUMA et al, 2004; BRAATHEN et al, 2007; KLEIN et al, 2008; BABILAS et al, 2010; FANTINI et al, 2011). De forma geral, os tipos de CBC aprovados para tratamento com a TFD são as variedades superficial e nodular, estando esta última restrita às lesões menores, com até 2mm de espessura (BRAATHEN et al, 2007).

Nos EUA, o ALA está aprovado para o uso com luz azul no tratamento de QA. Em um estudo multicêntrico fase IV, 748 QA em 110 pacientes foram tratadas com ALA a 20% (Levulan Kerastik®, DUSA, EUA). Após um período de incubação de 14-18 horas as lesões foram expostas à luz. A taxa de remissão foi de 78% após 12 meses, sendo a taxa de recorrência de 19% após 1 ano (TSCHEN et al, 2006).

As taxas de remissão após TFD com MAL no tratamento das QAs estão entre 69% e 91% após 3 meses (LEHMANN, 2007). MORTON et al (2006) compararam a eficácia da TFD com MAL versus crioterapia em um estudo multicêntrico randomizado em comparação intraindivíduo bilateral pareado. O estudo incluiu 119 pacientes (1501 lesões). Após 24 semanas, ambos os grupos apresentaram altas taxas de remissão (TFD com MAL: 89,1%, crioterapia: 86,1%). Pacientes e observadores preferiram TFD, cujos resultados cosméticos foram muito superiores.

O uso preventivo da TFD em transplantados renais foi estudado em 27 pacientes com QA, CBC ou verrugas. Uma área da face ou do dorso das mãos foi escolhida randomicamente para TFD com MAL, enquanto a outra área ficava como controle. A pele tratada foi exposta a uma fonte de luz incoerente (570-670, 74j/cm²). A média de surgimento de novas lesões foi significativamente maior na área tratada do que na área controle (9,6 versus 6,8 meses). Após 12 meses 62% das áreas tratadas com TFD estavam sem lesões comparadas com 35% das áreas controle (WULF et al, 2006).

Apesar dos resultados positivos da TFD, a eficácia da TFD deve ser otimizada para conseguir maior êxito na erradicação de tumores, incluindo os mais espessos, mais profundos, e ampliar as suas indicações. Estas falhas resultam geralmente de: (i) liberação não homogênea do fármaco fotossensível dentro do tumor ou diferença mínima dos níveis do mesmo na lesão e nos tecidos circunjacentes, (ii) pouca penetração da luz em algumas partes do tumor, e/ou (iii) inabilidade em assegurar que o tumor inteiro esteja adequadamente oxigenado durante todo o período de fotoirradiação (SZEIMIES, SASSY, LANDTHALER, 1994).

Para aumentar a eficácia do tratamento com a TFD, pesquisas têm sido feitas na procura por novos fármacos, fontes de luz mais específicas e de baixo custo e novos protocolos clínicos experimentais. Estas pesquisas têm encontrado um grande impulso nas abordagens da nanobiotecnologia que possibilita o desenvolvimento de novas formulações de fármacos fotossensíveis, como o ALA, em veículos nanoestruturados. Estas nanoestruturas visam especificidade e aumento da penetração do pró-fármaco e assim melhoria dos resultados obtidos com a TFD (SZEIMIES et al, 2010).

1.9 Nanotecnologia

A nanotecnologia é intrinsecamente multidisciplinar e tem avançado rapidamente nos últimos anos, encontrando aplicações nas mais diversas áreas, desde setores de energia e eletrônica até a indústria farmacêutica (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006).

O ponto inicial para a nanotecnologia foi considerado a palestra proferida em 29 de dezembro de 1959, por Richard Feynman, no Instituto de Tecnologia da Califórnia, onde introduziu a fundamentação da nanotecnologia (TEDESCO, SIMIONI, PRIMO, 2007). Na palestra, ele cita que, desde que as leis da natureza fossem mantidas, um dia seria possível manipular átomos individualmente, uma idéia revolucionária para a época (FEYNMAN, 1959). Entretanto, a análise de estruturas em escala nanométrica (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006), se tornou factível apenas nos anos 80 devido à invenção do microscópio de tunelamento e do microscópio de força atômica (AFM), os quais contribuíram decisivamente para o desenvolvimento da Nanociência e da Nanotecnologia.

Nanotecnologia é o campo do conhecimento humano cujo domínio incorpora a manipulação individual de átomos, moléculas e estruturas supramoleculares para criar estruturas materiais e sistemas mais complexos, em escala nanométrica ($1\text{nm}=1\times 10^{-9}\text{m}$) agregando funcionalidades e especificidades (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006).

As propriedades apresentadas por materiais em escala nanométrica (pelo menos uma dimensão no intervalo de 1-100nm), por serem peculiares, têm despertado um interesse tecnológico crescente (FORTINA et al, 2005; SCHEU et al, 2006; LIU & WEBSTER, 2007). Tais características devem-se, sobretudo, a dois fatores: seu efeito quântico e seu efeito de superfície. O comportamento dos átomos e dos elétrons é determinado pelo efeito quântico. Por outro lado, quanto menor for o tamanho do material, mais importantes são os efeitos de superfície, devido ao aumento da razão entre o número de átomos que estão na superfície em relação àqueles dispersos em seu volume, o que provoca um aumento significativo na sua reatividade (MELO & PIMENTA, 2004; THURMAN, 2006; PISON et al, 2006).

Quando são empregados os princípios da nanoescala e de técnicas associadas para entender e transformar biosistemas, recebem a denominação de Nanobiotecnologia (TOMA, 2004; ALINGTON 2004; NASCHIE, 2006;). A Nanobiotecnologia converge para a Nanomedicina quando procura desenvolver dispositivos a serem utilizados em procedimentos inovadores de tratamento e diagnóstico precoce e/ou mais preciso de doenças, a fim de preservar a saúde humana (HERR et al, 2006; YUN et al, 2007). Portanto, o impulso da Nanobiotecnologia tem se

mostrado expressivo em diversas áreas da saúde, tais como: engenharia genética, biologia celular, clonagem, medicina física, neurologia, medicina dentária, criogenia e dermatologia (STEINMETZ et al, 2006).

Os sistemas de carregamento e liberação de drogas estão entre os que possuem maior potencial de aplicação na Nanomedicina. Eles melhoram a eficácia terapêutica, reduzem efeitos colaterais e toxicidade, e aumentam a biodisponibilidade das drogas. Dentre os principais sistemas nanosestruturados para carregamento de fármacos e vacinas, temos os lipossomas, ciclodextrinas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, nanopartículas inteligentes (ROSSI-BERGMANN, 2008).

As partículas poliméricas, ao contrário dos lipossomas, não possuem um núcleo aquoso, mas sim uma matriz sólida constituída de polímero. O fármaco é agregado, encapsulado ou adsorvido às partículas, e, dependendo do método de preparação, pode-se obter nanoesferas ou nanocápsulas. O fármaco é liberado gradualmente da partícula por erosão ou difusão (ROSSI-BERGMANN, 2008).

A vantagem das nanopartículas poliméricas em relação aos lipossomos, além do menor custo dos polímeros em relação ao dos fosfolipídios, é a sua maior estabilidade e durabilidade, o que pode facilitar a estocagem à temperatura ambiente e aumentar o tempo de prateleira do medicamento. Elas tem sido usadas em próteses ortopédicas, fios de sutura biodegradáveis, carreadores de DNA (terapia gênica) e veiculação de quimioterápicos para o tratamento de câncer cerebral e de próstata (ROSSI-BERGMANN, 2008).

Com o objetivo de melhorar a estabilidade, aumentar a penetração e reduzir o tempo de oclusão foi desenvolvida, para a realização deste trabalho, uma nanoemulsão lipídica polimérica para veiculação do ALA, aplicando a nanotecnologia à terapia fotodinâmica.

2. Objetivos

2. Objetivo Geral

Investigar a resposta terapêutica e a tolerabilidade à terapia fotodinâmica (TFD) realizada com o ácido aminolevulínico (ALA) em nanoemulsão (NanoALA), por meio de um ensaio clínico para tratamento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da pele.

2.1. Objetivos específicos

1 – Investigar a eficácia da amostra NanoALA em realizar a TFD em pacientes com as lesões de pele: queratose actínica, carcinoma basocelular superficial, doença de Bowen.

2 – Comparar a eficácia da TFD realizada com luz em diferentes fluências, provenientes de um mesmo sistema com emissão de LED, luz vermelha (630nm e 635nm) no tratamento de lesões da pele.

3 – Investigar a eficácia da NanoALA-TFD com as seguintes variações: tempo de oclusão do fármaco, localização da lesão, tipo histopatológico da lesão.

4 – Investigar os efeitos colaterais e tolerabilidade da NanoALA-TFD no tratamento de lesões da pele.

5 – Investigar, por estudo piloto intra-indivíduo, usando um novo sistema de quantificação, a evolução do campo de cancerização em pacientes submetidos à TFD realizada por formulações derivadas do ALA (NanoALA) e metilaminolevulinato (MAL).

3. Metodologia

A descrição da metodologia será realizada em duas partes, sendo a primeira relativa ao tratamento das lesões localizadas, atendendo aos objetivos específicos relacionados à TFD com NanoALA (1 a 4) e a segunda parte, à do estudo piloto em campo de cancerização (objetivo 5).

Parte I - Tratamento das lesões localizadas

Nesta parte do trabalho foi realizado um ensaio clínico, aberto e prospectivo com terapia fotodinâmica, utilizando-se o ácido 5- aminolevulínico em nanoemulsão (NanoALA), no tratamento de queratoses actínicas (QA), carcinoma basocelular superficial (CBCs) e doença de Bowen (DB).

3.1. Pacientes

Foram tratados os pacientes com lesões que preenchiam os critérios de inclusão estabelecidos pelo presente estudo, atendidos pelo Programa de Câncer da Pele do DF, no ambulatório de Dermatologia do Hospital Regional da Asa Norte (HRAN).

Todos os pacientes foram devidamente esclarecidos a respeito do tratamento e assinaram o Termo de Consentimento (ANEXO), dentro das normas estabelecidas pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos e de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos da Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde, protocolo N° 121/06.

Foram incluídos todos os indivíduos que apresentavam queratoses actínicas, carcinomas basocelulares superficiais e doença de Bowen diagnosticados clínica e histologicamente, que aceitaram participar do estudo e que obedeceram aos demais critérios abaixo relacionados:

a) Lesões de CBCs e DB com diâmetro superior a 1 cm foram biopsiadas em mais de um lugar, tendo sido incluídas, preferencialmente, aquelas que apresentaram até 3 cm de diâmetro.

b) Tumores que obedeceram a esses critérios, mas localizados em áreas de risco, zona “H” na face (HABIF, 2005), só foram tratados quando os pacientes se recusaram ou não tiveram condições clínicas de se submeter à cirurgia.

Foram excluídos pacientes com imunossupressão endógena ou secundária, fotossensibilidade, hipersensibilidade ao ALA, gravidez e amamentação.

3.2. Fármaco fotossensível (pró-fármaco)

O pró-fármaco ácido aminolevulínico (ALA) foi utilizado na concentração equivalente a 20%, em preparações manipuladas pelo Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto e nomeadas NanoALA.

Para a produção do NanoALA, o ALA foi encapsulado em uma nanoemulsão polimérica produzida a partir de ácido poliláctico-poliglicólico e de lípides fosfatidilcolina (50:50), com tamanho médio variando de 100 a 300 nm. A nanoemulsão polimérica de óleo-em-água foi preparada na presença de ALA pelo processo de emulsificação espontânea, conforme descrito na literatura (PRIMO et al, 2011). Em resumo, a fase orgânica (acetona ou mistura de solventes orgânicos) contendo triglicérides de cadeias médias, fosfolípides de soja naturais e ALA (Dye Pharmaceutical, Brasil), este último a uma concentração final de 20%, foi preparada a 55°C. Subsequentemente, esta solução orgânica foi adicionada à fase aquosa contendo o surfactante aniônico, poloxâmero 188 (Sigma-Aldrich co., St. Louis, MO, EUA), sob agitação magnética. O solvente orgânico foi removido por evaporação sob pressão reduzida a 60°C. Formulações sem a droga fotossensibilizante foram preparadas, sob as mesmas condições, para serem usadas como referência para as análises espectroscópicas e fotobiológica. A amostra foi caracterizada por microscopia eletrônica de transmissão e zeta sizer.

3.3. Equipamento Eletromagnético: Fonte de Luz

O equipamento utilizado neste trabalho foi um aparelho produzido pela empresa INDUSTRA (SP) que é uma fonte de luz LED (Light Emitting Diodos) de ultra brilho, constituído por uma parte central e uma haste à qual podem ser acopladas 4 cabeças aplicadoras (4 spots). Inicialmente foi utilizado o Spot -PDT, lâmpada desenvolvida especificamente para a realização de terapia fotodinâmica em câncer da pele. Baseado nos trabalhos da literatura utilizando menores fluências e energias, compensados pelo

maior tempo de exposição (FOSTER et al, 1991; HENDERSON, Bush, Snyder, 2006; SHESADRI et al, 2008), decidiu-se utilizar o Spot –RED, também com LED, 635nm, com maior superfície ativa de LED. O tempo de exposição foi aumentado de 7 para 20 minutos para compensar a menor energia e fluência. Iniciou-se o uso em QA e em algumas lesões localizadas. As especificações técnicas estão descritas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Especificações técnicas das cabeças aplicadoras (“Spot”) do equipamento eletrônico gerador de luz

	Spot RED	Spot PDT
Comprimento de Onda	635 nm	630 nm
Intensidade Óptica	11 mW/cm ²	100 mW/cm ²
Superfície Ativa dos LED	01 central de 175 × 195 mm	40 × 80 mm
	02 laterais de 85 × 195 mm	

3.4. Fluorescência

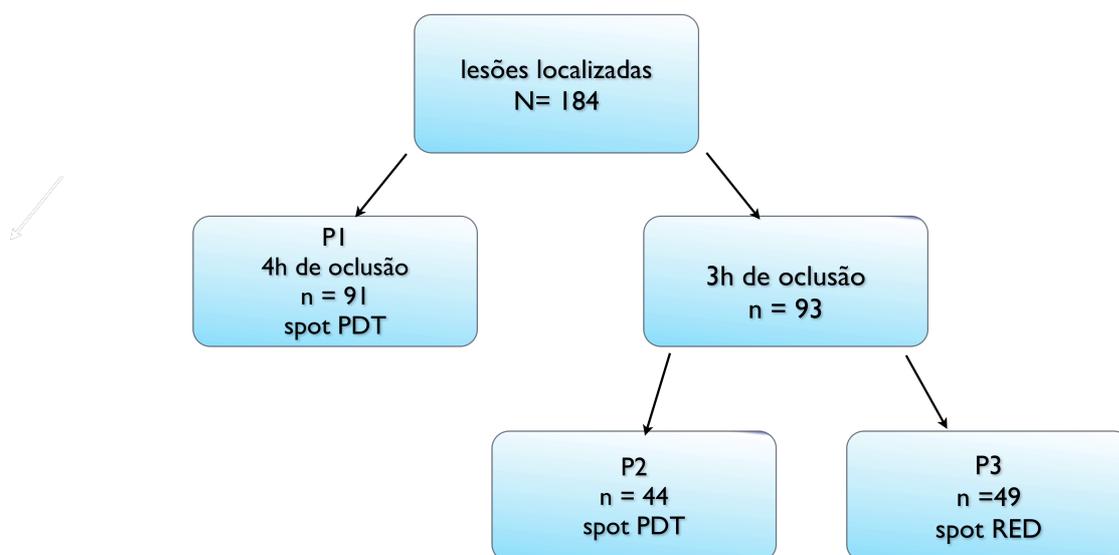
Os estudos de incorporação dos fármacos sobre a lesão e controle de biodistribuição da droga foram feitos com fotografias seriadas realizadas sob a iluminação de luz ultravioleta (luz de Wood), emitida por equipamento produzido na empresa Yoshi (SP). Este procedimento permite o monitoramento do consumo do PpIX, que fluoresce na cor vermelho coral quando iluminada pela luz ultravioleta.

Em alguns casos previamente selecionados foi realizada a espectroscopia de fluorescência do fármaco Protoporfirina IX, detectada por meio de uma sonda e processada por um software, traduzida então para um gráfico do “Excel”(Microsoft), comparando-se a fluorescência antes e após a TFD.

3.5. Protocolo de procedimento

Para o estudo, os pacientes foram separados em dois grandes grupos: Período de oclusão de 4 horas (como é citado na literatura com o ALA livre a 20% para o tratamento de QA e CPNM) e período de oclusão de 3 horas, como descrito no Fluxograma 3.1. Na sequência os grupos foram subdivididos de acordo com o tempo de oclusão e a fonte de luz spot PDT ou spot RED, sendo denominados protocolos 1, 2 e 3 (P1, P2 e P3), como descrito no Fluxograma 3.1 e na Tabela 3.2. A segunda fonte de luz foi usada com o objetivo de reduzir a dor e, também pelo fato da mesma tratar uma área bem maior de uma só vez, como descrito no item 3.2.

Fluxograma 3.1- Distribuição dos grupos e subgrupos submetidos à NanoALA-TFD



As lesões previamente selecionadas por estudos histológicos foram submetidas à antissepsia com álcool 70%, limpeza da pele com solução fisiológica 0,9%, curetagem superficial e à aplicação do fármaco fotossensível. O volume de 0,1mL de NanoALA acondicionado em seringas de 1mL foi aplicado em uma área de 5/5cm de diâmetro (área tratada total = 25cm²) que incluíam, de forma óbvia, as lesões. A aplicação nas lesões neoplásicas teve no mínimo 2cm de margem. Em seguida, as áreas foram

ocluídas durante 4 ou 3 horas. Após o período de oclusão as lesões foram expostas à irradiação com luz visível no comprimento de onda desejado (630 nm e 635nm), de acordo com o protocolo.

Tabela 3.2 - Descrição dos protocolos utilizados de acordo com o tempo de oclusão, tipo de fonte de luz, irradiância, fluência, tempo de exposição e distância das lâmpadas

Número do protocolo	Tempo de oclusão (horas)	Fonte de luz (635nm) spot	Irradiância (mw/cm ²)	Fluência (j/cm ²)	Tempo de exposição em minutos)	Distância da fonte de luz (cm)
P1	4	PDT-	90	37.8	7	4-7
P2	3	PDT	90	37.8	7	4-7
P3	3	RED	11	13.18	20	7-10

P1, P2 e P3 = Protocolo 1, 2 e 3, respectivamente.

3.5.1 Avaliação da cura

Documentação fotográfica das lesões foi realizada antes do procedimento e no seguimento do tratamento. Fotografias com a luz de Wood foram realizadas antes e logo após o procedimento para monitoramento do processo.

Cerca de sete dias após o procedimento descrito acima (primeira aplicação), foi realizada uma segunda sessão (aplicação). Os retornos e seguimento clínico ocorreram com 7, 30 e 90 dias após o tratamento TFD, com avaliação clínica e histopatológica final. Depois deste período, as consultas ocorreram a cada três meses até se completar 12 meses pós-procedimento. Ao fim de 12 meses os pacientes foram acompanhados a cada três ou seis meses, de acordo com seu grau de comprometimento actínico. Diante de qualquer suspeita de recidiva, os pacientes eram submetidos à reavaliação clínica e histopatológica e, se necessário, a um novo tratamento.

3.5.2 Avaliação da dor

A dor e ardência foram avaliadas, tanto pelo médico quanto pelo paciente, durante e após o tratamento por uma escala analógica numérica de dor de zero a 10, sendo zero ausência de dor e 10, o valor máximo.

3.5.3 Avaliação de outros efeitos adversos

A presença ou ausência dos efeitos adversos edema, infecção, exulceração e ulceração foram investigados dentro das duas primeiras semanas após o tratamento.

3.5.4 Avaliação do resultado estético

O resultado estético foi avaliado com 4 meses de seguimento, tanto pelo paciente como pelo médico responsável, e foi mensurado na escala: ruim, regular, bom, muito bom e excelente.

3.6. Análise Estatística

Os resultados foram analisados por meio do software SPSS, versão 16.0 e uso do programa SAS 9.2. Para efeito de análise utilizou-se um nível de significância de 5%. Para a análise dos resultados de eficácia nos diferentes protocolos foi empregado o teste de χ -quadrado ou exato de Fisher. Para a comparação dos resultados de eficácia ao longo do tempo foi realizado o teste de log-rank e para os casos em que eram comparados três grupos usou-se comparações múltiplas com ajustamento de Tukey. Para análise e comparação da intensidade da dor foi utilizado um modelo ANOVA a dois fatores de variação e com interação. Quando diferença entre os fatores foi detectada, foi empregada a análise com ajustamento de Bonferroni. Para verificação da intensidade média da dor e intensidade dos efeitos colaterais entre as seções foram também empregados o teste não paramétrico de Wilcoxon e o teste de simetria de Boweaker, respectivamente.

Parte II – Campo de cancerização

3.7. Pacientes

Baseado nos resultados encontrados, observando-se a fluorescência intensa nas lesões localizadas, pele fotodanificada e boa tolerabilidade do NanoALA, resolveu-se fazer um estudo piloto comparativo intraindivíduo, quantitativo, usando-se o NanoALA e o metilaminolevulinato (MAL) para avaliar o campo de cancerização.

Para quantificar o campo de cancerização e permitir a avaliação das diferenças entre os dois fotossensibilizantes, foi desenvolvido um software para cálculo da área fluorescente. O tempo de oclusão foi reduzido para duas horas, tanto para reduzir a dor, quanto para melhor observar a redução da fluorescência ao longo do tempo.

Foi realizado um estudo cego, intraindivíduo, com três pacientes portadores de queratoses actínicas na face. Foram selecionados pacientes que apresentavam queratoses actínicas de distribuição simétrica localizadas sobre áreas fotodanificadas. Lesões suspeitas de carcinoma basocelular (CBC) e carcinoma epidermóide (CEC), quando presentes, foram biopsiadas e adequadamente tratadas. Foram excluídos pacientes com imunossupressão endógena ou secundária, fotossensibilidade, hipersensibilidade ao ALA, gravidez e amamentação.

3.8. Fármacos fotossensíveis

Nos estudos do campo de cancerização, dois fármacos fotossensíveis foram usados:

- (i) Ácido 5-aminolevulínico (ALA) tópico em nanoemulsão- NanoALA, como descrito no item 3.2.
- (ii) Metilaminolevulinato(MAL) – METVIX®. Disponível na forma de cloridrato de aminolevulinato de metila na concentração de 16%, apresentados na forma de tubos contendo 2g.

3.9. Procedimento

Foram definidos dois campos de tratamento: hemifaces direita e esquerda, tratados sequencialmente na mesma sessão. Em cada hemiface foi aplicado um fármaco, MAL ou NanoALA, sendo sempre o mesmo fármaco usado nas sessões subsequentes. Foram aplicados 500mg aproximadamente em cada hemiface. A oclusão foi realizada com papel filme de PVC e, em seguida, papel de alumínio. O período de oclusão foi de 2 horas. Como fonte de luz foi utilizado o spot RED-LED comprimento de onda de 630 nm, 11 mW/cm² e 13,18 J/cm² (Multiwaves®, Industra, Brasil), durante 10 minutos. O tempo de iluminação também foi reduzido de 20 para 10 minutos para melhor observar a evolução da fluorescência ao longo do tempo. A aplicação foi realizada em cada hemiface, separadamente, com a proteção da exposição à luz na outra hemiface. Durante a exposição à luz a pele foi resfriada com jato de ar frio (Siberian, Industra, Brasil) e borrifos de água gelada. Nessa pesquisa foram realizadas 4 sessões, com intervalo de 3 semanas entre elas.

O paciente e o avaliador em teste cego desconheciam o que seria aplicado em cada hemiface. A fluorescência apresentada antes e após a exposição à luz foi documentada por meio de fotografias realizadas com iluminação utilizando a luz de Wood (luz ultravioleta), com escala milimétrica anexada para quantificação da área luminescente. As imagens foram processadas por software de tratamento de imagem, com quantificação da fluorescência da protoporfirina IX (PpIX), nas duas hemifaces, comparando-se os resultados, tanto intra-indivíduo, como entre os pacientes.

Para o estudo, as fotos para avaliação clínica foram padronizadas e realizadas com o equipamento OMNIA Imaging System (Canfield Scientif, USA), antes do tratamento, um mês e seis meses depois. A satisfação do paciente e do médico obedeceu uma escala com valores de zero a 5, onde zero era a ausência de melhora, 1-fraco, 2-regular, 3-bom, 4-muito bom e 5-excelente. A intensidade da dor era avaliada durante a sessão, nos primeiros 15 minutos e primeiras 24 horas, utilizando-se uma escala analógica numérica de dor, sendo zero a 10, onde zero correspondia à ausência de dor e 10, dor insuportável.

3.10. Análise do campo de cancerização pelo Software

A fim de analisar quantitativamente a evolução temporal das áreas tratadas segundo o protocolo descrito, relacionadas com a queratose actínica ou fotodano, um software de imagem de fluorescência sensível foi desenvolvido. Em resumo, este software grava digitalmente as áreas fluorescentes sob iluminação da lâmpada Wood, utilizando um novo filtro baseado em espaço de cor RGB. Avalia-se a área luminescente dentro de uma região de interesse, no trabalho definida como um polígono fechado, desenhado com base em aspectos anatômicos do rosto do paciente, canto interno e externo do olho, inserção da orelha e ângulo da mandíbula. Foi escolhido o espaço de cor RGB para processamento de imagem devido à sua natureza orientada a hardware que corresponde ao modo como os seres humanos percebem as cores, sendo sensível ao vermelho, verde e componentes azuis da luz visível (GONZALES & RICHARD, 2008).

Além disso, foi implementada neste software uma característica que permite ao usuário mapear as bordas do campo de cancerização simultaneamente em duas imagens selecionadas, a original e uma outra processada, permitindo a comparação dos resultados obtidos na análise da região saudável e do campo de cancerização da face do paciente. Uma descrição mais detalhada do software pode ser encontrada em um recente patente recentemente depositada (INPI-12876-4). Para cada hemiface, as áreas totais calculadas foram representadas em função do tempo de tratamento (sessões TFD) e o tempo de decaimento foi observado comparativamente. Os resultados permitem avaliação das diferenças observadas nas constantes de decaimento do campo de cancerização (CC) (meia-vida), extensão da área alvo do CC e redução da área fracional de CC, em termos de nanoencapsulação ou não do fotossensibilizante.

3.11. Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizado o software de Segmentação Colorimétrica – Color Seg- INPI 12876-4.

4. Resultados

4.1 Caracterização da amostra NanoALA

A Fig. 4.1 ilustra dados relacionados com a caracterização da NanoALA. A Fig.4.1A propõe um esquema de nanocápsula (NC) suspensa na nanoemulsão: na estrutura fosfolipídica da nanocápsula, as extremidades lipofílicas das moléculas estão voltadas para o interior oleoso, enquanto as cabeças polares estão voltadas para o exterior. A Fig.4.1B mostra uma micrografia típica da nanoemulsão, obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET), realizada para que se estime o tamanho das nanocápsulas presentes na amostra. É possível observar que nas nanocápsulas suspensas as camadas fosfolipídicas aparecem como anéis escuros envolvendo conteúdo oleoso interno mais claro.

As Fig. 4.1C e 4.1D mostram as curvas típicas de distribuição de tamanho (diâmetro) e potencial zeta (carga elétrica) obtidas para a nanocápsula contendo ALA, enquanto a Tabela 4.1 resume os valores obtidos (tamanho, dispersão de tamanho e carga elétrica).

O aumento de tamanho da NC-ALA comparado à NC, sugerindo o ancoramento das moléculas de ALA na superfície externa da NC, pode ser observado a partir da Tabela 4.1. Adicionalmente, o aumento médio de 15nm na espessura da parede da NC explica o surgimento de uma cobertura bem estruturada, baseada em ligações moleculares, que sugere a origem da alta estabilidade do produto final. Além disso, os dados do potencial zeta incluídos na Tabela 4.1 revelam uma redução substancial, de -40,3mV para -51,4mV, como resultado do nanoencapsulamento do ALA, representando uma mudança significativa da superfície externa da NC, supostamente decorrente do ancoramento das moléculas do ALA.

