

**Luís Antonio Ribeiro Torezan**

**Estudo da pele do campo cancerizável antes e  
após a terapia fotodinâmica através dos métodos  
clínicos, histopatológicos e imunohistoquímicos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Programa de Dermatologia  
Orientador: Prof. Dr. Cyro Festa Neto

São Paulo  
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Torezan, Luís Antonio Ribeiro

Estudo da pele do campo cancerizável antes e após a terapia fotodinâmica através dos métodos clínicos, histopatológicos e imunohistoquímicos / Luís Antonio Ribeiro Torezan. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Dermatologia.

Orientador: Cyro Festa Neto.

Descritores: 1.Terapia fotodinâmica 2.Fotoenvelhecimento da pele 3.Queratose actínica 4.Genes TP-53 5.Metaloproteinase 1 da matriz 6.Campo de cancerização

USP/FM/DBD-325/11

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Mário e Maria Cecília.*

*À minha esposa, Célia.*

*À nova luz que se fez em minha vida,  
minha filhinha Maria Isabel.*

# **AGRADECIMENTOS**

Aos funcionários do Laboratório de Dermatopatologia do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP - Jacqueline Meneghin, Maria Cristina Galhardo - pela colaboração na execução do estudo histopatológico.

Aos funcionários do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP - Rosilda F. dos Santos, Roberto Rinaldi, Eli Maria de Freitas - por todo carinho e ajuda dispensados durante o curso da pós-graduação.

Às bibliotecárias Suely C. Cardoso e Valéria de V. Lombardi, por toda cooperação no preparo final desta tese.

À Dra. Rossana Lopez, pela realização da análise estatística deste estudo.

Às Prof. Dra. Mirian Soto e Neusa Valente, pelos extensos e incansáveis ensinamentos no estudo histopatológico deste trabalho.

Aos Prof. Drs. Aparecida Moraes, Vitor Reis e José Antonio Sanches Jr, amigos e membros do exame de qualificação, pelas sugestões e correções neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rolf-Markus Szeimies, amigo e fonte de inspiração na área de terapia fotodinâmica, por toda sua co-orientação neste estudo.

Ao Prof. Dr. Cyro Festa Neto, amigo, mestre e grande incentivador da minha vida acadêmica. Muito obrigado por toda a dedicação, ensinamento e paciência dispensados na execução desta tese.

Aos demais colegas e funcionários do Departamento de Dermatologia que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 A radiação UV e a carcinogênese cutânea.....	6
2.2 Efeito mutagênico induzido pela radiação UV.....	7
2.3 Mecanismos de prevenção endógena anti-carcinogênese induzida pela radiação UV.....	13
2.4 O campo de cancerização.....	19
2.5 O envelhecimento cutâneo.....	30
2.6 A terapia fotodinâmica.....	36
2.7 Mecanismo de ação da TFD.....	45
2.8 Fontes de luz na TFD.....	50
2.9 Aplicações na oncologia cutânea.....	53
3 OBJETIVOS.....	58
4 MÉTODOS.....	60
4.1 Pacientes.....	61
4.2 Protocolo de tratamento.....	62
4.3 Avaliação clínica.....	67
4.4 Avaliação histopatológica e imunohistoquímica.....	69
4.5 Análise estatística.....	72
5 RESULTADOS.....	73
5.1 Avaliação clínica.....	73
5.2 Avaliação histopatológica.....	83
5.3 Avaliação imunohistoquímica.....	89
6 DISCUSSÃO.....	94
7 CONCLUSÕES.....	126
8 REFERÊNCIAS.....	127

## LISTA DE ABREVIATURAS

5- ALA	ácido 5-delta aminolevulínico
AP-1	proteína ativadora-1
CBC	carcinoma basocelular
CDP	dímero ciclobutano-pirimidina
CEC	carcinoma espinocelular
COX-2	ciclooxigenase-2
DISC	complexo sinalizador da morte celular
DNA	ácido desoxirribonucléico
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
IL	interleucina
LED	diodo que emite luz
LIP	luz intensa pulsada
MAL	metilaminolevulinato
MAPK	proteína-quinase ativadora de mitose
MMP	metaloproteinase da matriz extra-celular
NF-kB	fator nuclear Kb
Nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
ODC	ornitina decarboxilase
PAF	fator de ativação plaquetária
PCR	reação de polimerase em cadeia
PGE-2	prostaglandina E-2
PP	foto-produto pirimidina-pirimidona
QA	queratose actínica
RNA	ácido ribonucléico
RNS	radicais reativos de ácido nítrico
ROS	radicais reativos de oxigênio
TFD	terapia fotodinâmica
TGF	fator de crescimento tumoral
TIMP	enzima inibidora da metaloproteinase tecidual
Tn-C	tenascina-C
TNF	fator de necrose tumoral
TRAIL	proteína ligadora indutora de apoptose relacionada ao TNF
UV	ultra-violeta

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dano celular induzido pela radiação UV - direto e indireto.....	9
Figura 2- Apoptose induzida por UV. A ativação da cascata das MAPKs e do gene TP-53 induzem a apoptose pelas vias intrínseca e extrínseca.....	16
Figura 3 - Carcinogênese induzida pelo UV. O dano permanente ao DNA e a geração de ROS levam a ativação de EGFR e COX-2, resultando na supressão de apoptose e desenvolvimento de câncer de pele.....	17
Figura 4 - Ação da UV na pele e mecanismos envolvidos no reparo do DNA e carcinogênese (adaptado de Svobodova et al. <sup>11</sup> ).....	19
Figura 5 - Mecanismos induzidos pela radiação UV no envelhecimento precoce da pele.....	35
Figura 6 - Esquema da biossíntese do grupo Heme, captação do 5-ALA e sua metabolização. PBG = porfobilinogênio, CoA = coenzima A.....	39
Figura 7 - Espectro de absorção da PPIX.....	41
Figura 8 – Ativação do agente fotossensibilizante.....	46
Figura 9 - Curetagem leve nas lesões de QAs apenas para a remoção da hiperqueratose.....	63
Figura 10 - Aplicação do creme Metilaminolevulinato 16% sobre as QAs e em toda face.....	63
Figura 11 - Curativo oclusivo após a aplicação do creme Metilaminolevulinato 16%.....	64
Figura 12 - Fotodiagnóstico do campo de cancerização com Luz de Wood.....	65
Figura 13 - Iluminação com aparelho LED (Aktilite® - PhotoCure, Oslo – Noruega) após a remoção do curativo e proteção ocular.....	66
Figura 14 - Eritema e edema imediatamente após a iluminação com LED (Aktilite® - PhotoCure, Oslo – Noruega).....	75
Figura 15 - Quinto dia após a TFD. Observar as crostas e descamação como parte da resolução do processo.....	75
Figura 16 - Valores estatísticos entre os tratamentos e seus índices de melhora clínica (fotoenvelhecimento global, rugas superficiais, pigmentação difusa, aspereza, rugas profundas, eritema facial, telangiectasia, palidez). Notar a diminuição entre os valores iniciais e finais para todos os parâmetros clínicos estudados, com exceção de “rugas profundas”. Entre T2 e T3, somente houve diferença estatisticamente significativa para o parâmetro “eritema facial”.....	79
Figura 17 - Número de QAs (contagem de todas as lesões) em T0, T1, T2 e T3. Há diminuição do número das lesões após a TFD. O número total inicial era de 268 QAs e, após três sessões de TFD, diminuiu para 28, com índice de remissão final de 89,5%. Notar que a remissão foi mais expressiva entre T0 (antes do tratamento) e T1 e T2. A terceira sessão de TFD praticamente não mostra remissão expressiva das QAs.....	80
Figura 18 – Paciente JS. Melhora clínica da pele do campo de cancerização após a TFD (direita). Observe a melhora do envelhecimento global da face, assim como acentuada diminuição das QAs no campo.....	81

Figura 19 - Paciente LRV. Melhora clínica da pele tratada com a TFD (direita), com diminuição das lesões de QAs e atenuação das rugas finas no campo.....	81
Figura 20 - Paciente RM. Melhora clínica do parâmetro “telangiectasias” após a TFD (direita).....	82
Figura 21 - Paciente AC. Rejuvenescimento facial após a TFD (direita) com acentuada diminuição das QAs no campo tratado.....	82
Figura 22 - Fotomicrografia da pele do campo de cancerização antes (esquerda) e após (direita) a TFD. A epiderme mostra diminuição da intensidade da atipia celular e de sua extensão. H.E. 400x.....	83
Figura 23 - Fotomicrografia do campo de cancerização antes (esquerda) e após (direita) a TFD. Observar reestruturação da epiderme, neo-formação de colágeno na camada sub-epidérmica, diminuição da elastose e dos vasos sanguíneos dilatados na derme superior. H.E. 200x.....	85
Figura 24 - Fotomicrografia do campo de cancerização antes (esquerda) e após (direita) a TFD. Observar diminuição do material elastótico na derme superior e média após a TFD. Coloração de Weigert contra-corada com a técnica de Van Gieson. 40x....	86
Figura 25 - Fotomicrografia após a TFD. Observar as fibras colágenas abaixo da membrana basal epidérmica assim como na derme superior. H.E. 200x.....	86
Figura 26 - Variáveis histológicas avaliadas no estudo. Com exceção da variável “espessura epidérmica”, todas as outras variáveis apresentaram melhora significativa após a TFD.....	87
Figura 27 - Material elastótico antes e após o tratamento com TFD. Observa-se uma diminuição expressiva do valor obtido através da morfometria digital microscópica.....	88
Figura 28 - Expressão dos marcadores pró- colágeno I, MMP- 1, TP53 e Tenascina C antes e depois do tratamento nos pacientes com campo de cancerização.....	89
Figura 29 - Paciente J.T. Fotomicrografia da pele do campo cancerizável antes (esquerda) e após (direita) mostrando a diminuição da expressão imunohistoquímica de TP-53 após a TFD. 200x.....	91
Figura 30 - Relação positiva entre o parâmetro histopatológico “quantidade de atipia” e TP53 pré-tratamento, através do teste de correlação de Pearson ( $p = 0,002$ ).....	91
Figura 31 - Paciente AMA. Fotomicrografia do campo cancerizável antes (esquerda) e após (direita) mostrando o aumento da expressão da MMP-1 após a TFD. 100x.....	92
Figura 32 - Relação negativa entre grau de elastose e MMP- 1 após o tratamento, através do teste de correlação de Spearman ( $p = 0,033$ ).....	92
Figura 33 - Paciente MTS. Fotomicrografia do campo cancerizável antes (esquerda) e após (direita) mostrando o aumento da expressão do marcador pró-colágeno I após a TFD. 200x.....	93
Figura 34 - Paciente VP. Fotomicrografia do campo cancerizável antes (esquerda) e após (direita) mostrando o aumento da expressão do marcador Tenascina-C após a TFD. 200x.....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Escala de avaliação do fotoenvelhecimento de 5 pontos (adaptado de Dover et al. <sup>38</sup> e Zane et al. <sup>62</sup> ).....	68
Tabela 2 - Variáveis histológicas avaliadas no estudo.....	70
Tabela 3 - Descrição das variáveis clínicas. Na coluna “média” estão dispostos os valores médios de cada parâmetro avaliado antes e após cada tratamento. Tx = tratamento.....	78
Tabela 4 - Medidas histológicas referentes às variáveis são apresentadas. Observa-se que o grau de atipia pré tratamento é maior que o grau de atipia após o tratamento. Da mesma forma, os valores para “quantidade de atipia” e “grau de elastose” também diminuíram com o tratamento. A variável “camada de colágeno sub-epidérmica” mostrou aumento após a TFD. As variáveis “espessura da epiderme” e “camada de colágeno sub-epidérmica” foram medidas em mm.....	84
Tabela 5 - Características dos marcadores pro-colágeno I, MMP-1, TP-53 e Tenascina- C nos pacientes com campo de cancerização.....	90
Tabela 6 - Comparação antes e após tratamento para as medidas dos marcadores pró-colágeno I, MMP-1, TP-53 e Tenascina C.....	90

# RESUMO

Torrezan LAR. 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.

O conceito de campo de cancerização, em dermatologia, sugere que a pele fotodanificada tem maior potencial para o desenvolvimento de neoplasias cutâneas. A terapia fotodinâmica (TFD) é um método não invasivo para o tratamento de queratoses actínicas (QA) múltiplas, possibilitando a abordagem de todo o campo. Vinte e seis pacientes com múltiplas QAs na face foram submetidos a três sessões de TFD com metilaminolevulinato 16% (MAL) e luz vermelha, com intervalo de um mês. Biópsias foram realizadas antes e após três meses da última sessão e o material corado para hematoxilina-eosina e Weigert. O estudo imunohistoquímico foi feito para os marcadores: TP-53, pró-colágeno I, Metaloproteinase-1 e Tenascina-C. A avaliação do fotoenvelhecimento global melhorou consideravelmente ( $p < 0,001$ ) e a cura clínica das QAs foi de 89,5% ao final do estudo. Duas sessões mostraram ser equivalentes a três sessões de TFD. Diminuição significativa do grau e extensão da atipia celular ( $p < 0,001$ ), aumento das fibras colágenas ( $p = 0,001$ ) e melhora do grau de elastose ( $p = 0,002$ ) foram observadas. O estudo imunohistoquímico mostrou diminuição da expressão da TP-53 ( $p = 0,580$ ), aumento de pró-colágeno I ( $p = 0,477$ ) e de MMP-1 ( $p = 0,08$ ), embora não houvesse diferença estatisticamente significativa. Aumento significativo foi observado para Tenascina-C ( $p = 0,024$ ). Múltiplas sessões de TFD com MAL induziram melhora clínica e histológica do campo de cancerização. A diminuição da severidade e extensão da atipia celular associada à menor expressão de TP-53 sugerem redução do potencial carcinogênico do campo.

Descritores: 1.Terapia fotodinâmica 2.Fotoenvelhecimento da pele 3.Queratose actínica 4.Genes TP-53 5.Metaloproteinase 1 da matriz 6.Campo de cancerização

# **SUMMARY**

Torrezan LAR. *Clinical, histopathological and immunohistochemical assessment of human skin field cancerization before and after photodynamic therapy* [tese]. "São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina"; 2011.

The field cancerization concept suggests that photodamaged skin has an increased risk for the development of malignant lesions. Topical photodynamic therapy (PDT) is a non-invasive therapeutic method for multiple actinic keratosis (AK), allowing the possibility of treating the entire surface. Twenty-six patients with photodamaged skin and multiple AKs on the face were submitted to three consecutive sessions of PDT with methylaminolevulinate 16% (MAL) and red light, one month apart. Biopsies were performed before and three months after the last treatment session, and stained for hematoxylin-eosin and Weigert. Immunohistochemistry study was performed for TP-53, pro-collagen I, Metalloproteinase-1 and Tenascin-C. The global score for photodamage improved considerably in all patients ( $p < 0.001$ ). The AK clearance rate was 89.5% at the end of the study. Two treatments were similar to three MAL-PDT sessions. A significant decrease in keratinocytes' atypia grade and amount was observed ( $p < 0.001$ ). A significant increase in collagen deposition ( $p = 0.001$ ) and improvement of solar elastosis ( $p = 0.002$ ) were noticed. Immunohistochemical study showed decreased TP-53 expression although not statistically significant ( $p = 0.580$ ), increased pro-collagen I and MMP-1 expressions ( $p = 0.477$  and  $p = 0.08$ ) again not statistically significant and a increased expression of Tenascin-C ( $p = 0.024$ ), which was statistically significant. In conclusion, multiple sessions of MAL-PDT induced clinical and histological improvement of field cancerization. The decrease in severity and extension of keratinocytes' atypia associated with a decreased expression of TP-53 suggest a reduced carcinogenic potential of the altered field.

Descriptors: 1. Photochemotherapy 2. Skin aging 3. Keratosis, actinic 4. Genes TP-53 5. Matrix metalloproteinase 1 6. Field cancerization

# 1 INTRODUÇÃO

Os efeitos nocivos referentes à exposição crônica à radiação Ultra-Violeta (UV) são bem estudados e estabelecidos. Uma das características mais marcantes da pele fotoenvelhecida é o aparecimento de queratose actínica (QA), considerada a lesão pré-maligna mais comum da pele. Interessante notar que a maioria dos pacientes com sinais de envelhecimento cutâneo não apresentam apenas uma lesão, mas sim, múltiplas QAs, muitas vezes agregadas em áreas expostas ao sol e severamente danificadas pela radiação UV<sup>1</sup>. Introduzido por Slaughter<sup>2</sup>, em 1953, o conceito de campo de cancerização, na Dermatologia, pode ser definido como uma área de pele cronicamente foto-danificada com múltiplas lesões pré-malignas e malignas. Cerca de 0,025% a 16% das QAs sofrem transformação para carcinoma espinocelular (CEC). Dessa forma, é mandatório o tratamento dessas lesões<sup>3-5</sup>. Também é necessário considerar que as QAs visíveis ao exame dermatológico aparecem em um campo foto-danificado, onde múltiplos focos agregados de células mutadas estão presentes<sup>1</sup>. Esses pequenos focos de células mutadas podem se transformar em QAs e CECs caso continuem a proliferação e haja falha nos mecanismos de reparo do DNA. Existem evidências de que um campo de cancerização com múltiplas células geneticamente alteradas constituem um estágio biológico precoce na carcinogênese epitelial. Cada vez mais se aceita que é necessário tratar todo o campo e não somente as QAs individualmente<sup>1,2</sup>. Esse conceito tem, como fundamento, a eliminação de potenciais focos de células geneticamente alteradas, mesmo antes de se transformarem em câncer.

Além de apresentar maior risco de lesões pré-malignas e malignas, a pele foto-danificada mostra sinais clínicos de envelhecimento como aspereza, palidez, discromia, rugas finas e profundas, eritema, telangiectasias e hiperplasia de glândulas sebáceas<sup>6,7</sup>. Radicais oxigênio reativos (ROS) gerados pela ação da radiação U-V na pele ativam a transcrição das enzimas metaloproteinases (MMPs), diminuem a expressão de pró-colágeno I e III e estimulam a inflamação da derme acarretando uma contínua degradação do colágeno e da matriz extracelular<sup>8</sup>. O acúmulo de material elastótico na derme envelhecida constitui uma das principais características histopatológicas do dano solar sendo responsável pelo aspecto envelhecido e com descoloração da pele.

Nos últimos anos, vários lasers e fontes de luz têm sido utilizadas em Dermatologia para atenuação dos sinais do fotoenvelhecimento. Neste sentido, a terapia fotodinâmica (TFD) mostra-se uma terapêutica eficaz e comprovada no tratamento das neoplasias malignas não-melanocíticas da pele, assim como também atua no rejuvenescimento<sup>9</sup>. A TFD classicamente envolve um agente fotossensibilizante tópico, como o ácido 5-delta aminolevulínico (5-ALA) ou seu éster derivado (MAL), que é ativado por luz visível. Como consequência da combinação de luz, agente e oxigênio tecidual, ROS são formados no tecido neoplásico, induzindo necrose e apoptose seletivas das células tumorais.

Embora haja vários estudos da ação da TFD na pele fotolesada, muitos deles permanecem controversos, poucos voltados especificamente ao campo cancerizável e que apresentem dados relevantes histopatológicos e moleculares<sup>9,10</sup>, fato que motivou a realização deste trabalho.

No presente estudo, os autores avaliam a eficácia clínica de múltiplas sessões de TFD com MAL na face de pacientes severamente fotoenvelhecidos e com múltiplas QAs. Além disso, avaliações histopatológicas e imunohistoquímicas também foram realizadas para melhor elucidar as alterações epidérmicas e dérmicas antes e após o procedimento.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

## 2.1 A radiação UV e a carcinogênese cutânea

A radiação Ultra-Violeta (UV) possui alguns efeitos benéficos como a participação na síntese de vitamina D, o tratamento de doenças como vitiligo e psoríase, mas também é responsável por muitos efeitos deletérios agudos e crônicos, que são responsáveis pelo desenvolvimento de neoplasias malignas da pele. A incidência de melanoma e outras neoplasias malignas não-melanocíticas-queratose actínica (QA), carcinoma basocelular (CBC) e carcinoma espinocelular (CEC) - aumenta consideravelmente em todo mundo<sup>5,11,12</sup>.

O espectro eletromagnético da luz solar pode ser dividido em três tipos de radiação: UV, luz visível e luz infra-vermelha. A radiação UV compreende cerca de 5% do total da radiação solar e situa-se na faixa entre 100 e 400 nm. Três categorias podem ser nomeadas a partir do comprimento de onda: UV-C (100-280 nm), UV-B (280-320 nm) e UV-A (320 a 400 nm). A camada de ozônio absorve com eficiência a radiação UV até 310 nm, ou seja, toda UV-C e cerca de 95% da UV-B<sup>11</sup>. Assim, mais de 95% da radiação solar que atinge a Terra é composta por UV-A. Apenas para comparação, o UV-A penetra mais profundamente na pele e é cerca de 1000 vezes mais eficiente na produção de bronzeamento, em relação ao UV-B. A exposição prolongada ao UV-A é capaz de causar queimaduras e sinais prematuros de envelhecimento cutâneo. A radiação UV-B é considerada, por sua vez, o componente mais ativo da luz solar. É mais genotóxica, penetra menos na pele e 1000 vezes mais potente na indução de queimadura, em

relação ao UV-A. Sua ação deletéria é, portanto, mais restrita à camada basal da epiderme, induzindo dano direto ao DNA celular<sup>11,12</sup>. Já a radiação UV-C é a mais energética delas e oferece o maior potencial de dano biológico a todos os seres vivos, sendo altamente mutagênica e tóxica. Felizmente, é totalmente absorvida pela atmosfera terrestre, sendo que, na estratosfera, a energia da radiação UV-C é utilizada para a formação de ozônio, a partir de oxigênio molecular.

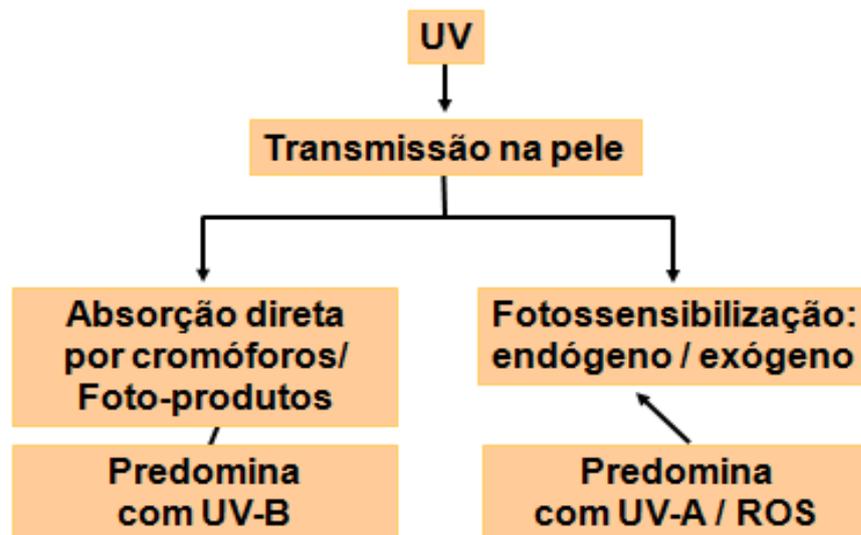
Os efeitos nocivos cutâneos induzidos pela radiação UV dependem de variáveis como o comprimento de onda, a dose de exposição, a raça e as características genéticas da pele<sup>6</sup>. Enquanto UV-B é máximo entre 11 horas e 13 horas, UV-A contribui entre 50-60% do comprimento fototóxico, podendo aumentar em determinados períodos do ano. A dose de UV é maior em altas altitudes e também em baixas latitudes, aumentando, ainda mais, no verão. Estima-se que ocorra um aumento de 30% na dose de UV recebida pelas pessoas nos dias de feriado, quando comparados aos dias de trabalho normal. Além disso, trabalhadores expostos ao sol recebem cerca de três a cinco vezes mais radiação UV do que profissionais que trabalham em ambientes fechados<sup>5,11,13</sup>

## **2.2 Efeito mutagênico induzido pela radiação UV**

O genoma é o principal alvo da ação das radiações UV-A e UV-B<sup>11,14</sup>. Ambos espectros são capazes de produzir danos ao DNA, seja de uma

maneira direta ou indireta. Para que este efeito ocorra, a radiação UV deve ser transmitida pelas camadas da pele e absorvida por moléculas celulares - que podem ser cromóforos ou moléculas fotossensibilizantes. Vários cromóforos podem ser identificados e que absorvem preferencialmente UV-B, tais como ácidos nucleicos, aminoácidos aromáticos, NADH, heme, quinonas, flavinas, porfirinas, carotenóides, ácido urocânico e eumelanina<sup>11,12</sup>. Há duas maneiras de se induzir o dano celular. No primeiro, ocorre absorção direta dos fótons UV por cromóforos que, por sua vez, induzem alterações nas bases do DNA. As bases pirimidínicas adjacentes aos anéis aromáticos são altamente vulneráveis à dimerização, levando à formação de dímeros ciclobutano-pirimidina e foto-produtos pirimidina-pirimidona. Na ausência de reparo do DNA, ocorrem transições nas bases C→T. Esse acúmulo de mutações de transição são típicos da ação da radiação UV-B<sup>12</sup>. A segunda maneira de provocar o dano celular-mecanismo indireto - inclui um processo de fotossensibilização, onde agentes fotossensibilizantes absorvem a radiação UV<sup>11</sup> (Figura 1). Quando isso ocorre, as moléculas tornam-se excitadas até um estado de excitação conhecido como "triplet" e tendem a voltar ao estado inicial de repouso. Porém, isso implica em reações intracelulares de transferência da energia recebida e pode ocorrer por duas vias principais chamadas de reações Tipo I e II. Os mecanismos que envolvem ambas reações são dependentes de características dos fotossensibilizantes. Na reação Tipo I, ocorre transferência direta de um elétron entre o fotossensibilizante excitado e outra molécula, resultando na formação de radicais livres. Essa reação Tipo I não

depende de oxigênio. Na reação Tipo II, ocorre a transferência de energia do fotossensibilizante para oxigênio molecular, acarretando a formação de radicais reativos de oxigênio( ROS, do inglês, “reactive oxygen species”). Na reação Tipo II, há formação de oxigênio “singlet”  $^1O_2$ , com grande ação oxidativa e vida média longa, embora o ânion superóxido também seja produzido. Este último sofre dismutação a peróxido de hidrogênio, que na presença de metais catiônicos, acarreta a formação de radicais hidroxila<sup>11,12,15</sup>.



**Figura 1.** Dano celular induzido pela radiação UV - direto e indireto

As interações desses radicais reativos de oxigênio com moléculas intracelulares provocam a resposta biológica final. A oxidação do DNA por radicais hidroxila resulta na formação de 8- hidroxiguanina, que, por sua vez, leva a transversão G→T. A importância do dano ao DNA induzido por ROS pode ser observada num estudo em que a enzima reparadora da 8-hidroxiguanina (OGG1) era administrada topicamente sobre a pele de

camundongos previamente exposta a UV-B. Nesses animais, o tamanho e o crescimento tumoral eram significativamente reduzidos em relação ao grupo que não recebeu a enzima<sup>12</sup>.

Na pele, os ácidos nucleicos são os cromóforos mais críticos na resposta biológica induzida pela radiação UV. Felizmente, aminoácidos aromáticos de proteínas da camada córnea absorvem grande quantidade de UV-B antes de atingir o DNA de células viáveis. A exposição crônica a UV-B induz ao dano do DNA, através da formação de dímeros ciclobutano-pirimidina (CDP) e de foto-produtos pirimidina-pirimidona (PP)<sup>11-15</sup>. Quando o mecanismo de reparo celular é insuficiente ou incorreto, esses danos ao DNA se propagam e induzem à mutação das células epidérmicas, com posterior formação de clones de células mutadas que se transformam em câncer. Esses dímeros são frequentemente observados na mutação do gene TP-53 de CEC. Estudos recentes mostraram que os foto-produtos PP são mais eficientemente reparados pela célula do que os dímeros CDP, o que possivelmente torna essa última, a principal indutora de mutações induzidas por UV nos mamíferos<sup>16,17</sup>.

Já os ROS (radicais reativos de oxigênio) são basicamente induzidos pela radiação UV-A e contribuem para o “stress” oxidativo gerado a partir da exposição crônica ao UV-A. Por outro lado, ROS fazem parte do metabolismo normal das células, sendo gerados constantemente nos queratinócitos e fibroblastos e removidos rapidamente por mecanismos anti-oxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, resultando num equilíbrio entre pró/anti-oxidação<sup>12</sup>. Na exposição crônica a UV-A, existe um acúmulo

grande de ROS, gerados a partir da reação entre fótons de UV com moléculas fotossensibilizantes, levando a um desequilíbrio entre pró-oxidação/anti-oxidação. O excesso de radicais livres assim gerados acarreta uma progressiva deterioração da função e estrutura celular. A oxidação do DNA se dá principalmente nas bases de Guanina, com formação da 8- hidroxiguanina, com transversão G→T. Além do dano ao DNA nuclear, há dano ao DNA mitocondrial<sup>11,13</sup>. Os mecanismos de reparo na mitocôndria são menos eficazes que no núcleo e, portanto, as mutações se acumulam numa razão ainda maior. Deleções são frequentes e induzem perda da fosforilação oxidativa. ROS também induzem danos nas membranas celulares a partir da peroxidação de ácidos graxos das estruturas fosfolípides da membrana. Peróxidos lipídicos são formados e iniciam uma cadeia de reações que aumentam, ainda mais, o dano oxidativo<sup>12</sup>.

A pele exposta cronicamente à radiação UV é constantemente agredida pelos radicais livres, sendo alvo de intenso “stress oxidativo”, conforme previamente mencionado. Embora exista também um processo anti-oxidante eficiente para manter esse equilíbrio Pró/Anti oxidante, ocorre um ganho desse “stress” oxidativo levando à inflamação, imunossupressão, envelhecimento e carcinogênese<sup>18</sup>. É sabido que UV-A induz mais inflamação do que UV-B, embora este último também participe na resposta inflamatória cutânea. Esse processo inflamatório inclui uma enorme cascata de eventos que promove infiltrado leucocitário, aumento na produção de prostaglandinas e liberação de várias interleucinas, que por sua vez, aumentam ainda mais a produção de ROS e o processo oxidativo na

célula<sup>18,19</sup>. A inflamação também induz a carcinogênese, uma vez que existe maior expressão de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) nas lesões de QAs e CECs. A PGE<sub>2</sub> induz a proliferação celular e inibe apoptose, fato marcante no disparo da carcinogênese cutânea<sup>11,12,18-20</sup>.

Diante da extensa e crônica exposição à radiação UV, ocorre, paralelamente, uma resposta enzimática celular. ROS é responsável pela ativação direta dos genes reguladores da produção de enzimas como MAPKs (do inglês, “mitogen-activated protein kinases”), fator nuclear k-B (NF-KB) e a cascata ativadora da proteína 1 (AP-1)<sup>12,20</sup>. A ativação destas cascatas enzimáticas contribuem para a liberação de interleucinas e metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) que são responsáveis por mais inflamação, carcinogênese e envelhecimento cutâneos. As MMPs serão abordadas mais detalhadamente no item “Envelhecimento cutâneo”<sup>8,12</sup>.