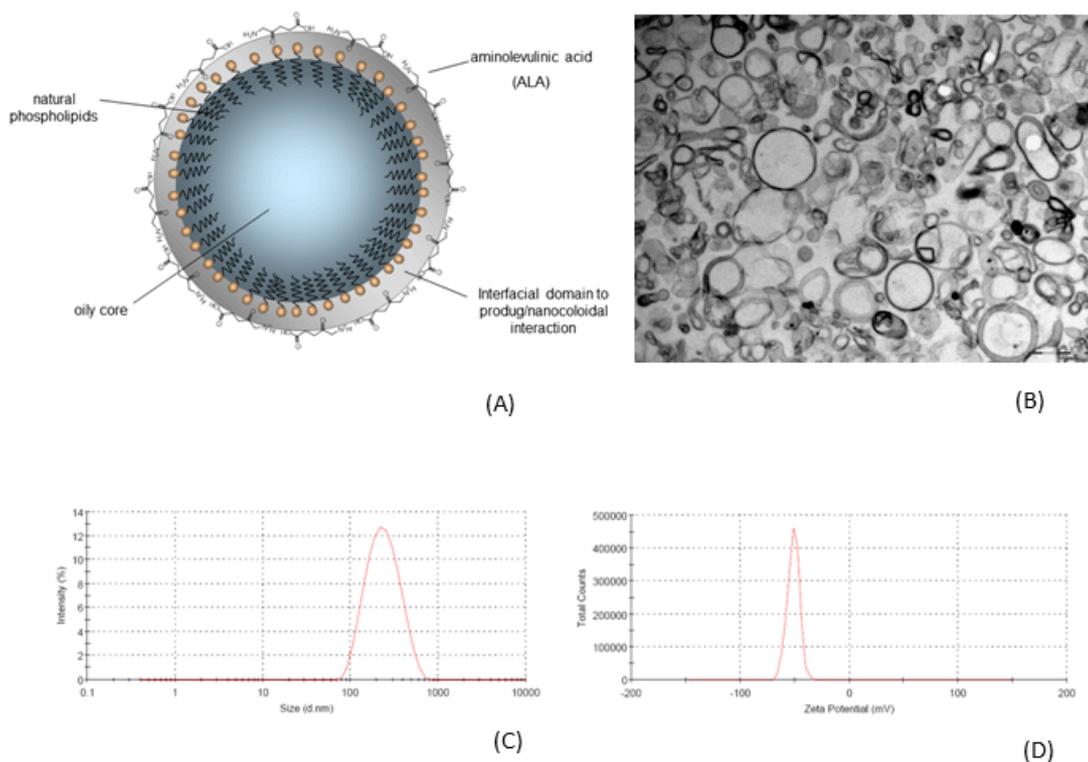


Figura 4.1 – (A) Desenho representando a nanoemulsão produzida; (B) micrografia eletrônica de transmissão típica da nanoemulsão; (C) distribuição de tamanho hidrodinâmico típico da nanoemulsão contendo ALA (NanoALA), obtido por meio da medição dinâmica de espalhamento de luz; (D) distribuição de potencial zeta típica da nanoemulsão contendo ALA (NanoALA), obtida por medição de electroforese.

Tabela 4.1 - Parâmetros físico-químicos de nanocápsulas vazias (NC) e nanocápsulas contendo ALA (NC-ALA).

	Amostras	
	NC	NC-ALA
Tamanho (nm)	180,0	210,2
Dispersão do tamanho	0,08	0,16
Potencial zeta (mV)	-40,3	-51,4
Solubilidade	Aquosa	aquosa
Estabilidade físico-química (dias)	90	90
Mecanismo de PDT	-	Tipo II (1O_2)

PARTE I – Terapia fotodinâmica nas lesões localizadas

4.2 A amostra NanoALA e intensidade de fluorescência

A comprovação de que a amostra NanoALA poderia ser útil na TFD foi obtida por exames de fluorimetria que, por emprego da luz de Wood, permite que se visualize, em vermelho coral (Fig. 4.2A), a protoporfirina IX (PpIX) produzida. Dez pacientes portadores de 11 lesões foram submetidos a exames de fluorimetria, e observou-se uma nítida correlação entre a intensidade da fluorescência e os dados obtidos pelo fluorímetro (ver Fig. 4.2). Observa-se que a exposição à luz reduz a fluorescência de mais de 900 unidades de intensidade para menos de 200 unidades, intensidade esta quase semelhante à da pele normal controle.

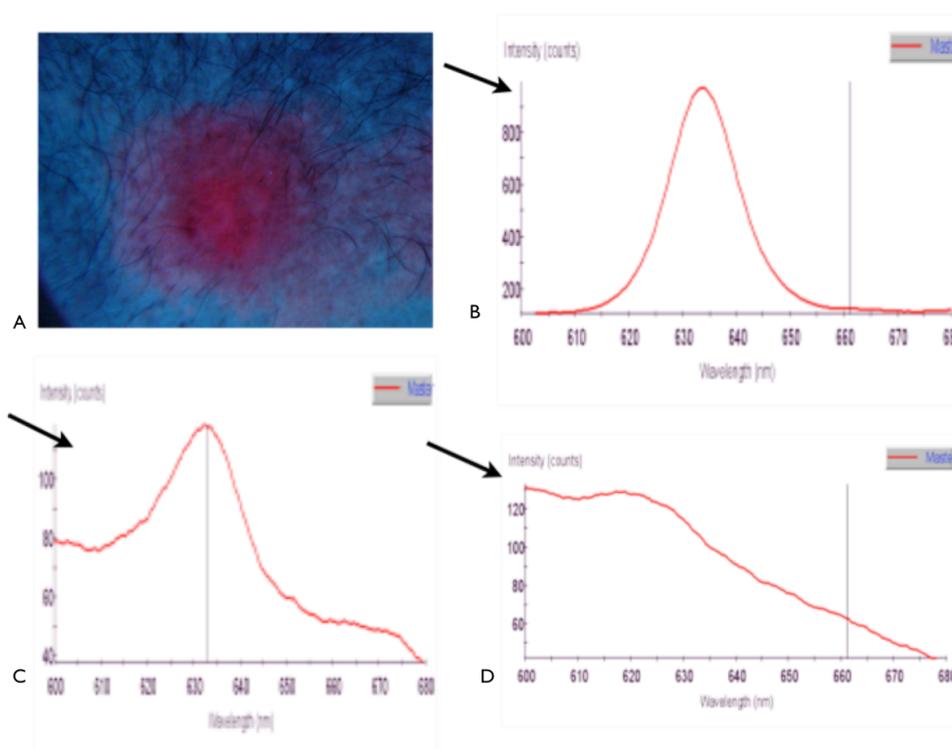


Figura 4.2 - Intensidade da fluorescência detectada em uma lesão de carcinoma basocelular superficial após 4 h de oclusão com NanoALA. A- Fluorescência em vermelho coral evidenciada pela luz de Wood. B- Representação gráfica da fluorescência detectada por um sensor (espectroscopia) e transcrita em representação gráfica, pouco antes da iluminação com luz vermelha (LED, 630nm). C- Intensidade da iluminação logo após a iluminação. D- Intensidade da fluorescência na pele normal (controle).

4.3 Caracterização da amostra de pacientes e das lesões tratadas

O tratamento NanoALA-TFD foi realizado em 65 pacientes e 184 lesões. Com idade entre 23 e 88 anos, a maioria dos pacientes tratados era do sexo feminino (62%) e apresentava os tipos 1 e 2 pela classificação de Fitzpatrick (75%), conforme detalhado na tabela 4.2. O diâmetro das lesões variou de 0,1 a 6 cm de diâmetro com média de $1,30 \pm 0,08$ cm. Nota-se que cerca de 87% das lesões tinham diâmetro inferior a 3 cm.

Tabela 4.2 - Distribuição dos pacientes de acordo com a idade e sexo e distribuição das lesões de acordo o diagnóstico e localização.

Nº de pacientes	65
Sexo feminino, n (%)	40 (61,5%)
Sexo masculino, n (%)	25 (38,5%)
Idade em anos, média	59
Mediana	60
Mínima	23
Máxima	88
Desvio padrão	15
Classificação da pele segundo Fitzpatrick	
Tipo 1	20 (30,8%)
Tipo 2	29 (44,6%)
Tipo 3	8 (12,3%)
Tipo 4	3 (4,6%)
Sem informação	5 (7,7%)
Nº de lesões tratadas:	
	184
Diagnóstico das lesões tratadas	
Queratoses actínicas	120 (65,2%)
Carcinoma basocelular superficial	45 (24,5%)
Doença de Bowen	19 (10,3%)
Localização das lesões	
Face	124 (67,4%)
Tronco	32 (17,4%)
Membros superiores	18 (9,8%)
Membros inferiores	10 (5,4%)
Tamanho das lesões em cm:	
<1	86 (46,7%)
1-2	56 (30,4%)
2-3	17 (9,2%)
3-4	17 (9,2%)
>4	8 (4,3%)

4.4 Eficácia da NanoALA-TFD nos pacientes

Os 65 pacientes incluídos neste estudo apresentaram queratoses actínicas, carcinomas basocelulares superficiais e doença de Bowen, conforme diagnóstico clínico e histológico. Após 3 e 12 meses do tratamento com NanoALA, foram novamente examinados. Aos três meses, 83% (54/65) dos pacientes apresentaram cura clínica e 17% (11/65), remissão parcial. Na visita dos 12 meses, 94% (48/51) dos pacientes em seguimento apresentaram cura clínica em todas as lesões, enquanto a taxa de recidiva foi de 6% (3/51) (Fig. 4.3).

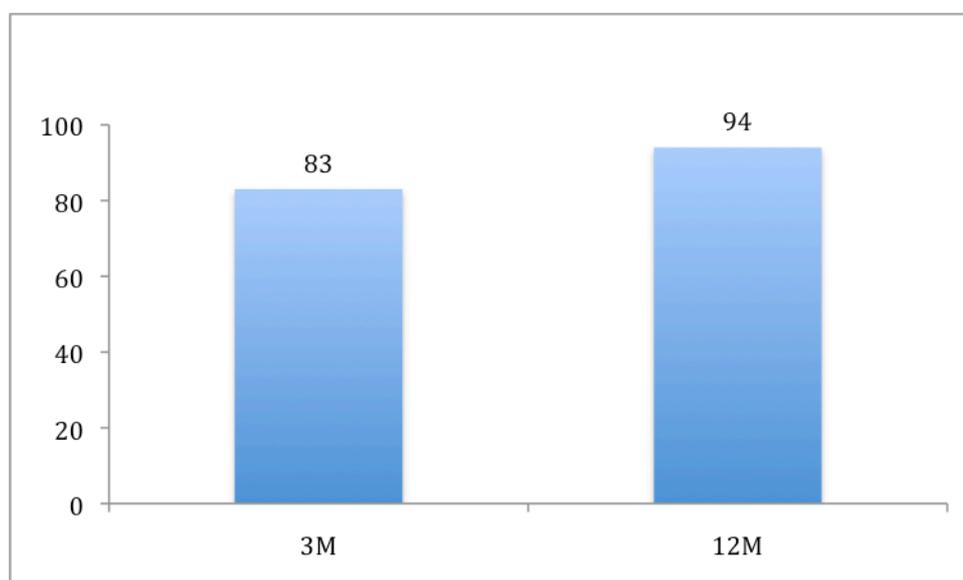


Figura 4.3 – Frequência (%) de cura dos pacientes tratados com NanoALA-TFD após 3 e 12 meses (M) de seguimento.

4.5 Eficácia da NanoALA-TFD nas lesões

As respostas clínicas foram também contabilizadas segundo o número de lesões tratadas (184). A Fig. 4.4 mostra os resultados de cura clínica obtidos 3 e 12 meses após a última sessão de TFD, tanto para o conjunto das 184 lesões, quanto para cada lesão diagnosticada (QA, CBCs e DB). Observa-se que as frequências de cura clínica são expressivamente altas, em geral maiores do que 90%. O único tipo de lesão que apresenta queda na frequência de cura aos 12 meses em relação ao que havia

apresentado aos 3 meses é a queratose actínica. Por outro lado, as lesões cancerígenas CBC e DB apresentam aumento na frequência de cura após 12 meses do tratamento, chegando a 100% no caso de DB.

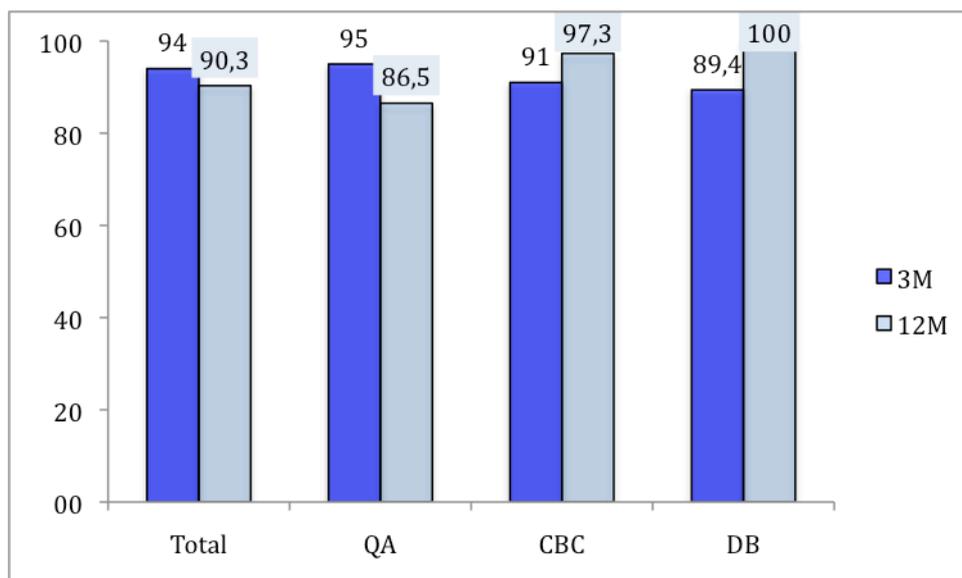


Figura 4.4 – Frequência (%) de cura clínica investigada 3 e 12 meses após TFD com NanoALA, de acordo com o total de lesões e tipo de lesão diagnosticada. QA = queratoses actínicas, CBC=carcinoma basocelular, DB=doença de Bowen.

As respostas clínicas relacionadas ao total de lesões, aos 3 e 12 meses após TFD, estão detalhadas na Tabela 4.3. Dados referentes a cada um dos diagnósticos (QA, CBC, DB), com os respectivos números de remissões parciais (RP), recidivas (RE), tempo de seguimento insuficiente e interrupção de tratamento (IT) estão também incluídos. O percentual de lesões que tiveram cura clínica completa até 3 meses foi de 94% (173/184), enquanto seis por cento (11/184) tiveram remissão parcial. Aos 12 meses, os dados sofreram pouca alteração, sendo 90,4% (141/156) os que tiveram cura clínica e 9,6% (15/156) os que apresentaram recidiva das lesões. Se forem considerados todos os dados acumulados em 12 meses, ou seja, incluídos no total os valores de IT, constata-se 6% (11/184) de remissões parciais e 8,15% (15/184) de recidiva.

Tabela 4.3 Resposta clínica ao NanoALA-TFD das lesões de pele de acordo com o diagnóstico, 3 e 12 meses de seguimento

Tipo de lesão Nº lesões	% de Cura Clínica (Nº resposta clínica do tumor/ Nº tumores tratados)		RP	RE	IT*
	3m	12m			
Total 184	94,0% (173/184)	90,4% (141/156)	6% (11/184)	8,15% (15/184)	10,3% (19/184)
QA 120	95% (114/120)	86,5% (90/104)	5% (6/120)	13,4% (14/104)	20% (24/120)
CBCs 45	91% (41/45)	97,3% (36/37)	9% (4/45)	2,7% (1/37)	11,1% (5/45)
DB *19	89,4% (17/19)	100% (16/16)	1%	0%	15,5% (3/19)

TFD: terapia fotodinâmica; NanoALA: ALA em nanoemulsão; CC – cura clínica; RP-remissão parcial; RE-recidiva; IT-interrupção de tratamento= número de lesões que foram excluídas do cálculo de 12 meses por remissões parciais e interrupção do seguimento por perda de contato ou tempo de seguimento insuficiente (que ainda não chegaram aos 12 meses); QA: queratose actínica; CBCs: carcinoma basocelular superficial; DB: Doença de Bowen

* Dois pacientes com remissão parcial foram submetidos a nova TFD e obtiveram cura

Dos pacientes que compareceram às consultas nos períodos de 18, 21, 24 e 30 meses (quando foram observadas 102, 76, 42 e 35 lesões, respectivamente), cujos dados não constam da tabela, 100% das lesões apresentavam, no que diz respeito ao seu aspecto clínico, remissão total. O número de pacientes que não havia completado o tempo de seguimento referente a cada período de tempo acima foi de 28, 52, 80 e 80, respectivamente. À medida que o período de tempo do estudo aumenta, diminui o total de lesões estudadas por perda de contato com paciente que, neste caso, foi de 29, 31, 37, 44, respectivamente. Considerando o tempo médio de seguimento de 18 meses, as taxas acumuladas de cura clínica foram 87,5%, de remissão parcial 4,3% e de recidiva 8,15%.

4.6 Caracterização da amostra das lesões de acordo com o tipo de lesão diagnosticada (QA, CBC, DB) e protocolo usado (P1, P2,P3)

A Tabela 4.4 apresenta a distribuição das lesões de acordo com os protocolos P1 a P3 descritos na metodologia, a qual detalha a irradiância, fluência, tempo de exposição e distância das fontes de luz utilizadas em cada protocolo. Vê-se que a maioria das lesões foi tratada com o protocolo P1 (91/184), enquanto quantidades aproximadamente iguais de lesões foram tratadas com os protocolos P2 e P3 (44 e 49,

respectivamente). A maioria das lesões era do tipo QA (65,2%), sendo menos frequentes as diagnosticadas como Doença de Bowen (10,3%).

Tabela 4.4 - Distribuição das lesões de acordo com o tipo de lesão diagnosticada (QA, CBC, DB) e protocolo usado (P1, P2, P3)

Número do protocolo	Tempo de oclusão em horas	Fonte de luz (635nm) spot	Diagnóstico			
			QA	CBCs	DB	Total
P1	4	PDT	63	24	4	91
P2	3	PDT	26	12	6	44
P3	3	RED	31	9	9	49
total			120	45	19	184

4.7 Eficácia da NanoALA-TFD de acordo com o tempo de oclusão e fontes de luz

Na Tabela 4.5 estão descritos os percentuais de cura de acordo com tempo de oclusão, fontes de luz, e os dois fatores simultaneamente (P1, P2 e P3) para 3 meses de seguimento, enquanto na Tabela 10, os mesmos dados são apresentados para 12 meses de seguimento. Para se comparar as proporções de cura clínica entre os tempos de oclusão, entre as fontes de luz e entre os protocolos P1, P2 e P3 foi empregado o teste de Qui-quadrado ou exato de Fisher.

Em relação aos 3 meses, observa-se que com 3 horas de oclusão obtém-se porcentagem de lesões com cura clínica significativamente maior do que a porcentagem de lesões com cura clínica após 4 horas de oclusão (P2 e P3 versus P1; P2 versus P1; P3 versus P1) (Tabela 4.5).

O uso das duas fontes de luz, ou seja, Spot-PDT versus Spot- RED (P1+ P2 versus P3), não levou a diferenças estatisticamente significativa na frequência de cura clínica das lesões (Tabela 4.5).

Aos 12 meses de seguimento (Tabela 4.6), o uso de diferentes tempos de oclusão ou de diferentes fontes de luz não influenciou significativamente nos percentuais de cura clínica.

Tabela 4.5 – Frequência de cura de acordo com os tempos de oclusão, e as fontes de luz aos 3 meses após TFD para todas os diagnósticos

3 meses	Cura Clínica* % (n)	Remissão parcial % (n)	p - valor‡
Tempo de Oclusão			0,0046
4 h	89,0% (81)	11,0% (10)	
3 h	98,9% (92)	1,1% (1)	
Fonte de Luz			0,0692
PDT	91,9% (125)	89,1% (11)	
RED	100,0% (48)	0,0% (0)	
Protocolo			0,0163
4 h PDT (P1)	89,0% (81)	11,0% (10)	
3 h PDT (P2)	97,8% (44)	2,2% (1)	
3 h RED(P3)	100,0% (48)	0,0% (0)	

* Resultados expressos em frequência (%); ‡ valores de p referentes à cura clínica

Tabela 4.6 – Frequência de cura de acordo com os tempos de oclusão e as fontes de luz aos 12 meses após TFD para todos os diagnósticos

12 meses	Cura Clínica*	Recidiva*	p - valor‡
Tempo de Oclusão			0,3995
3 h	88,6% (78)	11,4% (10)	
4 h	92,6% (63)	7,5% (5)	
Fonte de Luz			1,0000
PDT	90,8% (99)	9,2% (10)	
RED	89,4% (42)	10,6% (5)	
Protocolo			0,7374
4 h PDT	92,7% (63)	7,3% (5)	
3 h PDT	87,8% (36)	12,2% (5)	
3 h RED	89,4% (42)	10,6% (5)	

* Resultados expressos em frequência (%); ‡ valores de p referentes à cura clínica;

‡ Resultados do Teste de Qui-Quadrado ou Exato de Fisher.

Com relação às estimativas de cura (Fig. 4.5), o grupo com 4 horas de oclusão apresentou percentual de cura de 89,2% 12 meses após tratamento, enquanto aos 18 meses este valor decresceu para 83,4%, entretanto sem diferença estatística entre estes valores ($p=0,4097$, 95% de intervalo de confiança, teste de Logrank).

A taxa de remissão ou recidiva no intervalo de 3 a 6 meses foi igual a 1,1 %, e mostrou tendência a crescer nas análises de 12 meses, assumindo o valor de 6,7%.

Os grupos com 3 horas de oclusão (P2 e P3), após um ano de tratamento, apresentaram alta previsão de taxas de cura (97,7%) e, após 18 meses de tratamento,

este valor decresceu para 86,3%. A taxa de remissão e/ou recidiva aos 12 meses foi de 2,3%, chegando a 6,6% aos 18 meses.

Não se observou diferença estatística nas estimativas de cura quando se comparam as duas fontes de luz, Spot PDT e o Spot RED, ou seja P1+P2 versus P3 ($p = 0,7744$), mesmo quando se comparam os 3 protocolos P1 vs P2 vs P3 ($p = 0,6948$ –teste de Logrank). De forma similar, também não houve diferença estatisticamente significativa entre as estimativas de cura ($p = 0,6275$) para os diagnósticos de QA, CBCs e DB.

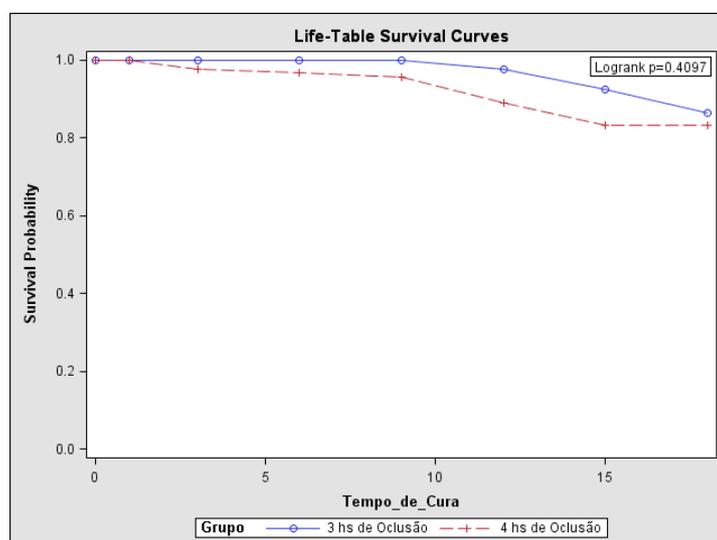


Figura 4.5 - Estimativas de cura para os grupos com 3 horas (P2 +P3) e 4 horas de oclusão (P1). Teste de Logrank.

4.8 Avaliação estética

Os pacientes avaliaram o tratamento como excelente (60,0%), muito bom (23,1%), bom (9,2%) e regular (3,1%). Concordantes com esta avaliação, os médicos avaliaram o tratamento como excelente (46,2%) e muito bom (38,5%) em 84,7% dos pacientes, bom em 6 (9,2%), regular em 2 (3,1%) e 1 ruim (1,5%). Nesta avaliação foram considerados não somente o aspecto estético, mas também a dor e a cura.

4.9 Cura clínica em pacientes com queratoses actínicas (QA)

Foram tratados 38 pacientes e 120 lesões de QA, sendo 26 (68,4%) pacientes do sexo feminino e 12 (31,6%) do sexo masculino, com idades variando entre 23 e 85 anos. A maioria dos pacientes tinha a pele classificada como tipo 2, segundo Fitzpatrick. A maioria das lesões estava localizada na face (83,3%) e tinha menos que 2cm de diâmetro (83,3%). Na Tabela 4.7 estão descritas as características clínicas dos pacientes e das lesões.

Tabela 4.7 - Distribuição dos pacientes portadores de queratoses actínicas (QA) de acordo com a idade, tipo de pele, e distribuição das lesões de acordo com os protocolos usados, localização e tamanho.

Nº de pacientes	38
Idade em anos, média	61
Mediana	63
Mínimo	23
Máxima	85
Desvio padrão	13,6
Tipo de pele segundo Fitzpatrick	
Tipo 1	12 (31,6%)
Tipo 2	17 (44,7%)
Tipo 3	4 (10,5%)
Tipo 4	1 (2,6%)
Sem informacao	4 (10,5%)
Nº Total de lesões localizada	120
Distribuição nos protocolos:	
P1	63
P2	26
P3	31
Localização das lesões	
Face	100 (83,3%)
Tronco	7 (5,8%)
Membros superiores	10 (8,3%)
Membros inferiores	3 (2,5%)
Tamanho das lesões	
<1	67 (55,8%)
1-2	33 (27,5%)
2-3	8 (6,7%)
3-4	9 (7,5%)
>4	3 (2,5%)

A taxa de cura das lesões de QA aos 3 meses (pontual) foi de 95% (n=114/120) e a remissão parcial ocorreu em 5% (n=6) (Tabela 4.3). Nenhum desses pacientes foi submetido a uma segunda sessão no período de até 12 meses após a última sessão de TFD. Dos pacientes que compareceram à visita aos 12 meses, 86,5% (90/104) apresentaram cura clínica e 13,4% (n=14) recidivaram. Houve perda de contato de pacientes portando 11 lesões (Tabela 4.3).

Dos pacientes que compareceram às consultas nos períodos de 18, 21 e 24 meses (71, 52, e 27 lesões, respectivamente), 100% apresentavam aspecto clínico de remissão total das lesões. Destes, 9, 28 e 47 pacientes, respectivamente, não haviam completado o tempo de seguimento respectivo para cada período de tempo acima citado. O número de lesões por perda de contato com paciente foi de 20, 20 e 26, respectivamente.

A média de seguimento foi de 15,6 meses e a taxa de cura de 83,3% (100 lesões). Aos 12 meses, o número de lesões cumulativas com remissão parcial foi de 5% (6) e o de recidivas, de 11,7%. A taxa estimada de cura completa foi de 92,9% para 1 ano e 83,2% para 1 ano e meio de tratamento.

Nas tabelas 4.8 e 4.9 estão descritas as respostas clínicas para os tempos de 3 e 12 meses de seguimento, respectivamente. Foi empregado o teste de Qui-quadrado para comparar as proporções de cura para os tempos de 3 e 4 horas de oclusão e destes com as fontes de luz, juntos ou separadamente, conforme protocolos P1, P2 e P3. O percentual de cura aos 3 meses para o período de oclusão de 3 horas foi estatisticamente superior ao de 4 horas. Para as demais comparações não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 4.8 Resposta clínica das queratoses actínicas a TFD no período de 3 meses de acordo com os diferentes protocolos

	Cura Clínica *	Remissão parcial	p - valor [‡]
Tempo de Oclusão			0,0285
3 h	57 (100,0%)	0 (0,0%)	
4 h	57 (90,5%)	6 (9,5%)	
Fonte de Luz			0,1972
PDT	83 (93,3%)	6 (6,7%)	
RED	31 (100,0%)	0 (0,0%)	
Protocolo			0,0654
4 h PDT	57 (90,5%)	6 (9,5%)	
3 h PDT	26 (100,0%)	0 (0,0%)	
3 h RED	31 (100,0%)	0 (0,0%)	

p =95% de intervalo de confiança.

Tabela 4.9 Resposta clínica das queratoses actínicas à TFD no período de 12 meses de acordo com os diferentes protocolos

	Cura Clínica*	Recidiva*	p - valor‡
Tempo de Oclusão			0,3996
3 h	47 (83,9%)	9 (16,1%)	
4 h	43 (89,6%)	5 (10,4%)	
Fonte de Luz			1,0000
PDT	63 (86,3%)	10 (13,7%)	
RED	27 (87,1%)	4 (12,9%)	
Protocolo			0,5713
4 h PDT	43 (89,6%)	5 (10,4%)	
3 h PDT	20 (80,0%)	5 (20,0%)	
3 h RED	27 (87,1%)	4 (12,9%)	

- Resultados expressos em frequência (%). ‡ Resultados do Teste de Qui-Quadrado ou Exato de Fisher. p =95% de intervalo de confiança.

4.10 Eficácia e localização das lesões

Foram avaliados os percentuais de cura de acordo com a localização, como descrito nas tabelas 4.10 e 4.11. Aos 3 meses de seguimento a porcentagem de lesões com cura clínica na face e na região cervical e tronco foram estatisticamente maiores que a porcentagem de lesões com cura clínica nos membros superiores e inferiores. Aos 12 meses não mais houve diferença significativa entre estes valores.

Tabela 4.10 - Resposta clínica das queratoses actínicas a TFD no período de 3 meses de acordo de acordo com a localização

Localização	Cura Clínica*	Remissão parcial*	p - valor‡
			0,0281
Face	97 (97,0%)	3 (3,00%)	
Região Cervical + Tronco	7 (100,0%)	0 (0,0%)	
MMSS	8 (80,0%)	2 (20,0%)	
MMII	2 (66,7%)	1 (33,3%)	

- * Resultados expressos em frequência (%); ‡ Resultados do Teste de Qui-Quadrado (95% de intervalo de confiança)

Tabela 4.11 - Resposta clínica das queratoses actínicas a TFD no período de 12 meses de acordo de acordo com a localização

	Cura Clínica *	Recidiva *	p - valor ‡
Localização			0,8061
Face	74 (85,1%)	13 (14,9%)	
Região Cervical + Tronco	7 (100,0%)	0 (0,0%)	
MMSS	7 (87,5%)	1 (12,5%)	
MMII	2 (100,0%)	0 (0,0%)	

- Resultados expressos em frequência (%); ‡ Resultados do Teste de Qui-Quadrado (95% de intervalo de confiança).

4.11 Cura Clínica em pacientes com carcinoma basocelular superficial

Foram tratados 33 pacientes aos quais correspondiam 45 lesões de CBCs. Entre estes, 20 (60,6%) pacientes eram do sexo feminino e 13 (39,4%), do sexo masculino, com idade variando entre 26 e 83 anos. Da mesma forma que observado para as QA, a maioria dos pacientes apresenta o tipo 2 na classificação de Fitzpatrick. A Tabela 4.12 descreve as características clínicas dos pacientes e das suas lesões.

As respostas clínicas das lesões de CBCs com 3 e 12 meses após a última sessão de TFD, já mencionadas anteriormente, estão demonstradas na Fig 4.4 e na Tabela 4.3. O percentual de lesões que tiveram cura clínica completa até 3 meses foi de 91% (41/45). Nove por cento tiveram remissão parcial (4/45). Aos 6 meses, 40 lesões permaneceram com cura completa e houve uma perda de contato. Aos 12 meses, 97,3% (36/37) permaneceram com cura clínica e 1 (2,7%) recidivou. Quatro lesões apresentaram remissão parcial, porém apenas uma foi novamente tratada apresentando-se curada após esta última sessão. Com 12 meses de tratamento, o total acumulado foi de 3 remissões parciais (6,7%) e 1 recidiva (2,2%). Duas lesões tinham tempo de seguimento insuficiente e 3 perderam o contato.

Dos pacientes que compareceram às consultas nos períodos de 18, 21, 24 e 30 meses, quando foram observadas 23, 19, 14 e 11 lesões, respectivamente, 100%

apresentavam aspecto clínico de remissão total. O número de pacientes que não haviam completado o tempo de seguimento respectivo para cada período de tempo acima citado era de 10, 13, 18 e 18 respectivamente, enquanto o número de lesões por perda de contato com paciente foi de 7, 8, 8 e 11 respectivamente. Nove pacientes apresentavam tempo de seguimento superior a 30 meses e desses, 2 tinham 67 meses. Todos permaneceram curados.

Tabela 4.12 - Distribuição dos pacientes portadores de CBCs de acordo com a idade, tipo de pele, e distribuição das lesões de acordo com os diferentes protocolos, localização e tamanho

Nº de pacientes	33
Idade em anos, média	57
Mediana	56
Mínimo	26
Máxima	83
Classificação da pele segundo Fitzpatrick	
Tipo 1	11 (33,3%)
Tipo 2	16 (48,5%)
Tipo 3	5 (15,2%)
Tipo 4	0
Sem informação	1 (3,0%)
Total de lesões localizadas	45
Distribuição nos protocolos:	
P1	24
P2	12
P3	9
Localização das lesões	
Face	19 (42,2%)
Tronco	20 (44,4%)
Membros superiores	5 (11,1%)
Membros inferiores	1 (2,2%)
Tamanho das lesões em cm:	
<1	15 (33%)
1-2	18 (40%)
2-3	4 (9%)
3-4	4 (9%)
>4	4 (9%)

A média do tempo de seguimento foi de 16,3 meses com total acumulado de 3 remissões parciais e uma recidiva. A taxa projetada livre de doença após 12 meses de TFD foi de 92,8% e de 87,3% com 18 meses de seguimento.

Entre as 33 lesões de CBCs com menos de 2 cm de diâmetro, 02 apresentaram remissão parcial e estavam localizadas uma em face (1,0cm) e outra em tronco com 1,0cm (5,8%). Houve uma recidiva com 12 meses (2,9%). A taxa de cura foi de 94% aos 3 meses e 97% aos 12 meses.

Das 12 lesões com diâmetro superior a 2 cm, duas tiveram remissão parcial, sendo uma localizada em face (2,5cm) e outra em tronco (4cm). Dessas 11 lesões nenhuma teve recidiva com acompanhamento de até 42 meses, com exceção de uma, localizada na face, com 2cm de diâmetro, que foi submetida a nova TFD.

A Fig. 4.6 demonstra o resultado clínico de uma lesão de CBCs tratada com NanoALA-PDT.

4.12 Cura clínica de Carcinoma Basocelular e Doença de Bowen segundo período de oclusão, fontes de luz, protocolos e localização

Devido ao reduzido número de lesões de DB e seu menor tempo de seguimento, essas lesões foram agrupadas às do CBCs para as análises de cura em acordo com os períodos de oclusão, fontes de luz (protocolos P1, P2 e P3) e localização.

As respostas clínicas das lesões de CBCs e DB aos 3 e 12 meses de seguimento estão respectivamente descritas nas tabelas 4.13 e 4.14. Foi empregado o teste de Qui-quadrado para comparar as proporções de cura para os protocolos P1, P2 e P3, isto é, para os tempos de oclusão e fontes de luz juntos e separadamente. Não houve diferença estatisticamente significativa para nenhuma das comparações.

Tabela 4.13 - Resposta clínica das lesões de CBCs e DB à NanoALA-TFD no período de 3 meses de acordo com o tempo de oclusão, fontes de luz e diferentes protocolos

	Cura Clínica [*]	Remissão parcial [*]	p - valor [‡]
Tempo de Oclusão			0,1590
3 h	35 (97,2%)	1 (2,8%)	
4 h	24 (85,7%)	4 (14,3%)	
Fonte de Luz			0,3131
PDT	42 (89,4%)	5 (10,6%)	
RED	17 (100,0%)	0 (0,0%)	
Protocolo			0,2157
4 h PDT	24 (85,7%)	4 (14,3%)	
3 h PDT	18 (94,7%)	1 (5,3%)	
3 h RED	17 (100,0%)	0 (0,0%)	

- Resultados expressos em frequência (%). ‡ Resultados do Teste de Qui-Quadrado ou Exato de Fisher. p = 95% de intervalo de confiança.

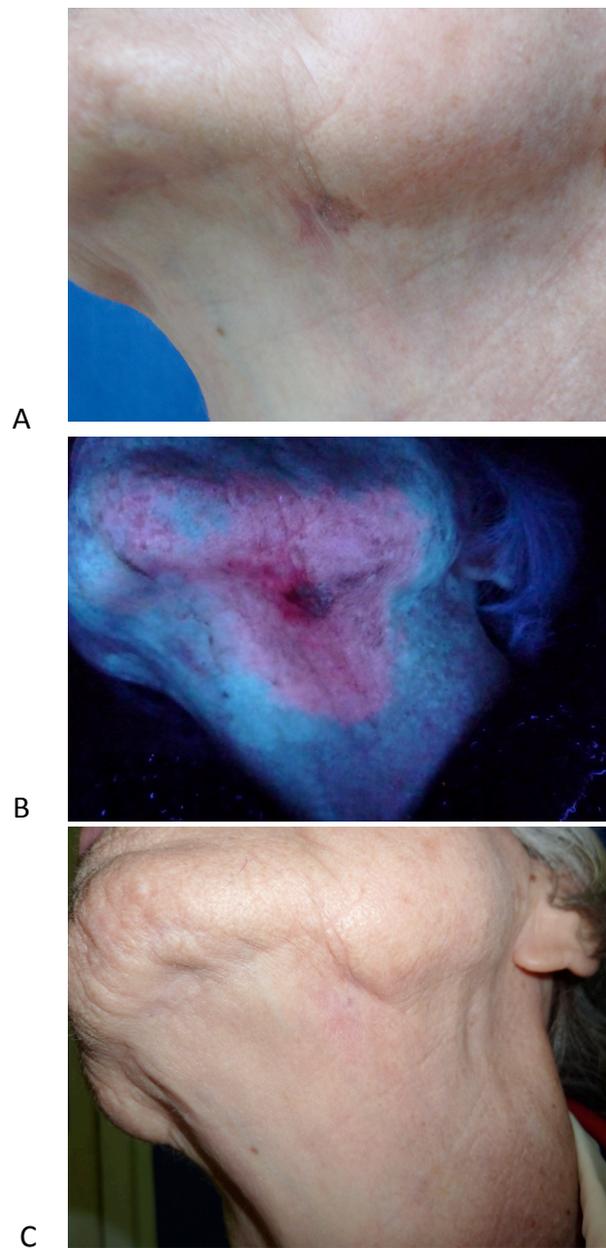


Figura 4.6 – Carcinoma basocelular superficial em paciente de 80 anos, tratado com NanoALA-TFD. A- lesão antes do tratamento. B- Fluorescência antes da aplicação da luz. C – Lesão 18 meses após NanoALA-TFD, spot PDT, $37,8\text{j}/\text{cm}^2$.

Tabela 4.14 - Resposta clínica das lesões de CBCs e DB a NanoALA-TFD no período de 12 meses de acordo com o tempo de oclusão, fontes de luz e diferentes protocolos

	Cura Clínica *	Recidiva *	p - valor ‡
Tempo de Oclusão			1,0000
3 h	31 (96,9%)	1 (3,1%)	
4 h	20 (100,0%)	0 (0,0%)	
Fonte de Luz			0,3077
PDT	36 (100,0%)	0 (0,0%)	
RED	15 (93,7%)	1 (6,3%)	
Protocolo			0,6154
4 h PDT	20 (100,0%)	0 (0,0%)	
3 h PDT	16 (100,0%)	0 (0,0%)	
3 h RED	15 (93,7%)	1 (6,3%)	

* Resultados expressos em frequência (%), ‡ Resultados do Teste de Qui-Quadrado ou Exato de Fisher. p (95% de intervalo de confiança).

Nas tabelas 4.15 e 4.16 estão descritas as respostas clínicas aos 3 e 12 meses de seguimento respectivamente das lesões de CBCs e DB de acordo com a localização. Foi empregado o teste de Qui-quadrado para comparar as proporções de cura para as localizações de face, região cervical e tronco, membros superiores (MMSS) e membros inferiores (MMII). Observa-se que a frequência de cura de CBCs e DB , aos 3 meses, não diferiu estatisticamente de acordo com as diferentes localizações (Tabela 4.15).

Tabela 4.15 - Resposta clínica das lesões CBCs e DB de acordo com a localização para o período de 3 meses de seguimento

Localização	Cura Clínica *	Remissão parcial	p - valor ‡
Face	22 (91,7%)	2 (8,3%)	0,7335
Região Cervical + Tronco	22 (88,0%)	3 (12,0%)	
MMSS	8 (100,0%)	0 (0,0%)	
MMII	7 (100,0%)	0 (0,0%)	

Resultados expressos em frequência (%). ‡ Resultados do Teste de Qui-Quadrado. p (95% de intervalo de confiança).

Da mesma forma, aos 12 meses da TFD, também não foram observadas diferenças estatísticas relativas às diferentes localizações das lesões (Tabela 4.16).

Tabela 4.16 - Resposta clínica das lesões CBCs e DB de acordo com a localização para o período de 12 meses de seguimento

Localização	Cura Clínica*	Recidiva*	p - valor[‡] 1,0000
Face	20 (95,2)	1 (4,8)	
Região Cervical + Tronco	19 (100,0)	0 (0,0)	
MMSS	6 (100,0)	0 (0,0)	
MMII	6 (100,0)	0 (0,0)	

* Resultados expressos em frequência (%).[‡] Resultados do Teste de Qui-quadrado . p (95% de intervalo de confiança).

4.13 Resposta clínica da Doença de Bowen após NanoALA-TFD

Foram tratados 13 pacientes e 19 lesões de DB, conforme características clínicas de pacientes e das lesões descritas na Tabela 4.17. Seis pacientes (46,2%) do sexo feminino e 7 (53,8%) do sexo masculino, com idade variando entre 45 e 85 anos. Também para os pacientes com DB, o tipo 2 segundo classificação de Fitzpatrick foi o mais comum (30,8%). A maioria das lesões tratadas tinha tamanho menor que 3 cm (73,7%). Dois pacientes eram portadores de 4 lesões cada um. O restante possuía lesões únicas estão.

A Figura 4.7 demonstra o resultado clínico de um paciente portador de DB em áreas extensas, bilateralmente. As Figuras 4.8 A, B, C e D representam o detalhe de cada hemiface antes e após tratamento.

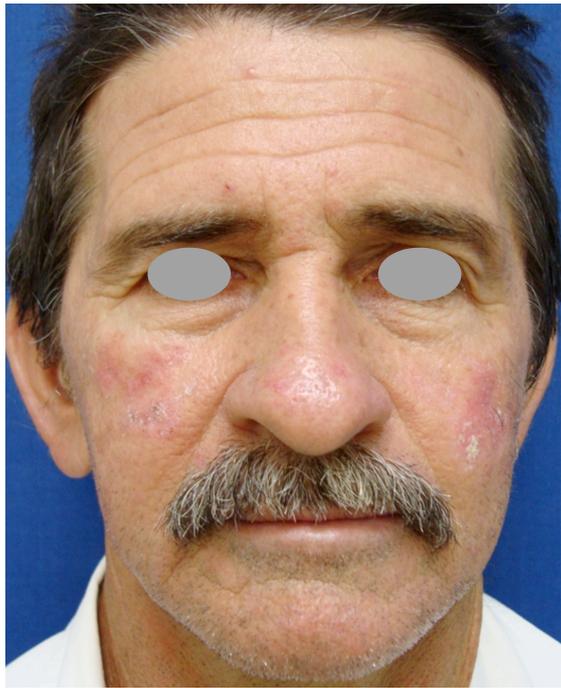
Após 1 ano de tratamento, 100% das lesões de DB estavam curadas. A média de seguimento foi de 12,5 meses (3-21 meses). Apenas 1 paciente tinha seguimento superior (41 meses) e apresentava-se curado. Constataram-se duas remissões parciais que depois de submetidas as sessões adicionais as taxas de cura a partir de 12 meses passaram a ser de 100%, assim permanecendo nos seguimentos de 12 (n=16), 15 (n=10), 18 (n=8) e 21 (n=5) meses. A partir de 12 meses houve perda de contato com 2 pacientes, e o restante não havia completado tempo de seguimento para a visita correspondente.

Tabela 4.17 Distribuição dos pacientes portadores de Doença de Bowen de acordo com a idade e sexo, e, das lesões de acordo o diagnóstico e localização.

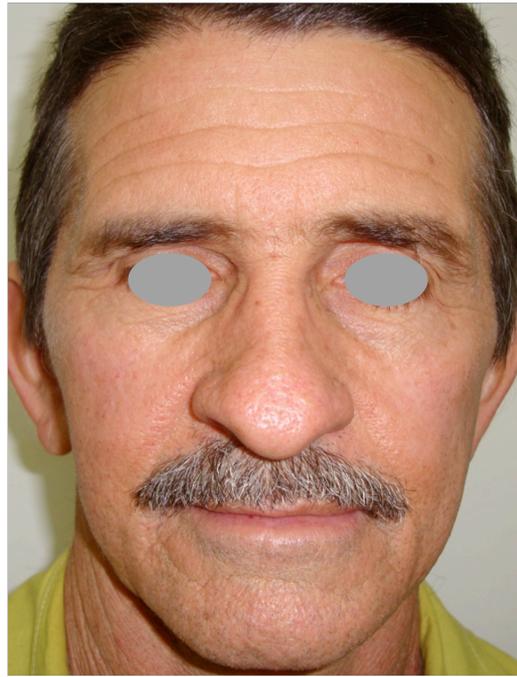
Nº de pacientes	13
Idade em anos, média	66
Mediana	68
Mínimo	45
Máxima	85
Desvio padrão	14
Classificação da pele segundo Fitzpatrick	
Tipo 1	3(23,1%)
Tipo 2	4(30,8%)
Tipo 3	2(15,4%)
Tipo 4	3(23,1%)
Sem informação	1(7,7%)
Total de lesões localizadas	19
Distribuição nos protocolos:	
P1	4
P2	6
P3	9
Localização das lesões	
Face	5(26,3%)
Tronco	5(26,3%)
Membros superiores	3(15,8%)
Membros inferiores	6(31,6)
Tamanho das lesões	
0,5 a 1 cm	4(21,1%)
1-2cm	5(26,3%)
2-3cm	5(26,3%)
3-4cm	4(21%)
>4cm	1(5,3%)

Os dois pacientes com remissão parcial submeteram-se há mais 1 e 2 dois tratamentos respectivamente. Ambos apresentavam comorbidades importantes sendo que o segundo (85 anos), era desnutrido, portador de insuficiência renal ainda controlada clinicamente. O primeiro tinha pele tipo 3 o segundo pele tipo 4 (classificação de Fitzpatrick). Ambos apresentavam lesões de 3 cm localizadas em região pré-esternal com limites imprecisos. Ambas as lesões foram biopsiadas em mais de um ponto para diagnóstico mais preciso. A histopatologia pós tratamento de ambas as lesões demonstrou ausência de DB.

Com relação às estimativas de cura, para 1 ano foi de 100% e para 18 meses de 90,91%.



A



B

Figura 4.7 – Doença de Bowen bilateral, comprometendo áreas extensas em regiões malares direita e esquerda, tratadas com NanoALA-TFD, 3 horas de oclusão. A- Antes do tratamento. B- Seis meses após o tratamento. Observa-se o excelente resultado cosmético. Sem evidências de recidiva clínica 24 meses após o tratamento.



A B
Figura 4.8- Regiões malar e massetérica direitas em detalhe (Figura 4.7). A- Antes do tratamento. B – Seis meses após tratamento. A fonte de luz utilizada foi LED spot PDT, 90 mW/cm², 37,8 J/cm², 7 minutos de exposição.



A B
Figura 4.9 – Regiões malar e massetérica esquerdas em detalhe (Figura 4.7). A- Antes do tratamento. B – Seis meses após tratamento. A fonte de luz utilizada foi LED –spot RED, 11mw/cm², 13,18j/cm², 20 minutos de exposição. Observa-se a melhora da cicatriz e o excelente resultado clínico e cosmético.

4.14 NanoALA-TFD e intensidade de dor

Ao se agrupar as lesões QA, CBCs e DB e analisar os efeitos do tempo de oclusão na dor verifica-se que a intensidade média da dor com 4h de oclusão ($5,8 \pm 3,4$) foi estatisticamente maior do que com 3 h de oclusão ($4,3 \pm 2,4$) ($p=0,0020$) (Fig 4.10). O tipo de fonte de luz (Fig. 4.11) e os diferentes diagnósticos (Fig.4.12) não influenciaram na intensidade da dor ($p=0,9551$ e $p=7977$).

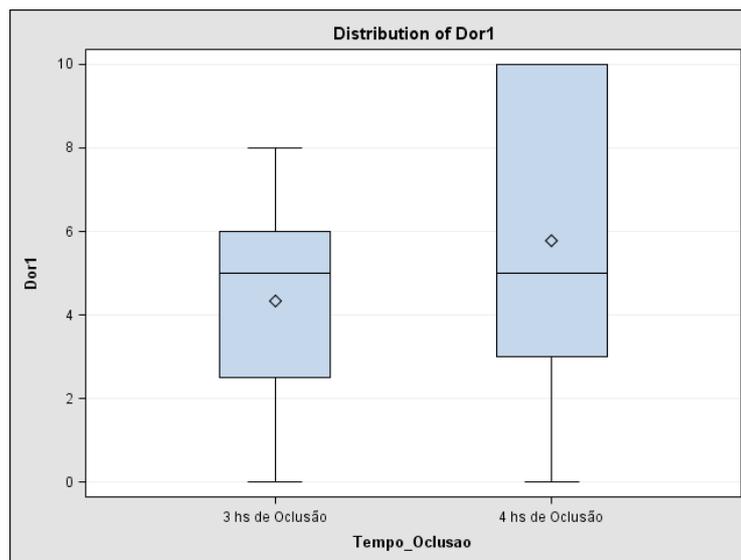


Figura 4.10 Intensidade da dor em todas as lesões para os períodos de 3 e 4 de oclusão. A dor foi mais intensa para o tempo de oclusão de 4h ($p=0,0020$).

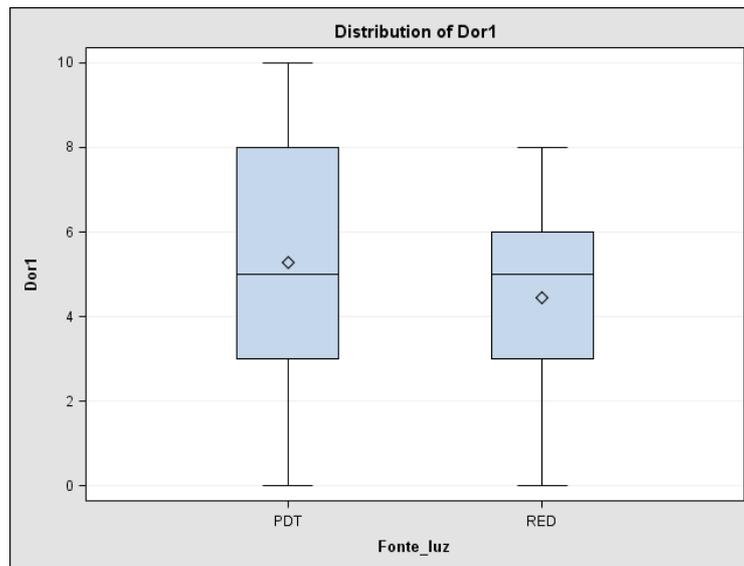


Figura 4.11 Intensidade da dor em todas as lesões de acordo com a fontes de luz utilizadas. Spot PDT inclui protocolos P1 +P2 e Spot RED relativo ao P3.($p=0,9551$).

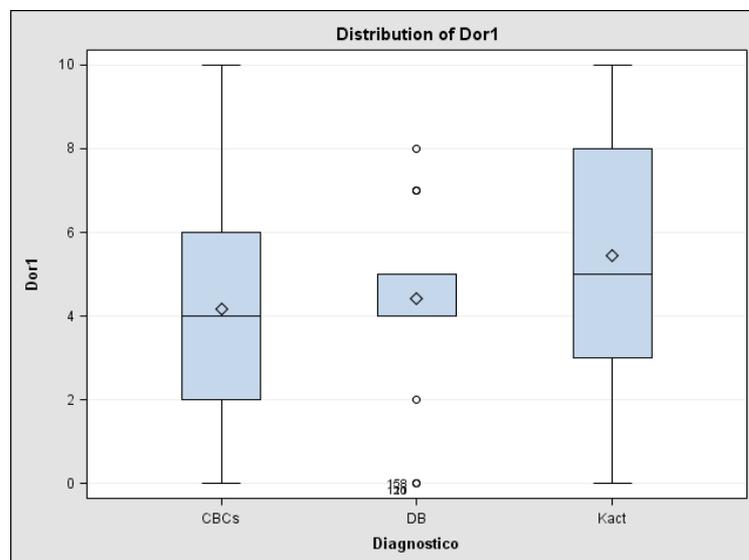


Figura 4.12 Intensidade da dor em todas as lesões de acordo com o diagnóstico ($p=7977$).

Na Fig. 4.13 está representada a intensidade da dor de acordo com a localização da lesão. A intensidade média da dor para a localização de face (5,75) foi estatisticamente superior com relação as localizações de tronco (media= 3,09 e MMSS (media=3,38) ($p = 0,0001$ e $p=0,0041$). Não houve diferença significativa para a face e MMII (5,10) ($p=0,9391$ e entre MMII e demais localizações (MMII $p = 0,3648$ e -reg cervical e tronco- ($p = 0,1927$), assim como as demais localizações entre si ($p=0,9869$) (Fig. 4.130).

Na Fig. 4.14 estão representados os efeitos da localização da lesão e das fontes de luz sobre a intensidade da dor. Não houve diferença para as localizações entre as duas fontes de luz ($p = 0,5041$ e $p=0,5137$).

Como a face foi o local onde a dor foi mais intensa, decidiu-se analisar em maior detalhe esta localização, como descrito no próximo item.

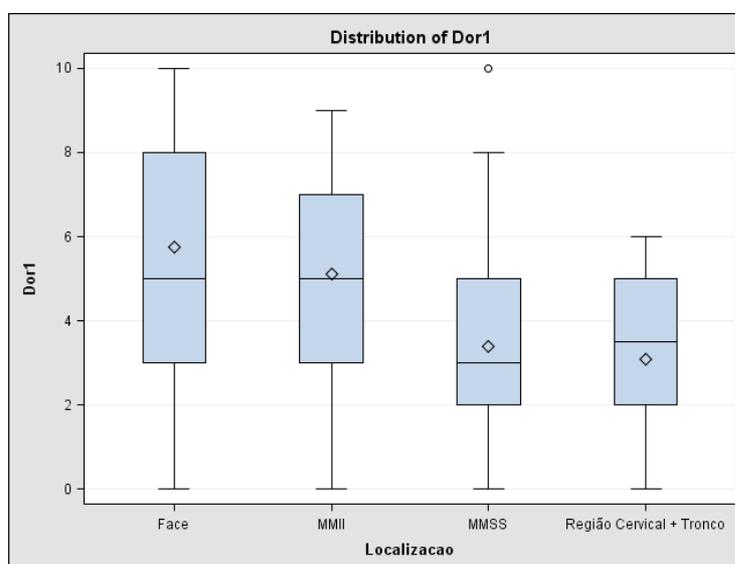


Figura 4.13 Intensidade da dor segundo as diferentes localizações das lesões. A intensidade média da dor para a localização de face foi estatisticamente superior com relação as localizações de tronco e MMSS ($p=0,0001$ e $p=0,0041$).

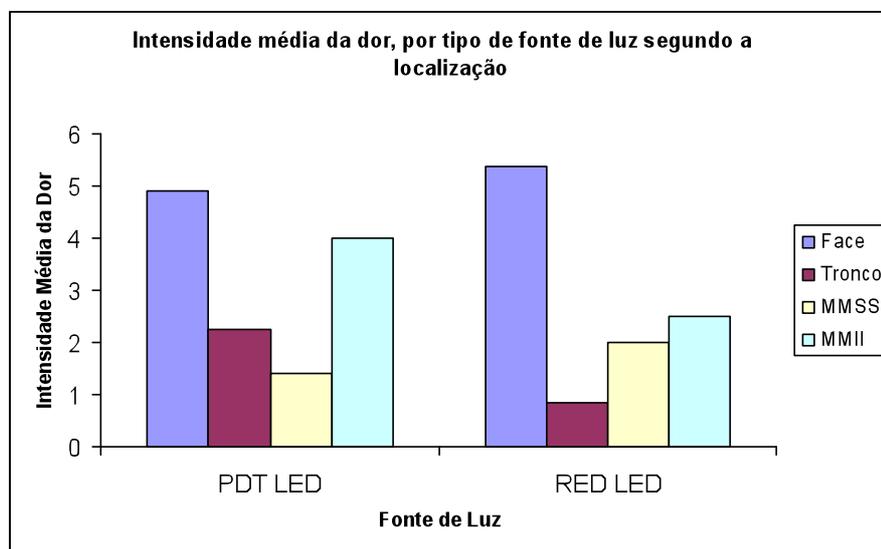


Figura 4.14 Comparação do efeito de dor, por tipo de fonte de luz e localização. A diferença foi significativa para a face em relação as demais localizações nas duas fontes de luz ($p < 0,0001$).