Como exemplos de ativação enzimática temos a participação de:

Heme-oxigenase – responsável pela metabolização do grupo Heme, promove liberação de Fe<sup>+2</sup>. Este na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, catalisa a reação de formação de OH<sup>-</sup>.

Cicloxigenases (COX)- existe maior expressão da COX-2 pela ação UV. Como consequência, ocorre formação de PGE<sub>2</sub> que inibe o processo de apoptose e aumenta a proliferação celular. Sabidamente, a PGE<sub>2</sub> encontra-se aumentada nas QAs e, ainda mais em lesões de CEC. Além disso, níveis altos de PGE<sub>2</sub> estão correlacionados com grau de severidade tumoral assim

como seu potencial invasivo. A PGE<sub>2</sub> interage com interleucinas IL-4 e IL-10, que induzem imunossupressão<sup>21-23</sup>.

Óxido nítrico sintetase – a radiação UV-B ativa esta enzima que é responsável pela formação de óxido nítrico (NO). Este, por sua vez, estimula melanogênese, eritema e imunossupressão<sup>11</sup>.

Ornitina-decarboxilase (ODC) – estimulada pela radiação UV-B tanto aguda como crônica, regula a proliferação celular e seu estímulo está ligado à promoção de crescimento tumoral<sup>11,20</sup>.

Citocromo P450 – faz parte da família das monoxigenases ligadoras de membrana. É estimulado pela radiação UV-A e seu papel parece ser de proteger a célula contra os efeitos oxidativos de ROS<sup>11,12,20</sup>.

## **2.3 Mecanismos de prevenção endógena anti-carcinogênese induzida pela radiação UV**

Considerando que a função da pele é proteger o organismo contra os efeitos adversos do meio ambiente, há vários mecanismos que previnem a ação deletéria dos raios UV. Uma vez que as mutações induzidas pela radiação UV são o principal fator da carcinogênese cutânea através da ativação de oncogenes e inativação do gene de supressão tumoral TP-53, mecanismos eficientes de defesa desenvolveram-se com a evolução. Neste sentido, a ativação do gene TP-53, a alteração do ciclo celular e a indução

da apoptose pela célula tornam-se defesas na eliminação das células pré-malignas<sup>1,12,18,19</sup>.

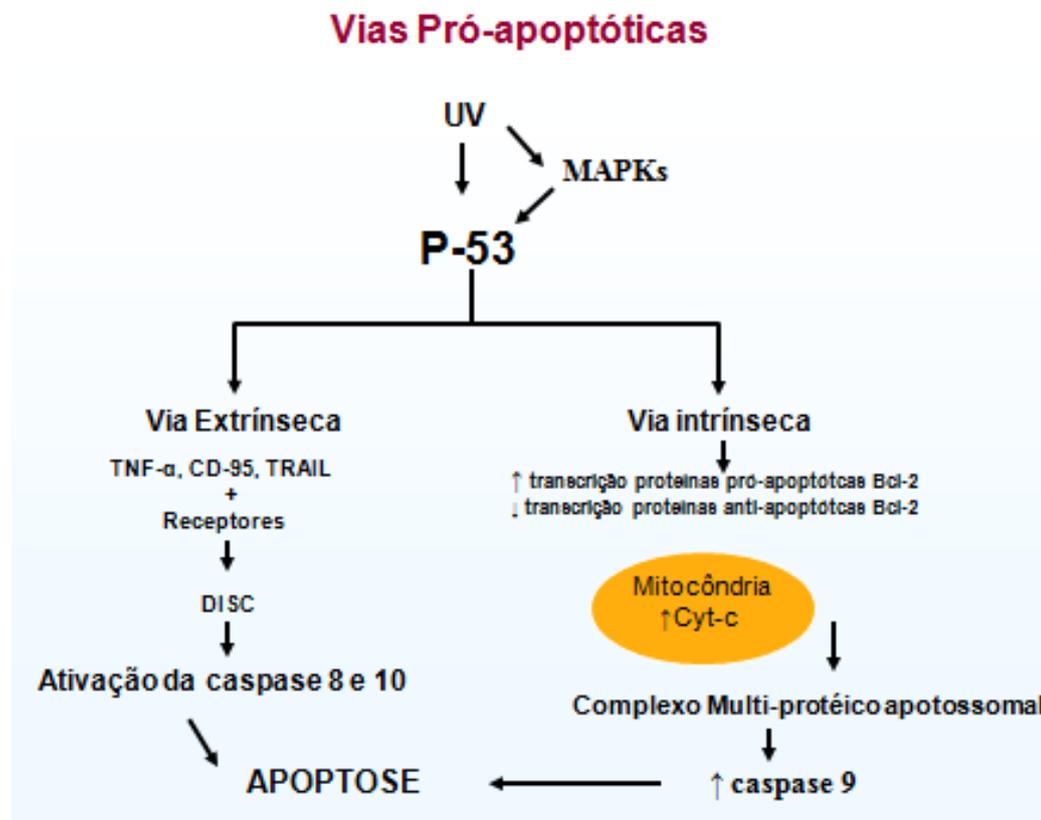
A proteína TP-53, codificada pelo gene de supressão tumoral TP-53, é importante no controle do ciclo celular e indução da apoptose. Em caso de dano ao DNA celular induzido pela UV, há transcrição do TP-53 e fosforilação da mesma<sup>1</sup>. As MAPKs (JNK e p38) são as principais enzimas responsáveis pela sua fosforilação<sup>12</sup>. Em caso de dano leve, ocorre o reparo ao DNA lesado com sucesso. Porém, se o dano ao DNA é severo e o reparo insuficiente, há persistência durante toda a fase S do ciclo celular, com maior probabilidade de mutação (transições nas bases C→T). Quando essas mutações ocorrem no gene TP-53, o processo de apoptose é perdido<sup>1,12,16,19</sup>.

A ativação do gene TP-53 também é responsável pela alteração do ciclo celular. Sob a ação da radiação UV, a proteína TP-53 fosforilada é capaz de prolongar a fase G1 do ciclo. Esse fato implica em maior tempo para a célula reparar o dano ao DNA antes da replicação na fase S. Quando o dano ao DNA induzido pela radiação UV é irreparável, as vias de apoptose são ativadas para promover a eliminação das células mutadas. A estrutura de apoptose dos queratinócitos é extremamente complexa e interligada e consiste na ativação das vias intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (mediada pela indução dos receptores de morte celular). Tais vias são diretamente reguladas pelas MAPKs e proteína TP-53<sup>12-14</sup>.

É sabido que a exposição ao UV é um dos principais fatores de estimulação das MAPKs e que o dano irreparável ao DNA celular é a principal causa de sua contínua ativação<sup>12,15</sup>. Ambas JNK e p38, enzimas do

complexo MAPK, podem ativar proteínas pró-apoptóticas Bcl2. Mas seu papel principal está na ativação da fosforilação da TP-53. Esta última, por sua vez, estimula a expressão dos receptores da morte celular TNF-R1, CD-95, TRAIL-R1 e TRAIL-R2. As proteínas chamadas de “ligandas” da morte celular (TNF- $\alpha$ , CD-95, TRAIL) são importantes reguladores da apoptose induzida pela radiação UV<sup>12,24,25</sup>. A inibição da atividade dessas “ligandas” ocorre nas células mutadas e facilita sua sobrevivência e crescimento. Ligando aos receptores, formam os complexos de sinalização indutores da morte celular (DISC, do inglês “death-inducing signalling complex”). O resultado final é a ativação da cascata pró-apoptótica das caspases 8 e 10, através da via extrínseca<sup>12,25,26</sup>.

A apoptose intrínseca ou mitocondrial depende diretamente da ativação da TP-53 que estimula a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bcl2 e inibição das proteínas anti-apoptóticas Bcl2 (complexo Bcl-xl). O equilíbrio entre proteínas pró/anti-apoptóticas controla a liberação de fatores mitocondriais no citoplasma da célula. A mitocôndria, por sua vez, aumenta a síntese e liberação de Citocromo C que induz a formação do complexo multi-protéico apoptossomal e posterior ativação da caspase 9, levando finalmente, à apoptose<sup>12,24,25</sup> (Figura 2).

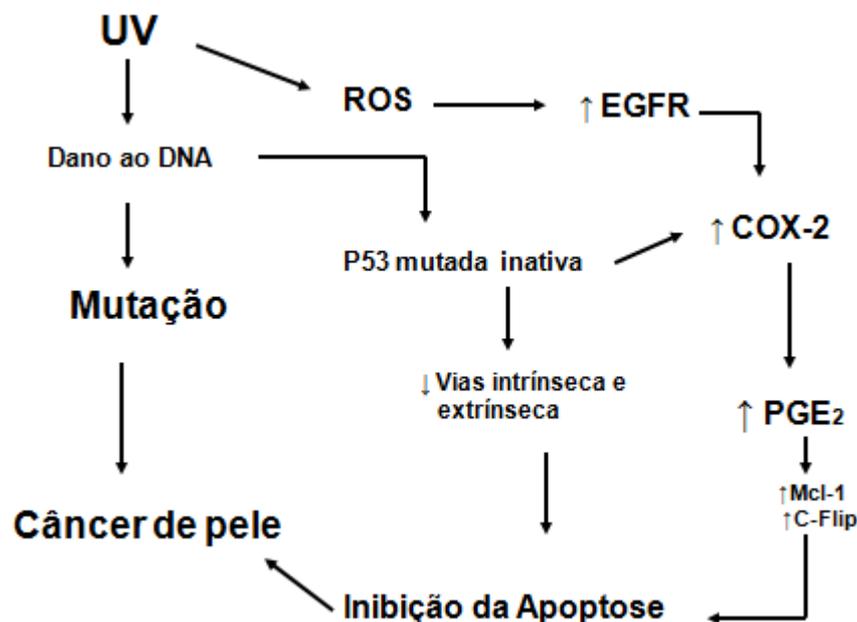


**Figura 2-** Apoptose induzida por UV. A ativação da cascata das MAPKs e do gene TP-53 induzem a apoptose pelas vias intrínseca e extrínseca

A despeito de todos os mecanismos preventivos acima descritos, etapas críticas na cascata da apoptose estão desreguladas no CEC. Essas etapas críticas envolvem, principalmente, TP-53, COX-2, MAPKs, complexo Bcl-2 e “ligandas” da via extrínseca da apoptose<sup>11,12,21-23,25</sup>.

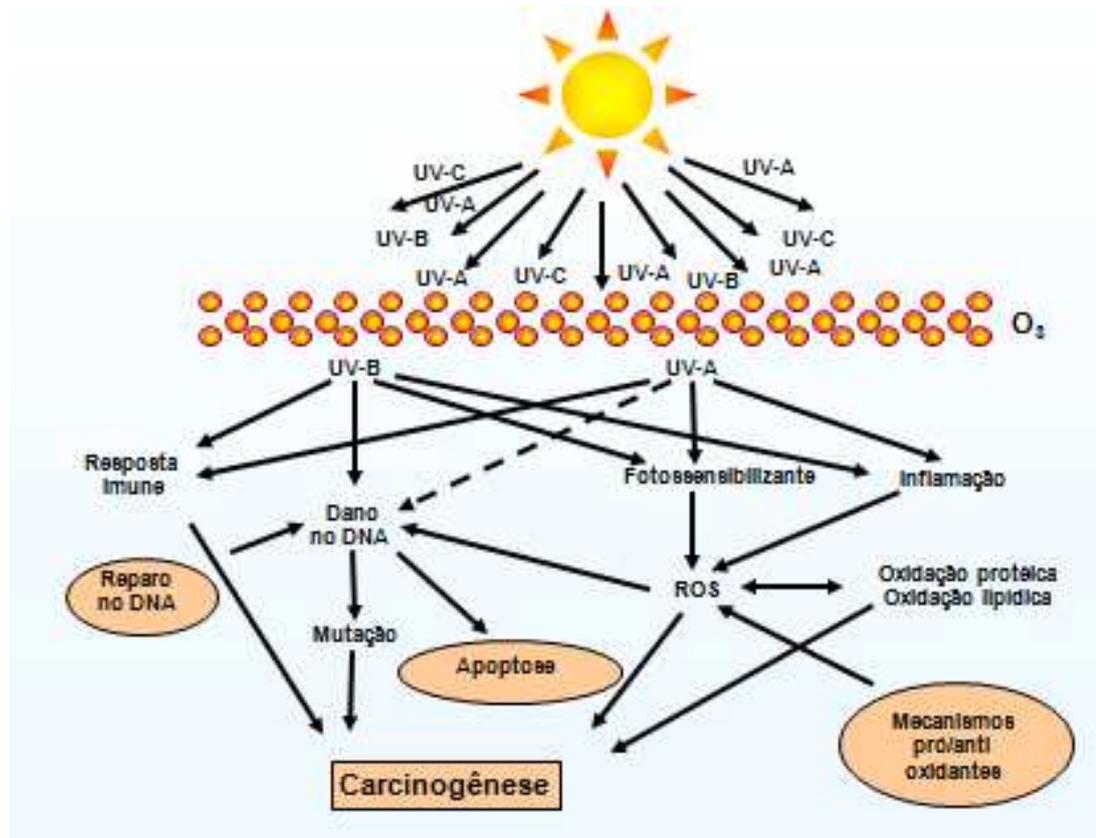
Neste sentido, a exposição crônica à radiação UV provoca inativação e mutação do gene TP-53, por dano direto ao DNA, assim como geração extensa de ROS, conforme explicado anteriormente. A inativação da TP-53 implica, direta e indiretamente, na inibição das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. O acúmulo dos radicais livres, gerados também pela exposição crônica ao UV, estimula a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, uma proteína trans-membrana de 180 kDa) pelos

queratinócitos, que por sua vez, estimula ainda mais a cascata das enzimas MAPKs<sup>27</sup>. A inativação da TP-53 e maior expressão de EGFR aumentam a atividade da COX-2, que por sua vez, aumenta a produção de PGE<sub>2</sub>. A PGE<sub>2</sub> é a principal prostaglandina produzida após irradiação pela UV, exercendo diferentes atividades biológicas<sup>21-23,27</sup>. Dentre as principais destacam-se a inibição da apoptose e aumento da proliferação dos queratinócitos. Além disso, níveis elevados de COX-2 foram correlacionados com aumento de proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 e c-FLIP em hepatócitos<sup>12,21,23</sup>. O resultado final de todo esse processo é a inibição da apoptose e crescimento desregulado das células, iniciando, assim, a carcinogênese (Figura 3).



**Figura 3** - Carcinogênese induzida pelo UV. O dano permanente ao DNA e a geração de ROS levam à ativação de EGFR e COX-2, resultando na supressão de apoptose e desenvolvimento de câncer de pele

Diante do exposto fica evidente que a célula dispõe de mecanismos de defesa ao estímulo UV que, quando ativados, previnem o dano permanente ao DNA e posterior mutação. Tais mecanismos envolvem a pronta ativação do gene TP-53, as vias intrínseca e extrínseca da apoptose e toda cascata interligada das proteínas pro e anti-apoptóicas. No desenvolvimento do câncer cutâneo, várias etapas críticas desses mecanismos preventivos são perdidos ou desregulados, particularmente inativação da TP-53, ativação das MAPKs, COX-2, EGFR e Bcl-2. O gene de supressão tumoral TP-53 tem papel fundamental em toda cascata de eventos gerados pela radiação UV, sendo que a interrupção da apoptose é considerada, pela maioria dos autores, como evento principal da carcinogênese<sup>12,18,19</sup>. Mutações no gene TP-53 são frequentes em câncer de pele e consideradas um passo inicial no CEC<sup>19</sup>. Uma vez que tanto a regulação da apoptose quanto a indução de inibidores do ciclo celular são ativados pela TP-53, a sua mutação contribui para a incontrolada proliferação celular e ausência de apoptose. Porém, ainda não foi demonstrada uma correlação entre o tipo de mutação e a gravidade do tumor, indicando que outros processos moleculares estão envolvidos na agressividade e invasão tumoral<sup>12,19</sup> (Figura 4).



**Figura 4** - Ação da UV na pele e mecanismos envolvidos no reparo do DNA e carcinogênese (adaptado de Svobodova et al.<sup>11</sup>)

## 2.4 O campo de cancerização

O conceito de campo de cancerização foi introduzido por Slaughter em 1953, estudando neoplasias multicêntricas de mucosa oral<sup>1,2</sup>. O termo foi introduzido na literatura médica baseado em algumas observações como: 1) a neoplasia oral origina-se de áreas multifocais com alterações pré-cancerosas; 2) o tecido que circunda a área do tumor primário apresenta-se histologicamente alterado; 3) as neoplasias, embora multifocais, podem se coalescer; e 4) a persistência de tecido vizinho anormal após cirurgia pode explicar recorrência tumoral ou surgimento de novo tumor em área previamente tratada. Outros órgãos podem apresentar campos de

cancerização além da mucosa oral: pulmão, esôfago, vulva, cérvix uterino, cólon, mama, bexiga e pele. Hoje está estabelecido que alterações genéticas acumuladas nesses campos de cancerização formam a base para o processo de carcinogênese<sup>1,28,29</sup>.

Esse processo pode ser definido em termos moleculares, indicando que a presença de células mutadas em um campo torna-se a base para a carcinogênese epitelial com relevantes implicações clínicas. Análises moleculares do tecido clinicamente “normal” adjacente ao tumor, assim como das margens cirúrgicas após a excisão, têm sido feitas com a intenção de melhor compreender o campo de cancerização<sup>14</sup>. Os marcadores mais usados para análise desses tumores e suas mutações são a perda da heteroziguidade (do inglês LOH), a instabilidade cromossômica, a mutação do gene TP-53 detectada pela amplificação do DNA, a imunohistoquímica e a hibridização *in situ*. Nesse contexto, torna-se importante a abordagem do estudo de Brennan et al.<sup>14</sup>. Esses autores mostraram, através de detecção de TP-53 mutante pela técnica de PCR em tempo real, que clones de células de CEC de cabeça e pescoço podiam ser detectadas nas margens cirúrgicas consideradas livres de tumor ao exame histopatológico em mais da metade da série analisada. Nesse estudo, quando havia mutação nas áreas peritumorais, a recorrência do tumor era maior e, estatisticamente significativa. Porém, nas áreas adjacentes que eram negativas para mutação do gene TP-53, não foram observadas recorrências<sup>14</sup>. Os marcadores de alterações genéticas mais empregados na análise molecular suportam uma provável alteração monoclonal dessas células alteradas no campo de cancerização.

Dessa forma, uma lesão de campo é uma lesão pré-neoplásica por definição, e não apresenta crescimento invasivo ou capacidade metastática podendo ou não apresentar características histológicas de displasia. Uma comparação mais detalhada entre histopatologia e análise molecular dessas células mostra: 1) grande variação na interpretação do exame histopatológico (em comparações por diversos patologistas); 2) células mutadas podem ser normais ao exame histopatológico de rotina; e 3) todas as células, moderada ou severamente displásicas, apresentam alterações genéticas<sup>1,18</sup>.

No desenvolvimento de câncer de várias linhagens de células humanas, as mutações somáticas no gene TP-53 são as mais frequentes. Podem ocorrer em quase todos os tipos de câncer em proporções que variam de 38% a 50% no ovário, esôfago, colo-retal, pulmão, laringe e cabeça e pescoço. Em outras linhagens tumorais podem estar presentes em até 5% como em leucemia, sarcomas, câncer testicular, melanoma maligno e carcinoma de cérvix uterino<sup>31</sup>.

As lesões precursoras desses campos de cancerização originam-se de pequenos grupos de células mutadas para o gene TP-53 conhecidos como "patches", definido como um grupo de células que apresentam o mesmo genótipo<sup>1,18,19,30</sup>. "Patches" de TP-53 mutados foram observados em pele normal, sendo muito mais frequentes na pele fotoexposta<sup>18</sup>. Jonason et al.<sup>1</sup> demonstraram que "patches" de TP-53 eram 10 vezes mais frequentes na pele exposta à radiação UV em relação à pele não fotoexposta. Além disso, através da técnica de PCR, os autores observaram que 50% desses

“patches” eram mutados. Esses pequenos grupos formam a base do campo de cancerização segundo os estudos mais recentes. As células TP-53 mutadas são consideradas um clone de uma célula progenitora comum (do inglês, “stem cell”). Quando a “stem cell” adquire uma alteração genética, todas as células clonais presentes no “patch” apresentarão as mesmas alterações, explicando a mutação do gene TP-53, através do estudo imunohistoquímico. Berg et al.<sup>19</sup>, através de técnicas de imunohistoquímica, observaram que a expressão de TP-53 na pele de ratos irradiados cronicamente com UV-B era um evento precoce e que, quanto maior o tempo de irradiação, maior a frequência e tamanho dos “patches”. Observaram, também, que 70% desses “patches” reagiam fortemente para anticorpo monoclonal PAb240, específico para TP-53 mutante. Por outro lado, ratos irradiados uma única vez, apresentaram apenas elevação transitória da expressão da proteína TP-53, que persistia por até 72 horas após a exposição ao UV-B. Nesses casos, não houve reação para PAb240, mostrando que se tratava de elevação de TP-53 normal ou “tipo-selvagem”<sup>19</sup>.

A identificação dos campos de cancerização em pacientes com CEC de cabeça e pescoço tratados cirurgicamente tem papel importante no monitoramento de outros tumores. Pacientes submetidos à remoção cirúrgica do tumor e com grandes chances de apresentar novo tumor, devem ser considerados candidatos a um estudo genético do campo em questão. Esse estudo poderá oferecer dados importantes na identificação do local provável de recorrência ou novo tumor, monitorar o processo da doença ou

até embasar um plano terapêutico futuro para essas lesões pré-malignas, através do conhecimento das alterações genéticas presentes no referido campo.

Em resumo, as consequências clínicas a partir das alterações moleculares descritas formam a base para o desenvolvimento de tumor em campo de cancerização. O grande número de células pré-malignas no campo aumentam as chances de desenvolvimento de neoplasias cutâneas. Isso também explica o grande número de recorrências, assim como surgimento de novo tumor, após cirurgia nessas áreas com células mutadas. Torna-se necessário, portanto, a detecção e monitoramento dos campos de cancerização, auxiliando o diagnóstico precoce de potenciais lesões pré neoplásicas<sup>1,14,18,32</sup>.

O conceito de campo de cancerização sugere que a pele, aparentemente normal que circunda as QAs, sustenta a base para a expansão clonal de células neoplásicas geneticamente alteradas<sup>2</sup>. As QAs apresentam-se principalmente em áreas fotoexpostas e são caracterizadas por pequenas pápulas eritemato-hiperqueratósicas. As QAs apresentam diferenças entre si. Alguns autores tentam indicar parâmetros clínicos que sugiram um maior potencial de transformação em CEC. São critérios clínicos como: infiltração, inflamação, diâmetro maior que 1 cm, crescimento rápido, sangramento, eritema e ulceração<sup>5,33</sup>. Histologicamente, elas são classificadas de acordo com a atipia de queratinócitos, pleomorfismo nuclear, hiperqueratose, paraqueratose, infiltrado inflamatório dérmico e elastose solar concomitante. Rotineiramente, o diagnóstico é essencialmente

clínico, embora o exame histopatológico seja considerado a melhor técnica. Porém, considerando que essas lesões apareçam, em geral, em campo de cancerização, muitas lesões pré-clínicas estão presentes na pele aparentemente normal. Assim, tornam-se necessários o diagnóstico e o tratamento de todo o campo e, não somente a lesão individualizada<sup>1,5,34,35</sup>. Técnicas não invasivas como microscopia óptica confocal e fotodiagnóstico com fluorescência emitida por protoporfirina IX estão sendo empregadas com a intenção de identificar lesões pré-clínicas em campo de cancerização<sup>36</sup>.

A etiopatogenia do campo de cancerização encontra-se em fase de estudo para melhor elucidação, principalmente para compreender a ocorrência de um segundo tumor primário na área onde antigo tumor foi excisado. Alguns estudos mostraram haver origem clonal comum das células neoplásicas e pré-neoplásicas na cavidade oral, esôfago e bexiga, mesmo que as lesões tivessem distância de 7 cm<sup>13,32</sup>. Ou seja, mesmo com distância considerável entre as lesões, esses tumores aparentemente eram originados a partir de um mesmo clone mutante. A conclusão de que as lesões são geneticamente relacionadas foi baseada na similaridade das alterações genéticas. Há teorias que tentam explicar a origem clonal comum de múltiplos tumores em um mesmo campo. A primeira delas postula que uma célula ou grupo de células possam migrar através da submucosa e atingir outros sítios. Outra teoria, advoga a favor de que as células tumorais de órgãos que possuem lúmen desprendem-se e atingem o lúmen do referido órgão (por exemplo, cavidade oral e bexiga), implantando-se em

outra área. Porém, uma terceira e nova teoria tem ganhado mais força e postula que um grande campo geneticamente alterado e contíguo reside no epitélio no qual múltiplas lesões geneticamente semelhantes se desenvolvem<sup>1,32</sup>. Os resultados indicam que uma grande proporção de múltiplos tumores primários, na mesma área anatômica, se desenvolvem dentro de um único campo pré-neoplásico.

Assim sendo, temos que o conceito de campo de cancerização tem importantes consequências clínicas. Está estabelecido que a após a remoção de um tumor, exista um maior risco no desenvolvimento de outro na mesma área. Algumas vezes, o novo tumor pode ser explicado a partir do crescimento de tumor incompletamente excisado. Porém, nos casos onde o tumor foi totalmente removido, parece provável que um campo geneticamente alterado tenha sido a causa<sup>14</sup>. A presença de um campo com células geneticamente alteradas parece ser um crescente fator de risco para desenvolvimento de neoplasias. As investigações clínicas são dificultadas pelo fato de que a detecção precoce de um campo é feita através de técnicas de biologia molecular difíceis de serem aplicadas em uma rotina hospitalar. Contribui para essa dificuldade, o fato de que as lesões precoces são, em geral, sub-clínicas e de difícil diagnóstico, mesmo com técnica de detecção precoce usadas na rotina. Por outro lado, as lesões de QA na pele são pré-neoplásicas, de diagnóstico mais fácil e surgem, em geral, em campo de cancerização.

A aceitação de que um campo geneticamente alterado aumenta as chances de formação de tumores provoca um paradigma entre o que é

recorrência local de um tumor e segundo tumor primário. Este último consiste em um novo tumor que se desenvolve independentemente do primeiro, no mesmo campo de cancerização. Quando um segundo tumor aparece no mesmo campo, temos que, aumentam, ainda mais as chances de um terceiro ou quarto tumor também surgirem no referido campo. Isso implica em seguimento e acompanhamento especiais desses pacientes, necessitando de avaliações mais próximas e profundas. A recorrência local pode ser o resultado de um tumor parcialmente excisado, porém também pode ser considerado resultado de “restos” locais de um campo, o que se confunde com segundo tumor primário<sup>1,2</sup>.

As implicações cirúrgicas no campo de cancerização são de grande importância. Em alguns órgãos, por exemplo, ressecções extensas do tumor junto do campo podem ser impraticáveis tais como cabeça e pescoço, vulva, bexiga e em carcinomas de cólon.

Na pele, o campo inclui alterações clínicas e sub-clínicas que podem ser diagnosticadas através da semiologia, com a presença de QAs e outras alterações como lentigos solares, distúrbios de pigmentação, alterações de textura e rugas, xerose e elastose solar. Portanto, a definição de campo de cancerização é: “uma área de pele fotoexposta, cronicamente danificada e com múltiplas lesões de QAs, além dos outros danos causados pela radiação UV”. Esse “território” comporta-se como um campo de lesões clinicamente visíveis e lesões sub-clínicas<sup>1,33,34</sup>.

Ou seja, as lesões pré-malignas estão aparentes em áreas danificadas pela ação da radiação UV e originam-se de focos disseminados

em área foto-exposta. Poucos estudos existem sobre esse assunto, sendo a maioria em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço<sup>14</sup>.

Interessante é a observação de que poucos estudos histopatológicos ou clínicos definem um campo de pele alterado que tenha predisposição à formação de tumores ou mesmo de lesões pré-malignas. Como, em muitas vezes, a aparência clínica da pele é normal, voltamos nossa atenção apenas para as lesões que clinicamente se apresentam. Este conceito necessita ser revisado, pois uma superfície de pele que é cronicamente exposta à radiação UV mostra mais chances de desenvolver neoplasias cutâneas quando comparada à pele protegida de exposição UV<sup>18</sup>. Nesse sentido, todo o campo deve ser alvo de estudo e, não somente, as lesões aparentes. Assim, técnicas laboratoriais mais específicas como biologia molecular são empregadas na definição das alterações da área cancerizável. Jonason et al.<sup>18</sup>, estudando pele normal de voluntários, observou a frequência da expressão da TP-53. Através da técnica de imunohistoquímica, os autores identificaram “patches” na epiderme e verificaram que a frequência média era de 3/cm<sup>2</sup> na pele coberta e de 33/cm<sup>2</sup> na pele cronicamente exposta ao sol. Esses “patches” não só eram mais frequentes como eram maiores em tamanho quando comparados com pele não exposta. Para determinar se esses “patches” continham mutações, os autores usaram a técnica de PCR e observaram que 50% das células positivas eram mutadas, sendo mais frequente a mutação C→T<sup>18</sup>.

Nas lesões de QAs, assim como nos CECs, foram identificadas, recentemente, expressões variáveis de uma proteína da matriz extracelular

chamada de Tenascina-C (Tn-C)<sup>35,36</sup>. Esta é uma proteína que está normalmente presente no tecido embrionário neural, em diversas fases da esquelotogênese e vasculogênese e nos tecido de reparação e músculo-esquelético. Sua função está diretamente ligada à adesão, migração e crescimento celulares, angiogênese e regulação da expressão das MMPs<sup>36</sup>. O seu papel na invasão tumoral ainda é incerto, mas estudos recentes mostraram maior expressão de Tn-C nas QAs com maior grau de atipia e que a intensidade da reação, assim como a sua extensão, eram maiores nos CECs do que nas QAs. A expressão da Tn-C era particularmente mais intensa nas células mais basais dos CECs, na fronteira de invasão tumoral. Tal observação parece relacionar-se com o potencial invasivo desses tumores, onde uma maior expressão de Tn-C pode se relacionar à menor capacidade de adesão celular favorecendo, assim, a invasão e disseminação do tumor<sup>36</sup>. Porém, ainda não se sabe qual é a expressão dessa proteína no campo de cancerização.

A pele cronicamente exposta à radiação UV apresenta sinais, precoces ou tardios, de envelhecimento. Esse processo inclui alterações na textura, coloração, distúrbios de pigmentação, rugas superficiais e profundas, eritema, telangiectasias e QA<sup>6</sup>. Essas alterações estão presentes no processo do envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento da pele.