4.15 Intensidade de dor localizadas na face segundo tempo de oclusão e fontes de luz

Os efeitos do tempo de oclusão e das fontes de luz PDT e RED na intensidade média da dor na face estão representados nas figuras 4.15 e 4.16 que revelam que 4h de oclusão ($6,68 \pm 3,43$) causa dor de maior intensidade do que 3h de oclusão ($4,88 \pm 2,20$) ($p = 0,0083$) (Fig. 4.15). O tipo de fonte de luz ($p = 0,9027$) (Fig.4.16) e o diagnóstico ($p = 0,7836$) não influenciaram na intensidade da dor.

4.16 Intensidade de dor na primeira e segunda sessões

A se comparar a intensidade média da dor entre a primeira e segunda sessões, cujos valores médios foram 5,11 e 5,10 respectivamente, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas sessões ($p=0,9635$) (teste não paramétrico de Wilcoxon, nível de significância de 5% programa SAS 9.2). O mesmo

aconteceu para a localização de face, com media de 5,79 na primeira sessão e 5,63 na segunda sessão ($p=0,7329$).

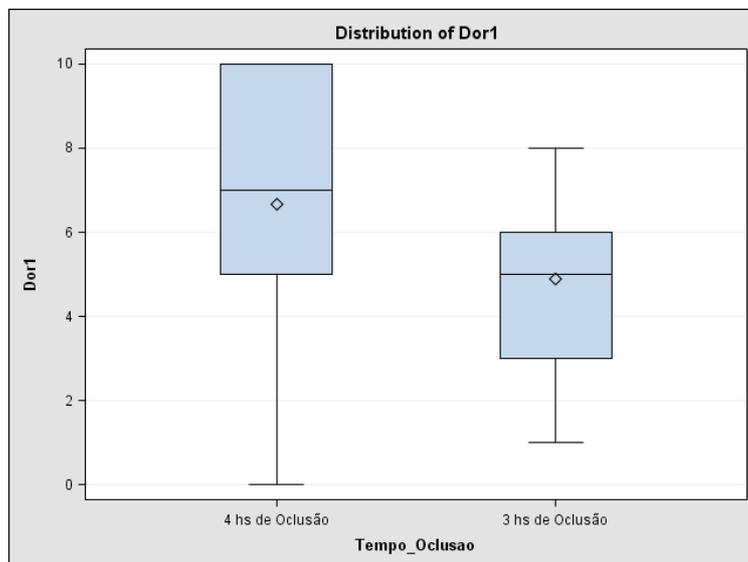


Figura 4.15 Intensidade da dor para as lesões localizadas na face para os períodos de 3 e 4 horas de oclusão. A dor foi mais intensa para o tempo de oclusão de 4h ($p = 0,0083$).

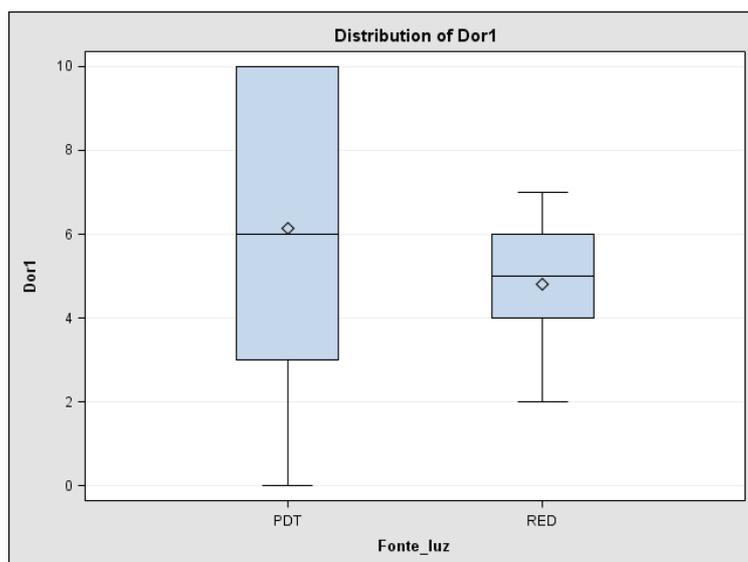


Figura 4.16 Intensidade da dor de acordo com a fontes de luz utilizada ($p=0,9027$).

4.17 Outros efeitos colaterais

Os efeitos colaterais mais comuns foram o eritema e edema nas lesões. Observou-se uma relação direta entre as intensidades do eritema e edema logo após a sessão e uma semana após o tratamento de TFD.

Em duas lesões houve infecção secundária. Essas duas lesões pertenciam a um só paciente. O paciente não apresentava comorbidades.

Verificou-se que a maioria dos pacientes apresentou eritema e edema, embora com intensidade variável. Enquanto 83,7% e 88% dos pacientes apresentavam estes sintomas logo após a primeira e segunda sessões, uma semana após estas sessões, os valores decresceram, respectivamente, para 40,2% e 59,2%. Entretanto, a intensidade do edema e eritema verificados logo após a primeira sessão não diferiram, estatisticamente, dos valores observados logo após a segunda sessão ($p=0,0567$ e $p=0,0519$, teste de simetria de Bowker). No entanto, a proporção de pacientes apresentando edema uma semana após a segunda sessão foi significativamente maior (54,2%) do que a proporção dos que o apresentaram uma semana após a primeira sessão (39,9%, $p=0,0002$). Não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao eritema uma semana após a primeira e segunda sessões.

A intensidade do edema, de acordo com a localização das lesões e os respectivos protocolos, observada logo após a primeira sessão, estão apresentados na Tabela 4.18. O eritema e edema foram mais frequentes e intensos quando localizados na face (4.19).

Na face, o edema intenso foi significativamente mais freqüente na primeira sessão (29,75%) em relação à segunda (17,36%) ($p=0,0042$). Por outro lado, o edema foi bem mais freqüente após a segunda sessão (42,7% vs 70,2%), apesar de menos intenso, isto é, com predomínio do leve e moderado nesta sessão (Tabela 4.19). Houve diferença estatisticamente significativa quando se compara a intensidade do edema uma semana após a primeira e segunda sessões ($p=0,002$).

Tabela 4.18 Intensidade do edema das lesões de acordo com a localização, tempo de oclusão e fonte de luz (spot-PDT e spot-RED)

Tempo de oclusão	Spot	Intensidade do Edema logo após Sessão 1	Localização					total
			face	Reg cervical	tronco	MMSS	MMII	
4 h	PDT	ausente	8		1	0	1	10
		leve	17		12	4	2	35
		moderado	11		4	4	0	19
		intenso	26		0	1	0	27
3h	PDT	ausente	10	0	0	4	1	15
		leve	1	1	4	0	1	7
		moderado	8	1	1	2	0	12
		intenso	10	0	0	0	0	10
3 h	RED	ausente	0		1	0	4	5
		leve	2		5	0	0	7
		moderado	31		2	3	0	36
		intenso	0		0	0	1	1
		Total	124	2	30	18	10	184

Tabela 4.19 Intensidade do edema das lesões de face logo após e 1 semana depois da primeira e segunda sessões de TFD.

Tempo de oclusão(horas)	Fonte de luz(spot)		Edema logo após a TFD		Edema 1 semana depois da TFD	
			1SS	2SS	1SS	2SS
4h	PDT	ausente	8	2	49	30
		leve	17	15	9	23
		moderado	11	19	3	3
		intenso	26	20	-	-
3h	PDT	ausente	10	1	12	4
		leve	1	16	11	16
		moderado	8	12	-	8
		intenso	10	-	6	-
3h	RED	ausente	-	-	10	3
		leve	2	2	19	11
		moderado	31	30	4	19
		intenso	-	1	-	-
Total			124	118	123	117
Sem informação			-	6	1	7

TFD- Terapia fotodinâmica; PDT- Spot-PDT; RED- Spot-RED- Aparelho Multiwaves® (Industra -Brasil). 1SS- primeira sessão; 2SS – segunda sessão

Devido às excelentes respostas encontradas no tratamento das lesões localizadas e boa tolerabilidade, deu-se seguimento ao estudo piloto de campo de cancerização.

PARTE II- TFD e Campo de Cancerização

Foram tratados três pacientes, sendo um do sexo masculino, 73 anos, e dois pacientes do sexo feminino com 76 e 56 anos. Em cada uma das 4 sessões de TFD foram coletadas as imagens de fluorescência para posterior correlação com a dependência do tempo das áreas luminescentes. Na Figs.4.17 (A) e 4.17(B) observa-se a evolução da fluorescência ao longo da sequência de 4 sessões, correspondendo o lado direito a MAL-TFD (terapia fotodinâmica realizada com o metilaminolevulinato) e o lado esquerdo com o NanoALA-TFD. Na sequência, com o objetivo de quantificar a área de campo de cancerização (CC), isto é, realizar um estudo quantitativo do que é descrito no protocolo de TFD, tanto para tratamento como para diagnóstico de CC, foram recolhidas e gravadas as áreas luminescentes, submetidas a análise do software Color Seg (INPI-12876-4) e correlacionadas com a dependência do tempo como demonstrado na Fig 4.18.

Em relação à Fig 4.19, o procedimento de normalização leva em conta a área luminescente da 1ª sessão de TFD, para cada paciente e cada lado da face. O número associado à área normalizada significa o número de pixels associados à área luminescente sobre o número de pixels associados ao polígono desenhado. Além disso, note que uma função de decaimento exponencial simples foi utilizada para ajustar os dados experimentais de ambos os tratamentos NanoALA e MAL, como representado na Fig. 4.19, independentemente do aspecto intra-individual da análise dos dados.

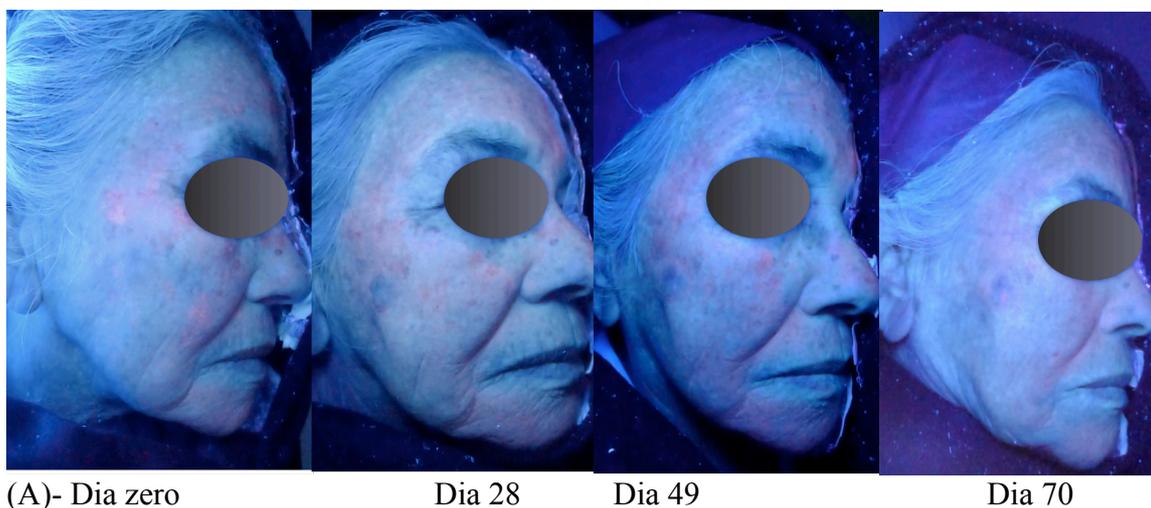


Figura 4.17 (A) - Sequência de imagens de fluorescência na hemiface direita de acordo com as 4 sessões de TFD-MAL e, na Figura 4.17 (B) - a mesma sequência em hemiface esquerda com o NanoALA-TFD. Observa-se da redução da área e da intensidade da fluorescência para todas as áreas tratadas do paciente, para ambas as hemifaces (MAL e NanoALA), sugerindo uma redução da intensidade do dano de CC em ambas as áreas tratadas com NanoALA e MAL. Em todas as áreas tratadas do paciente com NanoALA-TFD a fluorescência foi mais mais intensa do que nas áreas tratadas com MAL-PDT.

MAL- TFD – terapia fotodinâmica com metilaminolevulinato. NanoALA-TFD – terapia fotodinâmica com ácido 5-aminolevulínico em nanoemulsão

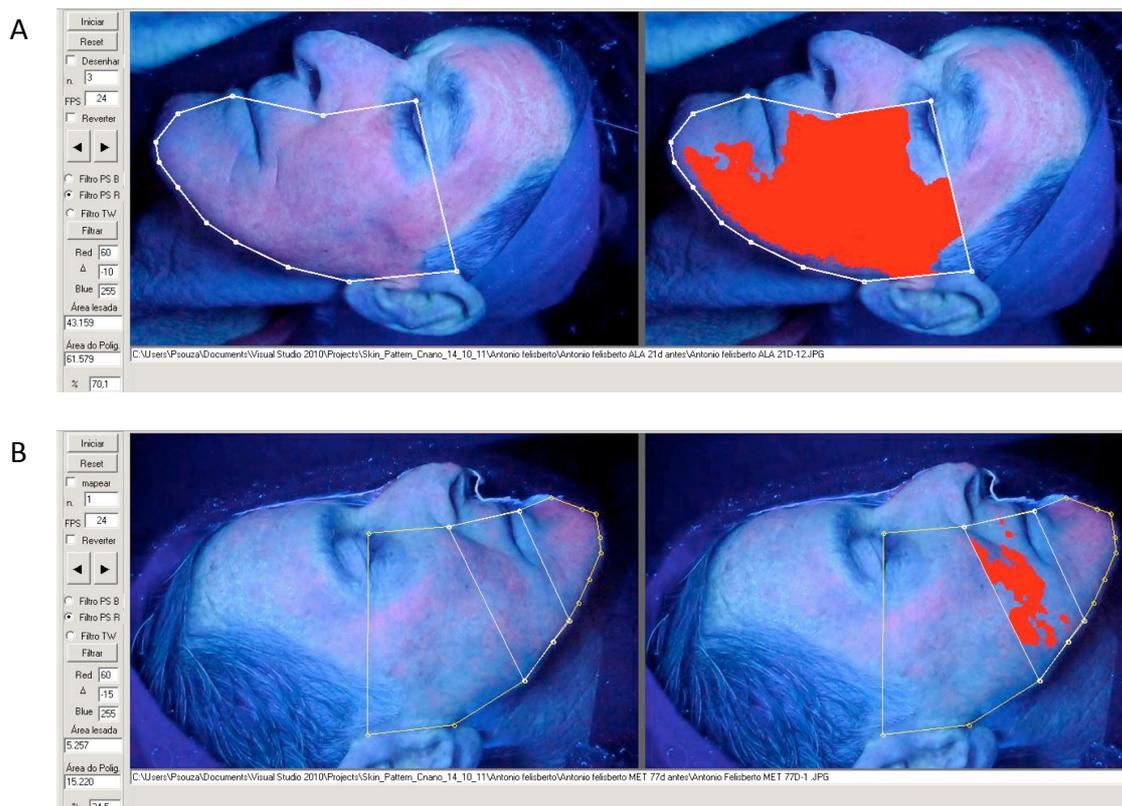


Figura 4.18 (A)- Imagem digital típica de área fluorescente da hemiface do paciente enquanto sob iluminação de Wood lâmpada (NanoALA-TFD). Observa-se o desenho do polígono (linha sólida branco) e da área avaliada interior luminescente (cor vermelha) nas painéis esquerdo e direito, respectivamente. (B) – Na imagem esquerda observa-se o desenho do polígono seguido pela segmentação. Na imagem da direita observa-se um segmento preenchido pelo mapeamento do campo de cancerização realizado pelo software (hemiface tratada com MAL-TFD).

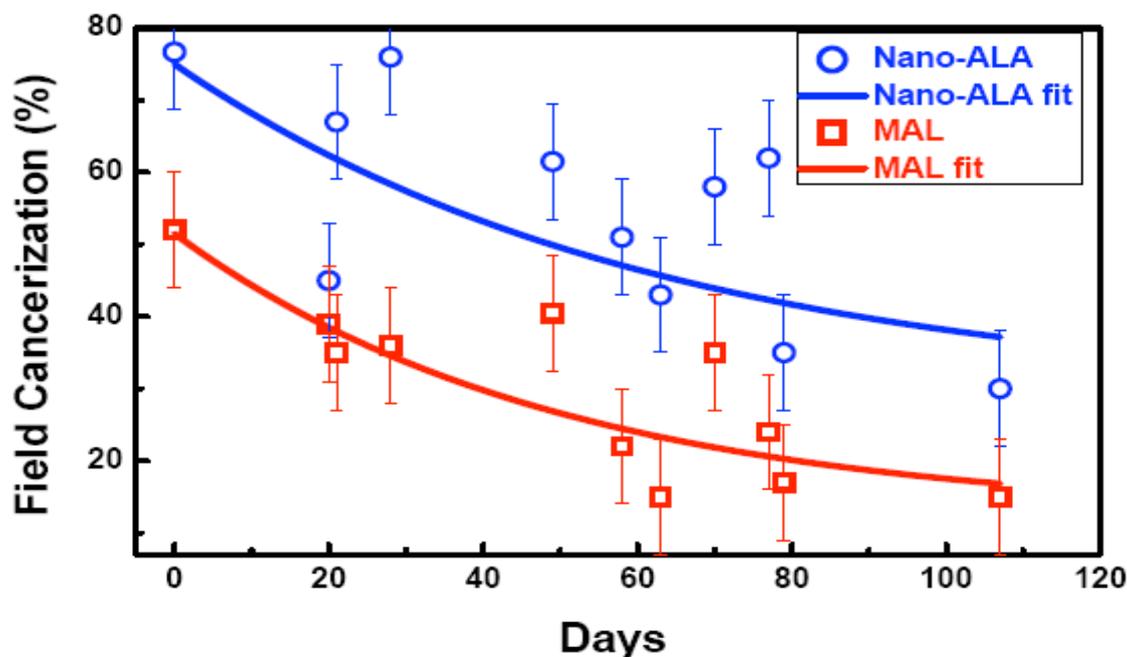


Figura 4.19 – Representação gráfica da evolução das áreas fluorescentes ao longo do tempo. Símbolos (círculos abertos e quadrados) são os pontos experimentais enquanto que as linhas sólidas passando pelos símbolos representam o melhor ajuste de curva de acordo com um decaimento exponencial dependente do tempo. As linhas e círculos azuis correspondem ao NanoALA-TFD e os quadrados e linhas vermelhos a MAL-TFD. Note que os dados incluídos foram normalizados em relação à área gravada. NanoALA- terapia fotodinâmica com ácido 5-aminolevulínico em nanoemulsão; MAL-terapia fotodinâmica com metilaminolevulinato.

As constantes de tempo de decaimento para as duas formulações, no entanto, foram diferentes, sendo cerca de 62,5 e 49,5 dias para NanoALA e MAL, respectivamente. Isto significa uma fluorescência na área demarcada com meia-vida de 43,3 e 34,3 dias para NanoALA e MAL, respectivamente, considerando o intervalo de realização do experimento. Embora a diferença de redução da área fluorescente, isto é, meia-vida, seja cerca de 26% mais longa para a formulação NanoALA, a área fluorescente observada com o uso do NanoALA é cerca de 45% maior que a área observada com o uso da formulação MAL. Além disso, para a janela de tempo apresentada na Fig. 4.19, a redução da área fluorescente com o NanoALA foi

ligeiramente mais elevada (cerca de 10% maior) do que a redução devido à formulação MAL. Esses resultados têm muitas implicações, que abrangem desde os aspectos fundamentais até os aspectos clínicos.

Com relação aos resultados clínicos, observa-se nas Figs 4.20, 4.21, 2.22 que todos os pacientes apresentaram melhora dos aspecto da pele tanto com o Nano-TFD como o MAL-TFD.

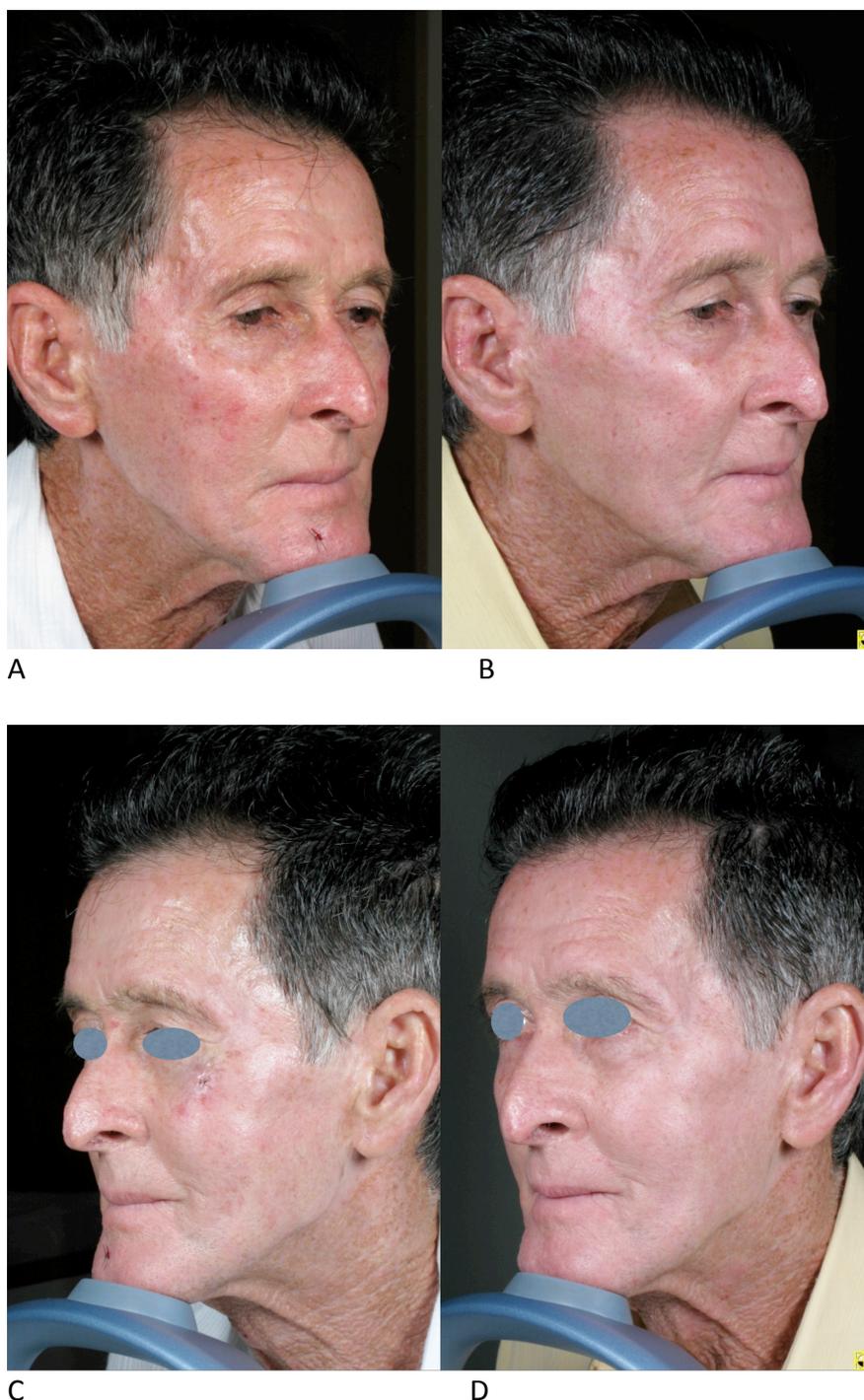


Figura 4.20 – Paciente antes e 6 meses após as 4 sessões de NanoALA -TFD e MAL-TFD. Figuras (A) –hemiface direita antes da MAL-TFD; (B) 6 meses após; (C) – hemiface esquerda antes da NanoALA-TFD; (D) 6 meses após. Observa-se redução importante das queratoses actínicas e melhora acentuada do aspecto da pele com ambos os pró-fármacos.



Figura 4.21- (A) - (B)
Paciente antes e 6 meses após as 4 sessões de NanoALA –TFD (esquerda) e MAL-TFD (direita)



Figura 4.22-(A) (B)
Detalhe do aspecto do dorso nasal direito e esquerdo antes e 6 meses após as 4 sessões de NanoALA – TFD (lado esquerdo) e MAL-TFD (lado direito). Destaque para a melhora da pele da cicatriz e da pele enxertada.

5. Discussão

Parte I - Lesões localizadas

A terapia fotodinâmica (TFD) constitui, atualmente, uma opção importante no tratamento do câncer da pele, embora ainda exista a necessidade do desenvolvimento de novas substâncias ou veículos para aumentar tanto sua eficácia, quanto a penetração [MORTON et al, 1998; KENNEDY, POTTIER, PROSS,1990; BRAATHEN et AL, 2007]. Vários sistemas de carreamento de drogas estão sendo pesquisados, porém poucos deles já estão disponíveis para uso clínico [KRAMER & VERWANGER, 2009]. Apesar da existência de numerosas publicações sobre a TFD, existe grande variedade na metodologia utilizada, desde os profármacos de substâncias fotossensibilizantes, até veículos e fontes de luz, o que pode dificultar a comparação dos resultados e dificultar a incorporação dos procedimentos na prática clínica. Para o presente trabalho, foi desenvolvida uma nova formulação de profármaco: ALA em nanoemulsão (NanoALA) a 20% visando minimizar as limitações dos veículos empregados na TFD. O NanoALA apresentou estabilidade, eficácia, boa espalhabilidade e praticidade. Ao ser aplicado no paciente a sensação de ardência foi muito discreta e durou poucos segundos.

Com taxas de cura de 94%, aos 3 meses e 90,3% após um ano do tratamento, o NanoALA mostrou ser eficaz no tratamento do câncer de pele não melanoma (CPNM). Estas taxas estão entre os melhores resultados encontrados na literatura, quando são consideradas, ao mesmo tempo, as lesões QA, CBCs e DB (BRAATHEN et al, 2007; BASSET-SEGUN et al, 2008; KLEIN et al, 2008; BABILAS et al, 2010). As taxas e estimativas de cura foram altas, mesmo quando se variou os tempos de oclusão (três e quatro horas) e as fontes de luz (PDT-LED e RED-PDT).

No que se refere à recidiva (remissão parcial) do CPNM, em nosso estudo ela foi de 6% em 12 meses. A literatura relata que quando ocorre remissão parcial e /ou recidiva, dentro de 9, 12 e até 24 semanas, as lesões são submetidas a novo procedimento de TFD. Em três dos 11 casos ocorridos no presente trabalho foi realizado um novo tratamento, e esses permaneceram curados até a última visita de seguimento. A taxa de recidiva, após um ano, considerando todos os protocolos, todas as lesões e para todos os diagnósticos, foi de 10,6%. Todavia, após 18 e 21 meses não foram mais encontradas recidivas nos pacientes que compareceram às visitas e, portanto, as taxas de

cura foram de 100%, para todos os protocolos. Estes resultados são particularmente importantes, uma vez que poucos resultados similares são encontrados na literatura [BRAATHEN et al, 2007; BASSET-SEGUN et al, 2008; KLEIN et al, 2008; BABILAS et al, 2010].

No estudo dos efeitos do tempo de oclusão foi constatado que 3 horas levou a maior percentual de cura e menor taxa de remissão parcial do que o período de 4 horas de oclusão, tanto aos 3 como aos 12 meses após TFD. Entretanto, a estimativa de cura para 3 horas de oclusão aos 12 meses (98%) não foi estatisticamente diferente da observada com 4 horas (89%). O fato de que o procedimento de TFD possa ter eficácia após 3 horas de oclusão é bastante relevante, pois além de facilitar a operacionalização do tratamento, este tempo de oclusão é bem menor do que o período preconizado para o Levulan® (13-17 horas) [FINCH-PUCHES et al, 1997; PIACQUADIO et al, 2004; TSCHEN et al, 2006], menor do que os produtos extemporâneos (4horas) [FIJAN, HONIGSMANN, ORTEL, 1995; WENNBERG et al, 1996] e se equipara ao período de oclusão usado para o MAL comercializado, ou Metvix® (3 horas) [BASSET-SEGUN et al, 2008; SOLER et al, 2001; VINCIULLO et al, 2004; FANTINI et al, 2011].