Devido à alta incidência de QAs e sua localização preferencial em áreas expostas (cabeça, pescoço, membros superiores), torna-se imperativo o tratamento eficaz de tais lesões assim como a diminuição do aparecimento de novas lesões no campo tratado. As QAs são consideradas as lesões

cutâneas pré malignas mais comuns da pele, sendo que alguns autores preferem classificá-la como um carcinoma espinocelular (CEC) *in situ*<sup>34</sup>. No hemisfério norte, a prevalência das QAs varia entre 11-25% na população acima de 40 anos. Existe a possibilidade de transformação em CEC invasivo e potencial metastático dessas lesões. Estima-se que o CEC seja responsável por até 34% das mortes causadas por câncer de pele em indivíduos entre 65 e 84 anos de idade e por 56% em pacientes acima de 85 anos<sup>5</sup>. Os fatores de risco mais implicados no seu desenvolvimento são a exposição crônica ao sol, imunossupressão, fototipos de pele I-II, fototerapia com PUVA (“psoralen Ultra – violet A”), exposição ao arsênico e alguns processos inflamatórios crônicos da pele.

Embora as QAs possam sofrer involução espontânea, o risco de progressão para CEC varia de 0,025% a 20% por ano<sup>3-5,33</sup>. Durante o curso de um ano, cerca de 20% a 25% das lesões regridem. Porém, no mesmo curso de um ano, 15% das lesões, que sofreram regressão, reapareceram<sup>5</sup>. É muito difícil e incerto estimar se a regressão é permanente ou apenas temporária. Dessa forma, o diagnóstico e tratamento são pertinentes. Foi estimado que 60% dos indivíduos caucasianos poderão apresentar pelo menos uma lesão de QA após os 40 anos de idade<sup>5,33</sup>. As QAs normalmente estão presentes nas áreas fotoexpostas e são múltiplas, resultando em áreas de cancerização. Uma vez que não se pode distinguir qual lesão sofrerá involução ou qual se transformará em CEC, torna-se obrigatório o tratamento de todas as lesões. Dessa forma, cada vez mais tem-se dado

importância ao tratamento de todo campo, uma vez que, lesões sub-clínicas podem sofrer transformação para CEC<sup>1,2</sup>.

## **2.5 O envelhecimento cutâneo**

O envelhecimento é um processo biológico, em nível celular, e que envolve uma redução progressiva da capacidade de reserva e menor habilidade na realização das funções normais. É algo inerente a todos os organismos vivos e considerado o resultado de uma programação genética específica para cada espécie. Devemos lembrar, porém, que danos cumulativos ao material genético e a suas proteínas podem alterar o processo natural e induzir o envelhecimento prematuro e a morte que, por sua vez, podem ser dependentes de mecanismos de reparação<sup>7</sup>. Sabe-se que, os queratinócitos humanos, em cultura, atingem a senescência replicativa após 50 a 100 divisões, permanecendo em fase G1 do ciclo celular após o período replicativo<sup>37</sup>.

O envelhecimento da pele é influenciado por vários fatores como genéticos, ambientais, processos metabólicos e alterações hormonais. Todos esses fatores somados contribuem para alterações na estrutura, função e aparência do órgão. Inquestionável, é o papel da exposição crônica à radiação UV como maior fator isolado de envelhecimento cutâneo<sup>7</sup>.

O envelhecimento cronológico ou intrínseco é definido como um conjunto de alterações clínicas, histológicas e fisiológicas que ocorrem na

pele protegida, ou seja, não exposta ao sol. As principais alterações são observadas na taxa de replicação celular da epiderme, depuração de substâncias químicas pela derme, espessura e celularidade dérmicas, termo-regulação, reparo tecidual pós injúria, proteção mecânica, resposta imunológica, percepção sensorial, produção de sebo e suor, síntese de vitamina D e reatividade vascular. Clinicamente, a pele apresenta-se atrófica e com perda da elasticidade. Embora a camada córnea quase não sofra alterações, a epiderme torna-se mais fina e ocorre retificação e achatamento da junção dermo-epidérmica, tornando-a mais frágil<sup>6-8</sup>. A capacidade metabólica dos fibroblastos é menor, o que torna mais lento e precário o processo de reparação tecidual. A resposta aos fatores de crescimento de queratinócitos e de fibroblastos também diminuem, levando à menor capacidade proliferativa. Outra função importante que diminui é a síntese de vitamina D<sub>3</sub>, devido à menor formação de 7-deidrocolesterol na epiderme atrófica<sup>8</sup>.

O fotoenvelhecimento, ou extrínseco, é o resultado da combinação dos danos causados pela radiação UV com as alterações intrínsecas previamente descritas, o que acarreta, por fim, o envelhecimento prematuro. A exposição crônica e prolongada à radiação UV, conforme já descrito anteriormente, induz a formação dos radicais reativos de oxigênio (ROS), de ácido nítrico (RNS) e radicais livres alterando as estruturas dos genes e de suas proteínas<sup>12</sup>. Clinicamente, a pele torna-se áspera, a epiderme se espessa no início e sofre atrofia na fase mais tardia, há flacidez, empalidecimento e rugas surgem gradativamente, telangiectasias, lentigos

solares e hiperpigmentação difusa são também notados com a progressiva exposição ao sol. Os poros dilatam-se, há crescimento de neoplasias benignas como queratoses seborréicas e acrocórdons, assim como lesões pré-malignas e malignas como QAs, CEC, melanoma e CBC. As alterações histopatológicas são também observadas como perda da polaridade dos queratinócitos, graus variáveis de atipia celular, degeneração do colágeno assim como depósito de material elastótico na derme, conferindo o aspecto da pele com excesso de rugas, sulcos e descoloração. Da mesma forma, vasos sanguíneos periféricos são alterados, tornando-se dilatados e tortuosos<sup>6,38-40</sup>

O colágeno dérmico é alvo do fotoenvelhecimento. Na pele normal, com pouca ou sem exposição solar, existe uma contínua remodelação, que é resultado do tecido conectivo normal. As enzimas responsáveis pela degradação e remodelação das fibras colágenas são conhecidas como metaloproteinases (MMPs) da matriz extracelular. Essas enzimas são membros de uma grande família de endopeptidases, zinco dependentes, produzidas constantemente por fibroblastos, queratinócitos, macrófagos, mastócitos, células endoteliais e eosinófilos<sup>11</sup>. A família das MMPs é composta por pelo menos 16 membros, até hoje conhecidos, e que podem ser classificados em quatro sub-grupos: 1) colagenases; 2) gelatinases; 3) estromelisinases; 4) MMPs de membrana. As três primeiras podem degradar o colágeno nativo e não desnaturado presente na derme. A primeira etapa da quebra é feita pelas colagenases, gerando dois tipos de fragmentos. Esses fragmentos desnaturados são chamados gelatinas e degradados,

posteriormente, pelas gelatinases e estromelinas<sup>7</sup>. Tão importante quanto a quebra do colágeno e posterior envelhecimento cutâneo, é o fato que o aumento da síntese de MMPs está correlacionado com maior agressividade e gravidade dos tumores cutâneos, favorecendo a invasão das células tumorais<sup>36</sup>.

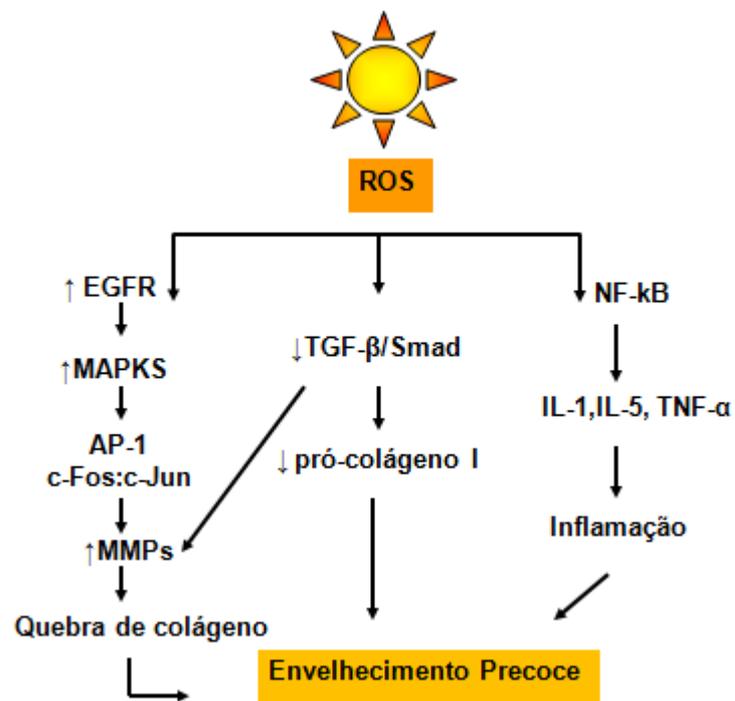
Todo esse processo de quebra e degradação do colágeno que contribui para o envelhecimento cutâneo é ativado por vias bioquímicas estimuladas pela radiação UV e que induzem a liberação de várias interleucinas (IL) e receptores de fator de crescimento. Nesta lista incluem-se os receptores de EGF, TNF- $\alpha$ , fator de ativação plaquetária (PAF), IL-1 e insulina. O acúmulo de ROS estimula o fator nuclear kB (NF-kB), que, por sua vez, estimula a produção de IL-1, IL-5 e TNF- $\alpha$ , gerando processo inflamatório na pele foto-exposta e, conseqüentemente, mais formação de ROS<sup>7,8,12,20,41</sup>.

A radiação UV é capaz de ativar EGFR (do inglês “epidermal growth factor receptor”) através de sua fosforilação. Tal evento é sensível e já pode ser observado após 10 minutos de exposição UV. Após esse evento, proteínas ligadoras de GTP (guanosina 5' trifosfato) são ativadas que, por sua vez, estimulam a cascata das MAPKs. Além de todo efeito na inibição da apoptose e aumento da síntese de COX-2, descritos anteriormente, as MAPKs estimulam a transcrição da via AP-1( via ativadora da proteína -1)<sup>41</sup>. AP-1 é constituída pelas famílias de proteínas c-Fos e JunD. Na presença de UV, ocorre a transcrição dos genes c-Fos e c-Jun. O aumento da proteína c-Jun compete diretamente com JunD, levando à formação de complexos

c-Jun:c-Fos na AP-1. A transcrição de várias enzimas da família das MMPs é regulada pelo complexo AP-1 formado após a radiação UV. Dessa forma, tem início o papel das MMPs na degradação das proteínas da matriz extracelular. Inicialmente, as MMPs são sintetizadas como pró-enzimas e sofrem degradação proteolítica para se tornarem ativas. Esse processo pode ser inibido pelas enzimas inibidoras de MMPs teciduais (TIMP). Várias MMPs são estimuladas pelo complexo AP-1 como: MMP-1 (colagenase 1) que inicia a degradação dos colágenos I e III; MMP-9 (gelatinase B), responsável pela degradação dos fragmentos de colágeno (gelatinas); MMP-3 (estromelisin 1), responsável pela degradação do colágeno tipo IV da membrana basal e também ativa a pró-MMP-1. Essas enzimas podem ser ativadas tão logo quanto oito horas após a radiação UV<sup>7,8,12</sup>. Somando-se à quebra progressiva do colágeno pelas MMPs, a exposição crônica à radiação UV inibe a síntese de colágeno tipo I, assim como a organização das fibras na derme (Figura 5). A expressão do pró-colágeno I é inibida após 8 horas de irradiação UV “in vivo” e torna-se completamente ausente após 24 horas de exposição, o que é consistente com a indução do complexo c-Jun:c-Fos e ativação da AP-1<sup>7,8,41</sup>. Ainda mais, o fator de crescimento do tecido conectivo é também inibido pela radiação UV.

A citocina pró-fibrótica TGF- $\beta$  regula múltiplas funções celulares incluindo diferenciação, proliferação e a síntese das principais proteínas da matriz extracelular- colágeno e elastina<sup>8,42</sup>. Na pele humana, TGF- $\beta$  inibe a proliferação de queratinócitos e estimula os fibroblastos. Inibe, também, a produção da MMP-1 e MMP-3, através da ligação aos receptores de

superfície celular T $\beta$ R I/II/III, prevenindo, assim, a quebra de colágeno. A via TGF- $\beta$ /Smad é a principal reguladora da síntese de pró-colágeno tipo I na pele humana<sup>8</sup>. Por sua vez, a irradiação UV é capaz de inibir a via TGF- $\beta$ , através da inibição da expressão do receptor T $\beta$ R-II. Ocorre, como consequência, uma redução de 90% da ligação da TGF- $\beta$  na superfície da célula. Essa é uma importante via que está inibida na pele cronicamente foto-exposta e que contribui ainda mais para a degradação progressiva das fibras colágenas. Portanto, a inibição da via TGF- $\beta$ /Smad acarreta na diminuição da expressão de pró-colágeno I e aumento da síntese de MMPs. O conjunto de eventos como estimulação das MMPs, inibição da via TGF- $\beta$ /Smad e inibição do fator de crescimento do tecido conectivo contribuem para degeneração assim como inibição da síntese de fibras colágenas na derme<sup>7,8</sup>.



**Figura 5** - Mecanismos induzidos pela radiação UV no envelhecimento precoce da pele

## 2.6 A terapia fotodinâmica

Na dermatologia, a TFD é empregada no tratamento do câncer de pele não-melanocítico e outras doenças inflamatórias e proliferativas não neoplásicas como psoríase, doença de Darier, sarcoidose e necrobiose lipoídica. Nas últimas décadas, a TFD progrediu de um recurso terapêutico experimental para se tornar primeira opção no tratamento de lesões como QAs e outras lesões superficiais extensas como CBC superficiais e nodulares finos e doença de Bowen (DB)<sup>9</sup>

Trata-se de um modelo que induz a citotoxicidade das células proliferativas através da combinação de um agente fotossensibilizante, uma fonte de luz e oxigênio. O tratamento é sempre feito em duas etapas: 1) administração da droga via tópica ou sistêmica, que se acumula no tumor; 2) iluminação do tumor ou área afetada com fonte de luz para promover a ativação fotodinâmica e, conseqüente, necrose tumoral. O agente fotossensibilizante, quando irradiado, transfere energia para o O<sub>2</sub> intracelular com a formação de radicais reativos como oxigênio singlet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), radicais hidroxila, superóxido e peróxido de hidrogênio com efeito citotóxico<sup>9,10,43,</sup>

No início da década de 1990 as pesquisas da TFD em dermatologia foram impulsionadas pelo desenvolvimento da droga de uso tópico ácido 5-delta aminolevulínico (5-ALA), por Kennedy et al.<sup>44-46</sup>. No fim da mesma década, um derivado lipofílico - metil éster do 5-ALA - foi produzido e ambas as drogas regem a TFD como drogas de uso tópico no mundo. Trata-se de um composto esterificado do 5-ALA, que por ter propriedade lipofílica,

apresenta a vantagem de maior penetração e especificidade no tecido tumoral.

ALA e MAL são considerados precursores porfirínicos, sendo que o composto ativo é a protoporfirina IX (PpIX), sintetizada no interior das células através da biossíntese do grupo Heme<sup>9,10,47,48,49</sup>. A PpIX é considerada potente agente fotossensibilizante e facilmente fotoativado, ou seja, a droga é degradada quando exposta à fonte de luz específica.

Esses compostos são quimicamente puros e, quando aplicados tópicamente ou sistemicamente, mostram alta eficácia, segurança e seletividade, com menor risco de fotossensibilidade prolongada em relação às drogas mais antigas<sup>43</sup>.

Hoje em dia, vemos um crescimento enorme da TFD e suas aplicações. Por um lado parece fascinante, por outro, até meio confuso através da combinação de várias drogas, protocolos, fontes de luz, novas indicações, etc que podem desorientar o profissional médico que esteja iniciando sua experiência com TFD. Neste sentido, a compreensão dos princípios básicos assim como o conhecimento dos agentes, fontes de luz e mecanismo de ação tornam-se imperativos para a boa realização da técnica e obtenção dos melhores resultados<sup>50</sup>.

Os agentes fotossensibilizantes sistêmicos, com estrutura química tetrapirrólica, são preferencialmente administrados por via endovenosa, pois não penetram na pele. Esse grupo de agentes pode ser dividido em derivados de primeira e segunda gerações. Os agentes de primeira geração derivam da hematoporfirina natural, enquanto os de segunda, são

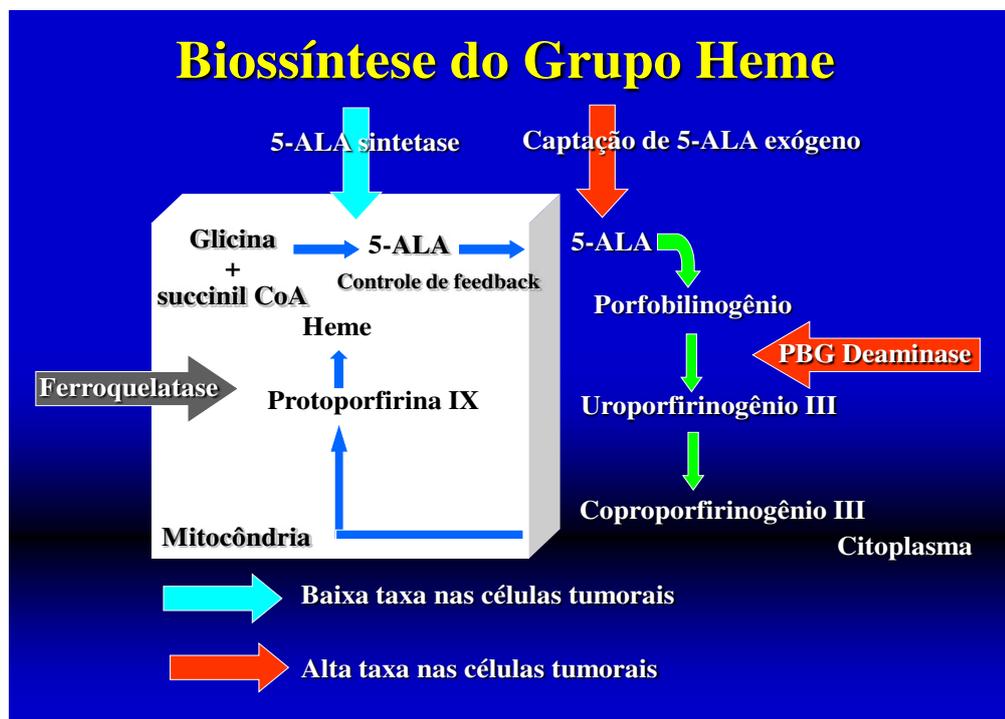
compostos sintéticos purificados de uso clínico e laboratorial investigacionais. O uso dos agentes sistêmicos na Dermatologia é muito restrito. Os riscos de fotossensibilização prolongada (de 4 a 8 semanas), a dificuldade de aplicação da técnica e a necessidade de regime hospitalar para sua realização dificultam sua utilização prática<sup>50</sup>.

Dentre os agentes tópicos, há grande destaque para as moléculas de 5-ALA e MAL. Esses não são agentes fotossensibilizantes propriamente ditos, porém, são precursores metabólicos de porfirinas fotoativas (PpIX), através da biossíntese do Heme intracelular<sup>43-45</sup>.

5-ALA é um agente hidrofílico sendo captado pelas células, principalmente, através de transporte ativo, como Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> dependente de beta aminoácidos como glicina e ácido gama aminobutírico (GABA) carregadores<sup>10,43,50</sup>. Esses sistemas não requerem energia, dependem de pH e temperatura, são lentos e saturáveis e estão um pouco mais acelerados em células tumorais. MAL é uma molécula lipofílica sendo captada por mecanismos de transporte ativos principalmente dependentes de aminoácidos não-polares como alanina, metionina, triptofano e glicina. Porém, o MAL também é captado por mecanismos passivos de difusão transmembrana<sup>43,50</sup>. Esse mecanismo não requer energia e não é saturável, sendo eficaz em células normais, porém, mais ainda em células neoplásicas. Essa pluralidade de fatores talvez explique a maior penetração do MAL em relação ao ALA, sobretudo em células malignas.

O 5-ALA é o primeiro intermediário na via de biossíntese do grupo Heme, sendo sintetizado a partir de glicina e succinil – Coa, no interior da

mitocôndria (Figura 6). Essa reação é catalisada pela enzima ALA-sintetase. Já no citoplasma da célula, duas moléculas de ALA formam o porfobilinogênio (PBG) e quatro moléculas de PBG formam o uroporfirinogênio III. Este último é convertido em coproporfirinogênio III e, novamente no interior da mitocôndria, em protoporfirinogênio IX, que é convertido em PpIX, pela ação da protoporfirinogênio oxidase<sup>50</sup>.



**Figura 6** - Esquema da biossíntese do grupo Heme, capturação do 5-ALA e sua metabolização. PBG = porfobilinogênio, CoA = coenzima A

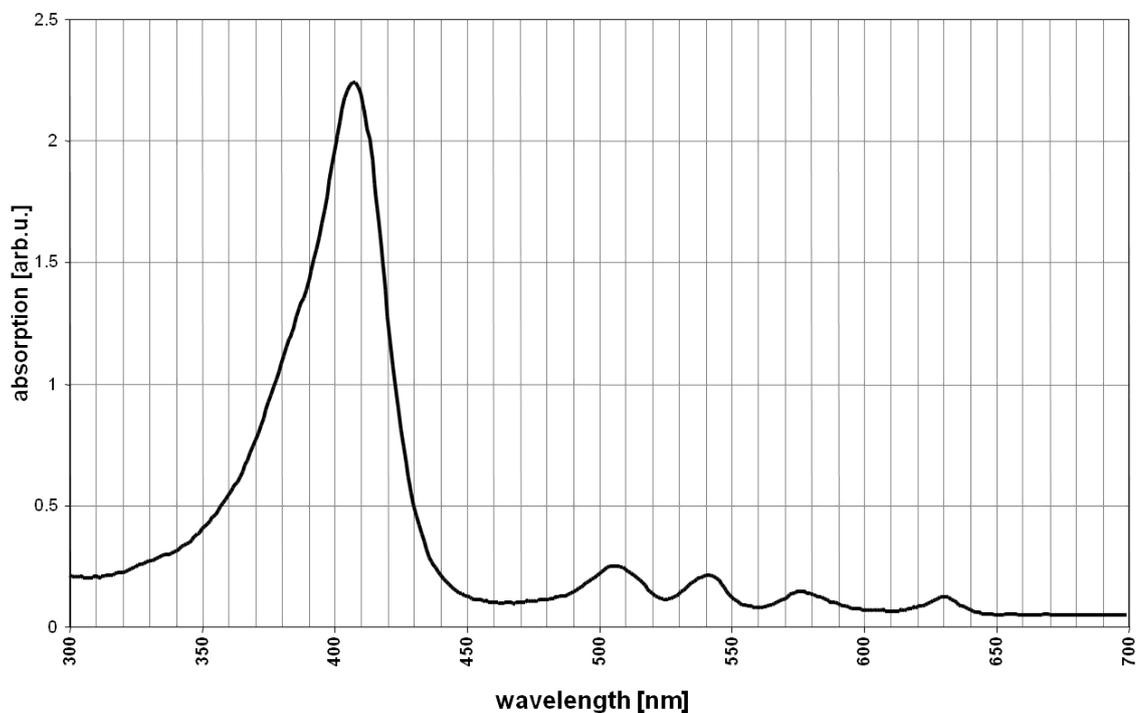
A PpIX é o intermediário porfirínico com atividade fotodinâmica e, quando ativado por luz azul, emite fluorescência vermelha intensa. Em contraste, o grupo Heme não fluoresce quando exposto à luz e não possui atividade fotodinâmica<sup>44,45,50,51</sup>. Enquanto anormalidades metabólicas na via da biossíntese do grupo Heme originam um grupo de doenças denominadas de Porfírias, o acúmulo proposital induzido por ALA ou MAL exógenos é utilizado com finalidade terapêutica na TFD.

A síntese normal de 5-ALA, no interior da célula, é controlada pela enzima ALA sintetase que, por sua vez, é inibida pelo acúmulo de Heme (*feedback* negativo). Se um excesso de 5-ALA exógeno for aplicado topicamente, ocorrerá rápida passagem através da epiderme anormal e posterior conversão à PpIX no interior da mitocôndria. Uma vez que a conversão da PpIX para Heme é uma reação lenta, as células tendem a acumular grande concentração de PpIX. Embora qualquer célula nucleada seja capaz de sintetizar Heme, algumas o fazem de maneira acelerada e diferentes mecanismos de controle de *feedback* podem agir nessas células<sup>43</sup>. O acúmulo excessivo de PpIX no interior da mitocôndria induz à sua difusão para o retículo endoplasmático e membrana celular, ambos alvos finais do dano celular induzido pela TFD.

Quando MAL é aplicado topicamente, a molécula é rapidamente demetilada a 5-ALA e sofre o mesmo processo de metabolização, conforme exposto acima<sup>52</sup>.

A PpIX possui vários picos de absorção da luz. O principal é na banda de Soret em 405 nm, correspondente à luz azul. Outros picos menores também têm importância e são chamados de “Q bands” ou bandas Q. São picos que ocorrem em 510, 545, 580, 630, 670 e 700 nm (Figura 7). Embora os picos das bandas Q sejam 10 a 40 x menores que o pico em 405 nm, muitos estudos em TFD são conduzidos usando fonte de luz no espectro da luz vermelha entre 620 e 635 nm. A principal razão reside no fato de que a luz vermelha proporciona maior penetração no tecido, otimizando a TFD para lesões mais profundas. Porém, fontes de luz azul e verde também são

empregadas em TFD para lesões mais superficiais e com resultados semelhantes<sup>43,50</sup>.



**Figura 7** - Espectro de absorção da PPIX

ALA pode ser administrado tópicamente ou sistemicamente, mostrando acúmulo de PpIX em células tumorais de CBC em quaisquer das vias. Estudos em animais e humanos mostraram que a PpIX é eliminada do organismo 24 horas após a administração de ALA exógeno, seja por vias tópica, oral ou endovenosa<sup>10,43</sup>. Assim, riscos de fotossensibilidade prolongada são considerados ausentes ou desprezíveis com o uso de ALA ou MAL.

Durante a exposição do tumor fotossensibilizado a uma fonte de luz adequada, a PpIX é rapidamente fotoativada, permitindo, assim, alta dose total de energia sem os riscos de reações fototóxicas relevantes para o tecido perilesional<sup>43</sup>.

Alguns fatores interferem com a penetração do ALA na pele: concentração, tipo de veículo utilizado na sua preparação, tempo de aplicação e uso de agentes coadjuvantes que favorecem o acúmulo de PpIX nas células tumorais. Nos estudos clínicos, as concentrações de ALA variam de 5 a 20%<sup>43,49</sup>. Os melhores resultados terapêuticos foram obtidos com concentrações entre 10 e 20%<sup>43,45,48,52-55</sup>. Existe divergência nos diversos protocolos sobre qual o melhor veículo a ser usado no preparo do ALA. Formulações como emulsão óleo/água, água/óleo, propilenoglicol e loção naonocolóide foram previamente testadas<sup>43,50</sup>. Hoje, utilizam-se ALA 20% em emulsão água/óleo e solução hidroalcolica (disponível comercialmente em forma de bastão, sendo o pó do ALA separado da solução, para uso tópico)<sup>48,49,54,57-59</sup>. Já o MAL somente está disponível em forma de creme contendo óleo de archis, glicerila e água na concentração de 16% (disponível comercialmente em forma de tubo contendo 2 g, pronto para uso tópico)<sup>9,10,60-62</sup>.

Quanto ao fator tempo de aplicação sobre a lesão, também existe grande variação de 60 minutos a 20 horas<sup>43,48,49,54-59</sup>.

Hoje, os protocolos aprovados para o uso de ALA tópico no tratamento de QAs são de aplicação prolongada entre 14 e 18 horas<sup>48,49</sup>. No caso do MAL, o tempo de aplicação é de três horas sob oclusão<sup>9</sup>.

O uso de agentes coadjuvantes em formulações com ALA pode aumentar, direta ou indiretamente, a formação de PpIX na célula tumoral. A adição de agentes que inibam a ação da enzima ferroquelatase ou aumentem a penetração do ALA no tecido, como ocorre com a

desferroxamina, o ácido dietilaminotetracético (EDTA) e dimetilssulfóxido (DMSO) constituem exemplos de aditivos que potencializam a TFD<sup>55,56</sup>. Outras técnicas também podem aumentar a concentração de PpIX por aumentar a absorção de ALA, como é o caso da iontoforese.

A capacidade penetração do ALA no CBC foi estudada por Szeimies et al.<sup>63</sup>, em 1993, através da microscopia de fluorescência. Após quatro horas de aplicação do ALA 20% em creme sob oclusão, foi observada apenas fluorescência leve nas glândulas sebáceas e porções superiores dos folículos pilosos. Após 12 horas, foi detectada fluorescência intensa na epiderme lesada e área perilesional, folículos pilosos, ductos sudoríparos e glândulas sebáceas, além de fluorescência homogênea nos CBCs superficiais e nodulares. Nos CBCs esclerodermiformes, a fluorescência foi heterogênea e leve, mesmo nas partes mais superficiais do tumor. Esses achados comprovam os melhores resultados da TFD nos CBCs superficiais e nodulares de padrão sólido, pois no padrão esclerodermiforme, o estroma fibroso dificulta a penetração do produto e, conseqüentemente, a formação de PpIX<sup>10,43</sup>. Cabe ressaltar que esse estudo foi conduzido com ALA 20% em creme e não com a formulação que atualmente existe no mercado (Levulan Kerastick®, Dusa Pharmaceuticals, Inc, USA).

Em relação ao MAL, trata-se como já exposto, de uma droga lipofílica que foi sintetizada no fim da década de 1990 com o intuito de promover maior penetração no tecido e aumentar a concentração de PpIX nos tumores. Fritsch et al.<sup>64</sup>, em 1998, compararam o acúmulo de porfirinas em QAs e pele normal com ALA e MAL. Em ambos os grupos houve maior

concentração de PpIX nas QAs em relação à pele normal adjacente. Porém, MAL foi mais seletivo para a pele lesada em relação ao ALA. Esse dado foi comprovado pela razão de fluorescência entre QA e pele normal (8,7 para MAL e 5,1 para ALA). A seletividade do MAL também se faz evidente em razões ainda maiores quando se compara a fluorescência nos CBCs e na pele normal tratada com MAL<sup>64</sup>. Em 2006, Angell-Petersen et al.<sup>47</sup>, estudaram a formação de porfirinas em QAs e CBCs tratadas com MAL em diferentes regimes de aplicação: as concentrações de MAL testadas foram de 1%, 8% e 16% e o período de aplicação variou de 3 a 28 horas. Nesse estudo, foi observado que a seletividade do MAL (relação tumor/pele normal) era alta nas primeiras horas (10x superior) e decaía com o tempo. Além disso, para as lesões nodulares, a melhor concentração de MAL foi de 16% e a profundidade de fluorescência atingida foi de 2,1 mm após 3 horas de aplicação. Em tempos de aplicação superiores, observou-se um aumento da intensidade de fluorescência nas camadas mais superficiais das lesões, além de menor seletividade<sup>47</sup>. De acordo com os dados de fluorescência, PpIX aumentou durante as 13 primeiras horas de aplicação nas QAs e CBCs superficiais. Outros autores já haviam demonstrado aumento de fluorescência após seis horas de aplicação para QAs e quatro horas para CBCs, sugerindo que a TFD com MAL em maior tempo de aplicação poderia ser de maior valor terapêutico<sup>50,64</sup>. Porém, em um estudo multicêntrico para a avaliação da dose e tempo de aplicação do MAL entre uma e 18 horas em CBCs, nenhuma diferença foi observada na resposta clínica dos grupos submetidos a três horas ou mais de aplicação do MAL. Este dado sugere

que a concentração de PpIX, após três horas de aplicação, é suficiente para induzir TFD<sup>43,47,50</sup>.