No que se refere aos efeitos das duas fontes de luz, spot-PDT e spot-RED, com as respectivas fluências, $37,8\text{j}/\text{cm}^2$ e $13,18\text{j}/\text{cm}^2$, observou-se que ambas foram eficientes no tratamento com NanoALA-TFD. Existem estudos com diferentes fontes de luz, desde lasers, lâmpadas halógenas, luz intensa pulsada, LED, com resultados ora semelhantes (FIJAN, HONIGSMANN, ORTEL, 1995; WENNBERG et al, 1996; WENNBERG et al, 1996; FANTINI et al, 2011; BRAATHEN et al, 2009), ora diferentes. Por exemplo, FINK-PUCHES (Fink-Puches, 1997) encontrou diferenças na resposta clínica ao utilizar ALA livre em 251 QA, 4 horas de oclusão e bandas de luz de diferentes comprimentos de onda (luz visível), em um ou dois. tratamentos A taxa livre de doença dos pacientes submetidos ao espectro completo da luz aos 12 meses foi superior àquela apresentada por bandas de luz isoladas. Um único tratamento TFD obteve 64% de resposta clínica enquanto com 2 tratamentos a resposta foi de 85%. A taxa de doença projetada com 36 meses de terapia foi de 71% para todo o espectro contra 23% para as lesões tratadas com bandas de luz diferentes (Logrank-mantel-cox). Nos braços e mãos a cura completa foi de 51% para a luz visível e 33% para as outras.

SZEIMIES et al (2010) utilizando, ALA BRF-200 em gel, LED (Aktilite® 670nm-630nm, 50-70mw de irradiância, e fluência de 37j/cm²) e uma fonte de luz de halógena (PhotoDyn 750-580-1400nm-170j/cm²) no tratamento de QA encontrou resposta superior com o LED. No seguimento de 12 semanas, a resposta foi de 96% contra 56% para a luz halógena.

DIRSCHKA et al (2012), em um estudo multicêntrico comparando ALA BRF-200, MAL e placebo para tratamento de QA, utilizando diferentes tipos de fontes de luz, encontrou taxas de curas completas com lâmpadas de espectro estreito (Narrow band) de 93,6% para BF-200 ALA) e 89,3% (MAL) após uma ou duas TFD. Para as lâmpadas com maior espectro de luz, as taxas de cura foram 69,7% e 59,1% após a primeira TFD (BF-200 ALA e MAL, respectivamente), e 86,3% e 76,3% após o TFD final (BF-200 ALA e MAL, respectivamente).

No presente estudo, o tempo de oclusão e a fonte de luz analisados conjuntamente (P1+P2 versus P3) apresentaram taxas de cura semelhantes, estando assim ambas as fontes de luz indicadas para o uso na TFD, para as 3 doenças estudadas (QA, CBCs e DB). É importante ressaltar que a baixa energia do spot-RED foi compensada pelo maior tempo de exposição à luz. A vantagem do spot-RED neste caso seria a possibilidade de tratar áreas maiores e ou mesmo várias lesões localizadas próximas umas das outras em um mesmo momento. Deve ser ressaltado que ambas as fontes de luz possuem um espectro estreito, isto é, são de 635 e 630nm (luz vermelha).

Considerando as respostas clínicas de acordo com o local anatômico, para o diagnóstico de QA, a porcentagem de lesões com cura clínica na face, região cervical e tronco foram maiores que a porcentagem de lesões com cura clínica nos membros superior e inferior, aos 3 meses, não mais havendo esta diferença 12 meses após a NanoALA-TFD. Em nosso estudo, a localização das lesões também não influenciou nas respostas clínicas para os diagnósticos de CBC e DB. FANTINI et al (2011), em 17 lesões de CBC, encontrou percentuais maiores de cura para as localizações de face, pescoço e tronco em relação aos membros, chegando à conclusão de que lesões situadas nos membros seriam um preditor de resposta clínica inferior. Já MORTON (2001) (CBCs e DB, lesões da face não incluídas) e SZEIMIES et al (2008) não encontraram

diferenças na resposta à TFD para as diferentes localizações. VINCIULLO et al (2005) encontraram taxas significativamente mais baixas de remissão completa para lesões localizadas na face / couro cabeludo comparado com as lesões no tronco / pescoço. Até o momento existe um consenso de que as respostas clínicas em membros sejam inferiores às encontradas em outras localizações (FANTINI et al 2011). Para essas diferentes respostas devem ser considerados os diferentes protocolos, substâncias fotossensibilizantes, fontes de luz e situação clínica dos pacientes, como possíveis vieses que possam também estar interferindo, levando a respostas tão diversas.

Os resultados relacionados a cura clínica serão avaliados separadamente por diagnóstico, iniciando pelas queratoses actínicas.

Queratose Actínica

O percentual de cura para a NanoALA-TFD no tratamento de QA foi de 95% com 3 meses. Na literatura, para períodos curtos de seguimento com 1 a 3 meses, as taxas de cura com 1 a 2 tratamentos variaram de 52% a 93% para períodos de seguimento de 3 meses [BRAATHEN et al, 2007; LEHMAN, 2007; CHOUDARY, NOURI, ELSAIE, 2009]. Nesses estudos foram utilizados ALA extemporâneo, 5-ALA em solução hidroalcoólica (Levulan®), MAL (Metvix®), ALA-patch e diferentes fontes de luz (JEFFES et al, 2001; DIJKSTRA et al, 2001; SZEIMIES et al, 2002; PARISER et al, 2003; TOUMA et al, 2004; TARSTEDT et al, 2005; PIACQUADIO et al, 2004; MORTON et al, 2006; HAUSCHILD et al, 2009; SZEIMIES et al, 2010]. Em um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, com 3 meses de seguimento, 57 pacientes com 418 lesões foram tratados com MAL- TFD, e 58 pacientes com 414 lesões tratadas com placebo [SZEIMIES et al, 2009]. Três meses após a última sessão Mal- TFD apresentou taxas de cura de 83,3% versus 28,7% do grupo placebo. Assim, o NanoALA está equiparado e até mesmo sobrepunhando os melhores resultados encontrados nas publicações. Muitos desses estudos apresentaram boas taxas de cura porém não tinham seguimentos em períodos maiores do que 3 meses.

Foi realizado estudo comparativo multicêntrico com observador cego, inter-indivíduo em 600 pacientes, utilizando BF-200 (ALA 10% em nanoemulsão em gel,

MAL e placebo). O seguimento foi de 3 meses. Foram encontradas taxas de cura por paciente de 78.2% para BRF-200-TFD versus 64,2% para MAL-TFD e 17.1% para o placebo. As taxas de cura por lesão foram de 90,4% e 83,2% remissão completa para o ALA e o MAL, e 37,1% para o placebo. Não houve diferença estatisticamente significativa para o BR -200 e MAL. Dos pacientes tratados com BF-200 e MAL, 40,0% e 46,4% respectivamente observaram melhora da qualidade da pele [DIRSCHKA et al, 2012]. No nosso estudo as taxas foram também bastante altas, porém os resultados cosméticos foram aparentemente superiores.

No tempo de seguimento de 12 meses, novamente os percentuais de cura para NanoALA- TFD estão entre os mais elevados da literatura, com os valores de 86,5%. Quando calculadas as estimativas de taxas para mais de 12 e 18 meses esses valores vão para 92,9% e 83,19% respectivamente. VARMA et al (2001) trataram 126 QA, com ALA a 20%, e lâmpada Waldmann PDT 1200®, 600-730nm. Obtiveram taxas de cura de 77% e 99% depois de 1 ou 2 tratamentos. Após 12 meses as taxas foram de 72%. A maioria das recorrências ocorreram com 6 meses. TSCHEN et al (2006) utilizando uma solução de ALA (Levulan® e luz azul, 13 a 19hs de oclusão) no tratamento de QA em 110 pacientes e 748 lesões obteve uma taxa de remissão de 78% e de recorrência de 19% em 12 meses. SZEIMIES [2010], utilizando ALA em patches, 4 horas de oclusão, luz vermelha (635nm), 37j/cm² (Aktilite CL 128 (Photocure ASA, Oslo, Norway) or Omnilux (Photo Therapeutics Inc., CA, U.S.A encontrou taxas de cura de 78% e recorrência de 11% em 12 meses. O ALA patch apresenta como desvantagens as pequenas áreas tratadas de cada vez e o período de oclusão de 4 horas. Assim, em comparação com estes resultados, novamente nossos percentuais de cura são elevados e nosso tratamento apresenta praticidade.

A taxa estimada de resposta completa por lesões para as QA foi de 92,90% após 1 ano e de 83,19% após 18 meses. Isto demonstra um efeito não somente curativo, como também preventivo. É importante lembrar que os pacientes têm, em sua maioria, pele clara (Fitzpatrick tipo 2), habitam em baixa latitude, em uma cidade com alto índice de radiação ultravioleta ao longo de todo ano, com períodos de seca por aproximadamente 5 meses. Acrescenta-se que são em sua grande maioria de baixa renda, com dificuldades econômicas para a compra de filtros solares, que, no Brasil,

possuem um custo elevado. Muitos dos pacientes são encaminhados ao HRAN por terem lesões numerosas e recorrentes. As taxas de recorrência são altamente variáveis nos diferentes estudos. Vários autores relataram taxas de recorrências de 4,8% [CLARK et al, 2003] a 28% [VARMA et al, 2001, FINK-PUCHES et al, 1997] até 6 meses e 30% após uma média de período de 13 meses [VARMA et al, 2001, STRIIT et al, 2008]. É interessante lembrar ainda a grande variedade de protocolos, com variações no preparo do ALA livre.

A grande maioria das lesões de QA estão localizadas na face, mesmo assim, proporcionalmente, houve maior recidiva/remissão parcial em membros. Neste trabalho, houve remissão parcial em 3 das 100 lesões de face e 3 das 13 lesões de membros (MMSS + MMII). Aos 12 meses foram 13 recidivas na face e 1 em membros. Na literatura, os percentuais de cura são menores para as localizações em braços e pernas. [FINK-PUCHES et al, 1997; KURWA et al, 1991; DRAGIEVA et al, 2004; STRIIT et al, 2008].

Para os tratamentos alternativos uma grande variedade de protocolos tem sido publicada. Todavia, a remissão completa das lesões com taxas superiores a 95% foi raramente encontrada em estudos de QA controlados (DE BERKER, MCGREGOR, HUGHES, 2007). Na literatura em geral, as taxas por paciente ou lesão variam largamente para o 5-fluorouracil (16-100%) [KRAWTCHENKO et al, 2007; WEISS et al, KAUR, ALIKHAN, MAIBACH, 2009] e imiquimode (0-85%), [KRAWTCHENKO et al, 2007; GEBAUER, SHUMACK, COWEN, 2009]. A eficácia das crioterapias (67 a 83%) [SZEIMIES et al, 2002, FREEMAN et al 2002, THAI et al, 2004, KRAWTCHENKO et al, 2007] foi similar às encontradas em estudos prévios de TFD [SZEIMIES et al, 2002; HAUSCHILD et al, 2009; TSCHEN et al 2006; PARISER et al, 2008; SZEIMIES et al 2009]. As taxas de cura pelo diclofenaco publicadas mostram valores entre 17 e 81% [RIVERS & MCLEAN, 1997; WOLF et al, 2001; RIVERS, 2002; PIRARD et al, 2005, DIRSCHKA et al, 2010].

Os resultados cosméticos encontrados neste estudo foram considerados entre excelentes e bons em 92,3% (excelente 60%, muito bom 23,1% e 9,2% bom) pelos pacientes. Os médicos classificaram 94% entre bons e excelentes. No estudo com BRF-200, os investigadores consideraram 49% como bons [SZEIMIES et al, 2010]. Na

realidade, os resultados cosméticos na TFD são bastante conhecidos, sendo um dos principais fatores de escolha dos pacientes por esta terapêutica e daí, a popularização do uso cosmético da TFD [TAYLOR & GONZALEZ, 2009], especialmente no rejuvenescimento [GOLD, 2009; ISSA & MANELA-AZULAY, 2009; BABILAS et al, 2010; SZEIMIES et al 2011].

Em síntese, o NanoALA- TFD mostrou ser muito eficaz no tratamento das QA, inclusive no seguimento de 12 meses, sendo, as taxas de cura semelhantes e até superiores às encontradas na literatura.

Carcinoma basocelular

No presente estudo as taxas de cura foram para o CBCs de 91% e 97,22% pontualmente, no seguimento de 3 e 12 meses respectivamente. Ficou demonstrado excelente resposta a NanoALA-TFD no tratamento do CBCs, estando entre as mais altas taxas de cura já publicadas [BRAATHEN et al 2007; STRIIT, 2008; KLEIN et al, 2008; BABILAS et al, 2010]. Ressaltamos que os pacientes com remissão parcial não foram submetidos a um segundo tratamento com 12-13 semanas, como relatado na maioria dos artigos, à exceção de um. Os estudos realizados com ALA foram ensaios abertos, com menor número de pacientes e lesões, em sua maioria com 1 a 3 meses de seguimento e taxas de cura entre 90 e 100% [KENNEDY, POTTIER, PROSS, 1990; SVANBERG et al, 1994; CALZAVARA-PINTON, 1995; FIJAN ; HONIGSMANN ; ORTEL, 1995; WENNERBERG et al, 1996; FINCH PUCHES et al, 1998; WANG et al, 2001]. Sendo assim, nossas taxas de cura de 97,22% em 1 ano, são excelentes.

Para maiores tempo de seguimento, as taxas de recidiva relatadas na literatura foram de 17% entre 24-36 meses de seguimento, [CALZAVARA-PINTON, 1995], 44% com tempo médio de 19 meses de seguimento [FINCH PUCHES et al 1998]. CALZAVARA-PINTON (1995) realizou um estudo aberto ALA-TFD, utilizando laser, em 23 lesões de CBCs com seguimento de 24-36 meses, tendo encontrado recorrências de 17% após 29 meses. Em outro estudo, comparativo, 39 lesões de CBCs, 22 tratadas com ALA-TFD, foram encontradas taxas de recidiva de 38%, versus 21% para criocirurgia, histologicamente controladas após 12 meses de seguimento. Estão

incluídos os CBC nodulares nesse percentual. [WANG et al, 2001]. Assim os resultados encontrados no presente estudo com 12 meses apresentaram taxas bastante elevadas, e até superiores aos encontrados na literatura com o ALA livre.

FINCH PUCHES et al (1998), utilizando um composto de ALA a 20%, e diferentes comprimentos de onda da luz visível policromática obteve resposta completa para todas as bandas de luz de 86% (82/95) no tratamento de CBCs (média de seguimento de 19 meses, 3 a 60 meses). A recorrência total foi de 44% (36/81). Não houve diferença estatística para as diferentes bandas de luz visível. A média de seguimento do nosso estudo foi de 16 meses (3 a 30 meses), com taxa de cura de 89% (40/45) e o total de remissões parciais e recorrência acumulada foi de 11% (5/45). Foram incluídos os pacientes com remissão parcial no período de 3 meses que não foram submetidos a um novo tratamento, como acontece em outros estudos. Caso fossem incluídos os nossos casos de remissão parcial, as taxas de cura ficariam próximas a 100%, uma vez que apenas uma dessas lesões foi submetida a uma segunda TFD. No nosso estudo, não encontramos diferença estatística para as duas fontes de luz utilizadas, porém ambas eram LEDs e possuíam comprimentos de onda semelhantes (630 e 635 nm), diferente do estudo acima referido onde vários comprimentos foram utilizados. No presente estudo ambas eram LED e o que variou foi a fluência, apesar da energia menor ter sido compensada pelo maior tempo de exposição. Assim, ambas as fontes de luz obtiveram excelentes resultados na NanoALA-TFD no tratamento do CBCs. Quando foram comparadas as taxas de doença livre projetada para o CBC, esses mesmos autores FINCH PUCHES et al (1998) encontraram aos 36 meses taxa de doença livre projetada para o CBC de 50% enquanto que no nosso estudo após 12 meses de TFD foram de 92,81%, e, 87,27% com 18 meses de seguimento. Ainda que não tenhamos feito o estudo até os 36 meses, foi demonstrada a eficácia da NanoALA-TFD no tratamento do CBCs, quando comparado aos dados da literatura referentes ao ALA livre.

Com o MAL-TFD, a eficácia no tratamento do CBCs superficial, tem sido com clareamento das lesões aos 3 meses em 80 a 97% das lesões (SOLER et al, 2001, BASSET SEGUN et al, 2004; BASSET SEGUN, et al 2005) incluindo casos mais complexos, com lesões recorrentes [HORN et al, 2003; VINCIULLO et al, 2004]. Em

um estudo multicêntrico, randomizado, com 196 pacientes, foi comparada a eficácia da MAL-TFD e cirurgia, no tratamento do CBCs de 8-20mm de diâmetro [SZEIMIES, 2008]. A TFD era repetida com 12-13 semanas quando necessário. As taxas de cura com 3 meses foram de 92,2% com MAL versus 99,2% com cirurgia. Aos 12 meses, 9,3% das lesões recidivaram com MAL- TFD (taxa de cura de 90,7%) e nenhuma com cirurgia. Essa diferença foi confirmada pelos pacientes. Trinta e quatro lesões apresentavam menos de 20mm no presente estudo e as taxas de cura para 3 e 12 meses foram de 94,1% e 97%, respectivamente. Assim as taxas de cura do presente estudo, chegando a superar alguns resultados de outros ensaios clínicos realizados com o MAL-TFD, hoje referência no tratamento com TFD para lesões tumorais.

No presente estudo, das 9 lesões com tempo de seguimento superior a 30 meses, nenhuma apresentou recidiva. Um desses pacientes com 67 meses de seguimento apresentava cura das duas lesões. No tratamento do CBCs para os períodos de seguimento mais longos, os estudos tem demonstrado que a MAL-TFD leva a remissões comparáveis à criocirurgia. Em um estudo de 5 anos de seguimento, taxas de cura de 75% para MAL-TFD versus 74% para criocirurgia foram encontradas [BASSET SEGUN et al, 2008]. Quanto às taxas de recidiva, elas ocorreram todas antes dos 3 anos de seguimento e foram de 22% para MAL-TFD e 20% para criocirurgia. Todavia, 60% informaram resultado cosmético superior em relação à crioterapia 16% ($p=0,00078$). Esses resultados reforçam a eficácia da TFD no tratamento do CBCs e, pode ser observado que o nosso estudo novamente apresenta excelentes resultados.

No nosso estudo foram incluídas lesões com até 6 cm de diâmetro, e mesmo assim as taxas de cura foram bastante altas (02 remissões parciais aos 3 meses e 1 recidiva aos 12 meses). Os pacientes com remissões parciais submeteram-se a um novo tratamento. MORTON (2001) realizou ALA-TFD (ALA livre) em pacientes com grandes placas (20mm e/ou múltiplas lesões de CBCs. Foram tratados 73 CBCs e desses, 66 (90%) curaram com 3 meses e 62 (85%) permaneceram curados no prazo entre 12 e 60 meses. Assim, NanoALA-TFD, mais uma vez, demonstra ser um tratamento promissor nas lesões de CBCs, incluindo grandes lesões, sendo eficaz tanto pela cura, como pela durabilidade da resposta, podendo ser utilizado em lesões grandes

e/ou múltiplas. O diâmetro das lesões não pareceu afetar o efeito da resposta à TFD e isso foi consistente com publicações prévias [MORTON et al, 2001; VINCIULLO et al, 2005; SZEIMIES et al, 2008; FANTINI et al, 2011].

Quanto à influência da localização na resposta terapêutica, das 45 lesões de CBC, duas da face e duas do tronco apresentaram remissão parcial e uma da face apresentou recidiva. A análise dos dados aqui presentes foi realizada juntamente com DB, como descrito em resultados. Em nosso estudo não foi possível correlacionar falha terapêutica e localização. FANTINI et al (2011) encontrou um grande impacto da localização na resposta à TFD. Em uma análise multivariada em 17 CBCs, as lesões do tronco obtiveram melhores respostas em relação àquelas localizadas na cabeça, pescoço e membros, mesmo em amostra pequena. Concluiu que a localização em membros poderia ser um preditor de falha terapêutica, quando comparado com a localização em cabeça/pescoço. Já MORTON et al (2001) não observaram diferença na resposta pela localização em 73 CBCs (lesões faciais não incluídas). SZEIMIES et al (2008) também não encontraram diferenças em um estudo comparativo de TFD versus cirurgia. Por outro lado, VINCIULLO et al (2005) encontraram diferenças significantes para as lesões localizadas na face/escalpe quando comparadas com as lesões de tronco/pescoço. É difícil explicar essa variedade de resposta para diferentes áreas do corpo. Em estudos comparativos de TFD versus criocirurgia no tratamento das QA, as localizadas nas extremidades demonstraram ser mais resistentes ao MAL-TFD do que as da face/escalpe (ou couro cabeludo) [MORTON et al, 2006, KAUFMANN et al, 2008]. Acreditamos que talvez a espessura da camada córnea dos antebraços dificulte a penetração do fármaco; além disso, os antebraços costumam ser mais bronzeados e, assim, a melanina poderia agir como uma barreira à penetração da luz. Acrescenta-se que o período de recuperação da face é bem mais curto, sendo o intervalo de uma semana o suficiente para que toda a descamação após a TFD ocorra, enquanto que nos membros todo o mecanismo de recuperação, cicatrização e descamação é mais lento. Apesar de não termos encontrado diferença significativa, acreditamos que possa haver alguma diferença dependendo das séries de casos, devido às razões acima descritas. FANTINI et al (2011) sugere que os tumores localizados em áreas fotoexpostas sejam mais resistentes aos mecanismos moleculares de fotodano.

Apesar da excisão e sutura permanecerem como o tratamento de escolha para CBC por possuírem as taxas de cura mais altas, a TFD se apresenta como uma excelente opção no tratamento do carcinoma basocelular superficial, especialmente nas circunstâncias nas quais a cirurgia não pode ser realizada. Situações essas seriam a presença de comorbidades, lesões grandes ou múltiplas em uma determinada área, ou localizadas em áreas cosmeticamente sensíveis. Assim, a TFD, e em especial a NanoALA-TFD, pode proporcionar grande vantagens em relação a outras terapias.

Doença de Bowen

A DB é uma doença para a qual a TFD tem sido indicada como primeira opção de tratamento. Possui crescimento predominantemente horizontal, superficial, e pode medir muitos centímetros. Não raramente o paciente pode apresentar numerosas lesões em uma mesma área, como a face por exemplo, o que torna a cirurgia uma opção extremamente difícil, especialmente pelas mutilações decorrentes de um tratamento para lesões superficiais. As outras opções de tratamento, como imiquimode e 5-FU (cremes) possuem duração prolongada, de 4 a 12 semanas, sendo os efeitos adversos frequentes. A criocirurgia frequentemente causa cicatrizes inestéticas [COX, EEDY, MORTON, 1999; BLUME & OREROFF, 2007; SHIMIZU et al].

A TFD com ALA em nanoemulsão nunca foi utilizada no tratamento da DB, apesar de existirem numerosas publicações de TFD com ALA livre e MAL. No presente estudo as taxas de cura foram de 87% após 3 meses do tratamento. Os estudos com ALA, aos 3 meses de seguimento mostraram taxas de cura de 88%, 94% e 100% [MORTON et al, 1996; MORTON et al, 2000; SALIM et al, 2003; BRAATHEN et al, 2007] e no maior estudo multicêntrico a taxa de cura para MAL foi de 93% [MORTON et al, 2004].

Foi encontrado neste estudo, 100% de cura clínica para os seguimentos de 6, 12, até 21 meses. O único paciente com seguimento mais longo, encontrava-se curado 41 meses após a TFD. No seguimento de 12 meses baixas taxas de recorrência foram relatadas na literatura: para MAL 15%, comparadas com 21% para criocirurgia e 17% para o 5-FU [SALIM et al, 2003]. Também baixas taxas quando o ALA livre (0 a 12%)

[MORTON et al, 1996; MORTON et al, 2000; SALIM et al, 2003] foi comparado com criocirurgia (10%) [MORTON, et al 1996], e 18% para 5-FU [SALIM et al, 2003]. Em um outro estudo aberto, 35 (88%) de 40 grandes placas de DB, todas com diâmetro máximo superior a 20mm, apresentaram remissão completa após MAL-TFD. Quatro apresentaram falha terapêutica aos 3 tratamentos citados, porém obtiveram melhora das mesmas. O tamanho da lesões causou impacto nas taxas de cura, estatisticamente significante. Durante os 12 meses de seguimento, 4 recidivaram, reduzindo a cura total para 78% [MORTON et al, 2001]. Aos 24 meses após o final do tratamento as taxas de cura foram de 68% para MAL-TFD, 11% para o placebo-TFD, 60% para crioterapia e 59% para 5-FU [MORTON et al, 2005 apud LEHMANN, 2007]. Assim, o NanoALA consitui um tratamento muito promissor para o DB, com excelentes resultados cosméticos e com taxas de cura excelentes.

Em publicação mais recente [CAVICCHINI et al, 2011], foram tratadas com MAL-TFD 43 lesões de DB classificadas como difíceis de tratar, tanto pelo tamanho como pela localização (face, membros). O seguimento variou de 25-65 meses e ocorreram 5 recidivas; dessas, duas eram em paciente imunossuprimidos e uma lesão tinha o diâmetro maior do que 5 cm. No nosso estudo nenhuma das lesões menores que 2 cm apresentou remissão parcial ou recidiva. As lesões com diâmetros superiores ou iguais a 20mm representavam, 52,3% (n=10) e dessas, duas recidivaram necessitando a realização de mais 1 e 2 tratamentos respectivamente com NanoALA-TFD. As duas lesões localizavam-se em região pré-esternal e ambos os pacientes tinham comorbidades. Acredita-se que as comorbidades, isto é, o estado clínico dos pacientes, sendo um, cardiopata grave e o outro, com grave desnutrição, tenham influenciado na reposta clínica. Outro paciente, com lesões extensas de DB em cada reg malar direita e esquerda, possuía lesões classificadas como difíceis de tratar , pela extensão, localização e ainda bilateralidade (Figs. 4.7, 4.8 e 4.9). Informamos que cada uma dessas lesões foi biopsiada em mais de um local. Ressalta-se que cada hemiface foi tratada com diferentes fontes de luz, com resultados de eficácia e cosmético semelhantes, sendo excelente para as duas fontes de luz. O paciente está completando 24 meses de pós TFD e continua curado. A intensidade da dor foi muito alta para ambos as fontes de luz, porém o paciente tolerou bem e continuou a tratar com TFD outros

lesões, demonstrando satisfação com o resultado. Este foi o único paciente que apresentou infecção no pós operatório. Acreditamos que isso tenha ocorrido pela falta de cuidados adequados no pós procedimento.

Em síntese, nossos resultados com o NanoALA-TFD mostram taxas de cura de 100% na DB, com 6 e 12 meses de seguimento, além de um paciente com 41 meses, acompanhada por excelentes resultados cosméticos em 100% dos pacientes. Nossos resultados, com alta eficácia, período rápido de recuperação e excelente resultado cosmético deste novo produto, vem a acrescentar e confirmar a escolha da TFD como um tratamento de primeira linha para a DB, incluindo os casos difíceis de tratar.

Avaliação da dor

A TFD tem demonstrado eficácia comprovada e várias vantagens no manejo do CPNM, assim como no tratamento de outras doenças em dermatologia, (acne, verrugas, esclerodermia, etc), porém a dor continua sendo um dos principais fatores limitantes ao uso dessa terapia [OREINSTEIN et al, 2002; VON FELBERT et al, 2002, GRAPENGIESSER et al, 2002], seguido pelo elevado custo. Durante a iluminação ocorrem sensação de picadas, queimação e dor, cuja intensidade varia de leve a intensa [WENNBERG, 2005], variando muito de paciente para paciente, sendo imprevisível [GRAPENGIESSER et al, 2002]. O mecanismo da dor ainda não está elucidado, mas provavelmente envolve a estimulação do nervo (dor neurogênica) e/ou dano tecidual. Substâncias citotóxicas e/ou inflamação criadas na reação fotodinâmica [MORTON, MCKENNA, RHODES, , 2008] e hipertermia pela iluminação têm sido sugeridas, embora a última hipótese não tenha sido evidenciada pelos estudos [OREINSTEIN et al 1995]. Várias estratégias têm sido utilizadas para minimizar a dor, Bloqueio neural [PAOLI et al, 2008; HALLDIN et al, 2009; SERRA-GUILLEN et al, 2009], ar frio [PAGLIARO, 2004], borrifamento de água fria ou compressas com gelo e pausas durante o tratamento têm proporcionado alívio aos pacientes [WIEGELL et al, 2008]. Nenhum efeito de redução de dor significativo foi encontrado com o uso de anestésicos tópicos [HOLMES et al, 2004; SKIVEREN et al, 2006; LANGAN & COLLINS, 2006]. No presente estudo foram utilizados o borrifamento de água, pausa, e jatos de ar em

temperatura ambiente (secador de cabelos na opção sem aquecimento) durante a iluminação.