Em relação às concentrações, observou-se que MAL 8% após 18 horas de aplicação e MAL 16% após três horas induziram uma adequada intensidade de fluorescência em lesões mais espessas. Porém, o último regime apresentou a maior profundidade relativa de fluorescência (razão entre a profundidade de fluorescência e profundidade do tumor), que foi de 98%<sup>52</sup>.

## **2.7 Mecanismo de Ação da TFD**

O conceito da TFD é a indução da citotoxicidade das células proliferativas por meio de uma fonte de luz. Para que isso ocorra, são necessários três componentes: agente fotossensibilizante, luz e oxigênio<sup>9,43-50</sup>.

A técnica, em geral, consiste de duas etapas. Na primeira, o agente fotossensibilizante acumula-se nas células tumorais após a administração tópica ou sistêmica. Na segunda, o tumor fotossensibilizado é exposto à luz de comprimento de onda que coincida com o espectro de absorção do agente fotossensibilizante<sup>10,43</sup>.

Durante a TFD, o agente fotossensibilizante ligado ao tumor é ativado na presença de luz. Essa ativação leva-o do estado de repouso ao estado de ativação chamado *singlet*, de meia vida curta (Figura 8). Nessa etapa, as

moléculas podem retornar ao estado de repouso, emitindo energia em forma de fluorescência por meio da liberação de fótons ou progredir na cadeia de reações químicas, até atingir o estado *triplet* de meia vida mais longa. As moléculas no estado *triplet* podem sofrer dois tipos de reação. Na reação tipo I, as moléculas reagem diretamente com substratos biológicos para formar radicais livres, como os radicais superóxido, hidroxila e peróxido. Já na reação tipo II, as moléculas transferem sua energia diretamente ao oxigênio intracelular, formando o oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ), altamente reativo, de meia vida curta e responsável pela morte celular. A reação tipo II predomina na TFD, enquanto a reação tipo I, no tratamento que envolve 8 – MOP e ultravioleta A (PUVA).

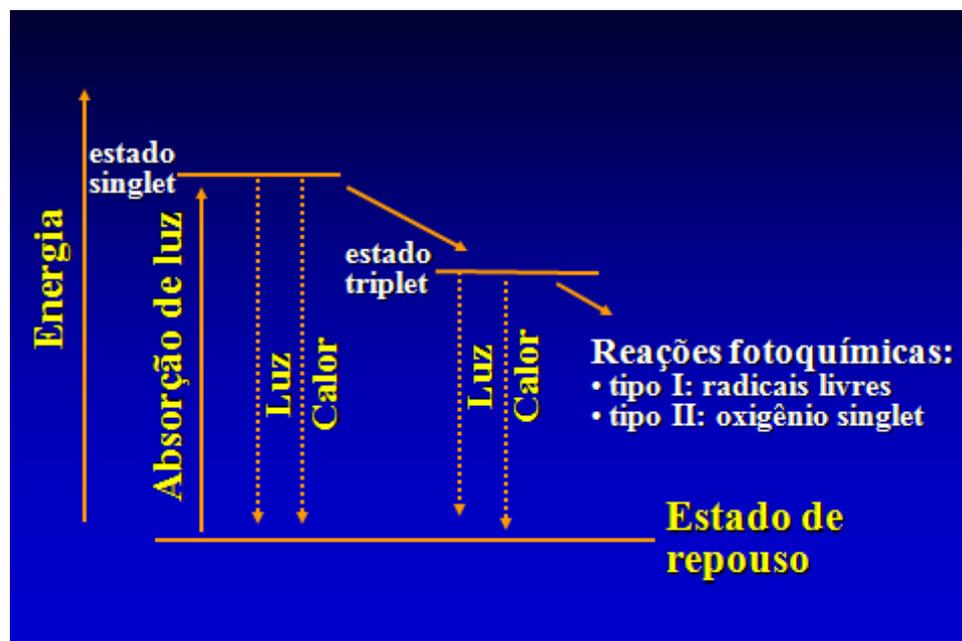


Figura 8 – Ativação do agente fotossensibilizante

Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente e a razão entre elas é influenciada pelas características do agente fotossensibilizante, dos substratos intracelulares e da concentração de oxigênio no meio. Porém, a

presença de  $^1\text{O}_2$  parece ser o principal fator para ocorrer a citotoxicidade. Em condições de anóxia, o efeito fotodinâmico é praticamente ausente. Nas condições de anóxia tecidual ou concentração de oxigênio inferior a 2%, as células tumorais tornam-se resistentes ao efeito citotóxico induzido pela TFD<sup>43,50,52</sup>.

Utilizando-se agentes fotossensibilizantes sistêmicos, como o porfimer sódico, o efeito direto induzido pelo  $^1\text{O}_2$  ocorre, porém parece ter importância secundária. Estudos histopatológicos evidenciaram hemorragia no interior do tumor em modelos experimentais e em pacientes submetidos à TFD com fotossensibilizantes sistêmicos. A necrose tumoral foi secundária à destruição da microvascularização do tumor, havendo menor participação do efeito direto induzido pelo  $^1\text{O}_2$ . Esses agentes sistêmicos agem, preferencialmente, nos vasos sanguíneos neoformados dos tumores. O dano ao endotélio acarreta quebra da função de barreira da parede do vaso, perda da junção entre as células endoteliais, exposição da membrana basal vascular com conseqüente ativação plaquetária e de polimorfonucleares neutrófilos. Essa sucessão de eventos leva à vasoconstrição das arteríolas e formação de trombos venosos e, subseqüentemente, hipóxia e necrose tecidual. Assim, a necrose isquêmica parece o principal mecanismo de destruição do tumor submetido à TFD com agentes sistêmicos, enquanto, com agentes tópicos (ALA e MAL), a citotoxicidade é decorrente da ação do  $^1\text{O}_2$ <sup>43,50,52</sup>. No caso das drogas de uso tópico, a seletividade pode ser favorecida pela maior permeabilidade anormal do *stratum corneum*, suprajacente ao tumor. A remoção desse tecido através de agentes

queratolíticos, curetagem e microdermabrasão pode aumentar a penetração das drogas tópicas nessas áreas afetadas<sup>54,57,59</sup>.

Em consequência da ação do  $^1\text{O}_2$ , a célula tumoral passa a apresentar falhas na integridade da membrana, o que acarreta alterações na permeabilidade e função de transporte entre os meios intra e extracelulares. Alterações nas membranas do núcleo, mitocôndria, lisossomos e retículo endoplasmático também ocorrem<sup>43,52,53,60</sup>. Dados utilizando microscopia de fluorescência sugerem que a fototoxicidade mitocondrial é a principal causa da morte celular induzida pela TFD<sup>65</sup>. Apesar da exata localização do efeito citotóxico, a consequência é a perda da integridade celular, havendo a liberação de fatores inflamatórios e ativação da cascata do complemento<sup>53,63,65</sup>.

Sabe-se que  $^1\text{O}_2$  e outras espécies reativas derivadas do oxigênio reagem com várias biomoléculas: colesterol, triacilglicerol, fosfolípidos e aminoácidos como triptofano, histidina, metionina e bases do ácido nucléico (guanina e guanosina). Os efeitos da TFD induzem inativação de enzimas de membrana, aumento da permeabilidade das membranas, formação de “bolhas” intracelulares, interrupção da divisão celular, falência respiratória e lise celular<sup>10,43</sup>. A indução da apoptose é mais observada com os agentes que se localizam na mitocôndria, através da inibição da produção de ATP, liberação do citocromo C e ativação das caspases<sup>12,15,43</sup>. Estudos mostram que 5-ALA, HpD e verteporfirin sensibilizam monócitos CD 14+, células dendríticas CD 83+, células de Langerhans, linfócitos CD 25+ e aumentam a produção de IL-6. Histamina, prostaglandinas, fator de ativação plaquetário

são ativados por mastócitos e, TNF, por macrófagos, durante a ativação fotodinâmica<sup>10,43,50</sup>.

Durante a TFD, a seletividade do tratamento depende da área exposta à luz e do acúmulo preferencial do agente fotossensibilizante nas células tumorais em relação ao tecido normal. Embora esse acúmulo preferencial seja pouco compreendido, alguns fatores são apontados como responsáveis. A permeabilidade da membrana das células tumorais está alterada. Esse fato pode ser comprovado pela rápida passagem de corantes, como azul de Evans e vermelho do Congo, do interior dos capilares para o estroma do tumor<sup>43,50</sup>. As fibras colágenas que integram o tumor são imaturas e semelhantes às observadas em tecido embrionário e processo de cicatrização recente. Essas fibras imaturas apresentam grande capacidade de ligação às porfirinas, constituindo um local para retenção e acúmulo do agente fotossensibilizante<sup>10</sup>. Outros fatores também colaboram para a maior captação e retenção da droga no interior das células tumorais como: rede linfática pouco desenvolvida, ligação das porfirinas a receptores de superfície de lipoproteínas de baixa densidade das células tumorais, presença de macrófagos e menor pH intracelular<sup>50</sup>.

Dessa forma, o efeito da TFD depende das características do agente fotossensibilizante, da via de administração (tópica ou sistêmica) e do tipo de tumor ou doença que é tratada.

## 2.8 Fontes de Luz na TFD

A TFD em procedimentos dermatológicos é altamente favorecida pois o acesso à lesão é muito fácil se comparada a lesões de órgãos internos. Uma fonte de luz com espectro de emissão que corresponda com o espectro de absorção do agente fotossensibilizante é condição necessária para se determinar a eficácia do procedimento.

Três diferentes grupos de fontes de luz podem ser caracterizadas para a TFD: lâmpadas de amplo espectro, lâmpadas de diodo e lasers. A ação destes aparelhos dependem fundamentalmente do espectro de emissão, da irradiância, da distribuição espacial da luz e da potência do aparelho<sup>9,43,52</sup>.

A emissão das lâmpadas de amplo espectro de alta pressão ou fluorescentes abrangem quase toda a luz visível e início do infravermelho, poupando, quase totalmente, a radiação U-V. Lâmpadas halógenas metálicas são amplamente usadas, pois são mais baratas e têm alta irradiância, que mantêm a exposição da luz constante e promovem uma TFD não muito longa. Podem ser usadas como fonte de projetores de slides (luz branca) ou equipadas com filtros ópticos que promovem a seleção da banda de luz que se deseja. Com a utilização de filtros, pode-se selecionar luz azul, vermelha, infravermelha, ou até uma combinação delas<sup>56</sup>. A lâmpada fluorescente mais usada opera na faixa da luz azul em 407 nm (banda de Soret), sendo suficiente para promover ativação fotodinâmica do 5-ALA.

Os LEDs (do inglês, “light emitting diodes”) são aparelhos compostos por semi-condutores sólidos ligados entre si e que geram luz. Fornecem uma fonte de luz confiável e de alta potência em faixas estreitas de bandas de luz (entre 20-50 nm) e podem ser distribuídas em painéis para promover a iluminação de uma superfície ampla e homogênea. Este último item é muito importante pois uma distribuição irregular da luz pode deixar de tratar partes de um tumor superficial mais extenso. São de fácil uso e de meia vida longa<sup>10</sup>.

A irradiância e a uniformidade da irradiação devem ser constantemente checados durante a TFD. As irradiâncias usadas em TFD variam de 50 a 150 mW/cm<sup>2</sup>. Em irradiâncias muito baixas o tempo de exposição à fonte de luz pode ser muito longo, enquanto que, em irradiâncias muito altas, pode ocorrer efeito térmico aditivo na TFD. Em relação à fluência, ou seja, a dose total de luz utilizada durante a sessão de TFD, os tumores malignos, em geral, necessitam de fluências maiores. Durante a irradiação do tumor ocorre um processo conhecido como fotoinativação da droga fotossensibilizante (do inglês, “photobleaching”), ou seja, à medida em que o tumor é destruído pela ativação fotodinâmica ocorre, paralelamente, inativação do agente pela absorção da luz<sup>10,43,47,52</sup>. Muitas vezes, em doses baixas do agente, um tempo excessivamente longo de exposição à luz pode ser necessário.

Ao contrário das lâmpadas, os lasers fornecem luz em comprimento de onda específico que pode ser bem compatível com o principal espectro de absorção do agente fotossensibilizante, além de um feixe de luz bastante

homogêneo. Muitos lasers já foram usados em TFD como laser de argônio, Nd: YAG, vapor de cobre, vapor de ouro e laser de diodo<sup>10</sup>. O seu uso permite a realização da TFD mais rápida, pois emitem alta fluência de luz monocromática que corresponde ao pico de absorção do agente. Porém, são aparelhos muito caros, não são portáteis, exigem muita assistência técnica e iluminam apenas pequenas áreas da pele.

As doses de luz estão intimamente relacionadas ao espectro de emissão da fonte e com o pico de absorção do agente. Após a utilização do MAL como agente, preconiza-se o uso de LED de 635 nm (luz vermelha) na dose de 37 J/cm<sup>2</sup> (Aktilite®, Photocure, Norway). Em relação ao uso do ALA disponível no comércio (Levulan Kerastisck®, Dusa Pharmaceuticals, USA), preconiza-se a lâmpada fluorescente azul de 417 nm (Blu-U®, Dusa Pharmaceuticals, USA).

Quando se avaliam as diversas publicações de TFD com lasers ou fontes de luz não-coerentes (LEDs e lâmpadas halógenas), deve ser ressaltado que as fluências só podem ser comparadas quando consideradas as respectivas irradiâncias dos aparelhos. Por exemplo, lâmpadas halógenas de amplo espectro emitem fótons em comprimentos de onda muito curtos ou muito longos que não são necessários para a ativação do agente fotossensibilizante, resultando fótons desprezados e acarretando superestimação da fluência efetiva quando comparados aos lasers<sup>10,43</sup>.

## 2.9 Aplicações na oncologia cutânea

O Metilaminolevulinato, ou MAL, e 5-ALA são as drogas aprovadas como precursores fotossensibilizantes tópicos para TFD. Há muita evidência do acúmulo preferencial de ALA e MAL pelas células neoplásicas, assim como sua conversão à PpIX. Após a aplicação desses agentes precursores, um tempo suficiente deve ocorrer para que haja penetração e conversão em porfirinas ativas. No protocolo do MAL, a droga deve ser aplicada por três horas e sob oclusão. No caso do uso do ALA, o protocolo inicial é de 14 a 18 horas<sup>9,48,49</sup>.

A escolha correta da fonte de luz é de extrema importância. Embora a luz azul possibilite ativação fotodinâmica e penetração suficiente para o tratamento das QAs superficiais, a luz vermelha oferece maior penetração no tecido, sendo mais efetiva nas lesões mais espessas como os CBCs. O protocolo de tratamento com 5-ALA é feito com fonte de luz azul fluorescente de 417 nm na dose total de 10 J/cm<sup>2</sup> enquanto que, com MAL, a fonte de luz é um LED de 635 nm na dose total de 37 J/cm<sup>2</sup><sup>9,48,49,60-62</sup>.

Os estudos publicados de TFD para tratamento das QAs, envolvem ALA e MAL. Todas as evidências mostram que a TFD é altamente eficaz. A resposta completa das lesões com MAL, após três meses de seguimento, mostram 90% de cura e cerca de 89% a 91% para ALA, no mesmo período de seguimento<sup>48,49,54,60,61,66,67</sup>. Em recente publicação, Tarstedt et al.<sup>67</sup>, observaram que apenas uma sessão de MAL-TFD, repetida três meses após se necessário, era igualmente eficaz e com índice de cura de 92%,

semelhante ao protocolo inicial. Assim, para o tratamento das QAs com MAL, preconiza-se apenas uma sessão e, se necessário, nova sessão após três meses, nos casos de resposta parcial. Cabe ressaltar que sempre se faz o preparo das lesões antes da aplicação do MAL, ou seja, uma leve curetagem das lesões com o intuito de remover as camadas mais superficiais de queratina. Touma et al.<sup>54</sup>, mostraram eficácia entre 87% e 96% no tratamento de QAs submetidas à TFD com 5-ALA em período de incubação curto de até três horas. Cabe ressaltar que sempre que se utiliza uma droga precursora com MAL ou ALA, deve obrigatoriamente, haver um tempo necessário para ocorrer penetração e conversão às porfirinas ativas.

Os estudos que comparam TFD com criocirurgia e 5-fluoracil mostram eficácia no mínimo igual ou superior com a TFD. Porém, o resultado cosmético final obtido com a TFD sempre foi superior em todas as publicações. Os estudos mostram excelentes resultados cosméticos entre 91% e 98% dos pacientes tratados<sup>60,66,67</sup>.

Em geral a TFD é bem tolerada pelos pacientes, que apresentam sintomas como dor e queimação durante o procedimento. Eritema e edema apresentam-se imediatamente após e podem permanecer por até sete dias pós tratamento. Wiegell et al.<sup>68</sup> conduziram um estudo com 20 pacientes, que mostrou que a TFD realizada com MAL foi mais tolerada e menos dolorosa do que com 5-ALA. Deve-se considerar que o tratamento de uma única lesão ou pequena área é bem tolerado pela maioria dos pacientes. Quando se faz o tratamento de lesões múltiplas ou áreas extensas em campo cancerizável, ocorre muita dor, devendo-se optar por métodos como

uso de sedação, bloqueio anestésico ou uso de aparelhos de ar refrigerado forçado sobre a área tratada.

Dentre as várias opções de tratamento, a TFD é, sem dúvida, uma excelente opção para o tratamento das QAs, sendo altamente seletiva, com índices de cura altos e oferecendo resultados cosméticos entre bons e excelentes<sup>43,69</sup>. Da mesma forma, a TFD pode ser utilizada no tratamento de múltiplas lesões e em superfícies extensas, áreas consideradas campos de cancerização.

Na pele, o campo de cancerização inclui alterações clínicas e sub-clínicas com a presença de QAs e outras alterações como lentigos solares, distúrbios de pigmentação, alterações de textura e rugas, xerose e elastose solar. Conforme abordado anteriormente, trata-se de uma área de pele fotoexposta, cronicamente danificada com múltiplas lesões de QAs, além dos outros danos causados pela radiação UV. Dessa forma, cada vez mais dá-se importância ao tratamento de todo campo, uma vez que, lesões sub-clínicas podem sofrer transformação para CEC. Assim, as lesões pré-malignas estão aparentes em áreas danificadas pela ação da radiação ultravioleta (UV) e originam-se de focos disseminados em área exposta<sup>1,62,70</sup>.

Zane et al.<sup>62</sup> avaliaram o uso do MAL e luz contínua vermelha (LED 635 nm) no tratamento da pele fotodanificada. Neste estudo, 20 pacientes foram submetidos a dois tratamentos com MAL em toda face e ocluídos por três horas e iluminados com LED contínuo de 635 nm. Após duas sessões, houve cura das QAs de 89% e redução considerável do grau de fotodano dos pacientes. A avaliação ecográfica da pele mostrou significativo aumento

da espessura da derme. Contudo, as telangectasias, hiperpigmentações e rugas profundas não mostraram resposta significativa<sup>62</sup>. Tal fato pode ser explicado uma vez que não se utilizou uma fonte de luz pulsada ou laser que respeitasse o T.R.T. (tempo de relaxamento térmico) do cromóforo. Quando se utiliza uma fonte de luz contínua tem-se o efeito fotoquímico esperado, porém não se observa fototermólise seletiva (observado com LIP e laser).

Orringer et al.<sup>71</sup>, em 2008, estudaram as alterações moleculares epidérmicas e dérmicas com TFD e laser pulsado na pele do antebraço de 25 voluntários com 5-ALA 20% ocluído por três horas. A avaliação das biópsias seriadas mostrou aumento da expressão da proteína Ki-67 nos dias dois e sete após o procedimento. A expressão da MMP-1 mostrou aumento no primeiro dia e retornou aos níveis basais em 24 horas. Foi também observado aumento da expressão de pro-colágeno I e III 30 dias após a TFD, o que é compatível com a produção de colágeno mais tardia. Nesse estudo, não houve mudança na expressão da proteína TP-53.

Issa et al.<sup>72</sup>, em 2009, observaram aumento da expressão de MMP 9 com 3 meses e de colágeno I com três e seis meses após TFD com MAL em pacientes fotoenvelhecidos com e sem QAs.

Os resultados de estudos pré-clínicos e clínicos com terapia fotodinâmica, em áreas extensas de pele que configurem campo de cancerização, sugerem que esse tratamento possa prevenir o aparecimento de QAs e neoplasias cutâneas não-melanocíticas<sup>9,43,73-78</sup>. Um dos fatores mais importantes envolvidos na prevenção de câncer de pele não-melanocítico é a frequência do tratamento<sup>74-76</sup>. Ainda há controvérsias nesse

campo, porém novos protocolos são necessários para o real estabelecimento da TFD na fotoquimioprevenção em pacientes com múltiplas QAs, no campo de cancerização. Até o presente momento, o melhor regime de TFD para a quimioprevenção é desconhecido, sendo possível que haja diferentes protocolos para grupos imunossuprimidos e imunocompetentes<sup>73-78</sup>. A melhor fonte de luz, agente fotossensibilizante, tempo entre aplicação de ALA ou MAL e exposição da luz e a melhor dose de energia ainda são parâmetros a serem estabelecidos na prevenção de novas QAs e outras neoplasias da pele.

## **3 OBJETIVOS**

1. Avaliar a melhora dos parâmetros clínicos da pele fotoenvelhecida após a TFD com Metilaminolevulinato.
2. Avaliar, através da histopatologia, as características da pele no campo de cancerização antes e após a TFD.
3. Estudar as alterações no material elastótico na derme dos pacientes tratados com a TFD, através da morfometria microscópica digital.
4. Analisar a expressão da proteína TP-53, MMP-1, pró-colágeno I e Tenascina-C na pele do campo de cancerização antes e após a TFD, através da imunohistoquímica.
5. Relacionar a eficácia de múltiplas sessões de TFD e a diminuição da atipia de queratinócitos no campo de cancerização e seu potencial efeito preventivo na carcinogênese.

## **4 MÉTODOS**

## 4.1 Pacientes

No período compreendido entre junho de 2008 e julho de 2009, foram estudados 26 pacientes provenientes do ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Do total, 18 pertenciam ao sexo feminino e oito ao sexo masculino. As idades variaram entre 35 a 90 anos, com média de 59,4 anos.

Os pacientes deveriam apresentar sinais de fotoenvelhecimento na face e, no mínimo, três lesões de QA no campo de tratamento, como critério de inclusão. Os fototipos de pele, segundo a classificação de Fitzpatrick, variaram entre I-IV. Em todos os pacientes, a área de tratamento foi a face.

Os critérios de exclusão previamente estabelecidos no estudo foram:

- história clínica de fotossensibilidade;
- doença infecciosa ativa;
- tratamento cosmético ou laserterapia na face nos últimos seis meses;
- história de uso de retinóide oral nos últimos 12 meses antes da entrada no estudo;
- alergia ao Metilaminolevulinato (MAL) ou componentes do creme tópico usado no estudo;
- história pregressa de quelóides;
- imunossupressão;
- alergia a lidocaína;
- gravidez;

- lactação; e
- falta de compreensão ou adesão dos pacientes ao protocolo utilizado.

O estudo foi aprovado pelos comitês de ética do HCFMUSP (CAPPesq – Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa- protocolo 0614/08) e da Universidade de Regensburg na Alemanha (protocolo 08/043) e pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa- protocolo 380/2009), sendo que todos os pacientes receberam e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

## **4.2 Protocolo de tratamento**

Antes do procedimento, toda a face foi limpa com solução alcoólica de clorexidine 0,5% e uma curetagem bem leve e superficial (Cureta de 3 mm – Miltex®, USA) foi realizada nas lesões de QAs, apenas com a intenção de remover as crostas e hiperqueratose das lesões (Figura 9). Imediatamente após, foi aplicada uma camada espessa do creme contendo Metilaminolevulinato (MAL) 16% (Metvix® - Galderma, França) sobre as lesões clínicas de QAs e uma fina camada sobre as demais áreas da face sem QAs, excetuando-se, cautelosamente, a área dos olhos, lábios e orifícios nasais (Figura 10).



**Figura 9** - Curetagem leve nas lesões de QAs apenas para a remoção da hiperqueratose



**Figura 10** - Aplicação do creme Metilaminolevulinato 16% sobre as QAs e em toda face

Toda a superfície da face foi, então, coberta com curativo oclusivo e opaco (papel filme transparente e papel de alumínio) evitando-se, assim, exposição à luz (Figura 11). Para cada paciente, foi utilizado, em média, 1,5 tubos de Metvix®, (Galderma, França) em toda face, por sessão (cada tubo contém duas gramas do produto). Após um período de três horas sob oclusão, todo o curativo foi removido e a pele limpa com solução fisiológica a 0,9%.



**Figura 11** - Curativo oclusivo após a aplicação do creme Metilaminolevulinato 16%

Imediatamente após a limpeza da face, o fotodiagnóstico com luz de Wood (espectro azul) foi utilizado para demonstrar a fluorescência típica da PPIX no campo cancerizável, como mostra a Figura 12.



**Figura 12** - Fotodiagnóstico do campo de cancerização com Luz de Wood

Toda a superfície da face foi iluminada com um aparelho de LED (Aktilite® - PhotoCure, Oslo – Noruega) que opera na faixa de luz vermelha a  $635 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ , com dose total de iluminação de  $37 \text{ J/cm}^2$ . O aparelho, que consiste em um painel de 128 lâmpadas de LED de alta potência que operam com irradiância variável entre 50 e  $100 \text{ mW/cm}^2$ , foi posicionado a 5 cm da superfície, sendo que cada hemi-face foi iluminada separadamente, assegurando-se que toda a área foi completamente iluminada (Figura 13).



**Figura 13** - Iluminação com aparelho LED (Akte® - PhotoCure, Oslo – Noruega) após a remoção do curativo e proteção ocular

Todos os 26 pacientes foram submetidos a três sessões de TFD conforme acima descrito, em intervalos mensais. Porém, o tempo de aplicação do composto Metvix® (Galderma, França) foi reduzido para 90 minutos nas segunda e terceira sessões.

Durante a iluminação, utilizou-se um aparelho que emite ar resfriado forçado (Zimmer®, Elektromedizin Corp – Alemanha). Nenhum outro método ou droga analgésica foram usados para aliviar a dor dos pacientes neste estudo. Todos os pacientes foram orientados para não se expor à luz solar por 48 horas após a sessão de tratamento e a aplicar fotoprotetor três vezes ao dia, por sete dias (FPS 50+).

### 4.3 Avaliação clínica

Durante o tratamento, todos os pacientes foram questionados para avaliarem a intensidade da dor, através de uma escala análoga visual (do inglês “visual analog scale”), considerando-se 0 (zero) como ausência de dor e, 10 (dez) como a dor mais severa<sup>79</sup>. Os efeitos adversos locais e sistêmicos foram observados durante o tratamento e nas visitas de seguimento após a TFD.

A avaliação clínica foi feita através de fotografias digitais antes do primeiro tratamento (T0), antes do segundo tratamento (T1), antes do terceiro tratamento (T2) e três meses após a última sessão de TFD (T3). O grau de severidade do fotoenvelhecimento também foi acessado nas mesmas visitas e quantificados segundo uma escala de cinco pontos (0 a 4) baseada nos estudos prévios de Dover et al.<sup>40</sup> e Zane et al.<sup>62</sup>, por dois médicos dermatologistas não envolvidos no presente estudo (Tabela 1).

Todos os pacientes foram avaliados e mensurados para:

- fotoenvelhecimento global da face;
- pigmentação difusa;
- rugas finas;
- rugas profundas;
- palidez facial;
- aspereza;
- eritema; e
- telangiectasia.

O número de QAs presentes no campo de tratamento também foi avaliado antes e após cada sessão.

**Tabela 1- Escala de avaliação do fotoenvelhecimento de 5 pontos (adaptado de Dover et al.<sup>38</sup> e Zane et al.<sup>62</sup>)**

<b>Fotoenvelhecimento global da face</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0- Pele facial macia ao toque, sem rugas ou alterações de pigmentação em quaisquer áreas – malar, frente ou Peri-oral</li> <li>1- Uma area com aspereza, despigmentação (hiper ou hipopigmentação) ou rugas finas.</li> <li>2- Duas áreas com aspereza, despigmentação ou rugas finas ou 1 área com aspereza, despigmentação e rugas finas.</li> <li>3- Três áreas com aspereza, despigmentação ou rugas finas ou 2 áreas com aspereza, despigmentação e rugas finas.</li> <li>4- Quatro áreas com aspereza e despigmentação ou rugas finas ou 3 áreas com aspereza, despigmentação e rugas finas</li> </ul>
<b>Pigmentação difusa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0- Pigmentação normal e uniforme</li> <li>1- Pequenas areas com discreta hipo ou hiperpigmentação</li> <li>2- Pequenas areas com moderada hipo ou hiperpigmentação</li> <li>3- Moderadas areas com moderada hipo ou hiperpigmentação, grandes áreas com discreta hipo ou hiperpigmentação ou pequenas áreas com intensa hipo ou hiperpigmentação</li> </ul>
<b>Eritema facial</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0- sem evidência de eritema</li> <li>1- pequenas areas de eritema leve</li> <li>2- pequenas areas de eritema moderado ou moderadas áreas com eritema leve</li> <li>3- moderadas areas de eritema, grandes áreas de eritema leve ou pequenas áreas de eritema</li> </ul>
<b>Telangiectasia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0- sem evidência de telangiectasia</li> <li>1- raras e espaçadas</li> <li>2- algumas e discretas</li> <li>3- moderadas e próximas</li> <li>4- muitas e difusas</li> </ul>
<b>Rugas finas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 – sem evidência de rugas</li> <li>1- raras</li> <li>2- algumas e discretas</li> <li>3- moderadas e próximas</li> <li>4- muitas e difusas</li> </ul>
<b>Rugas profundas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0- sem evidência de rugas profundas</li> <li>1- superficiais em apenas uma área (frente, glabella, peri-orbital, nasolabial)</li> <li>2- superficiais em mais de uma área ou moderadas em apenas uma</li> <li>3- moderadas em mais de uma área ou profunda em apenas um</li> <li>4- profundas em mais de uma área</li> </ul>
<b>Palidez</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 – pele rosada</li> <li>1- discreta palidez ou amarelamento</li> <li>2- palidez com moderada sugestão de amarelamento</li> <li>3- palidez com forte amarelamento</li> </ul>
<b>Aspereza</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 – pele macia</li> <li>1- pele macia com ocasional aspereza</li> <li>2- aspereza leve</li> <li>3- aspereza moderada</li> <li>4- aspereza intensa</li> </ul>

#### **4.4 Avaliação histopatológica e imunohistoquímica**

Todos os pacientes foram submetidos à biópsia de pele antes da primeira sessão e três meses após a última. Foi utilizado um instrumento cilíndrico de “punch” de 3 mm (Miltex®, USA) para a sua realização, sob condições estéreis, após anestesia local com lidocaína 1% sem vasoconstritor (Xylestesin®, Cristalia). O local da biópsia foi suturado com fio de monofilamento de Nylon 5-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Brasil). Nós selecionamos uma área de pele clinicamente normal ao exame dermatológico no campo de cancerização como o local padrão das biópsias, com o intuito de evitar qualquer lesão de QA. Em todos os 26 pacientes, a área selecionada foi a pré-auricular, assegurando que a segunda biópsia sempre fosse realizada a pelo menos 0,5 cm distante da primeira, eliminando a possibilidade de alterações histológicas secundárias ao processo cicatricial.