No que se refere ao tempo de oclusão, houve um aumento significativo da intensidade da dor de acordo com o maior tempo de oclusão, com 50% do pacientes com níveis muito elevados de dor. Ao se comparar os efeitos dos tempos de oclusão, exclusivamente para a localização em face, verificou-se que a dor mínima foi superior às encontradas para as demais localizações com intensidade de dor em valores muito mais altos para 4 horas de oclusão. Como discutido em seção anterior, a eficácia para os dois tempos de oclusão (3 e 4 horas) foi a mesma. Assim, a redução do tempo de oclusão resultou em menos dor sem perda da eficácia na NanoALA-TFD. Deve ser ressaltado que este produto é uma nanoemulsão, o que deve aumentar a velocidade de penetração do pró-fármaco, obtendo assim a mesma eficácia para os dois tempos de oclusão.

A fluência tem sido descrita como um fator crítico para a resposta a TFD, apesar dos seus mecanismos ainda serem desconhecidos [ARITS et al, 2010; WARREN et al, 2009; ERICSON, et al 2004; APALLA et al; 2011]. A literatura tem sugerido que baixas fluências podem resultar em melhores respostas clínicas e melhor tolerabilidade, isto é, redução da dor, para tratamento das QA [FREEMAN, 2003; COTTRELL, 2008; WIEGELL, 2008]. A utilização da lâmpada RED, com menos fluência, porém maior tempo de exposição, não influenciou na intensidade da dor estatisticamente. Entretanto, apesar da média e mediana serem semelhantes (Figura 4.16), observa-se que as dores não atingiram índices tão altos quanto os alcançados com o spot PDT. Com o spot RED a dor era mais intensa dos 6 aos 10 minutos iniciais. Era feita então uma pequena pausa de aproximadamente 1 minuto, fazia-se o resfriamento do local com compressas geladas e dava-se prosseguimento. Nos últimos 10 minutos de aplicação a dor era bastante reduzida ou mínima. ERICSON et al (2004) não encontraram diferenças significantes entre as fluências de 30, 40, 50 e 75mW/cm². APALLA et al (2011) estudaram 50 indivíduos, 150 QA, alocados randomicamente para a TFD-ALA tópico e fluências de 25, 50 ou 75mW/cm², utilizando uma luz não coerente, e observou dor significativamente superior para 75mw/cm², quando comparado com 25 e 50mW/cm². Não houve diferença na eficácia. WIEGELL (2008) tratou 26 pacientes com QA na face

e 34 com acne vulgar com MAL- TFD, e comparou dose de $37\text{j}/\text{cm}^2$ com fluências de $68\text{mw}/\text{cm}^2$ (QA e acne) e $34\text{mW}/\text{cm}^2$ (acne). Observou uma redução significativa da dor nos pacientes portadores de acne que utilizaram menor fluência. Deve ser salientado que os pacientes que utilizaram a menor fluência não foram submetidos à curetagem, o que aconteceu com os pacientes de fluências maiores. Assim, dois fatores podem ter influenciado na resposta deste último trabalho, o diagnóstico diferente e a curetagem, dificultando a comparação. Seriam necessários mais estudos para confirmar se essa redução da fluência poderia reduzir a dor. Deve ser ressaltado que pelo fato do spot Red atingir uma área no mínimo 4 vezes maior do que o spot PDT, um número muito maior de terminações nervosas seriam estimulados, especialmente em se tratando de toda a face. Com relação ao tipo de fonte de luz, não houve diferença para as duas fontes testadas, porém observa-se que as médias e medianas de dor foram maiores para o spot PDT (Figs. 4.11, 4.14 e 4.16), sugerindo que o spot RED possa proporcionar menos dor em determinados casos.

No que se refere à localização, no presente estudo as lesões localizadas na face foram as que apresentaram maior intensidade de dor, seguido pelos membros inferiores. A intensidade da dor na face foi superior estatisticamente quando comparada com as localizações de tronco e MMSS. Já WANG (2001) observou dores mais intensas em face, mãos e regiões perineais e relacionou este resultado pelo maior número de terminações nervosas nessas regiões. GRAPENGIESSER et al (2002) e STEINBAUEER et al (2009) encontraram dores mais intensas em couro cabeludo e face. VANOOSTEN, KUIJPERS, THISSEN (2006) não encontraram diferenças na intensidade da dor comparando cabeça, tronco e extremidades. Um estudo retrospectivo foi realizado com 983 tratamentos com TFD em 579 lesões, 301 pacientes, analisando a necessidade de intervenção para alívio da dor. Foi observada diferença estatisticamente significativa para as lesões localizadas em face e couro cabeludo, assim como para as lesões localizadas em extremidades [MILLER et al, 2011]. WIEGEL (2008) encontrou maior intensidade da dor em face e couro cabeludo do que para as lesões das extremidades. Uma hipótese que poderia explicar estas diferenças, seria o maior acúmulo de PpIX nas lesões de face [WIEGEL, 2008]. Tem sido sugerido também a menor espessura da pele da face em relação às outras áreas do corpo [WIEGEL, 2008].

No presente estudo foram encontradas fluorescências bastante intensas para as lesões localizadas na face, e também em lesões de membros inferiores, especificamente na região pre-tibial. Talvez a fluorescência intensa associada a localização muito próxima da superfície óssea, no caso da região pre-tibial, tenham contribuído para dores mais intensas encontradas no nosso estudo também em MMII.

Em relação ao diagnóstico, este não influenciou na intensidade da dor na NanoALA-TFD. Todavia, alguns autores afirmam que o diagnóstico poderia influenciar na dor [GRAPENGISSER et al, 2002, STEINBAUER et al, 2009; KORMEILI, YAMAUCHI, LOWE, 2004]. Especula-se se isto poderia ocorrer devido a tipos diferentes de células lesionais ou, pela localização, uma vez que certos diagnósticos ocorrem mais frequentemente em determinadas localizações. Tem sido encontrado uma relação entre dor e o diagnóstico de QA com maior frequência do que para os diagnósticos de CBC e DB [GRAPENGISSER et al, 2002, STEINBAUER et al, 2009 MILLER et al, 2011]. Entretanto, a maioria das QA localizam-se na face, local frequentemente relatado como de maior intensidade de dor. HOLMES et al (2004) e WIEGELL et al (2008) não encontraram esta correlação do diagnóstico com a dor. Acreditamos que a dor mais intensa para o diagnóstico de QA esteja mais relacionado ao fato dessas lesões ocorrerem mais frequentemente na face, e, por normalmente serem numerosas dentro de uma mesma grande área (face, couro cabeludo). De forma que quando tratadas, um grande número de lesões e uma grande área são tratados simultaneamente. Este fato não costuma acontecer para os diagnósticos de CBC e DB.

Efeitos colaterais

O segundo efeito colateral mais frequente da NanoALA-TFD, foi o edema e o eritema, muito comuns e esperados. Quando muito intensos e localizados na face, podem causar grande desconforto. A incidência de edema foi de 83,7% e 88% para logo após a primeira e segunda sessões e de 40,2% e 59,2% para 1 semana após a primeira e segunda sessões. As lesões na face foram as mais frequentes e onde o edema mais intenso (Tabela 4.18) ocorreu e, por esta razão, decidiu-se analisar o edema antes e após a primeira sessão especificamente para esta localização (Tabela 4.19).

Logo após primeira sessão houve uma proporção maior de pacientes com edema intenso estatisticamente significativa. Quando se analisa a Tabela 4.18, observa-se que ausência de edema foi maior também na primeira sessão, isto é, os graus extremos foram encontrados logo após primeira sessão e isto ocorreu apenas com o spot-PDT. Quando se usou o spot-RED a frequência maior foi de edema leve e moderado e nenhum caso de ausência de edema. Na Tabela 4.19, onde são comparados o edema da primeira com o segunda sessão para a localização de face, observa-se predomínio do edema leve para o spot PDT. E , do edema moderado para o spot RED. Isto pode ser interpretado de duas maneiras:

1- a resposta ao spot-RED é mais uniforme, homogênea, talvez pela menor fluência e maior tempo de exposição e, talvez, mais intensa, permanecendo o efeito na segunda sessão.

2- o spot PDT, com maior fluência e menor tempo de exposição, desencadearia uma resposta heterogênea, porém frequentemente mais intensa, podendo ocasionar também respostas menores. Assim, especula-se que talvez o spot-RED seja menos eficiente no fotocclareamento, e por isso o edema moderado tenha persistido.

No entanto, com relação a cura, ambas as ponteiros tiveram resultados semelhantes. Sendo semelhantes, a vantagem do spot PDT seria a possibilidade de se tratar áreas com maior número de lesões e/ou campo de cancerização, como os antebraços, onde a dor é menos intensa.

O terceiro efeito colateral encontrado foi infecção mas que acometeu apenas um paciente, como já descrito anteriormente. A descamação esteve presente em todos os pacientes, com total recuperação da face em uma semana, persistindo eritema até quase 1 mês após a TFD, com regressão gradual. As lesões de tronco e membros levaram 2 semanas para o término da descamação e cicatrização.

Enfim, a TFD com NanoALA foi bem tolerada e apresentou excelentes respostas, estando mais uma vez confirmado o seu efeito terapêutico e a boa tolerabilidade.

Parte II - Campo de Cancerização

Foi proposto neste trabalho um novo modelo para estudar a evolução do campo de cancerização por meio da evolução da fluorescência ao longo do tempo em uma sequência de sessões de TFD, utilizando dois precursores fotossensibilizantes em um estudo intraindivíduo. Os agentes em comparação foram o ALA em nanoemulsão (NanoALA) e o MAL comercializado (Metvix®) utilizado no tratamento do campo de cancerização (CC) da face. Para quantificar a evolução temporal do CC foi desenvolvido um novo software que avalia as imagens de áreas de CC tratados através da segmentação de imagens de cor [CHENG et al, 2001] usando um filtro de imagem. Foram comparados o NanoALA e o MAL com relação: (a) meia-vida de redução da área de fluorescência; (b) extensão de área de fluorescência; (c) eficácia da redução da área fracional de fluorescência. Além disso, este estudo revelou a robustez do software desenvolvido para avaliação de imagens de CC, proporcionando uma ferramenta muito eficaz e não invasiva para a prevenção de recidivas e acompanhamento em uma base clínica.

Para justificar a escolha do MAL para a comparação com o NanoALA, no tratamento do CC, é importante ressaltar que a literatura tem relatado alguns estudos comparativos envolvendo ambos, ALA e MAL livres. Várias vantagens de MAL sobre o ALA têm sido relatados na literatura, tais como: i) o perfil de permeação superior ao atravessar o estrato córneo e as membranas celulares; ii) maior seletividade (por exemplo, em QAs solares); iii) aumento da formação da PpIX conduzindo a uma maior eficiência de fluorescência e fotodinâmica; iiiii) menos dor, menos efeitos sistêmicos após o tratamento local; iv) uma depuração mais rápida de células e tecidos [KRAMMER & VERWANGER, 2009]. Por exemplo, um CBC nodulo-ulcerativo não podia ser suficientemente penetrado pelo ALA [PENG et al, 2001]. Para melhorar a penetração, técnicas tais como debulking e adição de potenciador de permeação, tal como o ácido etileno diamino tetraacético (EDTA) e dimetilsulfóxido (DMSO), foram e ainda são empregados. Foi demonstrado que a fluorescência emitida a partir de uma lesão da pele durante a utilização de ALA foi menos específico e menos intensa do que MAL. Além disso, o tempo de oclusão para ALA variou de 4 a 17 horas, enquanto que apenas 3 horas eram necessários para MAL. Por outro lado, foi mostrado que o ALA foi

mais eficaz para o tratamento de lesões inflamatórias do que MAL [BABILAS et al, 2010]. No entanto, as experiências *in vitro* demonstraram ser necessário uma maior concentração de MAL do que o ALA para a formação de PpIX eficiente [CASAS et al, 2001]. Uma eliminação mais rápida do MAL enquanto em comparação com ALA também foi observada em culturas de células epiteliais [WASHBROOK & RILEY, 1997]. Na verdade, a superioridade da MAL sobre ALA é ainda uma questão em aberto e muitos aspectos precisam ser avaliados [KRAMMER & VERWANGER, 2009].

Do ponto de vista clínico, a maior área de CC alvo da formulação NanoALA (45% maior), bem como a redução da área de CC ligeiramente superior (10% maior), constatadas pela análise das fotos pelo software no presente estudo, representam um benefício em favor do ALA nanoencapsulado. No entanto, a meia-vida mais curta na redução do CC, aparentemente favorecendo a formulação MAL, precisa ser entendida por uma análise mais profunda, como indicado abaixo. Com relação à aplicação clínica, o equilíbrio entre os benefícios de uma abordagem em favor do outro deve ser tomada em uma base caso a caso pelo médico.

A partir da análise dos dados obtidos (Fig. 4.17A e B) observa-se que NanoALA tem como alvo uma área maior em comparação com MAL. Esta é realmente uma diferença fundamental entre as duas formulações e sugere uma maior eficiência da formulação NanoALA em induzir a produção de PpIX, uma vez que a área alvo foi maior do que a do MAL, com apenas 2 horas de oclusão. Este fato também não aconteceria com as outras apresentações/formulações do ALA livre em tempo tão curto, indicando um benefício a favor da nanoencapsulação. Argumentamos que a área-alvo maior do NanoALA seria mais provavelmente devido à maior difusividade na pele. Na verdade, a literatura relata taxas elevadas de difusão na pele associadas às droga carregadas por nanocápsulas e do papel fundamental desempenhado pela estrutura da camada fosfolipídica [PRIMO, 2007; PRIMO, 2011]. Um modelo *ex-vivo* de pele porcina foi utilizado para analisar a penetração do ALA contido em nanoemulsão, o BF-200 ALA (10% de cloridrato de 5-ALA) versus a do MAL (Metvix®), por microscopia de fluorescência de PpIX, seu metabólito comum, após 3, 5, 8 e 12 horas [MAISCH et al, 2007]. Sinais de fluorescência da PpIX em suínos tratados com BF-200 ALA foram mais fortes do que aqueles para o MAL. Às 8 e 12 horas, os sinais de fluorescência de

PpIX foram 4,8 e 5,0 vezes mais elevada do que os medidos após a aplicação do creme de MAL. Sinais de fluorescência de PpIX após a aplicação de BF-200 ALA foram detectados em camadas mais profundas da epiderme dos tecidos porcinos do que após aplicações de creme MAL. Os autores concluíram que a BF-200 ALA na TFD pode conduzir a um efeito terapêutico superior na Doença de Bowen. Assim, sugerimos que tanto a redução maior na área de CC (10% maior) e meia-vida mais longa em redução de CC (cerca de 26% mais longo), com apenas 2 horas de oclusão, seriam consequências de uma melhor eficácia da formulação NanoALA em atingir o CC.

No presente estudo, além da redução da área do CC, foi observado na sequência de sessões a redução da intensidade da fluorescência em todos os pacientes, para ambas as hemifaces (MAL e NanoALA) (FIGS. 4.18 E 4.19), sugerindo uma redução da intensidade do dano de CC em ambas as áreas tratadas com NanoALA e MAL. TYRREL, CAMPBELL, CURNOW (2010) também observaram a redução das áreas de fluorescência após tratamentos sequenciais com MAL-TFD. No presente estudo, em todos os pacientes tratados com NanoALA-TFD a fluorescência foi mais mais intensa do que nos tratados com MAL-TFD. Deve ser ressaltado que o ALA livre, mesmo necessitando de mais tempo de oclusão (4 a 18 horas), apresenta fluorescência maior nas áreas classificadas como normais [BABILAS, 2010].

Os dois pacientes com fluorescência mais intensa apresentaram resíduos de fluorescência ao fim dos 10 minutos, e foi exatamente neles que os melhores resultados clínicos foram observados. Deve ser ressaltado que o tempo de iluminação foi de 10 min (spot RED- 13,18 j/s), metade do que foi utilizado no tratamento das lesões localizadas iluminadas com este spot (20 minutos). O tempo de exposição reduzido no presente estudo (duas horas) foi utilizado para permitir uma melhor avaliação do desempenho de fluorescência numa sequência de sessões de TFD. No tratamento das lesões localizadas e em outros pacientes que submeteram-se a tratamentos na face completa, não incluídos neste estudo, quando submetidos a iluminação com spot RED, 13,18j/s e 20 minutos de exposição, a dor mais intensa ocorria nos primeiros 10 minutos. Neste momento, a fluorescência de quase todos era muito reduzida ou ausente. Aguardava-se então 3 minutos, a área era refrigerada e com mais 10 minutos de exposição, a dor era reduzida para quase zero. Postulou-se que fluências menores

poderiam desencadear menos dor. Não houve diferença estatística na intensidade de dor utilizando os dois precursores fotossensibilizantes, NanoALA e MAL. Neste estudo, a intensidade da dor dependia mais do paciente do que da substância utilizada. A maioria dos pacientes relataram redução da dor nas sessões subsequentes, o que coincide com a redução do CC diagnosticado pela redução da fluorescência. Sugerimos que na rotina, a exposição à luz seja realizada até o consumo completo da PpIX, ou seja, 15 a 20 minutos de exposição com o spot RED e 7 minutos com o spot PDT, como se faz habitualmente para TFD de lesões localizadas tumorais.

Com relação aos aspectos clínicos, no presente estudo houve uma redução importante do número de QA e melhora acentuada da qualidade da pele observada com 1 e 6 meses de seguimento. Utilizando o NanoALA, com um período muito curto de oclusão, como 2 horas, excelentes resultados foram alcançados. Nas figuras 4.20, 4.21, 4.22, observa-se uma melhora global da pele e da textura. Esta última pode ser melhor visualizada na Fig 4.22, onde a fenda nasal consequente à retirada de um tumor reduziu drasticamente após a NanoALA-TFD, assim como a textura da pele do retalho. A pele do dorso nasal direito também apresentou melhora considerável da textura com o MAL-TFD. A melhora da pele após a TFD já tem muito relatos na literatura, inclusive com uma popularização do uso da TFD no tratamento do rejuvenescimento [ZANE et al, 2007; GOLBERG, 2008; ISSA et al, 2010; SZEIMIES et al, 2012; SAKAMOTO et al, 2012]. Mais recentemente tem sido relatada a melhora de cicatrizes [SAKAMOTO et al, 2012]. Esse remodelamento do colágeno proporcionado pela TFD tem sido objeto de diversos estudos [ZANE et al, 2007; ISSA et al, 2010; TOREZAN, 2011]. In vitro, ALA-TFD pode estimular a matriz de proteinases (MMPs) MMP-1 e MMP-3 [CAMPBELL et al, 2010]. O remodelamento envolve alterações do colágeno dérmico como resultado da ativação de MMP [SAKAMOTO et al, 2012]. Por outro lado, alguns estudos em humanos não conseguiram encontrar aumento estatisticamente significativo do MMP1 [ISSA et al, 2009; SZEIMIES et al, 2012], após TFD. TOREZAN (2011) em um estudo do CC em 26 pacientes tratados com MAL-TFD, 3 sessões sequenciais, encontrou melhora histológica da severidade e extensão da atipia dos queratinócitos, aumento das fibras colágenas e diminuição do grau de elastose na derme subjacente,

diminuição do material elástico na derme demonstrado por morfometria microscópica digital. Importante melhora clínica também foi observada.

Com o uso de uma nanoemulsão de ALA a 10%, (BRF-200), os autores tiveram respostas muito boas no tratamento das QA, apesar dos resultados cosméticos terem sido inferiores aos encontrados em outras publicações [SZEIMIES et al, 2010]. Formulações com ALA em nanoemulsão a 0,5% e 1%, com borrifamentos a cada 5 minutos durante 1 hora e meia, com posterior aplicação de luz pulsada no tratamento do rejuvenescimento, foram recentemente publicados [BJERRING et al, 2009]. Assim, observam-se resultados clínicos diversos no uso cosmético da TFD, com grande variação na concentração, nos veículos, períodos de oclusão e fontes de luz. O ideal seria um tratamento com período de oclusão mais curto, porém que oferecesse resultados adequados, duradouros e que não só rejuvenescesse, mas que também tratasse as QA, o CC, e realizasse a prevenção do CPNM. Deve ser ressaltado que no uso cosmético, profissionais médicos sem conhecimento adequado das lesões malignas podem realizar sub-tratamentos, podendo levar ao mascaramento de tumores mais agressivos, e isso no futuro, poderá prejudicar a visão da TFD como um tratamento efetivo.

O presente estudo sugere que NanoALA tenha sido mais sensível, uma vez que os tecidos com menos fotodano foram capazes de produzir mais fluorescência, embora a fluorescência em lesões específicas tenha sido também muito intensa. É possível que o NanoALA seja mais eficaz no tratamento de CC, especialmente em áreas com menor fotodano, isto é, teria maior sensibilidade porque: i) seria mais bem absorvido, e isso seria realizado em um tempo menor; ii) teria uma capacidade maior em produzir mais PpIX nestas áreas do que MAL.

Estudos moleculares e clínicos com número maior de pacientes e maior período de acompanhamento são necessários para esclarecer o real significado da diferença entre a pele não fluorescente denominada normal quando utilizado o MAL e a chamada de normal quando fluoresce quando NanoALA ou ALA é utilizado. Levantam-se as seguintes questões:

- Mesmo quando o NanoALA é utilizado existem áreas de pele pouco ou não comprometidas.

- Estudos moleculares demonstram que a pele aparentemente normal pode possuir numerosas alterações moleculares (assinatura molecular), ou seja, a própria definição do campo de cancerização.

Pode ainda ser indagado se a pele que não fluoresce quando submetida a TFD-MAL, mas que fluoresce pelo NanoALA, corresponderia à pele normal. Entretanto, de acordo com os novos conceitos de campo de cancerização, os resultados aqui encontrados e os demais dados da literatura, especula-se que provavelmente o NanoALA seja superior ao MAL no tratamento do CC, especialmente em áreas com menos fotodano aparente. Todavia, como anteriormente proposto, apenas estudos moleculares poderiam realmente comprovar esta suposição, uma vez que os resultados clínicos até o momento são semelhantes [MOLONEY & COLLINS, 2007]. O reduzido número de pacientes, a dificuldade na obtenção de dados clínicos objetivos e a falta de tempo de seguimento prolongado, além do reduzido número de estudos comparativos nos impedem de obter conclusões definitivas a respeito da superioridade de um sobre o outro. Por outro lado, os resultados deste trabalho foram altamente promissores, especialmente no que se refere a eficácia e tolerabilidade do NanoALA, abrindo grandes perspectivas para este fármaco no tratamento do campo de cancerização, incluindo a melhora de cicatrizes e pele de enxertos. Isto significa melhoria na qualidade de vida, especialmente em pacientes que já se submeteram a numerosas cirurgias e com maiores riscos de surgimento de novos tumores.

6. Conclusão

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

A amostra NanoALA, obtida pelo encapsulamento do ácido aminolevulínico (ALA) em nanoemulsão polimérica, apresenta excelente eficácia, tolerabilidade e resultado cosmético na realização de terapia fotodinâmica (NanoALA-TFD) para tratamento das queratoses actínicas, carcinoma basocelular superficial e doença de Bowen, como verificado aos 3 e 12 meses de seguimento.

O tempo de oclusão, a fonte de luz, o diagnóstico e localização das lesões não influenciam na resposta clínica aos 12 meses de seguimento, não havendo diferença significativa na eficácia da NanoALA-TFD em todos os parâmetros analisados em todos os três protocolos testados. Estes dados não diferem da resposta clínica aos 3 meses de seguimento, exceto pelo fato de ter havido nesse tempo diferença na eficácia da TFD quando as lesões estão localizadas na face.

O tempo de oclusão do NanoALA de 4 horas leva a maior intensidade de dor do que 3 horas. A localização da lesão na face leva a dor e edema mais intensos do que nas demais localizações, ainda que o tratamento tenha sido bem tolerado.

Testes preliminares com 3 pacientes sugerem que a NanoALA-TFD associada ao uso do *software* especificamente desenvolvido são eficazes no tratamento e quantificação do campo de cancerização, representando uma ferramenta de rotina para a detecção, tratamento e acompanhamento de ceratose actínica e de pele fotodanificada. Comparada ao MAL (Metvix®), a NanoALA apresenta maior tempo para redução da área luminescente (meia vida), mas redução 10% maior, evidenciando seu potencial para o diagnóstico do campo de cancerização.

7. Referências Bibliográficas

- ACKERMAN A. B.. Solar keratosis is squamous cell carcinoma. *Arch dermatol.* 139:1216-7, 2003.
- AGOSTINIS P., BERG K., CENGEL K. A., FOSTER T. H., GIROTTI A. W., GOLLNICK S. O., et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J Clin.* 61: 250-281, 2011.
- ALINGTON, V.A. Nanotechnology. In: Report of the National Nanotechnology Initiative Workshop, 2003.
- ALLISON R. R., MOTA H. C., SIBATA C. H.. (Clinical PD/PDT in North America: an historical review. *Photodiagn Photodyn Ther.* 1: 263–277, 2004.
- ALMEIDA A. M. P. T. & NAI G. A.. Câncer de pele e sua associação com dano solar Skin cancer and its association with solar damage. *Revista Brasileira de Medicina(RBM) Especial Dermatologia. DEZ, 67: 16-21, 2010.*
- ANWAR J., WRONE D. A., KIMYAI-ASADI A., ALAM M.. The development of actinic keratosis into invasive squamous cell carcinoma: evidence and evolving classification schemes. *Clin Dermatol.* 22(3): 189-96, 2004.
- APALLA Z., SOTIRIOU E., PANAGIOTIDOU D., LEFAKI I., GOUSSI C., IOANNIDES D.. The impact of different fluence rates on pain and clinical outcome in patients with actinic keratoses treated with photodynamic therapy. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine.* 27: 181–185, 2011.
- ARITS A. H., VAN DE WEERT M. M., NELEMANS P. J., KELLENNERS-SMEETS N. W.. Pain during topical photodynamic therapy: uncomfortable and unpredictable. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 24: 1452–1457, 2010.
- BABILAS P., SCHREML S., LANDTHALER M., SZEIMIES R. M. Photodynamic therapy in dermatology. State-of-the-art. *Photochem Photobiol Photomed.* 26:118-32, 2010.
- BASSET-SEGUIN N., IBBOTSON S., EMTESTAM L., TARSTEDT M., MORTON C., MAROTI M., et al. MAL-PDT versus cryotherapy in primary sBCC: results of 36 months follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 18(suppl 2): 412, 2004.
- BASSET-SEGUIN N., IBBOTSON S., EMTESTAM L., TARSTEDT M., MORTON C., MAROTI M, et al. MAL-PDT vs. cryotherapy in primary sBCC: results of 48-month follow up. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 19(Suppl 2): 237, 2005.
- BASSET-SEGUIN P., IBBOTSON S. H., EMTESTAM L, TARSTEDT M, MORTON C., MAROTI M. et al, Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy versus cryotherapy for superficial basal cell carcinoma: a 5 year randomized trial. *Eur J Dermatol.* 18 (5): 547-53, 2008.

- BIRCH-MACHIN M. A.. The role of mitochondria in ageing and carcinogenesis. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31:548–52. 2006.
- BJERRING P., CHRISTIANSEN, K., TROILIUS A, BEKHOR P., de LEEUW J. Skin Fluorescence Controlled Photodynamic Photorejuvenation (Wrinkle Reduction). *Lasers in Surgery and Medicine*. 41: 327–336, 2009.
- BLUME J. E., OSEROFF A. R.. Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy for Skin Cancers. *Dermatol Clin* 25 (2007) 5–14.
- BONNETT R. photosensitizers of the Porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*. 24(1): 19-33, 1995.
- BOUDEWIJN J. M., BRAAKHUIS RUUD H., BRAKENHOFF C., LEEMANS R.. Second Field Tumors: A New Opportunity for Cancer Prevention?. *The Oncologist*. 10:493–500, 2005.
- BRAAKHUIS B. J. M., TABOR M. P., KUMMER J. A., LEEMANS C, BRAAKENHOFF R. H.. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res*. 63:1727-30, 2003.
- BRAAKHUIS B. J., BRAKENHOFF R. H., LEEMANS CR. Second field tumours: a new opportunity for cancer prevention? *Oncologist*. 10: 493–500, 2005.
- BRAATHEN L. R., PAREDES B. E., SAKSELA O., FRITSCH C., GARDLO K., MORKEN T., et al. Short incubation with methyl aminolevulinate for photodynamic therapy of actinic keratoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23:550–555, 2009.
- BRAATHEN L. R., SZEIMIES R. M., BASSET-SEGUN N., BISONNETTE R., FOLEY P., PARISER D., et al. Guideline of International Consensus. *J Am Acad Dermatol*. 56:125-43, 2007.
- BUSCH T. M., XING X., YU G., YODH A., WILEYTO E. P., WANG H. W.. Fluence rate-dependent intratumor heterogeneity in physiologic and cytotoxic responses to Photofrin photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. Dec; 8(12): 1683-93, 2009.
- CALLEN J. P., BICKERS D. R., MOY R. L.. Actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol*. 36(4):650-3, 1997.
- CALVAZARA-PINTON P. G., VENTURINI M., SALA R.. Photodynamic therapy: update 2006 – part I: Photochemistry and photobiology. *Journal of the european academy of dermatology and venereology*. 21(3): 293-302, 2007.
- CALZAVARA-PINTON P. G.. Repetitive photodynamic therapy with topical delta-aminolevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumours. *J Photochem Photobiol B*. 29: 53-7, 1995.

- CAMPBELL SM, TYRRELL J, MARSHALL R, CURNOW A. Effect of MAL-photodynamic therapy on hypertrophic scarring. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 7:1 83–8, 2010.
- CASAS A., FUKUDA H., DI VENOSA G., BATLLE A.. Photo-sensitization and mechanism of cytotoxicity induced by the use of ALA derivatives in photodynamic therapy. *Br J Cancer.* 85(2): 279-284, 2001.
- CASTRO L. G. M.; FREIRE M. A; TOYAMA, C. L.; BRITTO, T. F.; GOMES A. P. Cancer de pele em clínica particular em São Paulo - SP / Skin neoplasms: a epidemiological study. [An. bras. dermatol.](#) Nov-dez. 71(6): 471-6, 1996.
- CAVICCHINI S., SERINI S. M., FIORANI R., GIRGENTI V., GHISLANZONI M., SALA F.. Long-term follow-up of metil aminolevulinate (MAL)-PDT in difficult-to-treat cutaneous Bowen's disease. *International Journal of Dermatology.* 50: 1002–1005, 2011.
- CHENG H. D., JIANG X. H., SUN Y., WANG J.. Color image segmentation: advances and prospects. *Pattern Recogn.* 34(12): 2259-2281, 2001.
- CHOUDHARY S., NOURI K., ELSAIE M. L. Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med Sci.* 24: 971–980, 2009.
- CIGNA E., TARALLO M., MARUCCIA M., SORVILLO V., POLLASTRINI A., SCUDERI N.. Clinical Study Basal Cell Carcinoma: 10 Years of Experience. *Journal of Skin Cancer.* 5: 1-5, 2011.
- CLARK C., BRYDEN A., DAWE R., MOSELEY H., FERGUSON J., IBBOTSON S. H.. Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparison of light sources *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 19: 134–141, 2003.
- COLGAN M. B., CAPPEL M. A., PITTELKOW M. R., FUJII K., TERHORST D., STOCKFLETH E.. Skin cancer- A World- Wide Perspective: Non melanoma Skin cancer: keratinocytic tumors.
- COTTRELL W. J., PAQUETTE A. D., KEYMEL K. R., FOSTER T. H., OSEROFF A. R.. Irradiance-dependent photobleaching and pain in delta-amino-levulinic acid-photodynamic therapy of superficial basal cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 14: 4475–4483, 2008.
- COWEN E. W., NGUYEN J. C., MILLER D. D., MCSHANE D., ARRON S. T., PROSE N. S.. Chronic phototoxicity and aggressive squamous cell carcinoma of the skin in

- children and adults during treatment with voriconazole. *J Am Acad Dermatol.* 62(1): 31, 2010.
- COX N. H., EEDY D. J., MORTON C. A.. Guidelines for management of Bowen's disease: 2006 update. *Br J Dermatol.* 156(1): 11—21, 2007.
- COX N. H., EEDY D. J., MORTON C. A.. Guidelines for management of Bowen's disease. British Association of Dermatologists. *Br J Dermatol.* 141(4): 633-41, 1999.
- DAKUBO G. D., JAKUPCIAK J. P., BIRCH-MACHIN M. A., PARR R. L.. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer Cell International.* 7:2, 2007.
- DATTA S. N., LOH C. S., MACROBERT A. J., WHATLEY S. D., MATTHEWS P. N.. Quantitative studies of the kinetics of 5- aminolaevulinic acid induced fluorescence in bladder transitional cell carcinoma. *British Journal of Cancer.* 78(8): 1113-1118, 1998.
- DE BERKER D., MCGREGOR J. M., HUGHES B.R.. British association of dermatologists therapy guidelines and audit subcommittee, guidelines for the management of actinic keratoses, *Brit. J. Dermatol.* 156: 222-230, 2007.
- DE ROSA, F. S., MARCHETTI, J. M., THOMAZINI, J. A.,TEDESCO, A. C. Influence Of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo accumulation of protoporphyrin IX in hairless mice skins: study of a vehicle for photodynamic therapy of skin cancer. *J Control Release.* 65, 359-66, 2000.
- DE ROSA, F. S., TEDESCO, A. C., LOPEZ, R. F. V., PIERRE, M. B. R., LANGE, N., MARCHETTI, J. M., ROTTA, J. C. G.,BENTLEY, M. V. L. B. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. *J Control Release.* 89: 261-9, 2003.
- DIEPGEN T. L., MAHLER V.. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol.* 146 (suppl 61): 1–6, 2002.
- DIJKSTRA A. T., MAJOIE I. M. L., VAN DONGEN J. W. F., VAN WEELDEN H. Photodynamic therapy with violet light and topical 5-aminolaevulinic acid in the treatment of actinic keratosis, Bowen's disease and basal cell carcinoma. *JEADV.* 15: 550 -554, 2001.
- DIRSCHKA T, RADNY P, DOMINICUS R, MENSING H, BRUNING H, JENNE L, et al. Photodynamic therapy with BF-200 ALA for the treatment of actinic keratosis: results of a multicentre, randomized, observer-blind phase III study in comparison with aregistered methyl-5aminolaevulinate cream and placebo *British Journal of Dermatology.* 166:137–146, 2012.

- DIRSCHKA T., BIERHOFF E., PFLUGFELDER A., GARBE C. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronic acid gel induces regression of cancerous transformation in actinic keratoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 24: 258-63, 2010.
- DOUGHERTY T. J.; KAUFMANN J. E.; GOLDFARB A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* 38: 2628-35, 1978.
- DOUGHERTY T. J.. An update on photodynamic therapy applications. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery.* 20(1): 3-7; 2002.
- DRAGIEVA, G., HAFNER J., R. DUMMER R., SCHMID-GRENDELMEIER P., ROOS M., PRINZ B. M., et al. Topical photodynamic therapy in the treatment of actinic keratoses and Bowen's disease in transplant recipients. *Transplantation.* 77: 115–121, 2004.
- DUMMER R, PITTELKOW M, IWATSUKI K, GREEN A, ELWAN NM Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. Páginas 89-120, 2011.
- DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. “Nanotecnologia”. São Paulo, Art Liber 2006. P.1-201, 2006.
- DURHAM S. E., KRISHNAN K. J., BETTS J., BIRCH-MACHIN M. A.: Mitochondrial DNA damage in non-melanoma skin cancer. *Br J Cancer.* 88:90-95, 2003.
- ERICSON M. B., SNADBERG C., STENQUIST B., GUDMUNDSON F., KARLSSON M., ROS A-M., et al. Photodynamic therapy of actinic keratosis at varying fluence rates: assessment of photobleaching, pain and primary clinical outcome. *Br J Dermatol* 2004; 151: 1204–1212, 2004.
- ESHAGHIAN A., VLEUGELS R. A., CANTER J. A., MCDONALD M. A., STASKO T., SLIGH J. E.: Mitochondrial DNA deletions serve as biomarkers of aging in the skin, but are typically absent in nonmelanoma skin cancers. *J Invest Dermatol.* 126:336-344, 2006.
- FANTINI F., GRECO A., DEL GIOVANE C., CESINARO A. M., VENTURINI M., ZANE C., et al. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: clinical and pathological determinants of response. *JEADV.* 25: 896–901, 2011.
- FEYNMAN, R. There's plenty of room at the bottom. In: Annual Meeting of the American Physical Society, 20 dez 1959. California Institute of Technology (Caltech). Eng Sci. California: Caltech, fev 1960. Disponível em: <http://www.zyvec.com/nanotech/feynman/html>
- FIJAN S, HONIGSMANN H, ORTEL B. Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolevulinic acid and desferrioxamine. *Br j Dermatol.* 133: 282-8, 1995.

- FINK-PUCHES R., HOFER A., SMOLLE J., KERL H., WOLF P.. Primary clinical response and long-term follow-up of solar keratoses treated with topically applied 5-aminolevulinic acid and irradiation by different wave bands of light. *J Photochem Photobiol B*; 41:145–51, 1997.
- FINK-PUCHES R., SOYER H. P., HOFER A., KERL H., WOLF P.. Long-term Follow-up and Histological Changes of Superficial Nonmelanoma Skin Cancers Treated With Topical Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy. *Arch Dermatol*. 134: 821-826, 1998.
- FOOTE J. A., HARRIS R. B., GIULIANO A. R., ROE D. J., MOON T. E., CARTMEL. B et al. Predictors for cutaneous basal-and squamous-cell carcinoma among actinically damaged adults. *Int J Cancer*. 95(1): 7-11, 2001.
- FORTINA, P. KRICKA L.J. SURREY, S. GRODZINSK, P. Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition. *Trends in Biotechnology*. 23(4), n.4, 2005.
- FOSTER TH, MURANT RS, BRYANT RG, KNOX RS, GIBSON SL, HILF R. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat Res*. 126: 296-303, 1991.
- FREEMAN M., VINCIULLO C., FRANCIS D., SPELMAN L., NGUYEN R., FERGIN P., et al. A comparison of photo- dynamic therapy using topical methyl aminolevulinate (Metvix) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Dermatolog Treat*. 14: 99-106, 2003.
- FRIEDBERG J. S., MICK R., STEVENSON J. P., ZHU T., BUSCH T. M., SHIN D.. Phase II trial of pleural photodynamic therapy and surgery for patients with non- small-cell lung cancer with pleural spread. *J Clin Oncol*. 22: 2192-2201, 2004.
- FROST C. A., GREEN A. C., WILLIAMS G. M.. The prevalence and determinants of solar keratoses at a subtropical latitude (Queensland, Australia). *Br J Dermatol*. 139(6): 1033-9, 1998.
- FROST C. A., GREEN A. C.. Epidemiology of solar keratoses. *Br J Dermatol*. 131(4): 455-64. 1994.
- GEBAUER K, SHUMACK S, COWEN PS. Effect of dosing frequency on the safety and efficacy of imiquimod 5% cream for treatment of actinic keratosis on the forearms and hands: a phase II, randomized placebo-controlled trial. *Br J Dermatol*. 161: 897–903, 2009.
- GLASS A. G., HOOVER R. N.. The emerging epidemic of melanoma and squamous cell skin cancer. *JAMA*. 262: 2097–100, 1989.

- GLOGAU R. G.. The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol.* 42: S23-4, 2000.
- GOLD M. H.. Therapeutic and Aesthetic Uses of Photodynamic Therapy. Part four of a five-part series. ALA-PDT in Clinical Practice. How One Clinician Performs This Procedure. *J Clin Aesthetic Derm.* 2(1): 32–35, 2009.
- GOLDBERG D. J.. Different pain sensations in photodynamic therapy of nodular basal cell carcinoma Results from a prospective trial and a review of the literature. *Clinics in Dermatology.* 26: 608-613, 2008.
- GONZALES RC, RICHARD E. Woods digital image processing. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall, 3rd ed., p. 290, 2008.
- GRAPENGIESSER S., GUDMUNDSSON F., LARKO O., ERICSON M., ROSE A., WENNERBERG A-M.. Pain caused by photodynamic therapy of skin cancer. *Clinical and Experimental Dermatology.* 27: 493–497, 2002.
- GREEN A. Changing patterns in incidence of nonmelanoma skin cancer. *Epithelial Cell Biol.* 1: 47–51, 1992.
- GUPTA A. K., DAVEY V., MCPHAIL H.. Evaluation of the effectiveness of imiquimod and 5-fluorouracil for the treatment of actinic keratosis: critical review and meta-analysis of efficacy studies. *J Cutan Med Surg.* 9: 209-14, 2005.
- HABIF T. P.. Lesões cutâneas pré-malignas e tumores não melanomas. In : Guia colorido para diagnóstico e tratamento – Dermatologia Clínica. 4º Edição. Porto Alegre, RS. Brasil, 2005.
- HACKER S. M.; BROWDER J. F.; RAMOS CARO F. A.. Basal cell carcinoma. Choosing the best method of treatment for a particular lesion. *Posgrad. Med.* 93: 101-104, 106-108, 111, 1993.
- HADJUR C., RICHARD M. J., PARAT M. O., JARDON P., FAVIER A.. Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells. *Photochem Photobiol.* 64: 375-381, 1996.
- HADLEY G., DERRY S., MOORE R. A.. Imiquimod for actinic keratosis: systematic review and meta-analysis. *J Invest Dermatol.* 126:1251. 2006.
- HALLDIN C. B., PAOLI J., SANDBERG C., GONZALEZ H., WENNERBERG A. M.. Nerve blocks enable adequate pain relief during topical photodynamic therapy of field cancerization on the forehead and scalp. *Br J Dermatol.* 160: 795–800, 2009.
- HAUSCHILD A., STOCKFLETH E., POPP G., BORROSCH F., BRÜNING H., DOMINICUS R., et al. Optimization of photodynamic therapy with a novel self-

adhesive 5-aminolaevulinic acid patch: results of two randomized controlled phase III studies. *Br J Dermatol.* 160:1066–1074, 2009.

HENDERSON B. W., BUSCH T. M., SNYDER J. W.. Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. *Lasers Surg Med.* Jun;38(5): 486-93, 2006.

HENDERSON B. W., DOUGHERTY T. J.. *Photochem Photobiol.* 55: 145-157, 1992.

HERR, J. K. SMITH, J. E. MEDLEY C. D, SHANGGUAN, D., TAN W. Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells. *Analytical Chemistry.* 78(9): 2918-2924, 2006.

HOEY S. E., DEVEREUX C. E., MURRAY L., CATNEY D., GAVIN A, KUMAR S., et al.. Skin cancer trends in Northern Ireland and consequences for provision of dermatology services. *Br J Dermatol.* 156: 1301–07, 2007.

HOLMES M. V., DAWE R. S., FERGUSON J., IBBOTSON SH. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the efficacy of tetracaine gel (Ametop) for pain relief during topical photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 150: 337–40, 2004.

HORN M., WOLF P., WULF H. C., WARLOE T., FRITSCH C., RHODES L. E., et al. Topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy in patients with basal cell carcinoma prone to complications and poor cosmetic outcome with conventional therapy. *Br J Dermatol.* 149: 1242-9, 2003.

IKUE SHIMIZU, MD, ANTONIO CRUZ, MD, KYUNG HEE CHANG, MD, AND RAYMOND G. DUFRESNE. Treatment of Squamous Cell Carcinoma In Situ: A Review *Dermatol Surg.* 37: 1394–1411, 2011.

INCA: <http://inca.gov.br/estimativas/2012/tabelaestados.asp?UF=DF>

ISSA M. C. A., MANELA-AZULAY M.. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. *An Bras Dermatol.* 85(4): 501-511, 2010.

ISSA M. C. A., PIÑEIRO- MACEIRA J., FARIAS R. E., PUREZA M., LUIZ R. R., MANELA-AZULAY M.. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in photodamaged skin by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 161:647-53, 2009.

ISSA M. C. A., PINHEIRO-MACEIRA J, VIEIRA M.T.C. OLEJ B., MANDARIM-DE-LACERDA C. A., LUIZ R. R., MANELA-AZULAY M.. Photorejuvenation with Topical Methyl Aminolevulinate and Red Light: A Randomized, Prospective, Clinical, Histopathologic, and Morphometric Study. *Dermatol Surg.* 36: 39-48, 2010.

JAEGER A. B., GRAMKOW A., HJALGRIM H., MELBYE M., FRISCH M.. Bowen disease and risk of subsequent malignant neoplasms: a population-based cohort study of 1147 patients. *Arch Dermatol.* 135(7):790-3, 1999.

- JEFFES E. W., MCCULLOUGH J. L., WEINSTEIN G. D., KAPLAN R., GLAZER S. D., TAYLOR JR. Photodynamic therapy of actinic keratoses with topical aminolevulinic acid hydrochloride and fluorescent blue light. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45, 96–104, 2001.
- JONASON AS, SUBRAHMANYAM K, PRICE G, RESTIFO R, BRASH D. Frequent clones of P53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci.* 93:14025-29, 1996.
- KALKA K., MERK H, MUKHTAR H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 42: 389-413. 2000.
- KARRER S; SZEIMES RM; HOHENLEUTNER U; HEINE A; LANDTHALER, M. Unilateral localized basaliomatosis: treatment with photodynamic therapy after application of 5-aminolevulinic acid. *Dermatology.* 190: 218-222, 1995.
- KAUFMANN R., SPELMAN L., WEIGHTMAN W., REIFENBERGER J., SZEIMIES R-M, VERHAEGHE E. et al. Multicentre intraindividual randomized trial of topical methyl aminolaevulinate–photodynamic therapy vs. cryotherapy for multiple actinic keratoses on the extremities. *Br J Dermatol.* 158: 994–999, 2008.
- KAUR R. R., ALIKHAN A., MAIBACH H. I. Comparison of topical 5-fluorouracil formulations in actinic keratosis treatment. *J Dermatolog Treat . Sep* 21(5): 267-271, 2009.
- KENNEDY J. C. & POTTIER R. H.. Endogenous protoporphyrin IX, a clinical useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 14: 275-292, 1992.
- KENNEDY J. C., POTTIER R. H., PROSS D. C.. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B.* 14: 275-92, 1990.
- KESSEL D, LUO Y. Delayed oxidative photodamage induced by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 64: 601-4, 1996.
- KESSEL D. Relocalization of cationic por- phyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 1: 837-840, 2002.
- KLEIN A., BABILAS P., KARRER S., LANDTHALER M., SZEIMIES R-M.. Photodynamic therapy in dermatology –an update 2008. *JDDG.* 6:839–845 (Journal of the German Society of Dermatology), 2008.
- KORMEILI T., YAMAUCHI P.S., LOWE N.J. topical photodynamic therapy in clinical dermatology. *Br j Dermatol.* 50: 1061-9, 2004.

- KRAMMER B., VERWANGER T. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid or its methyl ester: Which one is superior? *Med Laser Appl.* 24(4-5): 221-226, 2009.
- KRAWTCHENKO N., ROEWERT-HUBER J., ULRICH M., MANN I., STERRY W., STOCKFLETH E. A randomised study of topical 5% imiquimod vs. topical 5-fluorouracil vs. cryo- surgery in immunocompetent patients with actinic keratoses: a comparison of clinical and histological outcomes including 1-year follow-up. *Br J Dermatol.* 157 (Suppl. 2):34–40., 2007.
- KRICKER A., ARMSTRONG B. K., ENGLISH D. R., HEENAN P. J.. A dose-response curve for sun exposure and basal cell carcinoma. *Int J Cancer.* 60: 482–88. 1995a.
- KRICKER A., ARMSTRONG B. K., ENGLISH D. R., HEENAN P. J.. Does intermittent sun exposure cause basal cell carcinoma? A case- control study in Western Australia. *Int J Cancer.* 60: 489–94, 1995b.
- KURWA H. A., YONG-GEE S. A., SEED P. T., MARKEY A. C., BARLOW R. J.. A randomized paired comparison of photo- dynamic therapy and topical 5-fluorouracil in the treatment of actinic keratoses. *J. Am. Acad. Dermatol.* 41: 414–418, 1999.
- LAMPROS T. D., COBANOGLU A., PARKER F., [RATKOVEC R.](#), [NORMAN D.J.](#), HERSHBERGER R.. Squamous cell carcinoma in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 17(6): 586. 1998.
- LANGAN S. M., COLLINS P.. Randomized, double-blind, placebo-con- trolled prospective study of the efficacy of topical anaesthesia with a eutetic mixture of lignocaine 2.5% and prilocaine 2.5% for topi-cal 5-aminolaevulinic acid–photodynamic therapy for extensive scalp actinic keratoses. *Br J Dermatol.* 154:146–9, 2006.
- LEE Y, ELMA D, BARON ED. Photodynamic Therapy: Current Evidence and Applications in Dermatology Yoojin Lee Y, Elma D. Baron ED. *Semin Cutan Med Surg.* 30: 199-209, 2011.
- LEHMANN P.. Methyl aminolaevulinate- photodynamic therapy: review of clini-cal trials in the treatment of actinic ker- atoses and nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 156: 793–801. 2007.
- LEVY S., FURST K., CHERN W.. A pharmacokinetic evaluation of 0.5% and 5% fluorouracil topical cream in patients with actinic keratosis. *Clin Ther.* 23: 908., 2001.
- LIU, H. WEBSTER, T.J. Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials.* 28:354-369, 2007.
- LO J. S., SNOW S. N., REIZNER G. T., MOHS F. E., LARSON P. O., HRUZA G. J. Metastatic basal cell carcinoma: report of twelve cases with a review of the literature.

Journal of the American Academy of Dermatology. 24(5): 715–719, 1991.

MADAN V., LEAR J. T., SZEIMIES R. M.. Non-melanoma skin cancer *The Lancet*. 375 (N° 9715): 673–685, 2010.

MAISCH T., SANTARELLI F., SCHREML S., BABILAS P., SZEIMIES R. M.. Fluorescence induction of protoporphyrin IX by a new 5-aminolevulinic acid nanoemulsion used for photodynamic therapy in a full-thickness ex vivo skin model. *Experimental Dermatology*. 19: 302–e305, 2007.

MAIZE J. C., RASMUSSEN J. Precancerous lesions, in Helm F (ed): *Cancer Dermatology*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1979 apud LEE.

MARKS R. Malignant transformation of solar keratoses to SCC. *Lancet*. 1:795-7, 1988.

MARMUR E.S.; SCHMULTS C.D.; GOLDBERG D.J. A review of laser and photodynamic therapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer. *Dermatol Surg*. 30, 264-271, 2004.

MELO, C.P.; PIMENTA, M. *Nanociência e Nanotecnologia. Parcerias Estratégicas*, Brasília.18:09-21, 2008.

MILLER I. M., NIELSEN J. S., LOPHAVEN S., JEMEC G. B. E.. Factors related to pain during routine photodynamic therapy: a descriptive study of 301 patients. *JEADV*. 25, 1275–1281, 2011.

MOAN J., BERG K., KVAM E., WESTERN A., MALIK Z., RÜCK A., SCHNECKENBURGER H.. Intracellular localization of photosensitizers. *Ciba Found Symp*. 146:95-107; discussion 107-111, 1989.

MOLONEY F. J., COLLINS P.. Randomized, double-blind, prospective study to compare topical 5-aminolaevulinic acid methylester with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for extensive scalp actinic keratosis. *Br J Dermatol*. 157(1): 87-91, 2007.

MORTON C. A., HORN M., LEMAN J. et al. A randomised, placebo-controlled, European study comparing MAL-PDT with cryotherapy and 5-fluorouracil in subjects with Bowen's disease: results from a 24 months follow-up. Poster presented at the 10th World Congress on Cancers of the Skin, Vienna, May; P129, 2005.

MORTON C. A., HORN M., LEMAN J., TACK B., BEDANE C., TJIOE M., et al. A randomized, placebo-controlled, European study comparing MAL-PDT with cryotherapy and 5-fluorouracil in subjects with Bowen's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 18(Suppl 2): 415, 2004.

MORTON C. A., MCKENNA K. E., RHODES L. E.. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br J Dermatol*. 159: 1245–1266, 2008.

- MORTON C. A., WHITEHURST C., MCCOLL J. H., MOORE J. V., MACKIE R. M.. Photodynamic therapy for large or multiple patches of bowen disease and basal cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 137: 319–324, 2001.
- MORTON C. A., WHITEHURST C., MOORE J. V., MACKIE R. M.. Comparison of red and green light in the treatment of Bowen's disease by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 143:767-72, 2000.
- MORTON C. A., WHITEHURST C., MOSELEY H., MCCOLL J. H., MOORE J. V., MACKIE R et al. Comparison of photodynamic therapy with cryotherapy in the treatment of Bowen's disease. *Br J Dermatol.* 135: 766-771, 1996.
- MORTON C. A., WHITEHURST C.; MCCOLL J. H. ;MOORE J. V.; MACKIE R. M.. Photodynamic therapy for large or multiple patches of Bowen disease and basal cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 137: 319-24, 2001.
- MORTON C., CAMPBELL S., GUPTA G., KEOHANE S., LEAR J., ZAKI I.,WALTON S., KERROUCHE N., THOMAS G., SOTO P. Intra- individual, right-left comparison of topical methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy and cryotherapy in subjects with actinic keratoses: A multicentre, randomized controlled study. *Br. J. Dermatol.* 155:1029-1036, 2006.
- MORTON CA, MACKIE RM, WHITEHURST C, MOORE JV, MCCOLL JH. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: effect of tumor thickness and duration of photosensitizer application on response. *Arch Dermatol.* 134: 248– 249, 1998.
- MROZ P, HASHMI JT, HUANG Y-Y, LANGE N, HAMBLIN MR. Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Expert Rev Clin Immunol.* January ; 7(1): 75–91, 2011.
- NASCHIE, M.S.E. Nanotechnology for the developing world. *Chaos, Solitons and Fractals, Cobham.* 30:769-773, 2006.
- NEVES R. G.; LUPI O.; TALHARI S.. *Câncer da Pele.* 1ª edição, Rio de Janeiro, RJ, MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2001.
- NGUYEN T. H., HO D. Q. D.. Nonmelanoma Skin Cancer. *Current Treatment Options in Oncology .* 3:193–203, 2002.
- ORENSTEIN A., KOSTENICH G., TSUR H., KOGAN L., MALIK Z.. Temperature monitoring during photodynamic therapy of skin tumors with topical 5-aminolevulinic acid application. *Cancer Lett.* 93: 227–32, 1995.
- PAGLIARO J., ELLIOTT T., BULSARA M., KING C., VINCIULLO C.. Cold air analgesia in photodynamic therapy of basal cell carcinomas and Bowen's disease: an effective addition to treatment: a pilot study. *Dermatol Surg.* 30: 63–66, 2004.

- PAOLI J., HALLDIN C., ERICSON M. B., WENNBERG A. M.. Nerve blocks provide effective pain relief during topical photodynamic therapy for extensive facial actinic keratoses. *Clin Exp Dermatol.* 33: 559–564, 2008.
- PARISER D. M., LOWE N. J., STEWART D. M., JARRATT M. T., LUCKY A. W., PARISER R. J., YAMAUCHI P. S.. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: Results of a prospective randomized multicenter trial. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48: 227–232, 2003.
- PARISER D., LOSS R., JARRATT M., ABRAMOVITS W., SPENCER J., GERONEMUS R., et al.. Topical methyl-aminolevulinate photodynamic therapy using red light-emitting diode light for treatment of multiple actinic keratoses: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Am Acad Dermatol.* 59: 569– 76, 2008.
- PENG Q, SOLER AM, WARLOE T, NESLAND JM, GIERCKSKY KE. Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5- aminolevulinate. *J Photochem Photobiol B.* 62:140-5, 2001.
- PIACQUADIO, D. J., D. M. CHEN, H. F. FARBER, J. F. FOWLER JR, S. D. GLAZER, J. J. GOODMAN, L, et al. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp: Investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. *Arch. Dermatol.* 140, 41-46, 2004.
- PIERRE, M. B., TEDESCO, A. C., MARCHETTI, J. M., BENTLEY, M. Potential incorporation of 5-aminolevulinic acid in micelles and stratum corneum lipids liposomes: fluorescence quenching studies. *Brasilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001a, 37: 355-61, 2001a.
- PIERRE, M. B., TEDESCO, A. C., MARCHETTI, J. M., BENTLEY, M. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5- aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and in vitro permeation study. *BMC Dermatology.* 1: 5. 2001b
- PIRARD D., VEREECKEN P., MELOT C., HEENEN M.. Three percent diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses: a meta- analysis of the recent studies. *Arch Dermatol Res.* 297:185–9, 2005.
- PISON, U. WELTE, T. GIERSIG, M. GRONERBERG, D.A. Nanomedicine for respiratory diseases. *European journal of Pharmacology.* 533:341-350, 2006.
- PRIMO, F. L., REIS M. B. C., PORCIONATTO M. A., TEDESCO A. C.. In vitro evaluation of chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion and low-level laser therapy on human skin dermal equivalents and bone marrow mesenchymal stem cells. *Cur Med Chem.* 18(22):3376-3381, 2011.