Todo o material proveniente das biópsias foi fixado em formol 10%, incluído em parafina, cortado em cortes de três micrômetros e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). As fibras elásticas também foram avaliadas neste estudo. As lâminas preparadas foram submetidas à coloração de Weigert e contra-coradas com a técnica de Van Gieson. Todo o estudo histopatológico foi desenvolvido no laboratório de Dermatopatologia do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP. A combinação das duas colorações aumenta o contraste entre as fibras e o plano de fundo do campo visual, permitindo maior precisão do estudo morfométrico digital antes e

após o tratamento, quantificado através da análise de imagem (Image-Proplus versão 5.1, Media Cybernetics®). As imagens foram avaliadas e os resultados dos “pixels” selecionados expressos como percentual da área total analisada. A técnica quantifica a quantidade de material elastótico antes e após através do uso do software.

As variáveis histológicas avaliadas neste presente estudo foram comparadas antes e após as três sessões de TFD e classificadas de acordo com a Tabela 2.

**Tabela 2 - Variáveis histológicas avaliadas no estudo**

---

1- Espessura da epiderme (mm)
2- Grau de atipia celular – definida como a intensidade da atipia dos queratinócitos em: + (leve) ++ (moderada) +++ (intensa)
3- Quantidade da atipia celular – definida como a extensão do envolvimento da epiderme em: 1/3 – apenas um terço da epiderme apresenta atipia 2/3 – dois terços com atipia 3/3 – toda a epiderme apresenta atipia celular
4- Grau de Elastose - definida como a intensidade do material elastótico presente na derme em: + (FIBRILAR) ++ (FIBRILAR e AMORFA) +++ (AMORFA)
5- Camada de colágeno sub-epidérmico (mm) – definida como:

A medida obtida da camada basal até o aparecimento da elastose solar na derme superior, observada no campo histológico.

---

A análise imunohistoquímica foi realizada pelo Departamento de Dermatologia da Universidade de Regensburg, na Alemanha, sob a supervisão do Prof. Dr. Rolf-Markus Szeimies. Todo material incluído em

parafina foi submetido a cortes finos de três micrômetros e estudados para a expressão das proteínas TP-53, pró-colágeno I, MMP-1 e Tenascina-C (Tn-C). As colorações foram feitas simultaneamente, sob as mesmas condições, com os seguintes anticorpos e suas respectivas diluições: - Anti-TP-53 (TP-53, Dako- Glostrup, Dinamarca, diluição 1:100); - Anti-Pró – Colágeno I (Procollagen-I, Abcam – Cambridge, Reino Unido, diluição 1:100); - Anti-MMP-1 (MMP-1, Imgenex – Sorrento Valley, CA, Estados Unidos, diluição 1:25); - anti-Tenacina-C (Tenacin-C, Biohit- Helsinki, Finlândia, diluição 1:400). O método utilizado para a mensuração foi a morfometria microscópica digital, o mesmo para material elastótico acima descrito e, o programa, Image-ProPlus versão 5.1, Media Cybernetics®). As imagens foram avaliadas e os resultados dos “pixels” selecionados expressos como percentual da área total analisada. A técnica faz uma análise objetiva e quantifica a expressão dos reagentes específicos estudados antes e após a TFD, através do uso do software.

#### **4.5 Análise estatística**

Todos os dados obtidos neste estudo foram primeiramente testados sob a hipótese da distribuição normal usando o teste Kolmogorov-Smirnov. Os resultados clínicos e histopatológicos foram comparados com o teste estatístico não-paramétrico de Wilcoxon. Os resultados imunohistoquímicos foram comparados pelo teste paramétrico de t de Student. Da mesma forma,

para a mensuração do material elástico, o teste paramétrico de t de Student foi empregado. Os testes de correlação não-paramétricos de Spearman e Pearson foram também empregados para a determinação do grau de associação dos achados histopatológicos e imunohistoquímicos. Valores estatisticamente significativos foram considerados quando  $p < 0,05$ . Todos os dados foram avaliados no programa *PASW Statistics 18* para Windows.

## **5 RESULTADOS**

## 5.1 Avaliação clínica

Todos os vinte e seis pacientes completaram o estudo. Durante a iluminação com LED e com uso de ar resfriado forçado, os pacientes toleraram bem a dor, sendo que as notas variaram entre três e sete com valor médio de 4,4, segundo a escala visual adotada (VAS)<sup>79</sup>. Em geral, duas etapas de iluminação foram suficientes para tratar homoganeamente toda a face. Porém, em alguns casos de múltiplas QAs na região frontal, foram realizadas três etapas de iluminação, assegurando que nenhuma área tivesse sido sub-tratada. Em nenhum momento houve necessidade de interrupção do tratamento ou fracionamento da iluminação. Como já esperado, os efeitos adversos mais comuns foram eritema e edema (Figura 14). O tempo médio para resolução desses efeitos foram de cinco dias. Erosões e crostas foram observados nos locais onde as QAs estavam presentes e se resolveram em até sete dias (Figura 15). Não foram observadas infecções secundárias. Também não foram evidenciados efeitos colaterais sistêmicos ou distúrbios de pigmentação e de cicatrização até o final do estudo.



**Figura 14** - Eritema e edema imediatamente após a iluminação com LED (Aktilite® - PhotoCure, Oslo – Noruega)



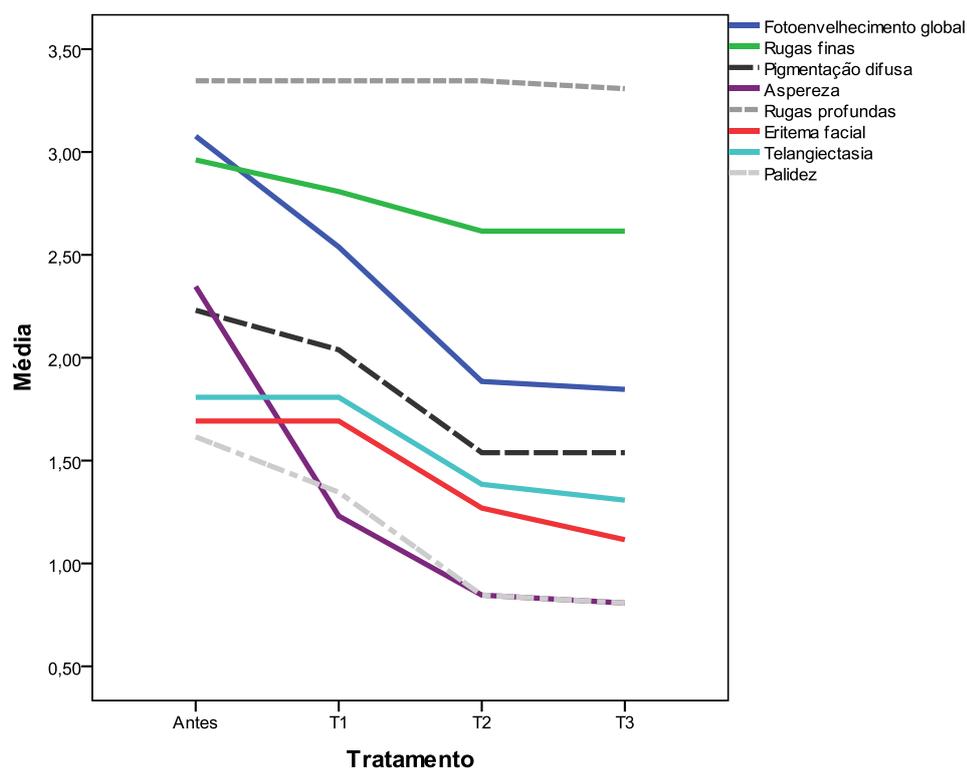
**Figura 15** - Quinto dia após a TFD. Observar as crostas e descamação como parte da resolução do processo

As variáveis clínicas utilizadas para a avaliação do fotoenvelhecimento da face foram previamente mencionadas e mensuradas antes e após por dois dermatologistas não envolvidos com o estudo, conforme anteriormente citado. Todos os resultados referentes aos parâmetros clínicos estão dispostos na Tabela 3. A avaliação do índice de fotoenvelhecimento global da face melhorou, apresentando valor de  $3,08 \pm 0,74$  em T0 (pré-tratamento),  $2,54 \pm 0,74$  em T1 (antes da segunda sessão),  $1,88 \pm 0,71$  em T2 (antes da terceira sessão) e  $1,85 \pm 0,67$  em T3 (3 meses após a terceira sessão de TFD). A diminuição dos valores mostra redução da severidade do fotodano global da face, conforme pode ser observado na Figura 16. Da mesma forma, os índices para rugas finas, pigmentação difusa, palidez, aspereza, eritema facial e telangiectasias também melhoraram (Figura 16). O parâmetro clínico “rugas finas” mostrou valor inicial de  $2,96 \pm 1,04$  em T0 (antes do tratamento), diminuindo para  $2,81 \pm 1,13$  em T1,  $2,62 \pm 1,17$  em T2 e  $2,62 \pm 1,17$  em T3. Da mesma forma, a diminuição dos valores retrata a melhora do parâmetro estudado. A avaliação do índice para “pigmentação difusa” inicial era  $2,23 \pm 0,71$  em T0,  $2,04 \pm 0,77$  em T1,  $1,54 \pm 0,71$  em T2 e  $1,54 \pm 0,71$  em T3. Este parâmetro clínico, apresentando diminuição dos valores, também melhorou com a TFD. O índice inicial para “palidez facial” era  $1,62 \pm 0,64$  em T0,  $1,35 \pm 0,75$  em T1,  $0,85 \pm 0,67$  em T2 e  $0,81 \pm 0,63$  em T3. A gradual diminuição das notas observada também é condizente com a melhora do parâmetro. A avaliação inicial do índice de “aspereza” era  $2,35 \pm 0,94$  em T0, diminuindo para  $1,23 \pm 0,82$  em T1,  $0,85 \pm 0,78$  em T2 e  $0,81 \pm 0,75$  em T3. Esses valores também

revelam melhora do parâmetro. A avaliação do índice para “eritema facial” era  $1,69 \pm 0,62$  em T0,  $1,69 \pm 0,62$  em T1,  $1,27 \pm 0,45$  em T2 e  $1,12 \pm 0,33$  em T3. Neste parâmetro estudado, a queda nos valores foi maior no período compreendido entre a terceira sessão de TFD (T2) e a avaliação final 3 meses após (T3). A avaliação do índice para “telangiectasias” era  $1,81 \pm 0,75$  em T0,  $1,81 \pm 0,75$  em T1,  $1,38 \pm 0,57$  em T2 e  $1,31 \pm 0,55$  em T3. Da mesma forma que no parâmetro “eritema facial”, as telangiectasias também mostraram maior redução nos valores entre T2 (antes do terceiro tratamento) e T3 (três meses após o terceiro tratamento). O teste não-paramétrico de Wilcoxon mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre os índices em T0 e T3 e entre T1 e T2 para todas as variáveis estudadas. Interessante notar que não foi observada diferença estatística entre T2 e T3 para as variáveis mencionadas, exceto para eritema facial, que melhorou entre T2 e T3 ( $p = 0,046$ ) (Figura 16). Não houve diferença estatisticamente significativa para a variável clínica rugas profundas, embora pequena melhora tenha sido observada (índice em T0  $3,35 \pm 0,89$ , em T1  $3,35 \pm 0,89$ , em T2  $3,35 \pm 0,89$  e em T3  $3,31 \pm 0,88$ ) (Tabela 3 e Figura 16).

**Tabela 3 - Descrição das variáveis clínicas. Na coluna “média” estão dispostos os valores médios de cada parâmetro avaliado antes e após cada tratamento. Tx = tratamento**

Variável clínica	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Fotoenvelhecimento global pré	3,08	3,0	0,74	2,0	4,0
Fotoenvelhecimento global após Tx1	2,54	2,5	0,71	1,0	4,0
Fotoenvelhecimento global após Tx2	1,88	2,0	0,71	1,0	3,0
Fotoenvelhecimento global apósTx3	1,85	2,0	0,67	1,0	3,0
Rugas finas pré	2,96	3,0	1,04	1,0	4,0
Rugas finas após Tx1	2,81	3,0	1,13	1,0	4,0
Rugas finas apósTx2	2,62	3,0	1,17	1,0	4,0
Rugas finas apósTx3	2,62	3,0	1,17	1,0	4,0
Pigmentação difusa pré	2,23	2,0	0,71	1,0	3,0
Pigmentação difusa após Tx1	2,04	2,0	0,77	1,0	3,0
Pigmentação difusa Tx2	1,54	1,0	0,71	1,0	3,0
Pigmentação difusa após Tx3	1,54	1,0	0,71	1,0	3,0
Palidez pré	1,62	2,0	0,64	1,0	3,0
Palidez após Tx1	1,35	1,0	0,75	0,0	3,0
Palidez após Tx2	0,85	1,0	0,67	0,0	2,0
Palidez após Tx3	0,81	1,0	0,63	0,0	2,0
Aspereza pré	2,35	2,5	0,94	1,0	4,0
Aspereza após Tx1	1,23	1,0	0,82	0,0	3,0
Aspereza após Tx2	0,85	1,0	0,78	0,0	3,0
Aspereza após Tx3	0,81	1,0	0,75	0,0	3,0
Rugas profundas pré	3,35	3,5	0,89	0,0	4,0
Rugas profundas após Tx1	3,35	3,5	0,89	0,0	4,0
Rugas profundas após Tx2	3,35	3,5	0,89	0,0	4,0
Rugas profundas após Tx3	3,31	3,0	0,88	0,0	4,0
Eritema facial pré	1,69	2,0	0,62	1,0	3,0
Eritema facial após Tx1	1,69	2,0	0,62	1,0	3,0
Eritema facial após Tx2	1,27	1,0	0,45	1,0	2,0
Eritema facial após Tx3	1,12	1,0	0,33	1,0	2,0
Telangiectasia pré	1,81	2,0	0,75	0,0	3,0
Telangiectasia após Tx1	1,81	2,0	0,75	0,0	3,0
Telangiectasia após Tx2	1,38	1,0	0,57	0,0	2,0
Telangiectasia após Tx3	1,31	1,0	0,55	0,0	2,0



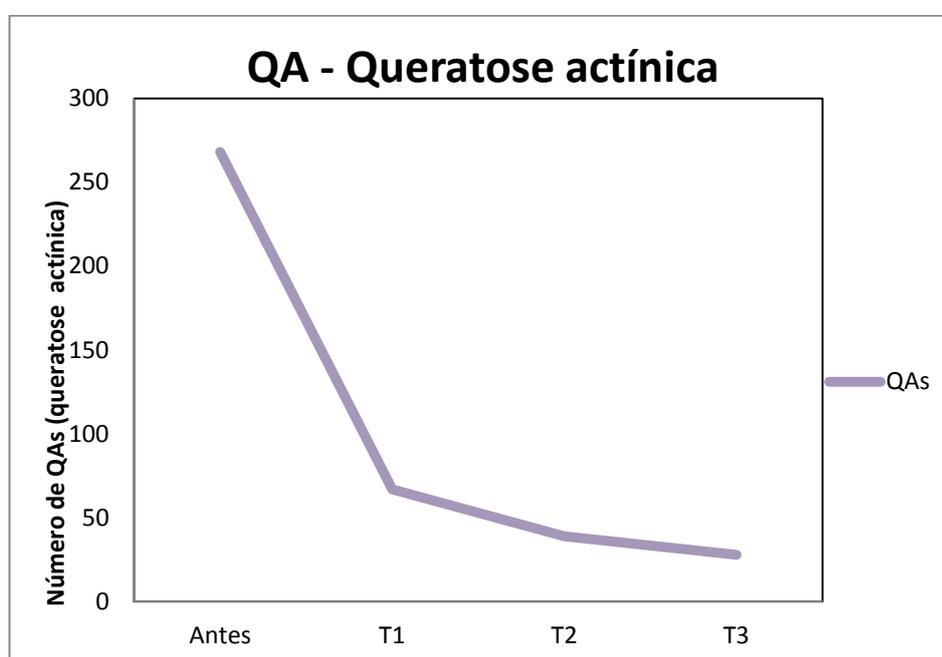
Variável	antes-T3	T1-T2	T2-T3
	p-valor	p-valor	p-valor
Fotoenvelhecimento global	<0,001	<0,001	0,317
Rugas finas	0,003	0,025	1,000
Pigmentação difusa	<0,001	<0,001	1,000
Palidez	<0,001	<0,001	0,317
Aspereza	<0,001	0,002	0,317
Rugas profundas	0,317	1,000	0,317
Eritema facial	<0,001	0,002	0,046
Telangiectasia	0,002	0,001	0,157

Teste de Wilcoxon  $p < 0,05$

**Figura 16** - Valores estatísticos entre os tratamentos e seus índices de melhora clínica (fotoenvelhecimento global, rugas superficiais, pigmentação difusa, aspereza, rugas profundas, eritema facial, telangiectasia, palidez). Notar a diminuição entre os valores iniciais e finais para todos os parâmetros clínicos estudados, com exceção de “rugas profundas”. Entre T2 e T3, somente houve diferença estatisticamente significativa para o parâmetro “eritema facial”

O número total de QAs (contagem de lesões todos os 26 pacientes) antes do tratamento, em T0, era 268. Em T1, ou seja 30 (trinta) dias após a realização da primeira sessão de TFD, o número total diminuiu para 67, com índice de resposta de 75%. Trinta dias após a segunda sessão em T2, 39 QAs foram observadas, com índice de resposta de 85,4%. Em T3 (três

meses após a terceira sessão), 28 QAs foram observadas, com índice de resposta de 89,5% (Figura 17). Porém, não se observou diferença expressiva entre T2 e T3, o que mostra que três sessões de TFD não foi superior a duas. Do total de 26 pacientes, 16 não apresentavam nenhuma lesão clínica de QA ao final do estudo, sendo que 10 ainda apresentavam alguma lesão.



**Figura 17** - Número de QAs (contagem de todas as lesões) em T0, T1, T2 e T3. Há diminuição do número das lesões após a TFD. O número total inicial era de 268 QAs e, após três sessões de TFD, diminuiu para 28, com índice de remissão final de 89,5%. Notar que a remissão foi mais expressiva entre T0 (antes do tratamento) e T1 e T2. A terceira sessão de TFD praticamente não mostra remissão expressiva das QAs

As Figuras 18, 19, 20 e 21 ilustram as melhoras clínicas observadas antes e após a TFD.



**Figura 18** – Paciente JS. Melhora clínica da pele do campo de cancerização após a TFD (direita). Observe a melhora do envelhecimento global da face, assim como acentuada diminuição das QAs no campo



**Figura 19** - Paciente LRV. Melhora clínica da pele tratada com a TFD (direita), com diminuição das lesões de QAs e atenuação das rugas finas no campo



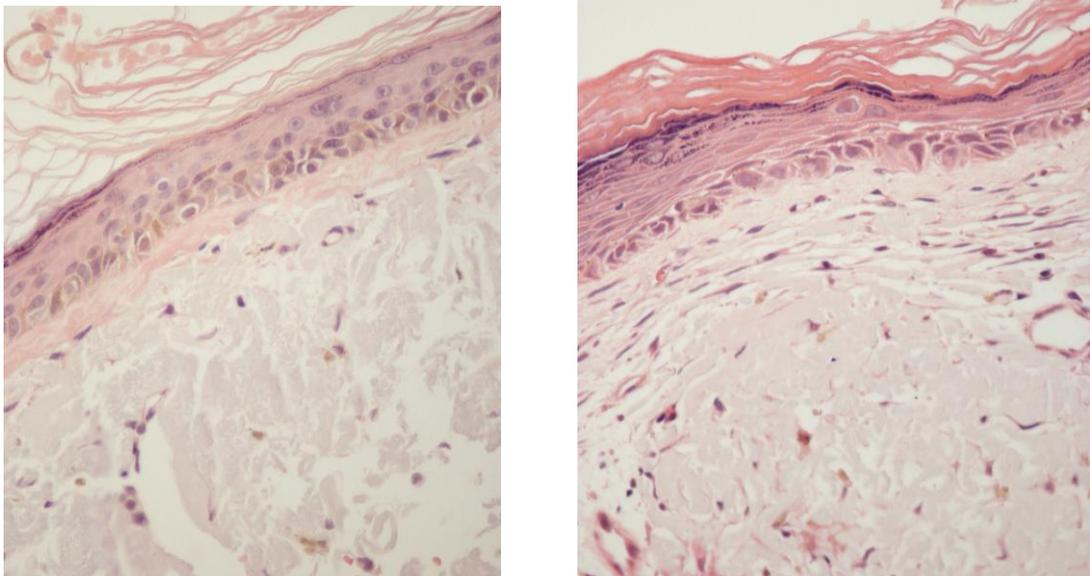
**Figura 20** - Paciente RM. Melhora clínica do parâmetro “telangiectasias” após a TFD (direita)



**Figura 21** - Paciente AC. Rejuvenescimento facial após a TFD (direita) com acentuada diminuição das QAs no campo tratado

## 5.2 Avaliação histopatológica

Todos os pacientes mostraram significativas alterações nos parâmetros histopatológicos estudados após a TFD com MAL (Tabela 4). A avaliação do “grau de atipia” mostrou melhora de  $1,46 \pm 0,58$  em T0 (antes da TFD) para  $0,69 \pm 0,47$  em T3, ou seja, três meses após a última sessão de tratamento, quando a biópsia final foi realizada ( $p < 0,001$ ) (Figura 22).



**Figura 22** - Fotomicrografia da pele do campo de cancerização antes (esquerda) e após (direita) a TFD. A epiderme mostra diminuição da intensidade da atipia celular e de sua extensão. H.E. 400x

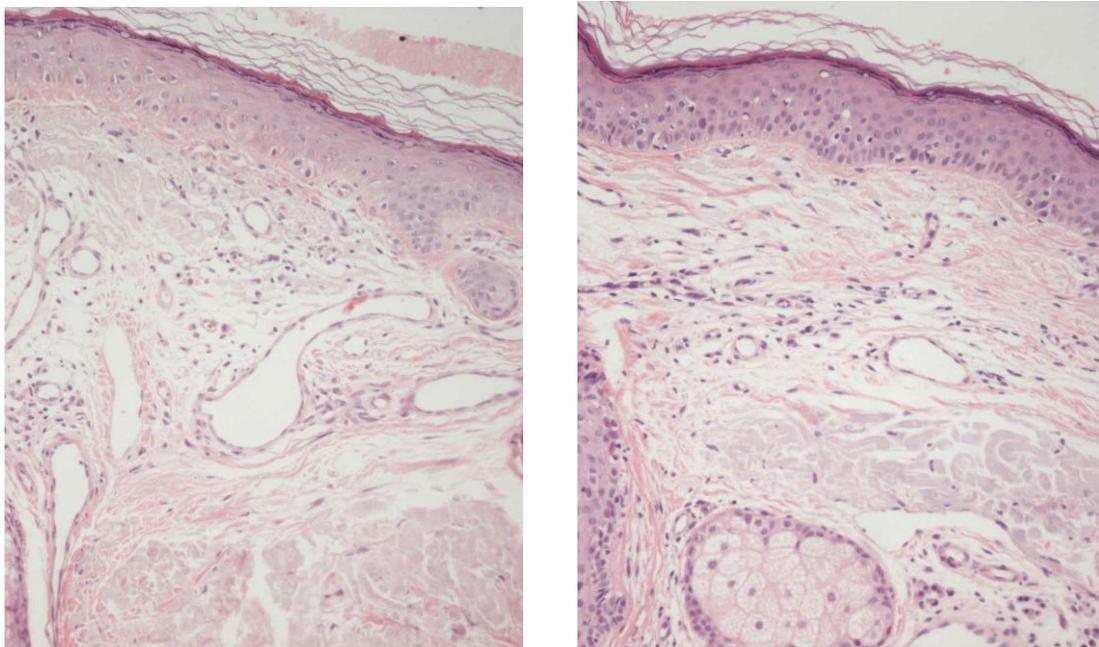
**Tabela 4 - Medidas histológicas referentes às variáveis são apresentadas**

Variável	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Grau de atipia pré	1,46	1,00	0,58	1,00	3,00
Grau de atipia após	0,69	1,00	0,47	0	1,00
Quantidade de atipia pré	0,49	0,33	0,19	0,33	1,00
Quantidade de atipia após	0,26	0,33	0,20	0	0,67
Espessura da epiderme pré (mm)	0,08	0,08	0,02	0,04	0,10
Espessura da epiderme após (mm)	0,07	0,08	0,02	0,03	0,11
Grau de elastose pré	1,77	2,00	0,65	1,00	3,00
Grau de elastose após	1,38	1,00	0,64	1,00	3,00
Camada de colágeno sub-epidérmica (mm)	0,04	0,03	0,05	0,01	0,30
Camada de colágeno sub-epidérmica (mm)	0,17	0,06	0,43	0,01	2,25

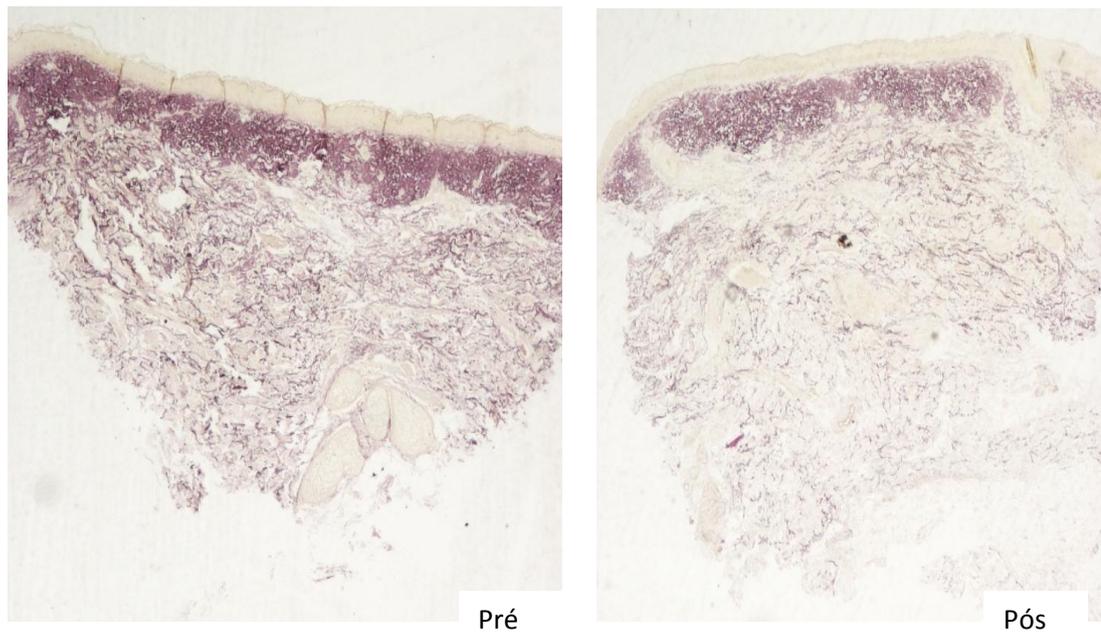
**Nota:** Observa-se que o grau de atipia pré tratamento é maior que o grau de atipia após o tratamento. Da mesma forma, os valores para “quantidade de atipia” e “grau de elastose” também diminuíram com o tratamento. A variável “camada de colágeno sub-epidérmica” mostrou aumento após a TFD. As variáveis “espessura da epiderme” e “camada de colágeno sub-epidérmica” foram medidas em mm

Da mesma forma, o parâmetro “quantidade de atipia” também melhorou com redução de  $0,49 \pm 0,19$  em T0 para  $0,26 \pm 0,20$  em T3 ( $p < 0,001$ ) (Figuras 22 e 23). O parâmetro “espessura da epiderme” era  $0,08 \pm 0,02$  em T0 e  $0,07 \pm 0,02$  em T3, não sendo observada diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,214$ ). A avaliação do “grau de elastose” melhorou, com redução do índice de  $1,77 \pm 0,65$  em T0 para  $1,38 \pm 0,64$  após três meses em T3 ( $p = 0,002$ ). A avaliação histopatológica permitiu evidenciar que houve nítida diminuição das massas de fibras elásticas amorfas e aumento de fibras fibrilares após as sessões de TFD (Figuras 23

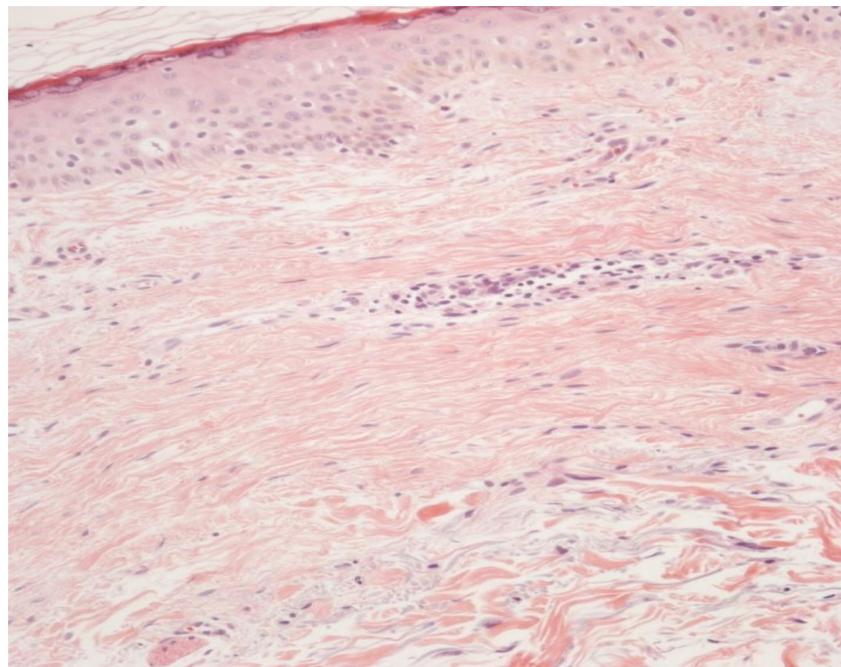
e 24). O parâmetro “camada de colágeno sub-epidérmica” demonstrou um significativo aumento no índice de  $0,04 \pm 0,05$  em T0 para  $0,17 \pm 0,43$  em T3 ( $p = 0,001$ ). Esse aumento reflete nova deposição de colágeno na derme após a TFD (Figuras 23 e 25). O teste não-paramétrico de Wilcoxon mostrou diferença estatisticamente significativa para todas as variáveis histológicas com exceção da espessura da epiderme (Figura 26).