- QUAEDVLIIEG P. J. F., TIRSI E., THISSEN M. R. T. M., KREKELS G. A.. Actinic keratosis: how to differentiate the good from the bad ones? *Eur J Dermatol.* 16 (4):335-9, 2006.
- REGO R. F.. Estudo comparativo de precursores da Protoporfirina IX (ALA e MAL) utilizados topicamente em Terapia Fotodinâmica [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos, Biotecnologia; 2008.
- REIZNER GT, CHUANG TY, ELPERN DJ, et al. Bowen's disease (squamous cell carcinoma in situ) in Kauai, Hawaii. A population-based incidence report. *J Am Acad Dermatol.* 31(4): 596-600, 1994.
- RIGEL D. S., FRIEDMAN R., DZUBOW L. M., REINTGEN D. S., BYSTRYN J. C., MARKS R.. Cancer of the Skin: basal cell carcinoma. Elsevier Saunders.. Primeira Edição. Páginas101-132, 2005.
- RIVERS J. K., ARLETTE J., SHEAR N., GUENTHER L., CAREY W., POULIN Y.. Topical treatment of actinic keratoses with 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel. *Br J Dermatol.* 146:94–100, 2002.
- RIVERS J. K., MCLEAN D. I.. An open study to assess the efficacy and safety of topical 3% diclofenac in a 2.5% hyaluronic acid gel for the treatment of actinic keratoses. *Arch Dermatol.* 133: 1239–42, 1997.
- ROBERT D J & CAIRNDUFF F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. *Br J Plast Durg.* 48: 360-70, 1995.
- RODUST P.M., STOCKFLETH E., ULRICH C., LEVERKUS M., EBERLE J.. UV- induced squamous cell carcinoma- a role for antiapoptotic signaling pathways. *Br J Dermatol.* 161(Suppl 3):107-15, 2009.
- ROEWERT-HUBER J, STOCKFLETH E, KERL H. Pathology and patho- biology of actinic (solar) keratosis—an update. *Br J Dermatol.* 157(Suppl. 2):18—20, 2007.
- ROOS W. P., KANIA B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med.* 12: 440-50. 2006.
- ROSSI-BERGMANN B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. *Cienc Cult.* 60(2): 54-57. São Paulo. 2008.
- ROSSO S., ZANETTI R., MARTINEZ C., TORMO M.J., SCHRAUB S., SANCHO-GARNIER H.. The multicentre south European study “Helios” II: different sun exposure patterns in the aetiology of basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. *Br J Cancer.* 73: 1447–54, 1996.
- SAKAMOTO F. H., IZIKSON L., TANNOUS Z., ZURAKOWSKI D., ANDERSON R. R.. Surgical scar remodelling after photodynamic therapy using aminolaevulinic acid or its

- methylester: a retrospective, blinded study of patients with field cancerization . *Br J Dermatol.* 166: 413-416, 2012.
- SALIM A., LEMAN J. A., MCCOLL J. H., CHAPMAN R., MORTON C. A.. Randomized comparison of photodynamic therapy with topical 5-fluorouracil in Bowen's disease. *Br J Dermatol.* 148: 539-43, 2003.
- SAMPAIO S. A. P.; RIVITTI E. A.. *Dermatologia. Afecções epiteliais pré-malignas e tumores intraepidérmicos* In: *Dermatologia*, 1ª edição, São Paulo, Artes Médicas, 1998.
- SCHEU, M. VEEFKIND, V. VERBANDT, Y. MOLINA GALAN, E. ABSALOM, R. FORSTER, W. Mapping nanotechnology patents: The EPO approach. *World Patent Information.* 28:204-211, 2006.
- SERRA-GUILLEN C., HUESO L., NAGORE E., VILA M., LLOMBART B., REQUENA CABALLERO C., et al. Comparative study between cold air analgesia and supraorbital and supratrochlear nerve block for the management of pain during photodynamic therapy for actinic keratoses of the frontotemporal zone. *Br J Dermatol.* 161: 353–356, 2009.
- SESHADRI M., BELLNIER DA, VAUGHAN LA, SPERNYAK JA, MAZURCHUK R, FOSTER TH.. Light delivery over extended time periods enhances the effectiveness of photodynamic therapy. *Clin Cancer Res.* May 1: 14(9): 2796-805. 2008.
- SIDOROFF A., THALER P.. Taking treatment decisions in non-melanoma skin cancer—The place for topical photodynamic therapy (PDT). *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 7, 24—32, 2010.
- SIMON R., ELTZE E., SCHÄFER K. L., BÜRGER H., SEMJONOW A., HERTLE L., et al.. Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. *Cancer Res.* 61: 355-62, 2001.
- SKIVEREN J., HAEDERSDAL M., PHILIPSEN P. A., WIEGELL S. R., WULF H. C.. Morphine gel 0.3% does not relieve pain during topical photodynamic therapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 86: 409–11, 2006.
- SLAUGHTER D. P., SOUTHWICK H. W., SMEJKAL W.: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 6: 963-968, 1953.
- SMITS T., MOOR A. C.. New aspects in photodynamic therapy of actinic keratoses. *J Photochem Photobiol B.* 96(3):159–69. 2009.
- SOLER A. M., WARLOE T., BERNER A., GIERCKSKY K. E.. A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell

carcinomas treated with methyl 5-aminolaevulinate-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. *Br J Dermatol.* 145:467-71, 2001.

- STEINBAUER J. M., SCHREML S., BABILAS P., ZEMAN F., KARRER S., LANDTHALER M., et al. Topical photodynamic therapy with porphyrin precursors – assessment of treatment-associated pain in a retrospective study. *Photochem Photobiol Sci.* 8: 1111– 1116, 2009.
- STEINMETZ NF, CALDER G, LOMONOSSOFF GP, Evans DJ. Plant viral capsids as nanobuilding blocks: construction of arrays on solid supports. *Langmuir.* 22: 10032-10037, 2006.
- STOCKFLETH E., KERL H. Guidelines for the management of actinic keratoses. *Eur J Dermatol.* 16 (6): 599-606, 2006.
- STRITT A., MERK H. F., BRAATHEN L. R., FELBERT Vv. Review Photodynamic Therapy in the Treatment of Actinic Keratosis. *Photochemistry and Photobiology.* 84: 388-398. 2008.
- SU F., VIROS A., MILAGRE C., TRUNZER K., BOLLAG G., SPLEISS O., et al.. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med.* 366(3): 207, 2012.
- SVANBERG K; ANDERSON T; KILLANDER D; WANG I; STENRAM U. Photodynamic therapy of non-melanoma malignant tumours of the skin using topical γ -amino levulinic acid sensitization and laser irradiation. *B. J. Dermatol.* 130: 743-751, 1994.
- SVOBODOVA A., WALTEROVA D., VOSTALOVA J..Ultravioletlight induced alteration of the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 150(1): 25-38, 2006.
- SZEIMIES R-M, RADNY P, SEBASTIAN M, BORROSCH F, DIRSCHKA T, KRAHN-SENFTLEBEN G, et al. Photodynamic therapy with BF-200 ALA for the treatment of actinic keratosis: results of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *British Journal of Dermatology.* 163:386–394, 2010.
- SZEIMIES R-M., STOCKFLETH E., POPP G., BORROSCH F., BRÜNING H., DOMINICUS R., et al. Long-term follow-up of photodynamic therapy with a self-adhesive 5-aminolaevulinic acid patch: 12 months data. *British Journal of Dermatology.* 162: 410–414, 2010.
- SZEIMIES R. M. KARRERA S., RADA KOVIC-FIJAN S., TANEW A., CALVAZARA-PINTON P. G., ZANE C. Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: A prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol.* 47:258–62, 2002.
- SZEIMIES R. M., IBBOTSON S., MURRELL D. F., RUBEL D., FRAMBACH Y., DE

- BERKER D., et al.. A clinical study comparing methyl aminolevulinate photodynamic therapy and surgery in small superficial basal cell carcinoma (8–20 mm), with a 12-month follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 22: 1302–1311, 2008.
- SZEIMIES R. M., IBBOTSON S., MURRELL D. F., RUBEL D., FRAMBACH Y., DE BERKER D. et al. A clinical study comparing methyl aminolevulinate photodynamic therapy and surgery in small superficial basal cell carcinoma (8–20 mm), with a 12-month follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 22: 1302–1311, 2008.
- SZEIMIES R. M., KARRER S., RADAKOVIC-FIJAN S., TANEWB A., CALVAZARA-PINTONC P.G., ZANEC C. et al. Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol.* 47: 258–62, 2002.
- SZEIMIES R. M., MATHESON R.T., DAVIS S.A. BHATIA A. C., FRAMBACH Y., KLÖVEKORN W., et al.. Topical methyl amino- levulinate photodynamic therapy using red light-emitting diode light for multiple actinic keratoses: a randomized study. *Dermatol Surg.* 35:586–92, 2009.
- SZEIMIES R. M., TOREZAN L., NIWA A., VALENTE N., UNGER P., KOHL E., et al. Clinical, histopathological and immunohistochemical assessment of human skin field cancerization before and after photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 167: 150–159, 2012.
- SZEIMIES, RM, SASSY T, LANDTHALER M. Penetration potency of topical applied 5-ALA for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. *Photochem Photobiol.* 59: 73-6, 1994.
- TABOR M. P., BRAKENHOFF R. H., RUIJTER-SCHIPPERS H. J., VAN DER WAL J. E., SNOW G.B, LEEMANS C. R.. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol.* 161: 1051-60, 2002.
- TARSTEDT M., ROSDAHL I., BERNE B., SVANBERG K., WENNBERG A. M.. A randomized multicenter study to compare two treatment regimens of topical methyl aminolevulinate (Metvix)- PDT in actinic keratosis of the face and scalp. *Acta Derm. Venereol.* 85: 424–428, 2005.
- TAYLOR M. N., GONZALEZ M. L.. The practicalities of photodynamic therapy in acne vulgaris. *British Journal of Dermatology.* 160: 1140–1148, 2009.
- TEDESCO, AC; SIMIONI AR; PRIMO FL. Introdução a nanotecnologia. In: Morales MM(Org). *Terapias avançadas: Células–tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada a saúde.* São Paulo, Atheneu. p. 237-246, 2007.
- THAI K. E., FERGIN P., FREEMAN M., VINCIULLO C., FRANCIS D., SPELMAN L. et al. A prospective study of the use of cryosurgery for the treatment of actinic keratoses.

Int J Dermatol. 43: 687-92, 2004.

THISSEN MR, SCHROETER CA, NEUMANN HA. Photodynamic therapy with delta-aminolaevulinic acid for nodular basal cell carcinomas using a prior bebulking technique. Br J Dermatol. 142: 338-9, 2000.

THURMAN, J.M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. Clinical Immunology. 123: 7-13, 2006.

TING P. T., KASPER R., ARLETTE J. P.. Metastatic basal cell carcinoma: report of two cases and literature review. Journal of Cutaneous Medicine and Surgery. 9(1): 10–15, 2005.

TOMA, H.E. O mundo nanométrico: dimensão do novo século. São Paulo: Editora Oficina Texto. 102p, 2004.

TOREZAN L. Terapia fotodinâmica: princípios de fotoquímica, fotobiologia, agentes fotossensibilizantes e aplicações na oncologia cutânea. In: Osorio N, Torezan L. Laser em dermatologia. 2a ed. São Paulo: Roca;. p.171-94, 2009.

TOREZAN L., NIWA A. B. M., NETO C. F.. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. An Bras Dermatol. 84(5): 445-59, 2009b.

TOREZAN L.A.R.. Estudo da pele do campo cancerizável antes e após a terapia fotodinâmica através dos métodos clínicos, histopatológicos e imunohistoquímicos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2011.

TOUMA D., YAAR M., WHITEHEAD S., KONNIKOV N., GILCHREST B. A.. A trial of short incubation, broad-area photodynamic therapy for facial actinic keratosis and diffuse photodamage. Arch Dermatol. 140: 33-40, 2004.

TSCHEH E. H., WONG D. S., PARISER D. M., DUNLAP F. E., A. HOULIHAN A., M.B. FERDON M. B.. Photodynamic therapy using aminolaevulinic acid for patients with nonhyperkeratotic actinic keratoses of the face and scalp: phase IV multicentre clinical trial with 12-month follow up. Br J Dermatol. 155: 1262–9, 2006.

TSCHEH E. H., WONG D. S., PARISER D. M., DUNLAP F. E., HOULIHAN A., FERDON M. B.. Photodynamic therapy using aminolaevulinic acid for patients with nonhyperkeratotic actinic keratoses of the face and scalp: phase IV multicentre clinical trial with 12-month follow up. Br J Dermatol. 155: 1262–1269, 2006.

TYRRELL J., CAMPBELL S., CURNOW A.. Validation of a non-invasive fluorescence imaging system to monitor dermatological PDT. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 7: 86-97, 2010.

VANLANGENAKKER N, VANDEN BERGHE T, KRYSKO DV, FESTJENS N, VANDENABEELE P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell

death. *Curr Mol Med*. 8: 207-220, 2008.

VANOOSTEN E. J., KUIJPERS D. I. M., THISSEN M. R. T. M.. Different pain sensations in photodynamic therapy of nodular basal cell carcinoma Results from a prospective trial and review of the literature. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 3: 61–68, 2006.

VARMA S., WILSON H.; KURWA H.A., GAMBLE B., CHARMAN C., PEARSE A.D. et al. Bowen`s disease, solar keratoses and superficial basal cell carcinomas treated by photodynamic therapy using a large-field incoherent light source. *Br J Dermatol*. 144: 567-74, 2001.

VATVE M., ORTONNE J-P., BIRCH-MACHINÀ M. A., GUPTA G. Management of field change in actinic keratosis. *British Journal of Dermatology*. 157 (Suppl. 2), 21–24, 2007.

VINCIULLO C, ELLIOTT T, GEBAUER K, SPELMAN L, NGYEN R. MAL-PDT in patients with basal cell carcinoma: results of an Australian multicenter study. Poster presented to the International Skin Cancer Conference 2004, Zurich, Switzerland, July 22-24, 2004.

VINCIULLO C., ELLIOTT T., FRANCIS D., GEBAUER K., SPELMAN L, NGUYEN R., et al. Photodynamic therapy with topical methyl aminolaevulinate for ‘difficult-to-treat’ basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 152: 765–772, 2005..

VON FELBERT V., HOFFMANN G., HOFF-LESCH S., ABUZAHRA F., RENN C.N., BRAATHEN L. R. et al. Photodynamic therapy of multiple actinic keratoses: reduced pain through use of visible light plus water-filtered infrared A compared with light from light-emitting diodes. *Br J Dermatol*. 163: 607–615, 2010.

WANG I., BENDSOE N., KLINTEBERG C. A., ENEJDER A. M., ANDERSSON-ENGELS S., SVANBERG S., et al. Photodynamic therapy vs. cryo- surgery of basal cell carcinomas: results of a phase III clinical trial. *Br J Dermatol*. 144: 832-40, 2001.

WARREN C. B., KARAI L. J., VIDIMOS A., MAYTIN E. V.. Pain associated with aminolevulinic acid-photodynamic therapy of skin disease. *J Am Acad Dermatol*. 61: 1033–1043, 2009.

WASHBROOK R., RILEY P. A.. Comparison of delta-aminolaevulinic acid and its methyl ester as an inducer of porphyrin synthesis in cultured cells. *Br J Cancer*. 75 (10): 1417-1420, 1997.

WEISS J., MENTER A., HEVIA O., JONES T., LING M., RIST T., et al. Effective treatment of actinic kera- tosis with 0.5% fluorouracil cream for 1, 2, or 4 weeks. *Cutis*. 70: 22–9, 2002.

- WENNBERG A. M.. Pain, pain relief and other practical issues in photodynamic therapy. *Australas J Dermatol.* 46(Suppl): S3-4; discussion S23-5, 2005.
- WENNBERG AM, LINDHOLM LE, ALPSTEN M, LARKO O. Treatment of superficial basal cell carcinomas using topically applied delta- aminolaevulinic acid and a filtered xenon lamp. *Arch Dermatol Res.* 1:288: 561-4. 1996.
- WHITAKER I. S., SHOKROLLAHI K., JAMES W., MISHRA A., LOHANA P., MURISON MC. Combined CO₂ laser with photodynamic therapy for the treatment of nodular basal cell carcinomas. *Ann Plast Surg* , 59: 484–488, 2007.
- WIEGELL S. R., SKIVEREN J., PHILIPSEN P. A., WULF H. C. Pain during photodynamic therapy is associated with protoporphyrin IX fluorescence and fluence rate. *British Journal of Dermatology.* 158: 727–733, 2008.
- WIEGELL S. R., SKIVEREN J., PHILIPSEN P. A., WULF H. C.. Pain during photodynamic therapy is associated with protoporphyrin IX fluorescence and fluence rate. *Br J Dermatol.* 158: 727–733, 2008.
- WOLF J. E. Jr, TAYLOR J. R., TSCHEN E., KANG S.. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol.* 40:709–13, 2001.
- WULF H. C., PAVEL S., STENDER I., BAKKER-WENSVEEN A. H. B. C.. Topical photodynamic therapy for prevention of new skin lesions in renal transplant recipients. *Acta Derm Venereol.* 86: 25-28, 2006.
- YUN Y., DONG Z., SHANOV V., HEINEMAN W. R., HALSALL H. B., BHATTACHARYA A., et al. Nanotube electrodes and biosensors. *Nanotoday.* 2(6): 30-37, 2007.
- ZANE C., CAPEZZERA R., SALA R., VENTURINI M., CALZAVARA-PINTON P.. Clinical and Echographic Analysis of Photodynamic Therapy Using Methylaminolevulinate as Sensitizer in the Treatment of Photodamaged Facial Skin. *Lasers in Surgery and Medicine.* 39: 203-209 , 2007.
- ZELICKSON BD. Mechanism of Action of Topical Aminolevulinic Acid. IN: Goldman MP, Dover J, Alam M. *Photodynamic Therapy.* 2^o ed. China. Saunders Elsevier.p1-10., 2008.

Anexo I

Classificação da pele segundo Fitzpatrick

Tipo de pele	Descrição
Tipo I	Pele muito clara , sempre queima, nunca bronzeia
Tipo II	Pele clara, sempre queima e algumas vezes bronzeia
Tipo III	Pele menos clara, algumas vezes queima e sempre bronzeia
Tipo IV	Pele morena clara raramente queima e sempre bronzeia
Tipo V	Pele morena escura, nunca queima e sempre bronzeia
Tipo VI	Pele negra, nunca queima, sempre bronzeia

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

Estudo a ser desenvolvido: “Uso da Terapia Fotodinâmica para tratamento do câncer da Pele”

NOME DO PACIENTE: _____

1- fui convidado(a) para participar de um estudo de um tratamento diferente para doenças pré-cancerígenas e câncer da pele e me foram dados os seguintes esclarecimentos:

Esclarecimentos:

a) Justificativa, objetivos e procedimentos que serão utilizados na pesquisa:

Justificativa:Entendi que o tratamento ideal para o câncer de pele é normalmente a cirurgia, mas vou fazer a terapia fotodinâmica.

- 1) por escolha própria ou;
- 2) porque não estou em condições clínicas de fazer cirurgia; ou
- 3) porque tenho múltiplas lesões superficiais no rosto e no tronco.

Objetivos:

Fui informado de que os objetivos deste estudo são:

- 1) Avaliar a resposta a um novo tratamento chamado terapia fotodinâmica em um total de 60 pacientes com lesões pré-malignas ou malignas.
- 2) Mais tarde montar um serviço de terapia fotodinâmica na Secretaria de Saúde do DF para tratamento do grande número de pacientes com lesões malignas ou pré-malignas que não estão em condição de cirúrgicas.

Procedimento:

Entendi que o tratamento consiste no uso de uma pomada (ácido 5-aminolevulínico) 3 horas antes da iluminação das lesões (manchas e tumores da pele) com luz de 630nm, que corresponde a uma luz vermelha especial. Em alguns casos precisará de anestesia local. Após o procedimento será necessária limpeza adequada para que não ocorra infecção e

feito um curativo. Este será trocado com 24 horas. Dias depois poderá surgir uma ferida, o que faz parte do tratamento. O tratamento na mesma lesão poderá ser repetido para melhores resultados.

Serei examinado pelo médico responsável aos 7, 15, 30, 60 e 90 dias após o tratamento.

b) Os desconfortos e riscos possíveis e os benefícios esperados:

Desconfortos possíveis:

Entendi que durante o tratamento poderá ocorrer dor. A pele ficará avermelhada e poderá ocorrer inchaço. Entendi também que a cicatrização completa poderá levar de 3 a 6 semanas. Foi garantido que os danos previsíveis, tais como dor, inflamação e infecção serão evitados.

Riscos:

Entendi que o curativo colocado para tampar o local onde será feito o tratamento deve ser mantido no local para que o tratamento funcione.

Entendi que o novo tratamento pode não levar a cura completa das lesões.

Entendi que é necessário seguir as orientações do médico para evitar complicações.

Benefícios esperados:

Foi explicado que este tratamento tem vantagens em relação à criocirurgia: é menos doloroso, causa menos reação inflamatória e inchaço, tem melhor resultado estético e menor risco de infecção. Foi dito também que o tratamento pode ser realizado sem internação em hospital e que em estudos parecidos foi grande a proporção de doentes que se curaram.

c) Os métodos alternativos existentes:

Fui informado de que existem outras formas de tratamento de lesões além da terapia fotodinâmica, como cirurgia, eletrocoagulação, curetagem e criocirurgia. Fui informado de que se aparecer nova forma de tratamento mais eficiente que a fotodinâmica, esta será interrompida e a outra adotada.

d) A forma de acompanhamento e assistência, assim como os responsáveis:

Entendi que após ser selecionado e ter concordado em fazer este tratamento, serei atendido por médicos do serviço de dermatologia do Hospital Regional da Asa Norte

(HRAN) que vão fazer o tratamento e marcar as datas em que deverei voltar para fazer exames que verifiquem o progresso do tratamento. Fui informado também de que os mesmos médicos vão prestar assistência caso qualquer resultado não esperado aconteça após o tratamento.

Ficou esclarecido que as dúvidas sobre o tratamento e resultados serão esclarecidas a qualquer momento deste estudo.

Eu entendi que sou livre para me recusar a participar deste estudo ou retirar meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao meu tratamento e atendimento médico.

Me foi garantido que os dados confidenciais envolvidos neste estudo serão mantidos sob sigilo.

Fui informado de que poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa pelo telefone (061) 3325-4955 caso este Termo de Consentimento Livre Esclarecido não seja cumprido.

Fui informado de que poderei também entrar em contato com os pesquisadores responsáveis por este estudo, Dra. Simone Karst Passos e Prof. Zulmira Lacava, pelo telefone (061) 3307-2963 ou e-mail dermatologiasimonekarst@yahoo.com.br e cnano@unb.br, caso este Termo de Consentimento Livre Esclarecido não seja cumprido ou queria receber outros esclarecimentos.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre Esclarecido devidamente assinado por mim e pelo médico que me atendeu será mantido em meu poder.

Eu concordo em participar do estudo e cooperar com o médico durante as consultas e procedimentos previstos que foram a mim explicados.

Assinatura do paciente ou responsável

Nome do paciente: _____

Registro do Paciente: _____

Data: ____/____/____

Nome e CRM do médico:

Assinatura do

Médico: _____

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

Estudo a ser desenvolvido: “Uso da Terapia Fotodinâmica para tratamento do câncer da Pele”

NOME DO PACIENTE: _____

1- fui convidado(a) para participar de um estudo de uso de terapia fotodinâmica para doenças pré-cancerígenas e câncer da pele e me foram dados os seguintes esclarecimentos:

Esclarecimentos:

2- A terapia fotodinâmica consiste na aplicação de um creme na pele (ALA e metil-ALA no presente estudo), contendo uma substância que será transformada pelo organismo em outra sensível a luz, após um período de 3 horas. Depois desse período a área tratada será exposta a luz.

Justificativa:

3- Entendi que existem outros tratamentos para ceratoses actínicas como o Efurix (5-fluourouracil) e a criocirurgia (no momento não disponível na rede da SES), mas prefiro fazer a terapia fotodinâmica.

4- Entendi que o tratamento ideal para o câncer de pele é normalmente a cirurgia, mas vou fazer a terapia fotodinâmica.

a) por escolha própria ou;

b) porque não estou em condições clínicas de fazer cirurgia; ou

c) porque tenho múltiplas lesões superficiais no rosto e no tronco.

d) outros motivos

Objetivos:

Fui informado de que os objetivos deste estudo são:

5- Comparar a resposta terapêutica entre duas substâncias fotossensibilizantes já utilizadas na terapia fotodinâmica para tratamento de lesões pré-malignas ou malignas da pele.

6- Comparar a resposta terapêutica a terapia fotodinâmica utilizando-se duas fontes de luz diferentes sendo ambas da cor vermelha

Procedimento:

7-Lesão deveser limpa diariamente com água e sabonete apropriado e um creme deveser aplicado de acordo com a orientação médica. No primeiros 2 dias a limpeza do local deveser realizada longe da luz solar e de iluminação intensa.

8- A pele ficará avermelhada, inchada durante 7-15 dias.

9 –Alguns dias depois poderá surgir uma ferida superficial, o que faz parte do tratamento. A terapia fotodinâmica na mesma lesão poderá ser repetida para melhores resultados. Serei examinado pelo médico responsável aos 7, 30, 90 dias após o tratamento. Depois desse período as consultas serão trimestrais (a cada 3 meses) no primeiro ano e semestrais (a cada 6 meses) no segundo ano. Em todas as consultas as áreas tratadas serão fotografadas para acompanhamento.

Desconfortos e riscos possíveis:

10- Entendi que durante o tratamento poderá ocorrer dor e, principalmente ardência que varia de intensidade de acordo com a localização da lesão e o paciente. A pele ficará avermelhada e poderá ocorrer inchaço. Entendi também que a cicatrização completa poderá levar até 4 semanas. Foi garantido que os danos previsíveis, tais como dor, inflamação e infecção serão evitados.

11- Entendi que o novo tratamento pode não levar à cura completa das lesões.

12- Entendi que é necessário seguir as orientações do médico para evitar complicações.

Benefícios esperados:

13- Foi explicado que este tratamento tem vantagens em relação à criocirurgia: é menos doloroso, causa menos reação inflamatória e inchaço, tem cicatrização mais rápida, melhor resultado estético e menor risco de infecções. Foi dito também que o tratamento pode ser realizado sem internação em hospital e que em estudos semelhantes foi grande a proporção de doentes que se curaram.

Forma de acompanhamento e assistência, assim como os responsáveis:

- 14-** Entendi que após ser selecionado e ter concordado em fazer este tratamento, serei atendido por médicos do Serviço de Dermatologia do HRAN que vão fazer o tratamento e marcar as datas em que deverei voltar para fazer exames que verifiquem o progresso do tratamento. Fui informado também de que os mesmos médicos vão prestar assistência caso qualquer resultado não esperado aconteça após o tratamento, providenciando outro tratamento, seja com terapia fotodinâmica, seja outro método de tratamento mais adequado.
- 15-** Ficou esclarecido que as dúvidas sobre o tratamento e resultados serão esclarecidas a qualquer momento deste estudo.
- 16-** Eu entendi que sou livre para me recusar a participar deste estudo ou retirar meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao meu tratamento e atendimento médico.
- 17-** Me foi garantido que os dados confidenciais envolvidos neste estudo serão mantidos sob sigilo.
- 18-** Fui informado de que poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa pelo telefone (061) 3325-4955 caso este Termo de Consentimento Livre Esclarecido não seja cumprido.
- 19-** Fui informado de que poderei também entrar em contato com os pesquisadores responsáveis por este estudo, Dra. Simone Karst Passos e Prof. Zulmira Lacava, pelo telefone (061) 3307-2963 ou e-mail dermatologiasimonekarst@yahoo.com.br e cnano@unb.br, caso este Termo de Consentimento Livre Esclarecido não seja cumprido ou queria receber outros esclarecimentos.
- 20-** Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre Esclarecido devidamente assinado por mim e pelo médico que me atendeu será mantido em meu poder.
- 21-** Eu concordo em participar do estudo e cooperar com o médico durante as consultas e procedimentos previstos que foram a mim explicados.

Assinatura do paciente ou responsável

Nome do paciente: _____

Registro do Paciente: _____

Data: ____/____/____

Nome e CRM do médico:

Assinatura do Médico: _____