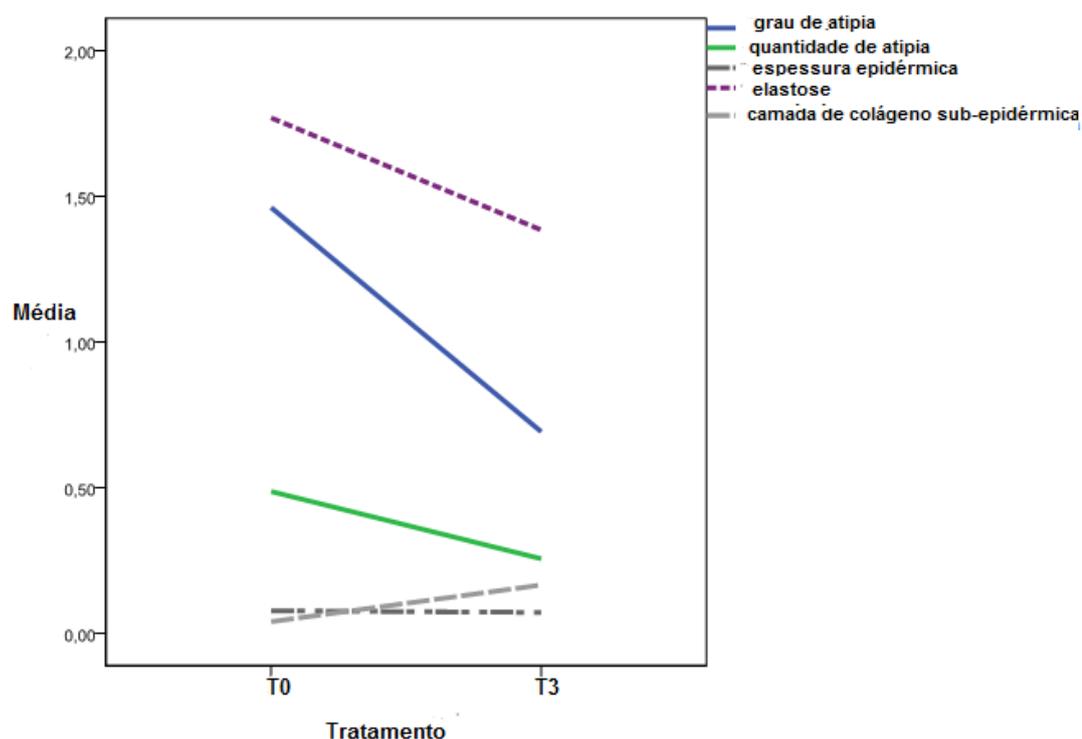
**Figura 23** - Fotomicrografia do campo de cancerização antes (esquerda) e após (direita) a TFD. Observar reestruturação da epiderme, neo-formação de colágeno na camada sub-epidérmica, diminuição da elastose e dos vasos sanguíneos dilatados na derme superior. H.E. 200x



**Figura 24** - Fotomicrografia do campo de cancerização antes (esquerda) e após (direita) a TFD. Observar diminuição do material elastótico na derme superior e média após a TFD. Coloração de Weigert contra-corada com a técnica de Van Gieson. 40x



**Figura 25** - Fotomicrografia após a TFD. Observar as fibras colágenas abaixo da membrana basal epidérmica assim como na derme superior. H.E. 200x



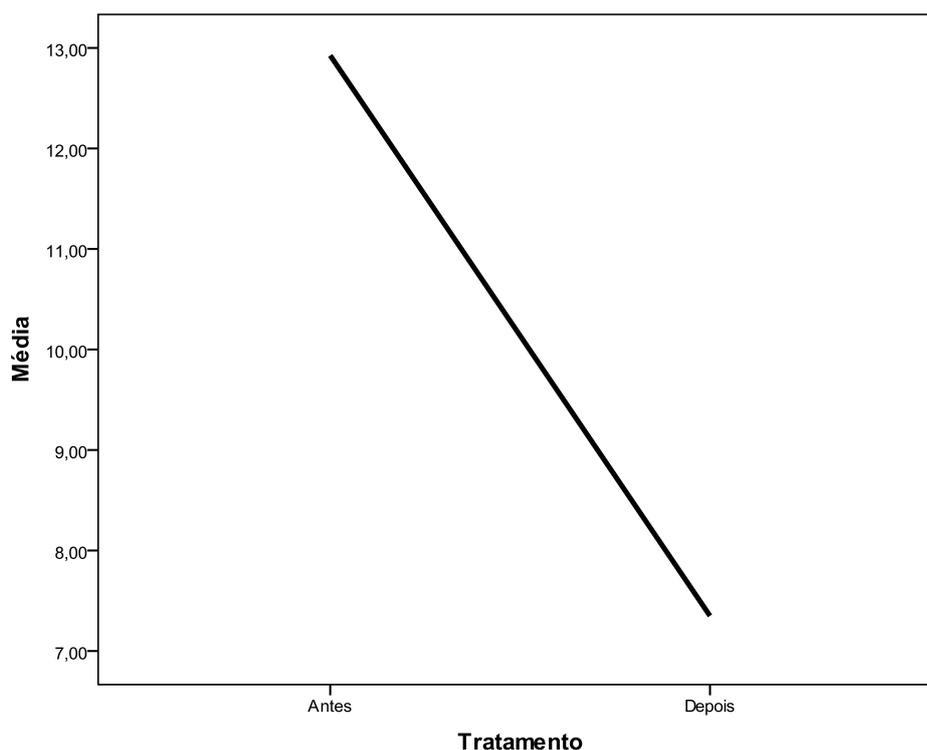
Variáveis	Valor de p
Grau de atipia	<0,001
Quantidade de atipia	<0,001
Espessura epidérmica	0,214
Elastose	0,002
Camada de colágeno sub-epidérmica	0,001

Teste de Wilcoxon  $p < 0,05$

**Figura 26** - Variáveis histológicas avaliadas no estudo. Com exceção da variável “espessura epidérmica”, todas as outras variáveis apresentaram melhora significativa após a TFD

Baseado no coeficiente de correlação de Spearman, observamos uma correlação positiva entre as variáveis “grau de atipia” e “quantidade de atipia”. Em T0, ou seja, pré TFD os índices para as duas variáveis eram correlatos ( $p = 0,028$ ). Já em T3, após os múltiplos tratamentos, a correlação foi ainda mais evidente ( $p < 0,001$ ). Isso demonstra que há uma paridade entre as variáveis, ou seja, quando uma melhora a outra também melhora.

O estudo morfométrico digital do material elástico foi quantificado pela análise de imagem através do programa Image-ProPlus versão 5.1, Media Cybernetics® (Figura 19). Em T0, ou seja, pré tratamento o índice era  $12,93 \pm 2,40$  e diminuiu para  $7,35 \pm 1,44$  em T3, caracterizando uma nítida diminuição da quantidade de material elástico depositado na derme após as sessões de TFD ( $p = 0,013$ , teste *t* de Student) (Figura 27). Para se evitar erros na interpretação das mensurações, foram tomadas três medidas das áreas analisadas no programa Image-ProPlus, antes e após o tratamento e submetidos à análise estatística.



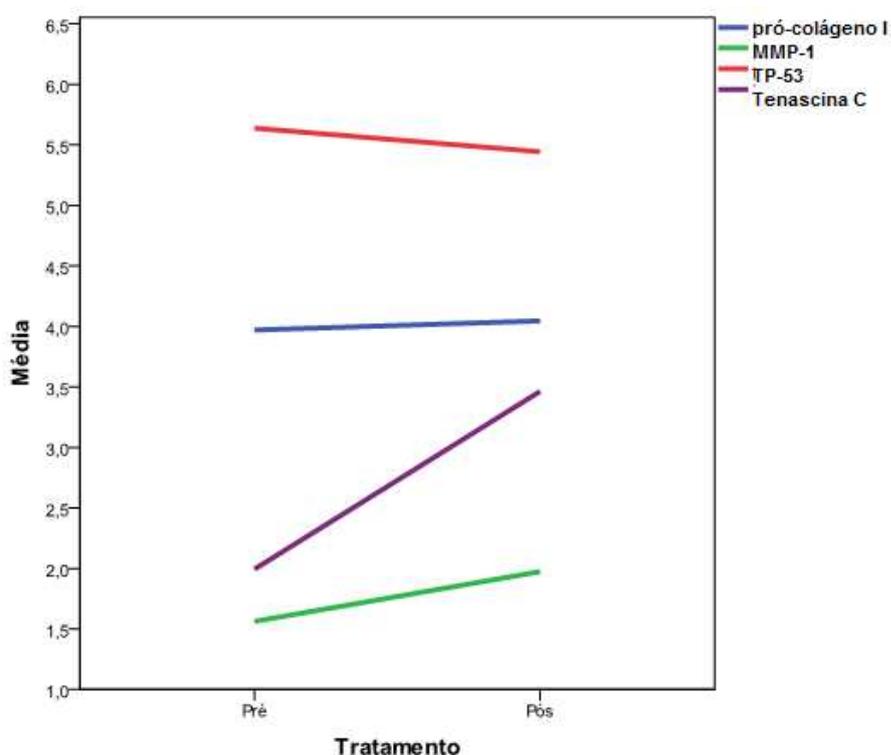
Tratamento	média (DP)	IC(95%)	Valor de p
Antes e após	5,58 (10,64)	1,28-9,87	0,013

DP: Desvio padrão; IC(95%): Intervalo de confiança de 95% para a média.

**Figura 27** - Material elástico antes e após o tratamento com TFD. Observa-se uma diminuição expressiva do valor obtido através da morfometria digital microscópica

### 5.3 Avaliação imunohistoquímica

A avaliação imunohistoquímica do presente estudo foi feita com os marcadores para TP-53, MMP-1, pró-colágeno I e Tenascina-C. A técnica utilizada foi previamente descrita e o método para a mensuração foi a morfometria microscópica digital, o mesmo para material elastótico acima descrito e, o programa, Image-ProPlus versão 5.1, Media Cybernetics®. As imagens foram avaliadas e os resultados dos “pixels” selecionados expressos como percentual da área total analisada. A técnica faz uma análise objetiva e quantifica a expressão dos reagentes específicos estudados antes e após a TFD, através do uso do software. Os resultados de todos os marcadores estão dispostos na Figura 28 e nas Tabelas 5 e 6.



**Figura 28** - Expressão dos marcadores pró- colágeno I, MMP- 1, TP53 e Tenascina C antes e depois do tratamento nos pacientes com campo de cancerização

**Tabela 5 - Características dos marcadores pro-colágeno I, MMP-1, TP-53 e Tenascina-C nos pacientes com campo de cancerização**

Marcador	Tratamento	Média (DP)	Mediana	Mínimo	Máximo	Teste de normalidade <sup>§</sup> Valor de p
Pro-colágeno I	Pré	3,97 (4,88)	1,77	0,22	20,24	0,093
	Pós	4,05 (5,06)	3,00	0,30	25,39	0,072
MMP -1	Pré	1,56 (0,97)	1,44	0,16	3,56	0,794
	Pós	1,97 (1,09)	1,85	0,58	4,75	0,693
TP-53	Pré	5,64 (3,63)	4,71	0,52	12,94	0,251
	Pós	5,44 (3,14)	4,84	1,31	11,47	0,505
Tenascina C	Pré	1,99 (1,51)	1,61	0,17	5,78	0,395
	Pós	3,46 (3,31)	2,63	0,23	15,16	0,262

MMP-1: metaloproteinase 1

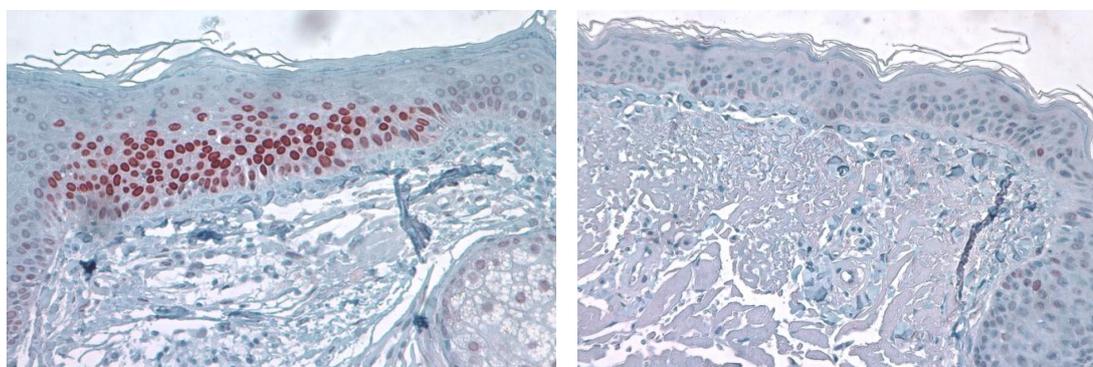
**Tabela 6 - Comparação antes e após tratamento para as medidas dos marcadores pró-colágeno I, MMP-1, TP-53 e Tenascina C**

Marcador	Tratamento	Média (DP)	Intervalo de confiança de 95% para a média da diferença	Teste t pareado <sup>¥</sup>	Valor de p
Pro colágeno I	Pré - Pós	-0,08 (6,57)	-2,73; 2,58	-0,06	0,4769
MMP- 1	Pré - Pós	-0,41 (1,45)	-1,00; 0,17	-1,45	0,0801
TP-53	Pré - Pós	0,19 (4,85)	-1,76; 2,15	0,21	0,5804
Tenascina C	Pré - Pós	1,47 (3,60)	0,01; 2,93	2,08	<b>0,0240</b>

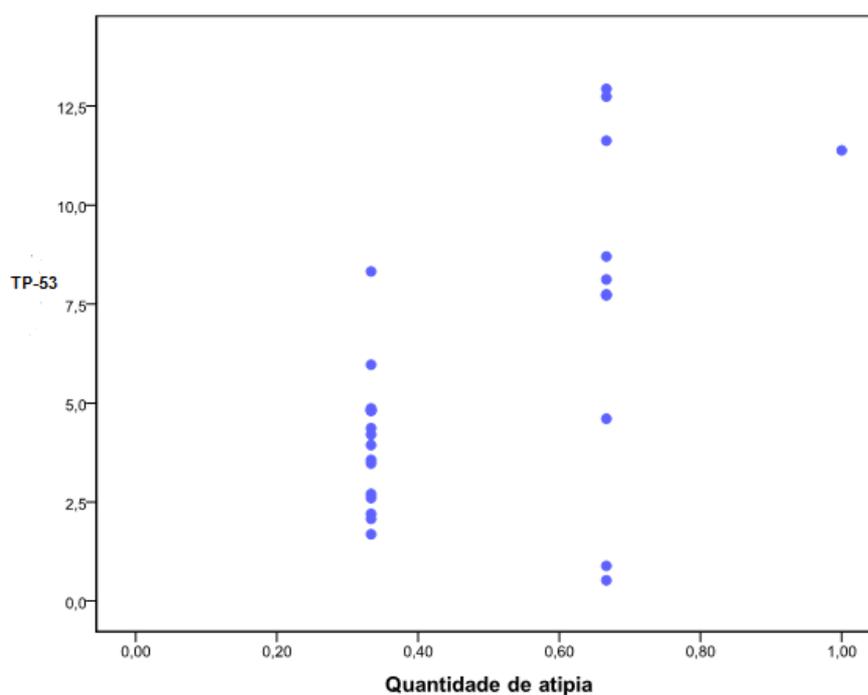
MMP-1: metaloproteinase 1

A avaliação do marcador TP-53 mostrou valor inicial pré-tratamento de  $5,64 \pm 3,63$  e redução para  $5,44 \pm 3,14$  na biópsia final, três meses após a última sessão de TFD. Esse resultado, embora mostre uma redução do valor médio do marcador, não foi estatisticamente significativo ( $p = 0,5804$ ). Mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa para o marcador TP-53, 14 dos 26 pacientes estudados, mostraram diminuição da expressão da proteína, sendo um dado relevante em nosso estudo (Figura 29). Interessante observar que, através do teste de correlação de Pearson,

houve correlação positiva significativa entre o parâmetro histológico “quantidade de atipia” e expressão de TP-53 pré-tratamento, ou seja, maior quantidade de atipia correlacionava-se com maior expressão da proteína TP-53 ( $p = 0,002$ ), como mostra a Figura 30. A mesma correlação após o tratamento não foi observada, embora houvesse semelhança de resultados ( $p = 0,07$ ).

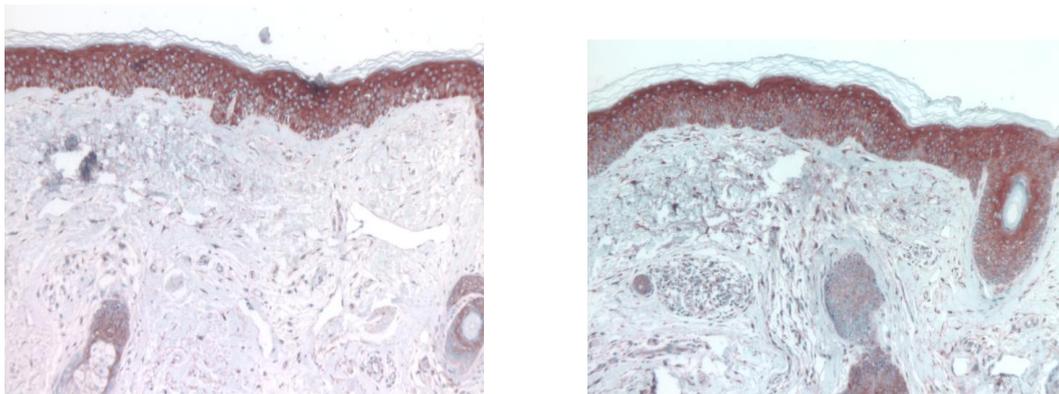


**Figura 29** - Paciente J.T. Fotomicrografia da pele do campo cancerizável antes (esquerda) e após (direita) mostrando a diminuição da expressão imunohistoquímica de TP-53 após a TFD. 200x

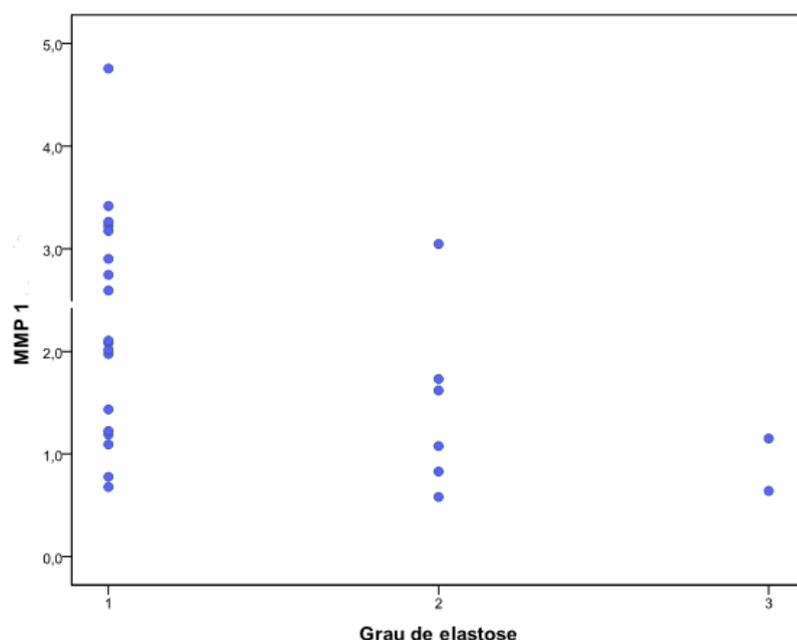


**Figura 30** - Relação positiva entre o parâmetro histopatológico “quantidade de atipia” e TP53 pré-tratamento, através do teste de correlação de Pearson ( $p = 0,002$ )

A expressão de MMP-1, embora tivesse aumentado após o tratamento, também não mostrou alteração estatisticamente significativa. O valor inicial, pré-tratamento foi  $1,56 \pm 0,97$  e aumentou para  $1,97 \pm 1,09$  ao final do tratamento ( $p = 0,08$ ). Esse aumento foi identificado em 12 dos 26 pacientes tratados com TFD (Figura 31). Através do teste de correlação de Spearman, houve correlação linear negativa entre “grau de elastose” e expressão de MMP-1, após o tratamento (Figura 32). Isso significa que um aumento da expressão da MMP-1 correlacionava-se com diminuição do parâmetro histopatológico “grau de elastose” ( $p = 0,033$ ).

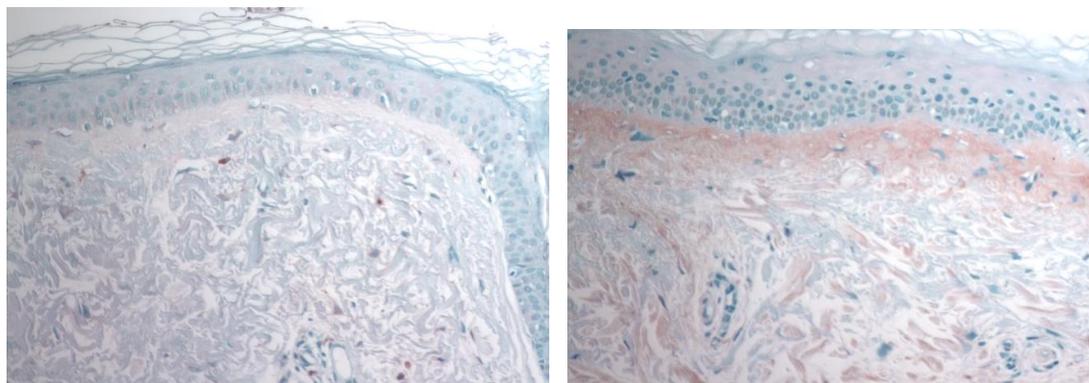


**Figura 31** - Paciente AMA. Fotomicrografia do campo cancerizável antes (esquerda) e após (direita) mostrando o aumento da expressão da MMP-1 após a TFD. 100x

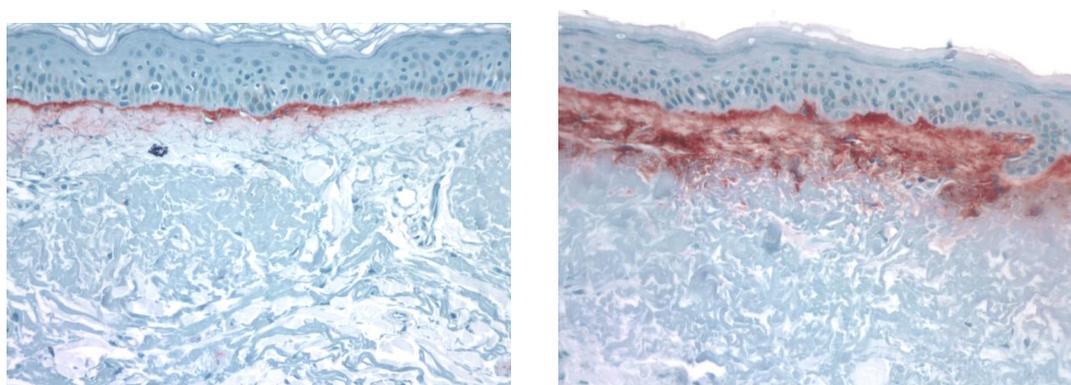


**Figura 32** - Relação negativa entre grau de elastose e MMP- 1 após o tratamento, através do teste de correlação de Spearman ( $p = 0,033$ )

Para o marcador pró-colágeno I, o valor médio inicial era  $3,97 \pm 4,88$  e o valor final de  $4,05 \pm 5,06$ . Também não se observou diferença estatisticamente significativa para esse marcador, porém 14 dos 26 pacientes tiveram aumento da expressão para pró-colágeno I ( $p = 0,4769$ ) (Figura 33). Já para o marcador Tenascina-C observamos um aumento significativo da sua expressão após o tratamento ( $p = 0,024$ ) (Figura 34). O valor médio inicial foi  $1,99 \pm 1,51$  e o valor final de  $3,46 \pm 3,31$  (Tabela 6). A expressão da glicoproteína Tenascina-C, no adulto, é limitada e pode ocorrer no tecido muscular e esquelético, em processos de reparação tecidual e nas lesões de QA e CEC. Ressaltamos que as biópsias foram feitas em pele “cl clinicamente normal”, dentro do campo de cancerização.



**Figura 33** - Paciente MTS. Fotomicrografia do campo cancerizável antes (esquerda) e após (direita) mostrando o aumento da expressão do marcador pró-colágeno I após a TFD. 200x



**Figura 34** - Paciente VP. Fotomicrografia do campo cancerizável antes (esquerda) e após (direita) mostrando o aumento da expressão do marcador Tenascina-C após a TFD. 200x

## **6 DISCUSSÃO**

O conceito de campo de cancerização sugere que agrupamentos de células mutadas estão frequentemente, senão sempre, presentes envolvendo as lesões de QA estabelecidas. Campos contíguos de queratinócitos mutados já foram observados neste território cancerizável e apresentam origem clonal comum, conforme visto anteriormente<sup>1,19</sup>.

Embora a TFD no tratamento das QAs e também do fotoenvelhecimento tenha sido extensivamente estudada, o seu emprego bem orientado em dermatologia é relativamente novo. Apesar de vários artigos publicados de TFD para envelhecimento induzido pela radiação UV com relatos de melhora clínica, pouco ainda se conhece sobre as alterações histopatológicas e moleculares que ocorrem na pele em resposta ao tratamento. Menos ainda sobre o real papel da TFD no campo de cancerização, onde poucos dados quantitativos, em seres humanos, estão disponíveis para suportar o seu uso, até o presente momento.

Em nosso estudo, vinte e seis pacientes com múltiplas QAs na face e sinais clínicos evidentes de fotoenvelhecimento completaram o protocolo de 3 sessões de TFD com MAL. O tratamento foi bem tolerado pelos pacientes embora existam vários relatos de dor relativamente intensa nos pacientes que se submetem a esse tratamento. No nosso resultado, o índice médio de dor foi de 4,4 segundo a escala de VAS adotada. Isso significa um bom grau de tolerabilidade por parte dos indivíduos que incluídos no estudo. A maior nota observada foi 7, referente aos pacientes que apresentavam múltiplas QAs e grau de fotodano mais evidente. Isso pode ser atribuído à maior captação de MAL pelas células pré-neoplásicas do campo cancerizável e

sua maior conversão à PPIX. Observamos também que, quanto mais QAs estavam presentes no campo, tão maiores eram os efeitos adversos de eritema e edema no período de pós- imediato. Esses efeitos adversos eram bem tolerados e resolveram-se, em média, em cinco dias. Também erosões e crostas estavam presentes na fase resolutive do processo inflamatório gerado pela TFD, principalmente nos casos com fotodano mais severo. Esses efeitos adversos resolveram-se em até sete dias, conforme previamente mencionados. Todos esses resultados estão de acordo com os estudos previamente realizados no tratamento de QAs com TFD, seja com 5-ALA ou MAL<sup>9,48,49,53,54,57,59,60-62,66,67</sup>. Interessante observar que os estudos conduzidos com 5-ALA com período de incubação menor (entre 30 minutos e 3 horas) mostram menor índice de dor por parte dos pacientes. Também, quando utilizada fonte de luz pulsada, seja laser ou luz intensa pulsada, o índice de dor sempre era menor e os efeitos colaterais, também, menores. Porém cabe ressaltar, que o uso de ALA ou MAL em períodos de incubação menores promovem menor tempo de absorção da droga, assim como menor conversão à PPIX. Na presença de fonte de luz pulsada, há menor atividade fotodinâmica e, portanto menor dor. Da mesma forma, o uso de laser pulsado ou luz intensa pulsada, promove uma irradiação muito rápida da área afetada, embora os níveis de fluência sejam relativamente altos<sup>38,57-59,80-82</sup>. O uso de LED ou lâmpada halógena não-coerente e contínua promove maior ativação fotodinâmica e permite maior e mais homogêneo grau de “photobleaching” ou consumo maior da PPIX durante a sessão de TFD. Isso gera mais ROS e maior eficácia terapêutica, principalmente no

tratamento das QAs. Em um estudo por nós publicado em 2005, pacientes com múltiplas QAs e fotodano foram submetidos à TFD com 5-ALA tópico na concentração de 20% e período de incubação de quatro horas, seguido por irradiação com luz intensa pulsada em toda face. Após dois tratamentos, todas as QAs tiveram completa resolução, assim como houve uma considerável melhora da severidade do fotodano. Porém, seis meses após, houve recidiva clínica de várias lesões de QAs, quando comparados com as fotografias pré-tratamento. A histopatologia revelou melhora do grau de severidade do fotodano e deposição de novo colágeno na derme papilar<sup>82</sup>. Porém, a despeito da conclusão ter mostrado que o emprego da luz intensa pulsada na TFD fosse de grande valor, os autores colocaram grande preocupação na eficácia do método para o tratamento das QAs, uma vez que se trata não de lesão estética, mas sim, de lesão potencialmente maligna, ou até maligna, segundo alguns autores<sup>9,82</sup>.

A resposta clínica das QAs com TFD está bem estabelecida na literatura<sup>9,83-85</sup>. Existem, certamente, diferenças nos diversos protocolos em relação ao tipo de droga usada, tempo de incubação, veículo, fonte de luz, dose e irradiância da fonte de luz, preparo ou não das lesões, etc. Cabe ressaltar que, o preparo prévio das lesões, ou seja, uma leve curetagem sem sangramento, suficiente para a remoção das crostas e/ou hiperqueratose e a aplicação correta da droga sobre as mesmas são de extrema importância para o índice de cura das QAs. Da mesma forma, chamamos a atenção para o tempo de incubação assim como a dose de luz corretamente aplicadas durante a sessão de TFD. No nosso estudo, tivemos o cuidado de preparar

corretamente todas as lesões, assim como irradiar toda a superfície cancerizável de maneira bem uniforme, assegurando que toda a face fosse tratada igualmente. Em geral, duas etapas de iluminação foram suficientes para tratar homoganeamente toda a face. Porém, em alguns casos de múltiplas QAs na região frontal, foram realizadas três etapas de iluminação, assegurando que nenhuma área tivesse sido sub-tratada. Esse dado prático é extensamente aplicado nos manuais e guias de aplicação da TFD em Dermatologia<sup>9</sup>.

Braathen et al.<sup>85</sup>, em 2008, conduziram um estudo para avaliar o tempo de incubação da droga MAL nas queratoses actínicas. Neste estudo um grupo de pacientes foi submetido ao protocolo original com três horas de incubação, seguido de irradiação com fonte contínua e não coerente de luz vermelha (570-670 nm). O outro grupo foi submetido ao mesmo protocolo, porém, com período de incubação de uma hora apenas. Após três meses, houve resposta completa de 96% e 87% para as lesões de QAs finas e moderadamente espessas, respectivamente, no grupo de três horas. No grupo de uma hora, as respostas completas foram 78% e 74%, respectivamente. Em um seguimento de 12 meses, o índice de recorrência foi de 17% para o grupo de três horas e de 19% para o grupo de uma hora. Os autores concluíram que, para lesões selecionadas e com preparo prévio, ou seja, curetagem, o tempo de incubação de uma hora pode ser suficiente para a cura das lesões de QAs<sup>85</sup>.

Em nosso protocolo, conforme mencionado anteriormente, foram realizadas três sessões de TFD com MAL com intervalo mensal nos 26

pacientes estudados. A primeira sessão foi realizada com tempo de incubação da droga de três horas. As demais sessões foram feitas com tempo de incubação reduzido de 90 minutos, baseado nos resultados do estudo de Braathen et al.<sup>85</sup>. Considerando essa redução, o tratamento pode ser mais rápido e, também, um pouco menos dolorido (experiência do autor). Cabe ressaltar que 90 minutos de incubação para lesões finas e remanescentes após o primeiro tratamento não configura um tempo curto de incubação, mas sim, um período suficiente para absorção da droga e sua conversão à PPIX.

Em relação ao número de lesões de QAs no campo de cancerização, observamos uma diminuição expressiva logo após a primeira sessão de TFD. Adotamos o critério de contagem total das lesões em todos os pacientes. Assim houve resposta completa de 75% das QAs após uma única sessão de TFD. Após a segunda sessão, a resposta foi de 85,4% e, após a terceira sessão, a resposta completa foi de 89,5%. Ao final, dos 26 pacientes estudados, 10 ainda apresentavam alguma QA (valor total pré-tratamento de 268 lesões e valor final em T3 de 28 QAs) (Figura 17). Nossos resultados estão em conformidade com todos os estudos clínicos de TFD seja com MAL ou 5-ALA<sup>9,48,49,53,54,60,61,66,67,69,83-85</sup>. No estudo que mais se assemelha ao nosso protocolo, Zane et al.<sup>62</sup> observaram resposta completa de 71,5% após a primeira sessão e de 88,3% após duas sessões.

Recentemente, Kleinpenning et al.<sup>86</sup> avaliaram a eficácia da TFD com MAL nas lesões de QAs em pacientes com graus de fotodano moderado e severo na face e couro cabeludo. Neste estudo, 14 pacientes com número

total de QAs de 223 na face e couro cabeludo foram submetidos a dois tratamentos com MAL e TFD em intervalo de três meses entre as sessões. Os autores definiram grau moderado quando os indivíduos apresentavam, em média, 10 a 12 QAs por paciente. Acima deste valor, os pacientes eram classificados como grau severo de fotodano. Três meses após a segunda sessão os pacientes foram avaliados e os autores observaram uma melhora expressiva na severidade do fotoenvelhecimento global da face. O índice geral de cura das lesões após uma sessão foi de 54,7% e de 61,9% após duas sessões. Redução completa das QAs foi observada apenas nos pacientes com fotodano moderado e resolução parcial das QAs nos pacientes com fotodano severo. Nenhum paciente, que teve resposta completa, apresentou recidiva ou novas lesões no período do estudo, de até seis meses de seguimento. Os autores concluíram que um maior número de sessões talvez seja necessário para tratar eficazmente os pacientes com acentuado fotodano e QAs<sup>86</sup>.

Apalla et al.<sup>87</sup>, em 2010, avaliaram o potencial efeito preventivo da TFD com 5-ALA tópico no surgimento de novas QAs no campo de cancerização de pacientes imunocompetentes. Neste estudo, pacientes portadores de múltiplas QAs na face e couro cabeludo foram randomizados para receber tratamento com 5-ALA ou placebo- TFD e acompanhados por um ano. Após apenas uma única sessão, o número de novas lesões nas áreas tratadas com placebo foi mais que o dobro, quando comparados ao lado tratado com 5-ALA e TFD, ao final de 12 meses de seguimento. Da mesma forma, 64% dos pacientes tratados com 5-ALA-TFD não tinham

novas lesões no campo tratado. Por outro lado, apenas 26% dos pacientes submetidos a placebo-TFD não apresentavam lesões novas. Até o sexto mês após a TFD, existia nítida diferença no aparecimento de novas lesões quando comparados os dois grupos. Após esse período, o percentual de aparecimento de novas lesões no lado tratado com 5-ALA-TFD gradualmente aumentou. Esses dados sugerem que a TFD pode ter valor preventivo no aparecimento de novas lesões de QA nos campos de cancerização e também, que repetidas intervenções de TFD nos pacientes extremamente fotodanificados podem apresentar grande valor na prevenção de neoplasias cutâneas não-melanocíticas em campo de cancerização<sup>87</sup>. Porém, não se sabe qual o melhor regime terapêutico para essa finalidade.

Esses dois recentes estudos são interessantes pois mostram a melhora do fotoenvelhecimento global da face e cura clínica das QAs. Porém, o percentual de diminuição das lesões foi menor do que os relatos de literatura. Os autores concluem que pacientes severamente fotodanificados talvez tenham mais recidivas e/ou maior número de novas lesões nos campos de cancerização. No estudo de Kleinpenning et al.<sup>86</sup>, os pacientes tinham um número médio de QAs de 15,93/paciente (total de 223 QAs divididos por 14 participantes no estudo). Esse elevado número talvez revele o grau de severidade do campo de cancerização e seja o responsável pelo menor índice de cura observado, segundo a conclusão dos autores. Se fizermos uma comparação com nossa casuística, observamos um número médio de QAs de 10,30/paciente (total de 268 divididos por 26 participantes). Esse valor é compatível com um grau moderado de fotodano segundo a

definição adotada por Kleinpenning et al.<sup>86</sup> Também observamos uma resposta final de 89,5%, o que é compatível com todos os estudos apresentados. No estudo conduzido por Zane et al.<sup>62</sup>, o número médio de QAs por paciente foi de 6,85 e o índice de cura de 88,3%, semelhante ao nosso resultado. Desta forma, fica difícil concluir que quanto maior o número de QAs por paciente, menor será o percentual de cura. Porém, é possível que pacientes severamente fotodanificados tenham maior número de novas lesões no seguimento. A importância da instituição de múltiplas sessões de TFD em caráter regular, ao nosso ver, é de considerável importância para a prevenção de novas lesões em campos de cancerização severos. Esses dados já foram demonstrados em estudos clínicos em humanos e em animais<sup>73-79</sup>.

Em resumo, baseado nos resultados obtidos em nosso estudo, fica evidente que a TFD com MAL mostrou-se um tratamento eficaz e seguro para as QAs em pacientes fotodanificados. Além disso, o índice de cura foi compatível com a maioria dos estudos publicados<sup>9,48,49,53,54,60,61,66,67,69,83-85</sup>. Duas sessões de TFD com MAL mostrou-se tão eficaz quanto três sessões, baseado no índice de cura das lesões no nosso protocolo de estudo. Portanto, podemos concluir, segundo nossos resultados, que duas sessões são suficientes para se atingir um índice de cura semelhante aos dados da literatura médica e que uma terceira sessão, não só aumentará os gastos do tratamento como o desconforto nos pacientes, promovendo um índice de cura semelhante a duas sessões de TFD com MAL.

A avaliação histopatológica dos casos também foi objetivo de nosso estudo e os resultados obtidos, foram de grande relevância. Adotamos o critério de variáveis histológicas que foram submetidas à análise antes e após o tratamento conforme extensamente explicado anteriormente. O parâmetro “grau de atipia” dos queratinócitos reduziu de  $1,46 \pm 0,58$  em T0 (antes da TFD) para  $0,69 \pm 0,47$  em T3, ou seja, três meses após a última sessão de tratamento ( $p < 0,001$ ). Isso demonstra uma diminuição da intensidade da displasia celular no campo de cancerização tratado com TFD. Campos de cancerização apresentam lesões pré-clínicas (“patches” de clones mutados) e clínicas de QAs, além de CECs e CBCs<sup>1,2,14,18,19</sup>. Esses clones de células mutadas contribuem para os achados histopatológicos de variados graus de atipia celular. Da mesma forma, observamos que o parâmetro “quantidade de atipia” também melhorou com redução de  $0,49 \pm 0,19$  em T0 para  $0,26 \pm 0,20$  em T3 ( $p < 0,001$ ). Este último parâmetro, em nosso estudo, mede a extensão da atipia celular presente na epiderme (Tabela 2). Os dois parâmetros citados, ou seja, “grau e quantidade de atipia” mostraram-se sensíveis às sessões de TFD. Houve diminuição nítida da intensidade da displasia celular no campo cancerizável e também diminuição do comprometimento epidérmico. Assim, os queratinócitos apresentavam-se com aspecto normal, com tendência à polarização normal e também, a epiderme encontrava-se mais corretamente estratificada após a TFD. Observamos que existia uma forte correlação entre esses dois parâmetros histológicos, segundo o coeficiente de correlação de Spearman. Segundo este dado, quanto maior a correlação, maiores as probabilidades

de se obter resultados semelhantes para ambas variáveis. Conforme apresentado, as variáveis “grau” e “quantidade de atipia” eram fortemente correlatas e com notas altas antes do tratamento e mantiveram-se correlatas e com diminuição de suas notas após a TFD. Isso demonstra que a TFD induziu melhora da atipia e da quantidade e extensão das células atípicas na área tratada. Interessante notar que, se a TFD é capaz de induzir melhora da atipia celular e diminuição do comprometimento epidérmico, talvez possamos inferir que esse tratamento de campo possa realmente levar a um potencial efeito preventivo no surgimento de novas lesões, conforme citado nos trabalhos anteriores. Nossas observações histopatológicas talvez possam corroborar os resultados clínicos nestes estudos supra citados.

O parâmetro “espessura da epiderme” era  $0,08 \pm 0,02$  em T0 e  $0,07 \pm 0,02$  em T3, não sendo observada diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,214$ ). Alguns estudos mostram aumento da espessura da epiderme após a TFD, enquanto outros mostram diminuição ou até ausência de alterações relevantes<sup>62,71,72,83</sup>. Nenhum dos estudos mostrou uma importância relevante do aumento ou diminuição da espessura da epiderme no contexto do rejuvenescimento induzido pela TFD.

Orringer et al.<sup>71</sup>, estudando o efeito da TFD com laser de corante pulsado de 595 nm de comprimento de onda e 5-ALA na pele de indivíduos fotoenvelhecidos, demonstraram um aumento da expressão do marcador de proliferação celular Ki-67, 48 horas após o tratamento. Esse aumento persistiu por até 30 dias e coincidiu com um aumento da espessura da epiderme<sup>71</sup>. Os autores também avaliaram a expressão da TP-53 porém,

não conseguiram demonstrar nenhuma alteração antes e após a TFD com laser e 5-ALA<sup>71</sup>.

Bagazgoitia et al.<sup>88</sup>, em 2011, demonstraram, por sua vez, que a TFD com MAL e LED vermelho diminuíram as alterações histopatológicas do campo de cancerização e a expressão de marcadores oncogênicos na pele fotoenvelhecida. Neste estudo, 22 pacientes com fotodano e QAs foram tratados com uma única sessão de TFD e MAL e submetidos à biópsia 6 semanas após. Foram observados redução da displasia dos queratinócitos basais e melhora da polaridade epidérmica. Porém, 10 dos 22 pacientes ainda apresentavam displasia (45% dos casos). Os autores também observaram diminuição da expressão de Ki-67 em 20 dos 22 pacientes e diminuição da expressão de TP-53 em 11 dos 22 indivíduos (50%). Os outros 11 participantes não mostraram nenhuma alteração na expressão da proteína TP-53. Os valores foram estatisticamente significantes antes e após a TFD com MAL. Já para o marcador ciclina D1, proteína que participa da regulação do ciclo celular, não foram encontradas alterações induzidas pela TFD. Interessante notar que as biópsias foram realizadas nas lesões clínicas de QA mais evidentes no campo de cancerização, dado que difere de nosso protocolo, pois selecionamos uma área “clinicamente normal” dentro do campo. A redução significativa da expressão da TP-53 nesse estudo também sugere que a TFD possa reduzir o processo carcinogênico induzido pela radiação UV na pele exposta. Porém, metade dos participantes não mostraram nenhuma alteração da expressão da proteína após a TFD. A redução da expressão de Ki-67 também difere dos dados apresentados por

Orringer et al.<sup>71</sup>. Os autores sugerem que a TFD possa reverter o processo de carcinogênese UV-induzido, baseados nos achados de diminuição da displasia epidérmica e redução da expressão de TP-53 após o tratamento. Porém, concluíram que uma única sessão talvez seja insuficiente para diminuir os riscos de novas lesões no campo, uma vez que 45% dos pacientes estudados ainda persistiam com algum grau de displasia e que 50% deles não mostraram redução da positividade para TP-53<sup>88</sup>.

Em nosso estudo, não observamos redução média estatisticamente significativa para a expressão da proteína TP-53 após as sessões de TFD. Houve diminuição da expressão em 14 dos 26 pacientes estudados, o que é um dado relevante. Além disso, através do teste de correlação de Pearson, houve correlação positiva significativa entre o parâmetro histológico “quantidade de atipia” e expressão de TP-53 pré-tratamento, ou seja, maior quantidade de atipia correlacionava-se com maior expressão da proteína TP-53 ( $p = 0,002$ ), como mostra a Figura 30. Esse é um dado estatístico importante que mostra, com clareza, que uma maior expressão de TP-53 está relacionada com maior intensidade de atipia no campo de cancerização. Cabe ressaltar que adotamos um critério de mensuração objetivo, onde um software de computador media a quantidade de “pixels” antes e após o tratamento. Isto gera um número médio final, sendo então, submetido à análise estatística. No estudo de Bagazgoitia et al.<sup>88</sup>, os autores optaram por uma análise semi-quantitativa medida por dois observadores não relacionados ao trabalho, podendo gerar diferenças na interpretação dos resultados. Além disso, os autores elegeram uma lesão de QA clinicamente

visível para o local da biópsia pré-tratamento. Assim, sabidamente é esperado uma maior expressão de TP-53 nas lesões de QA e uma maior probabilidade de diminuição dessa expressão após o tratamento. Em nosso estudo, realizamos a biópsia em uma área de pele “aparentemente normal” dentro do campo. O nosso objetivo, com isto, era estudar os efeitos da TFD em todo o campo e não somente na lesão clínica de QA. Interessante observar que houve diminuição da expressão em 14 dos 26 pacientes do nosso estudo, o que mostra que, mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa, a TFD foi capaz de reduzir essa expressão na maioria dos casos. Ressaltamos que a reação imunohistoquímica da proteína TP-53 feita no trabalho de Bagazgoitia et al.<sup>88</sup> e, também em nosso estudo, utilizou um reagente não específico para a proteína TP-53. Portanto, a mensuração engloba tanto a proteína selvagem quanto a mutada no campo histopatológico. Outro dado relevante é a dificuldade de interpretação da expressão da TP-53. Uma exposição aguda à radiação UV-B, de horas, pode elevar muito a TP-53 selvagem na pele<sup>19</sup>. Assim, dias antes da biópsia final, não podemos excluir a possibilidade dos pacientes terem se expostos agudamente à radiação UV e, no dia da realização do exame, apresentarem um aumento considerável da expressão da proteína TP-53, prejudicando a interpretação final dos resultados.

Em 2004, Orringer et al.<sup>89</sup>, demonstraram o efeito do laser de CO<sub>2</sub> ultrapulsado na pele fotoenvelhecida do antebraço de voluntários. Após uma única sessão com duas passadas do laser ablativo sobre a área afetada, biópsias foram obtidas com três semanas e seis meses após o tratamento. O

exame imunohistoquímico realizado antes do tratamento com laser revelou padrões de expressão da TP-53 tanto agrupados (chamados de “clusters”) quanto difusamente distribuídos na epiderme inter-folicular. Os autores observaram uma diminuição da densidade da expressão para a proteína TP-53 de 250 células/mm<sup>2</sup>, antes do procedimento, para 3 células/mm<sup>2</sup> após três semanas. Após seis meses, a densidade média mantinha-se baixa em 5 células/mm<sup>2</sup>. Houve diminuição da expressão de TP-53 tanto difusamente distribuída nos queratinócitos da epiderme inter-folicular quanto para células agrupadas<sup>89</sup>. Interessante notar que a expressão difusa da TP-53 na epiderme sugere o padrão selvagem da proteína. Por outro lado, o agrupamento de queratinócitos com intensa coloração para TP-53 sugere acúmulo de células com mutação do gene. Esse estudo propõe que o laser de CO<sub>2</sub> pode ser de grande valor na prevenção do aparecimento de QAs e câncer cutâneo não-melanocítico, uma vez que diminuindo a expressão de proteínas marcadoras de tumor, pode-se inferir que haja menor formação desses tumores. Também interessante é a persistência, relativamente longa, da diminuição da expressão da TP-53. Os autores concluíram que o campo de cancerização apresenta agrupamentos de células com TP-53 mutadas e também, aumento da expressão da TP-53 difusamente na epiderme (padrão selvagem). Porém, ainda não se sabe se esses pacientes com aumento da expressão de TP-53 selvagem beneficiar-se-ão dos métodos ablativos para diminuir as chances de carcinogênese.

Berg et al.<sup>19</sup>, através de imunohistoquímica, observaram que a expressão de TP-53 na pele de ratos irradiados cronicamente com UV-B era

um evento precoce e que, quanto maior o tempo de irradiação, maior a frequência e tamanho dos “patches”. Neste estudo, os ratos receberam dose eritematosa mínima diária com luz UV-B por 1, 17 ou 30 dias. O grupo irradiado por apenas um dia apresentou elevação da expressão de TP-53 difusamente distribuída na epiderme, havendo diminuição progressiva em até 72 horas após. Com 17 dias de irradiação, havia intensa expressão de TP-53 em agrupamentos na epiderme e que persistiam por até 56 dias, havendo diminuição da expressão a seguir. No grupo irradiado por 30 dias, a frequência desses “patches” foi seis vezes maior, havendo correlação positiva entre tempo de irradiação e frequência dos “patches”. Observaram, também, que 70% desses “patches” reagiam fortemente para anticorpo monoclonal PAb240, específico para TP-53 mutante. Por outro lado, os ratos irradiados uma única vez, apresentaram apenas elevação transitória da expressão da proteína TP-53, não havendo reação para PAb240, mostrando que se tratava de elevação de TP-53 normal ou “tipo-selvagem”<sup>19</sup>.

Esses dados são muito interessantes e mostram que o aparecimento de positividade para TP-53 é um evento precoce na carcinogênese, muito antes do aparecimento de tumores cutâneos. Interessante também notar que houve queda na expressão da imuno-positividade para TP53 com a interrupção da exposição à radiação UV-B. Vários autores concordam que as células mutadas, para sobreviverem, necessitam do estímulo UV constante e que sofrem pressão natural seletiva da epiderme. Em outras palavras, as células TP-53 mutadas devem competir com outras células da camada basal para conseguirem se estabelecer e formar “patches”, que,

posteriormente, transformar-se-ão em tumores. Semelhante ao que ocorre com lesões iniciais de QA, esses “patches” sofrem um processo de regressão na ausência de irradiação UV-B.

Sabe-se que pacientes cronicamente expostos à radiação solar apresentam maior expressão da positividade de TP-53 na epiderme e que a exposição aguda à radiação UV é capaz de induzir maior expressão de TP-53, mesmo que seja transitória<sup>18</sup>. Assim, é difícil quantificar, com exatidão, a expressão de TP-53 antes e após o procedimento de nosso estudo, pois embora tenhamos orientado e fornecido filtros solares a todos os pacientes, estes poderiam ter se expostos à radiação UV dias antes da realização das biópsias e dificultar, portanto, a interpretação dos resultados.

Em nosso trabalho, fica uma importante dúvida a ser elucidada: os pacientes podem apresentar uma frequência maior de clones de células mutadas e, ao mesmo tempo, maior expressão de TP-53 “selvagem” no campo de cancerização, pois não utilizamos anticorpo monoclonal específico, tampouco técnica de PCR em tempo real para quantificar a mutação antes e após as sessões de TFD. Como projeto futuro, temos grande interesse em realizar métodos específicos de medição da expressão da TP-53 mutada no campo de cancerização, dando continuidade a este projeto de pesquisa.

Em relação à expressão do marcador Tn-C, observamos um aumento significativo da sua expressão após o tratamento ( $p = 0,024$ ). O valor médio inicial foi  $1,99 \pm 1,51$  e o valor final de  $3,46 \pm 3,31$ . A expressão da glicoproteína Tn-C, no adulto, é limitada e pode ocorrer no tecido muscular e

esquelético, em processos de reparação tecidual e nas lesões de QA e CEC. Nas lesões de QAs, assim como nos CECs, foram identificadas, recentemente, expressões variáveis da Tn-C<sup>35,36</sup>. Sua função está diretamente ligada à adesão, migração e crescimento celulares, angiogênese e regulação da expressão das MMPs, induzindo aumento de MMP-9 na frente de invasão tumoral<sup>36</sup>. O seu papel ainda é incerto, mas estudos recentes mostraram maior expressão de Tn-C nas QAs com maior grau de atipia e que a intensidade da reação, assim como a sua extensão, eram maiores nos CECs do que nas QAs. A expressão da Tn-C era particularmente mais intensa nas células mais basais dos CECs, na fronteira de invasão tumoral<sup>36</sup>. Tal observação pode estar ligada diretamente ao potencial invasivo desses tumores, onde uma maior expressão de Tn-C pode se relacionar à menor capacidade de adesão celular favorecendo, assim, a invasão e disseminação do tumor<sup>36</sup>. Porém, não se sabe qual é a expressão dessa proteína no campo de cancerização.

Quando escolhemos a expressão desta glicoproteína para estudo antes e após a TFD, decidimos averiguar como se comportava sua expressão na pele aparentemente “normal” no campo. Sabidamente, se tivéssemos realizado a biópsia em uma lesão específica de QA, esperaríamos uma diminuição na sua expressão após o tratamento, pois se diminuímos em 89,5% o número de QAs no campo, provavelmente observaríamos uma menor expressão de Tn-C. Porém, como podemos notar, houve um aumento da sua expressão após a TFD, tendo sido estatisticamente significativo. Latinjhouwers et al.<sup>90</sup>, mostraram que a síntese

da glicoproteína Tn-C não somente ocorre nas células mesenquimais, mas também nos queratinócitos. Demonstraram também que, em injúria tecidual e nos processos de reparação tecidual de úlceras crônicas há maior expressão da Tn-C, adjacente ao processo proliferativo epidérmico<sup>90,91</sup>. Além disso, em outro estudo dos mesmos autores, a expressão de Tn-C foi induzida por citocinas, principalmente IL-4, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , em cultura de queratinócitos<sup>92</sup>. Desta forma, tentamos explicar que o aumento médio observado em nosso estudo talvez tenha sido resultado do constante processo de reparação dermo-epidérmico após a injúria tecidual induzida pelas três sessões de TFD e que, sabidamente, várias citocinas estão elevadas no processo inflamatório induzido pela TFD, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e TGF- $\beta$ 1<sup>6,93</sup>. Como demonstrado por Latinjhouwers et al, um aumento de citocinas inflamatórias aumentam a expressão da Tn-C<sup>92</sup>.

Os efeitos clínicos induzidos pela TFD com MAL no rejuvenescimento do campo de cancerização também foram objetivo de nosso estudo. Avaliamos o grau de severidade do fotoenvelhecimento segundo uma escala de 5 pontos adaptada de dois estudos distintos de Dover et al.<sup>38</sup> e Zane et al.<sup>62</sup>. Estudamos as seguintes variáveis clínicas: “fotoenvelhecimento global da face, pigmentação difusa, eritema facial, telangiectasia, rugas finas, rugas profundas, palidez facial e aspereza”. Todas as variáveis foram avaliadas por dois dermatologistas não envolvidos com o estudo. Conforme mostrado anteriormente todos os parâmetros clínicos melhoram significativamente (Figura 16), excetuando-se as rugas profundas. As notas atribuídas no início do estudo, ou seja pré-tratamento, correspondiam ao grau de severidade do

fotoenvelhecimento e todos os valores médios, ao final do tratamento, diminuíram. Isso mostra que múltiplas sessões de TFD resultaram em rejuvenescimento da área tratada, ou seja, do campo de cancerização facial. A melhora clínica observada foi gradativa, sendo que os pacientes sempre melhoraram entre as sessões. Essa observação também foi previamente feita por Park et al.<sup>83</sup>. Diferença estatisticamente significativa entre os índices em T0 e T3 e entre T1 e T2 foi observada para todas as variáveis estudadas. Interessante notar que não foi observada diferença estatística entre T2 e T3 para as variáveis mencionadas, exceto para “eritema facial”, que melhorou entre T2 e T3 (Tabela 3 e Figura 16). O parâmetro “rugas profundas” não apresentou melhora após o nosso protocolo. Os estudos, até agora publicados, da TFD com LED ou fonte luz contínua não mostram efeitos clínicos relevantes no tratamento das rugas profundas e, portanto, estamos em conformidade com os resultados da literatura.

Dover et al.<sup>38</sup> conduziram um estudo prospectivo e randomizado com luz intensa pulsada e 5-ALA 20% tópico em 20 pacientes com fotoenvelhecimento num total de cinco tratamentos com intervalo de três semanas entre eles. Neste estudo, um lado da face era tratado com luz intensa pulsada isolada, enquanto o outro lado era submetido à aplicação de 5-ALA (tempo de aplicação curto 30-60 minutos) combinado com luz intensa pulsada a seguir. Os três primeiros tratamentos foram realizados com 5-ALA e luz intensa pulsada e, os dois últimos, luz pulsada isoladamente. Os autores observaram melhora mais acentuada do fotoenvelhecimento global da face e da pigmentação difusa com a combinação de 5-ALA e luz pulsada

quando comparado à luz pulsada isolada (80% x 45%). O parâmetro de “rugas finas” também melhorou, sendo que a resposta foi semelhante em ambos os lados. Já os parâmetros “aspereza” e “palidez facial” não mostraram melhora clínica no estudo<sup>38</sup>. Os efeitos adversos relatados foram poucos e com duração de até 48 horas após a TFD.

Zane et al.<sup>62</sup>, por sua vez, estudaram 20 pacientes portadores de fotoenvelhecimento com múltiplas QAs. Os pacientes foram submetidos a duas sessões, com intervalo de 30 dias, de TFD com MAL, obedecendo ao protocolo de três horas de incubação com MAL e iluminação padrão com LED 635 nm e dose total de 37 J/cm<sup>2</sup>. A avaliação clínica mostrou melhora da “pigmentação difusa”, “rugas finas”, “palidez” e aspereza” da pele. Porém, nenhuma melhora foi observada para “rugas profundas”, “eritema facial”, “telangiectasia” e “hiperplasia sebácea”. Neste mesmo estudo, os autores promoveram uma avaliação ecográfica da pele, para quantificar as modificações epidérmicas e dérmicas induzidas pela TFD. Observaram um espessamento epidérmico além de uma diminuição da zona hipoeogênica sub-epidérmica, revelando deposição de tecido. Os autores atribuíram que essa alteração era decorrente da neo-formação de colágeno, embora nenhum estudo histopatológico tenha sido feito<sup>62</sup>.

Quando comparamos os nossos resultados com o estudo de Zane et al.<sup>62</sup>, observamos, que os parâmetros clínicos “eritema facial” e “telangiectasia” melhoraram em nossa casuística. A melhora clínica desses dois parâmetros foi mais evidente entre T1 e T2 e entre T2 e T3. Esse resultado é bastante interessante uma vez que não empregamos uma fonte

de luz pulsada ou laser pulsado, que operam pelo princípio da fototermólise seletiva, mas sim usamos uma fonte de luz contínua (LED vermelho) que opera através de princípios fotoquímicos. Já no estudo conduzido por Dover et al, a fonte de luz excitadora da PPIX foi uma luz intensa pulsada, que promove não somente um efeito fotodinâmico mas, também, um efeito seletivo de fototermólise. Sempre que ocorre fototermólise seletiva com laser ou luz pulsada que destruam o alvo hemoglobina, há melhora do eritema facial e das telangiectasias. Assim, explicar que as telangiectasias melhoraram somente com a TFD fica muito difícil, uma vez que não há destruição dos vasos sanguíneos superficiais pela TFD. O que nós postulamos é que haja sim, uma neo-formação de fibras colágenas na derme superficial e média e que este acúmulo de colágeno comprima as telangiectasias para baixo na derme média e profunda (Figura 23). Talvez um maior número de sessões induza maior deposição de colágeno e, portanto, a melhora de eritema facial tenha sido observada ainda após a terceira sessão, conforme observada uma diferença estatisticamente significativa entre T2 e T3 para eritema facial.

Em resumo, todos os parâmetros clínicos melhoraram significativamente, excetuando-se as “rugas profundas”. Também, ficou evidente que duas sessões de TFD com MAL foram semelhantes a três sessões. Dessa forma, duas sessões de TFD podem se equiparar a três sessões, lembrando que há menor custo envolvido e menor desconforto dos pacientes com número reduzido de sessões.

No presente estudo sobre o efeito da TFD no campo de cancerização cutâneo, observamos, também, relevantes modificações histopatológicas na derme, fato que nos impulsionou para uma melhor avaliação das fibras colágenas e material elastótico. Houve melhora do índice para “grau de elastose” na derme do campo de cancerização havendo redução do índice de  $1,77 \pm 0,65$  em T0 para  $1,38 \pm 0,64$  após três meses em T3 ( $p = 0,002$ ). A avaliação histopatológica permitiu evidenciar que houve nítida diminuição das massas de fibras elásticas amorfas e aumento de fibras fibrilares após as sessões de TFD (Figura 14 e Tabela 4). Na pele fotoenvelhecida, há deposição de material elastótico amorfo e basofílico em grande quantidade na derme. A exposição crônica à radiação UV diminui a expressão de pró-colágeno I, pela inibição da via TGF $\beta$ -1, e aumenta a expressão das MMPs responsáveis pela degradação das fibras colágenas. Também há aumento da produção de fibras elásticas ricas em fibrilina e tropoelastina<sup>83</sup>. Observamos, através do estudo morfométrico, uma diminuição da quantidade de material elastótico na derme. Em T0, ou seja, pré tratamento o índice era  $12,93 \pm 2,40$  e diminuiu para  $7,35 \pm 1,44$  em T3, caracterizando uma nítida diminuição da quantidade de material elastótico depositado na derme após as sessões de TFD ( $p = 0,013$ ). Nossos resultados estão em conformidade com os estudos publicados<sup>71,72,83,88,89,93,94</sup>.

Almeida Issa et al.<sup>72</sup> estudaram o efeito da TFD com MAL em 14 pacientes portadores de variados graus de fotodano, com ou sem QAs na face. A avaliação histopatológica mostrou diminuição do material elastótico e aumento da deposição de fibras colágenas em biópsias três e seis meses

após o tratamento. A avaliação imunohistoquímica revelou aumento da expressão de colágeno I, nas mesmas biópsias e aumento de MMP-9, apenas na biópsia de três meses<sup>72,94</sup>.

Em nosso estudo, observamos um aumento da deposição de fibras colágenas na derme superior. O parâmetro “camada de colágeno sub-epidérmica” demonstrou um significativo aumento no índice de  $0,04 \pm 0,05$  em T0 para  $0,17 \pm 0,43$  em T3 ( $p = 0,001$ ). Esse aumento reflete nova deposição de colágeno na derme após a TFD. Zane et al.<sup>62</sup> mostraram deposição de colágeno na derme superior através de estudo ecográfico. Em nosso estudo, o aumento das fibras colágenas foi nítido após a TFD, podendo ser observadas fibras colágenas dispostas paralelamente e em faixa abaixo da camada basal sub-epidérmica, assim como fibras colágenas difusas e dispersas na derme média dos campos estudados. Esses achados mostram que a TFD é capaz de induzir neoformação de colágeno e de diminuir os danos provocados pela exposição crônica à radiação UV. A expressão imunohistoquímica de pró-colágeno I apresentou valor médio inicial de  $3,97 \pm 4,88$  e o valor final de  $4,05 \pm 5,06$ . Observa-se um discreto aumento médio após as sessões de tratamento. Não se observou diferença estatisticamente significativa para esse marcador, porém 14 dos 26 pacientes tiveram aumento da expressão para pró-colágeno I. Espera-se aumento da expressão de pró-colágeno I nos procedimentos que induzem neoformação de colágeno, como após peelings químicos profundos, uso de laser ablativo de CO<sub>2</sub>, dermabrasão cutânea, etc. Também após a TFD, como demonstrado por Almeida Issa et al.<sup>72</sup>, Park et al.<sup>83</sup> e Orringer et al.<sup>71</sup>,

a expressão de pró-colágeno I aumentou e foi estatisticamente significativa nestes trabalhos<sup>71,83,94,95</sup>. Em nossos casos, a despeito do aumento em 14 dos 26 casos tratados, não observamos diferença estatisticamente significativa. Esse fato, talvez, possa ser explicado pela biópsia final ter sido realizada três meses após a última sessão de TFD. Possivelmente, se tivéssemos realizado biópsias seriadas com um, dois e três meses após, teríamos observado um aumento considerável inicialmente, onde é mais esperado uma elevação da expressão de pró-colágeno I. Notamos que, após três meses, o que se sucede é um aumento expressivo das fibras colágenas na derme superior, como já explicado acima e, nesta fase mais tardia, a expressão de pró-colágeno I possivelmente encontra-se em queda. Apenas Almeida Issa et al observaram persistência da elevação de pró-colágeno I após três e seis meses da TFD<sup>94</sup>.

Em um estudo com microscopia eletrônica, que envolveu sete pacientes com grau leve de fotoenvelhecimento, Marmur et al.<sup>96</sup>, observaram aumento das fibras colágenas tipo I em pacientes tratados com luz intensa pulsada e 5-ALA. No protocolo, metade da face foi tratada com luz intensa pulsada e a outra metade com 5-ALA (uma hora de incubação) e luz pulsada. A biópsia final foi feita após três meses, revelando aumento das fibras colágenas I em ambos os lados, porém, mais intensa no lado pré-tratado com 5-ALA<sup>96</sup>. Neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os lados, uma vez que a amostra foi pequena. Interessante notar que o tempo de incubação da droga foi curto e que os pacientes apresentavam grau leve de fotodano. Os próprios autores criticam esses

métodos, uma vez que, talvez um maior tempo de incubação da droga e uma amostra de pacientes com QAs no campo, possivelmente mostraria resultados mais expressivos.

Park et al.<sup>83</sup> avaliaram o efeito da TFD com 5-ALA tópico em 14 pacientes orientais com fotodano e QAs, submetidos dois tratamentos com intervalo de 30 dias e biópsia de pele antes e após um mês da última sessão. A avaliação imunohistoquímica mostrou aumento da expressão para: TGF $\beta$ , T $\beta$ RII, pró-colágeno I e III. Houve diminuição da expressão das MMPs 1,3 e 12 e de fibrilina e tropoelastina<sup>83</sup>. Esses achados mostram que a TFD aumentou a expressão do receptor tipo II para TGF $\beta$ , assim como a síntese de TGF $\beta$ . Sabidamente, a ativação da via TGF $\beta$ /Smad induz a síntese de pró-colágeno I e inibe a síntese de MMPs 1 e 3<sup>7,8</sup>. Esses resultados, em conjunto, mostram a neoformação de colágeno induzida pela TFD. A diminuição das expressões de tropoelastina e fibrilina está diretamente relacionada à diminuição do material elastótico. A expressão dos genes da tropoelastina e de fibrilina está aumentada na pele cronicamente fotodanificada, sendo que essas proteínas depositam-se, preferencialmente, nas fibras elásticas amorfas e degradadas do material elastótico<sup>83</sup>. Neste estudo, foram observadas diminuição do material elastótico, assim como diminuição da expressão dessas proteínas no campo estudado<sup>83</sup>.

Orringer et al.<sup>71</sup>, estudando o efeito da TFD com 5-ALA na pele de indivíduos fotoenvelhecidos através de biópsias seriadas, também mostrou aumento da expressão para pró-colágeno I e III após 30 dias do tratamento.

Observaram também, que a expressão de MMP-1 aumentou em mais de 20 vezes em relação ao valor basal nas 24 horas iniciais após a TFD, voltando aos níveis pré-tratamento após esse período<sup>71</sup>. Choi et al.<sup>93</sup> demonstrou que a TFD com MAL, em ratos, aumentou a expressão das citocinas IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1, 48 horas após o procedimento. Da mesma forma, as MMP1, 2, 3 e 9 aumentaram também nas 48 primeiras horas e diminuíram gradativamente a partir deste momento. Já a expressão de pró-colágeno I e III mostrou-se aumentada 12 dias após o procedimento, revelando ser um evento mais tardio.

Em nosso trabalho, a expressão de MMP-1, embora tivesse aumentado após o tratamento, também não mostrou alteração estatisticamente significativa. O valor inicial, pré-tratamento foi  $1,56 \pm 0,97$  e aumentou para  $1,97 \pm 1,09$  ao final do tratamento ( $p = 0,08$ ). Esse aumento foi identificado em 12 dos 26 pacientes tratados com TFD. Através do teste de correlação de Spearman, houve correlação linear negativa entre “grau de elastose” e expressão de MMP-1, após o tratamento. Isso significa que um aumento da expressão da MMP-1 correlacionava-se com diminuição do parâmetro histopatológico “grau de elastose”. Na maioria dos trabalhos, a elevação das MMPs ocorre como um evento inicial, promovendo a degradação das fibras colágenas alteradas. Esse evento parece ser importante para iniciar o processo de neocolagênese, uma vez que o acúmulo desse colágeno degradado e de material elastótico a inibe<sup>6,93,95</sup>. Portanto, a digestão protelolítica dessas fibras alteradas pelas MMPs, logo

no início da cascata de evento, são de grande importância no restabelecimento da biossíntese do colágeno<sup>71,95</sup>.

A MMP-1, também chamada de colagenase 1, é responsável pela quebra dos colágenos I e III, que posteriormente serão digeridos pelas gelatinases (MMP-9). A persistência da expressão de MMP-1, após três meses da última sessão de TFD, pode ser considerada um achado normal, uma vez que a digestão das fibras colágenas degeneradas ainda ocorre. Observamos uma correlação negativa entre níveis de MMP-1 e “grau de elastose”. Esse achado corrobora o fato de que um aumento da enzima MMP-1 promove maior quebra de colágeno degradado e desencadeia neocolagênese. O aumento consequente das fibras colágenas contrapõe-se com o grau de elastose e a quantidade de material elastótico observada na derme fotodanificada.

Em resumo, os achados histopatológicos dérmicos de nosso estudo mostraram um aumento significativo das fibras colágenas após o tratamento, que se apresentavam predominantemente na derme papilar e, por vezes, na derme média circundando o material elastótico característico do envelhecimento cutâneo induzido pela radiação UV. Observamos, também, que a quantidade de material elastótico, medida através da análise morfométrica digital, também diminuiu. Por último, o grau de elastose também mostrou alterações significativas, havendo diminuição das fibras elásticas degradadas e amorfas e aumento das fibras elásticas fibrilares e mais organizadas.

Os achados clínicos dos estudos acima mencionados, assim como os resultados das expressões de diversos marcadores imunohistoquímicos nos ajudam a embasar os possíveis mecanismos de ação da TFD na pele fotodanificada<sup>6</sup>. Como consequência de um aumento da captação de 5-ALA ou MAL, existe maior conversão e acúmulo de PPIX nos queratinócitos pré-malignos no campo de cancerização. Durante a ativação fotodinâmica, existe necrose destes queratinócitos, resultando em renovação da epiderme e diminuição das QAs no campo. Essa renovação acarreta na melhora dos sinais clínicos de aspereza, pigmentação e palidez. Além disso, a neocolagênese ocorre como um efeito indireto da TFD, estimulada pela produção de várias citocinas. Karrer et al.<sup>97</sup>, demonstraram a síntese das MMP 1 e 3 por fibroblastos através das citocinas produzidas por queratinócitos após a TFD<sup>97</sup>. O processo inflamatório induzido pela TFD promove dano sub-letal nos queratinócitos. Esse processo, leva à síntese e liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e TGF- $\beta$ 1. Essas citocinas penetram a membrana basal e desencadeiam a produção de MMPs pelos fibroblastos dérmicos através de uma via parácrina. Em contraste com a produção de ROS induzida pela exposição crônica à radiação UV, que também ocorre na derme e é responsável pelo envelhecimento cutâneo, através do efeito direto nos fibroblastos e matriz extracelular, a TFD apenas atua na epiderme, uma vez que não ocorre fotossensibilização relevante da derme após a aplicação com 5-ALA ou MAL. O acúmulo crônico de fibras colágenas degradadas e fragmentadas, presente na derme envelhecida, inibe a neocolagênese<sup>91</sup>. A ação proteolítica das MMPs na derme contribui para a diminuição do

colágeno degradado e do material elástico e parece ter participação decisiva para o reinício da biossíntese de colágeno. A via TGF- $\beta$ 1/Smad é estimulada e desencadeia a maior expressão de pró-colágeno I e III. O estímulo desta via, por sua vez, inibe a expressão tardia das MMPs<sup>7,8,83</sup>. Esse conjunto de eventos leva a um constante aumento na produção de fibras colágenas que revelam a melhora do fotodano global da face, com atenuação de rugas finas e diminuição aparente das telangiectasias e eritema facial.

Finalmente, podemos concluir que os achados clínicos, histopatológicos e imunohistoquímicos no presente estudo, que incluiu 26 pacientes, são relevantes. O número de QAs no campo estudado diminuiu em 89,5%, o que está de acordo com os dados da literatura. As alterações clínicas induzidas pelas sessões de TFD com MAL mostraram melhora estatisticamente significativa para todos os parâmetros clínicos estudados: “fotoenvelhecimento global da face, pigmentação difusa, rugas finas, palidez facial, aspereza, eritema, e telangiectasia”. Porém, não observamos mudanças no parâmetro “rugos profundas”, como já era esperado. Nossos resultados são compatíveis com a maioria dos estudos publicados até hoje, com relevância para melhora do eritema e telangiectasias faciais, fato não observado no estudo de Zane et al.<sup>62</sup>.

A avaliação histopatológica do campo de cancerização e da derme adjacente ao campo revelaram intensas mudanças após a TFD. O tratamento foi capaz de induzir melhora nos índices de gravidade da atipia dos queratinócitos, promover maior síntese de fibras colágenas na derme

superior e média e diminuir tanto o grau de intensidade da elastose como a quantidade de material elastótico depositado na derme. Os resultados dos estudos imunohistoquímicos revelaram: 1) diminuição da expressão da TP-53 na epiderme do campo de cancerização, embora o resultado não tenha sido estatisticamente significativo; 2) elevação de MMP-1 e pró-colágeno I, embora também não fossem estatisticamente significantes. Já a expressão da Tn-C, mostrou-se aumentada significativamente. Esse resultado talvez possa ser explicado pelos seguintes fatores: - elegemos o local da biópsia na pele aparentemente “normal” dentro do campo de cancerização e – o processo inflamatório decorrente da TFD gera citocinas capazes de elevar a expressão de Tn-C no tecido. Baseado nos resultados obtidos neste estudo e confrontados com os dados de literatura, talvez possamos sugerir que o emprego da TFD no campo de cancerização tenha potencial efeito na diminuição do índice de severidade da atipia celular assim como no aparecimento de novas lesões malignas e pré-malignas. A importância da instituição de múltiplas sessões de TFD em caráter regular, a nosso ver, é de considerável importância para a prevenção de novas lesões em campos de cancerização severos.

Como perspectivas futuras, pretendemos continuar com a mesma linha de pesquisa através de estudos com técnicas específicas para mensurar a expressão da proteína TP-53 mutada no campo de cancerização e avaliar o efeito preventivo no aparecimento de novas QAs no campo tratado, através de um estudo controlado, randomizado e em longo prazo.

## **7 CONCLUSÕES**

O estudo da pele do campo cancerizável antes e após a TFD com MAL mostrou:

1. Melhora clínica da pele fotoenvelhecida com exceção do parâmetro “rugas profundas”;
2. Alta eficácia no tratamento das QAs, com diminuição em 89,5% das lesões;
3. Resultados clínicos semelhantes quando utilizadas duas ou três sessões de TFD com MAL;
4. Melhora histológica da severidade e extensão da atipia dos queratinócitos, aumento das fibras colágenas e diminuição do grau de elastose na derme subjacente;
5. Diminuição do material elastótico na derme demonstrado pela morfometria microscópica digital;
6. Diminuição do marcador precoce da carcinogênese cutânea TP-53 e aumento e marcadores de neo colagênese pró-colágeno-I e MMP-1, através do exame imunohistoquímico, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa;
7. Aumento da expressão de Tn-C secundário ao processo de reparação tecidual.

## **8 REFERÊNCIAS**

1. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kmmmer JA, Leemans C, Braakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003;63:1727-30.
2. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. *Cancer (Phila).* 1953;6:963-8.
3. Marks R. Malignant transformation of solar keratoses to SCC. *Lancet.* 1988;1:795-7.
4. Glogau RG. The risk of progression to invasive disease. *JAAD.* 2000;42(Suppl):S23-4.
5. Quaedvlieg PJF, Tirsi E, Thissen MRTM, Krekels GA. Actinic keratosis: how to differentiate the good from the bad ones? *Eur J Dermatol.* 2006;16 (4):335-9.
6. Kohl E, Torezan LAR, Landthaler M, Szeimies R-M. Aesthetic effects of topical photodynamic therapy. *J Eur Acad Dermatol.* 2010:1-9.
7. Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting HC, Roeder A, Weindl G. Retinoids in the treatment of photoaging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clin Int Aging.* 2006;1(4):327-48.
8. Quan T, He TKang S, Voorhees JJ, Fisher G. Solar UV radiation reduces collagen photoaged human skin by blocking transforming growth factor- $\beta$  type II receptor/Smad signaling. *Am J Pathol.* 2004;165(3):441-51.
9. Braathen L, Szeimies RM, Basset-Seguín N, Bissonnette R, Foley P, Pariser D, Roelands R, Wennberg AM, Morton C. Guidelines on the use of photodynamic therapy for non melanoma skin cancer: an international consensus. *J Am Acad Dermatol.* 2007;56(1):125-43.
10. Babilas P, Schreml S, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology. State-of-the-art. *Photochem Photobiol Photomed.* 2010;26:118-32.

11. Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultravioletlight induced alteration of the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006;150(1):25-38.
12. Rodust PM, Stockfleth E, Ulrich C, Leverkus M, Eberle J. UV- induced squamous cell carcinoma- a role for antiapoptotic signaling pathways. *Br J Dermatol.* 2009;161(Suppl 3):107-15.
13. Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, van der Wall JE, Braakhuis BJM. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol.* 2002;161:1051-60.
14. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Koch WM, Sidransky D. Molecular assessment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Eng J Med.* 1995;332:429-35.
15. Nishigori C. Cellular aspectsof photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci.* 2006;5:208-14.
16. Ischihashi M, Ueda M, Budyianto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T. UV-induced skin damage. *Toxicology.* 2003;189:21-39.
17. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of UV radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;195:298-308.
18. Jonason AS, Subrahmanyam K, Price G, Restifo R, Brash D. Frequent clones of P53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93:14025-29.
19. Berg RJW, van Kraken HJ, Rebel HG, de Vries A, van Vloten WA, van Kreijl CF, van der Leun JC, de Gruijl FR. Early p-53 mutations in mouse skin carcinogenesis by UV-B radiation: immunohistochemical detection of mutant p-53 protein clusters of preneoplastic epidermal cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93:274-8.
20. Roos WP, Kania B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med.* 2006;12:440-50.

21. Isoherranen K, Punnomen K, Jansen C. Ultraviolet irradiation induces cyclo-oxygenase-2 expression in keratinocytes. *Br J Dermatol*. 1999;140:1017-22.
22. Rundhaug JE, Fisher SM. Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis. *Photochem Photobiol*. 2008;84:322-9.
23. Tripp CS, Blomme EAG, ChinnKS. Epidermal COX-2 induction following UV irradiation: suggested mechanism for the role of COX-2 inhibition in photoprotection. *J Invest Dermatol*. 2003;121:853-61.
24. Lei K, Davis JR. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl-2 family induces Bax dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:2432-7.
25. Delehedde M, Cho SH, Sarkiss M. Altered expression of bcl -2 family member proteins in non-melanoma skin cancer. *Cancer*. 1999;85:1514-22.
26. Peter ME, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*. 2003;10:26-35.
27. Rosette C, Karin M. UV light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*. 1996;274:1194-7.
28. Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid B. P53 mutant clones and field effects on Barrett's esophagus. *Cancer Res*. 1999;59:4784-7.
29. Axell T, Pindborg JJ, Smith CJ, van der Waal I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppala, Sweden, May 18-21, 1994. *J Oral Pathol Med*. 1996;25:49-54.
30. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D. Association between cigarette smoking and mutation of the p-53 gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Eng J Med*. 1995;332:712-7.

31. Olivier M, Hollstein M, Hainault P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:1-17.
32. Simon R, Eltze E, Schafer KL, Burger H, Semjonow A, Bowker W. Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. *Cancer Res.* 2001;61:332-55.
33. de Becker D, McGregor JM, Hughes BR. Guidelines for the management of actinic keratoses. *Br J Dermatol.* 2007;156:222-30.
34. Ulrich M, Maltusch A, Röwert-Huber J, Gonzalez S, Sterry W, Stochfleth E, Astner S. Actinic keratoses: non-invasive diagnosis for field cancerisation. *Br J Dermatol.* 2007;156(Suppl 3):13-7.
35. Lentini M, Schepis C, Cuppari DA, Batolo D. Tenascin expression in actinic keratosis. *J Cutan Pathol.* 2006;33:716-20.
36. Dang C, Gottschilling M, Roewert J, Forshner T, Stockfleth E, Nindl I. Tenascin-C patterns and splice variants in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2006;155:763-70.
37. Rheinwald JG, Hahn WC, Ramsey MR. A two-stage p16 and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent telomere status. *Mol Cell Biol.* 2002;22:5157-72.
38. Dover JS, Bathia AC, Stewart B, Arndt KA. Topical 5-ALA combined with intense pulsed light in the treatment of photoaging. *Arch Dermatol.* 2005;141:1247-52.
39. Ruiz-Rodriguez R, Sanz-Sanchez T, Cordoba S. Photodynamic photorejuvenation. *Dermatol Surg.* 2002;28:742-4.
40. Ruiz-Rodriguez R, López-Rodriguez L. Non-ablative skin resurfacing: the role of PDT. *J Drugs Dermatol.* 2006;5(8):756-62.
41. Rittié L, Fisher G. UV-light – induced signal cascades and skin aging. *Aging Res Rev.* 2002;1:705-20.

42. Massague J. How cells read TGF- $\beta$  signals. *Nat Rev*. 2000;1:169-78.
43. Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 2000;42:389-413.
44. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B*. 1990;6:143-8.
45. Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX: a clinical useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 1992;14:275-92.
46. Daniell MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg*. 1991;61:340-8.
47. Angell-Petersen E, Sorensen R, Warloe T, Soler AM, Moan J, Peng Q, Giercksky KE. Porphyrin formation in actinic keratosis and basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *J Invest Dermatol*. 2006;126(2):265-71.
48. Piacquadio DJ, Chen DM, Farber HF, Fowler JF Jr, Glazer SD, Goodman JJ. Photodynamic therapy with aminolevulinic topical solution and visible blue light in the treatment of multiples actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. *Arch Dermatol*. 2004;140:41-6.
49. Nestor, MS, Gold MH, Kauvar ANB, Taub AF, Geronemus RG, et al. The use of photodynamic therapy in dermatology: results of a consensus conference. *J Drugs Dermatol*. 2006;5(2):140-54.
50. 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; 2009. p.171-94.
51. Charlesworth P, Truscott TG. The use of 5-ALA in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 1993;18:99-100.

52. 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.* 2001;62:140-5.
53. Szeimies RM. Photodynamic therapy with topical application of 5-ALA in the treatment of actinic ketaratosis; a clinical and histological study. *Dermatology.* 1996;192:246-51.
54. Touma D, Yaar M, Whitehead S, Konnikov N, Gilchrest BA. A trial of short incubation, broad-area photodynamic therapy for facial actinic keratosis and diffuse photodamage. *Arch Dermatol.* 2004;140:33-40.
55. Fijan S, Honigsman H, Ortel B. Photodynamic therapy of epithelial skin tumors using delta-aminolevulinic acid and desferroxamine. *Br J Dermatol.* 1995;133:282-8.
56. Orenstein A, et al. Photodynamic therapy of malignant lesions of the skin mediated by topical application of 5- ALA in combination with DMSO and EDTA. *Lasers Life Sci.* 1996;7:49-57.
57. Avram D, Goldman MP. Effectiveness and safety of ALA-IPL in treating actinic keratoses and photodamage. *J Drugs Dermatol.* 2004;3(Suppl):36-9.
58. Alster TS, Tanzi EL, Welsh EC. Photorejuvenation of facial skin with topical 20% 5-ALA and intense pulsed light treatment: a split-face comparison study. *J Drugs Dermatol.* 2005;4:35-8.
59. Gold MH, Bradshaw VL, Boring MM, Bridges TM, Biron JA. Split face comparison of photodynamic therapy with 5- aminolevulinic acid and intense pulsed light versus intense pulsed light alone for photodamage. *Dermatol Surg.* 2006;32(6):795-803.
60. Szeimies RM, Karrer S, Radakovic-Fijan S, Tanew A, Calzavara-Pinton P, Zane C, Sidoroff A, Braathen L. Photodynamic therapy using methyl aminolevelinate compared with cryotherapy for actinic keratosis:

- a prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol.* 2002;47:258-62.
61. Pariser D, Lowe N, Stewart DM, Jarratt MT, Lucky AW, Pariser RJ, Yamauchi P. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:(2) 227-32.
  62. Zane C, Capezera R, Sala R, Venturini M, Calzavara-Pinton P. Clinical and echographic analysis of PDT using MAL as sensitizer in the treatment of photodamaged facial skin. *Lasers Surg Med.* 2007;39:203-9.
  63. Szeimies, RM, Sassy T, Landthaler M. Penetration potency of topical applied 5-ALA for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. *Photochem Photobiol.* 1994;59:73-6.
  64. Fritsch C, Homey B, Stahal W. Preferential relative porphyrin enrichment in solar keratoses upon topical application of delta-aminolevulinic acid methylesther. *Photochem Photobiol.* 1998;68:218-21.
  65. Kessel D, Luo Y. Delayed oxidative photodamage induced by photodynamic therapy. *Photcehm Photobiol.* 1996;64:601-4.
  66. Freeman M, Vinciullo C, Francis D, Spelman L, Watson A, Foley P. A comparison of PDT using topical methyl aminolevulinate with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratoses: a prospective, randomized study. *J Dermatol Treat.* 2003;14:99-106.
  67. Tarstedt M, Rosdahl I, Berne B. A randomized multicenter study to compare two treatment regimens of topical MAL-PDT in actinic keratosis of the face and scalp. *Acta Dermatol Venereol.* 2005;85:424-8.
  68. Wiegell SR, Stender IM, Wulf HC. Pain associated with photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acido or 5-aminolevulinic acid

- methylester on tape-stripped normal skin. *Arch Dermatol.* 2003;139:1173-7.
69. Fink-Puches R, Wulf P. Long term follow-up and histological changes of superficial non-melanoma skin cancers treated with topical delta-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Arch Dermatol.* 1998;134:821-6.
70. Wiegell SR, Fabricius S, Stender IM, Berne B, Kroon S, Andersen BL, Mørk C, Sandberg C, Jemec GB, Mogensen M, Brocks KM, Philipsen PA, Heydenreich J, Haedersdal M, Wulf HC. A randomized multicentre study of directed daylight exposure times of 1½ vs 2½ hs daylight-mediated PDT with methyl aminolevulinate in patients with multiple thin actinic keratoses of the face and scalp. *Br J Dermatol.* 2011;164(5):1083-90.
71. Orringer JS, Hammerberg C, Hamilton T, Johnson TM, Kang S, Sachs DL, Fisher G, Voorhees JJ. Molecular effects of Photodynamic Therapy for photoaging. *Arch Dermatol.* 2008;144(10):1296-302.
72. Almeida Issa, MC, Maceira-Pineiro J, Farias RE, Pureza M, Raggio-Luiz R, Azulay MM. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in photodamaged skin by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2009;161:647-53.
73. Sharfei S, Juzenas P, Moan J, Bissonnette R. Weekly topical application of methyl aminolevulinate followed by light exposure delays the appearance of UV-induced tumors in mice. *Arch Dermatol Res.* 2002;294:237-42.
74. Bissonnette R. Chemopreventive thoughts for photodynamic therapy. *Dermatol Clin.* 2007;25 95-100.
75. Wulf HC Pavel S, Stender I, Bakker-Wensveen CA. Topical Photodynamic therapy for prevention of new skin lesions in renal transplant patients. *J Eur Acad Dermatol Venerol.* 2006;86:25-8,.

76. Wennberg AM, Stenquist B, Stockfleth E. Photodynamic therapy with methyl aminolevulinate for prevention of new skin lesions in transplant recipients: a randomized study. *Transplantation*. 2008;86:423-9.
77. Stender IM, Bech-Thomsen N, Poulsen T, Wulf HC. Photodynamic therapy with topical ALA delays UV carcinogenesis in hairless mice. *Photochem Photobiol*. 1997;66:493-6.
78. Dragieva.G, Prinz BM, Hafner J, Dummer R, Burg R, Binswanger U, Kempf W. A randomized controlled clinical trial of topical photodynamic therapy with methyl aminolevulinate in the treatment of actinic keratoses in transplant patients. *Br J Dermatol*. 2004;151:196-200.
79. McCarthy M Jr, Chang CH, Pickard AS et al. Visual analog scales for assessing surgical pain. *J Am Coll Surg*. 2005;201:245-52.
80. Alexiades-Armenakas MR, Geronemus RG. Laser-mediated photodynamic therapy of actinic keratoses. *Arch Dermatol*. 2003;139:1313-20.
81. Key DJ. 5-ALA – pulsed dye laser photodynamic therapy for the treatment of photoaging. *Cosmet Dermatol*. 2005;18:31-6.
82. Torezan LA, Osorio N, Festa-Neto C, Soto MN. Photodynamic photorejuvenation of the skin using 5-ALA and intense pulsed light: clinical and histological evaluation. *Lasers Surg Med Suppl*. 2005;17 93.
83. Park MY, Sohn S, Lee ES, Kim YC. Photorejuvenation induced by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in patients with actinic keratosis: histologic analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2010;62(1):85-95.
84. Lehman P. Methyl aminolevulinate- photodynamic therapy: a review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2007;156:793-801.
85. Braathen LR, Paredes BE, Saksela O, Fritsch C, Gardlo K, Morken T, Frolich KW, Warloe T, Soler AW, Ros AM. Short incubation with methylaminolevulinate for photodynamic therapy of actinic keratosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;23:550-5.

86. Kleinpenning MM, Van de Kerkhof PC, Gerritson RM. The clinical efficacy of topical MAL-PDT in moderate to severe actinic keratoses of the face and scalp. *J Dermatolog Treat.* 2010;21(4):252-7.
87. Apalla Z, Sotiriou E, Chovarda E, Lefaki I, Devliotou-Panafiotidou D, Ioannides D. Skin cancer: preventive photodynamic therapy in patients with face and scalp cancerization. A randomized placebo-controlled study. *Br J Dermatol.* 2010;162(1):171-5.
88. Bagazgoitia L, Cuevas Santos J, Juarranz A, Jaen P. Photodynamic therapy reduces the histological features of actinic damage and the expression of early oncogenic markers. *Br J Dermatol.* 2011;165:144-51.
89. Orringer JS, Johnson TM, Kang S, Karimipour DJ, Hammerberg C, Hamilton T, Voorhees JJ, Fisher G. Effect of carbon dioxide laser resurfacing on epidermal p53 immunostaining in photodamaged skin. *Arch Dermatol.* 2004;140:1073-7.
90. Latijnhouwers M, Bergers M, Ponec M, Dijkman H, Andriessen M, Schalkwijk J. Human epidermal keratinocytes are a source of tenascin-C during wound healing. *J Invest Dermatol.* 1997;108(5):776-83.
91. Latijnhouwers M, Bergers M, Van Bergen BH, Spruijt KI, Andriessen M, Schalkwijk J. Tenascin expression during wound healing in human skin. *J Pathol.* 1996;178(1):30-5.
92. Latijnhouwers M, Pfundt R, de Jongh GJ, Schalkwijk J. Tenascin-C expression in human epidermal keratinocytes is regulated by inflammatory cytokines and a stress response pathway. *Matrix Biol.* 1998;17(4):305-16.
93. Choi JY, Park GT, Na EY, Wi HS, Lee SC, Lee JB. Molecular changes following topical photodynamic therapy using methyl aminolaevulinate in mouse skin. *J Dermatol Sci.* 2010;58(3):198-203.
94. Issa MCA, Pineiro-Maceira J, Vieira MTC, Olej B, Mandarim-Lacerda CA, Luiz RR, Azulay MM. Photorejuvenation with topical Methyl

- aminolevulinate and red light: a randomized, prospective, clinical, histopathologic and morphometric study. *Dermatol Surg.* 2010;36:39-48.
95. Orringer JS, Voorhees JJ, Hamilton T. Dermal matrix remodeling after nonablative laser therapy. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53:775-82.
96. Marmur ES, Phelps R, Goldberg DJ. Ultrastructural changes seen after ALA-IPL photorejuvenation: a pilot study. *J Cosmet Laser Ther.* 2005;7:21-4.
97. Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, Landthaler M, Szeimies RM. Keratinocytes-derived cytokines after photodynamic therapy and their paracrine induction of matrix metalloproteinases in fibroblasts. *Br J Dermatol.* 2004;151:776-83.