

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS,  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA

OTIMIZAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ATRAVÉS DO  
MÉTODO FRACIONADO NO TRATAMENTO DE CARCINOMA  
BASOCELULAR

**Dora Patricia Ramirez Angarita**

Universidade Federal de São Carlos  
São Carlos, SP – Brasil  
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS,  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA

OTIMIZAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ATRAVÉS DO  
MÉTODO FRACIONADO NO TRATAMENTO DE CARCINOMA  
BASOCELULAR

**Dora Patricia Ramirez Angarita**

Tese apresentada ao programa de  
Pós-graduação em Biotecnologia  
como requisito para a obtenção do título de  
DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA

**Orientadores:**

Prof. Dr Vanderlei Salvador Bagnato  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Universidade Federal de São Carlos  
São Carlos, SP – Brasil  
2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Dora Patricia Ramirez Angarita, realizada em 22/06/2017:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato  
USP

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava  
UFSCar

Profa. Dra. Angelina Maria Fuzer  
UFSCar

Profa. Dra. Denise M. Zezell  
USP

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues  
UFSCar

Dedico este trabalho a Deus e a minha família  
que me dão força e sabedoria; A força para  
enfrentar qualquer dificuldade e a sabedoria  
para fazer o que é correto.

## Agradecimentos

Agradeço a DEUS, em primeiro lugar, pelas graças e oportunidades que me foram dadas na vida.

À meus pais pelo apoio incondicional. À minha mãe agradeço os valores, os objetivos de vida que me transmitiram e o amor “muchas gracias”. A meu querido irmãozinho e minha amada sobrinha porque são minha inspiração e fazem que cada dia eu queira me esforçar mais.

Um agradecimento muito especial para Camilo, meu marido, por todo o tempo que não lhe pude dedicar, em prol da realização deste trabalho, pelas palavras de incentivo e, essencialmente, por me ter feito acreditar que era capaz.

À minha segunda família especialmente as senhoras Maria Antonia, Rosa Tulia e Rosa por sua confiança e apoio brindado em momentos cruciais.

Ao professor Vanderlei, meu primeiro mestre, pela orientação e dedicação pela confiança em permitir que eu integrasse seu grupo. Agradeço pela paciência, apoio permanente, pelo conhecimento e experiências compartilhadas sem as quais este trabalho no teria sido realizado.

À Professora Fernanda, pela orientação, pelo carinho, pelos ensinamentos e acima de tudo pela amizade.

À Dra Ana Gabriela, quem não só me apresentou a dermato-oncologia como sua paixão, mas também, me inspirou com seu exemplo de vida em muitos outros aspectos.

À Professora Cristina pelos ensinamentos e seu exemplo de vida e especialmente pela la gran ajuda na reta final deste trabalho.

À Natalia por todo o apoio pessoal, carinho e por estar sempre prestes a escutar e ajudar oferecendo seus conhecimentos.

À Lilian pela amizade, ensinamento e todo o tempo invertido neste trabalho.

Agradeço especialmente, as leituras minuciosas e as sugestões que trouxeram maior clareza aos textos

À Elisângela, Maira e Leticiapelas contribuições e apoio brindado na reta final deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos, especialmente a Miriam, Michele, Thaila, Mariana, Larissa, Kate, Paulinha, Hilde, Dirceu pelo apoio e contribuições.

Aos amigos Viviane e Henrique por suas dicas valiosas e longas conversas da vida.

À minha eterna amiga Paty, por suas preces e amizade, mesmo longe. À Yazmín e Victor por sua preocupação, preces e amizade.

Aos funcionários e amigos da pós-graduação em Biotecnologia da UFscar e do IFSC, em especial Claudia pelo apoio constante.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFscar e o IFSC/USP pela oportunidade oferecida.

Em especial aos pacientes, pela confiança e sem os quais não teria sido possível a realização desta investigação.

Ao Brasil, gigante da América do Sul, pela imensurável contribuição em minha formação e pela oportunidade de realizar esta aspiração pessoal. Minha eterna gratidão.

*"porque Dios es el que en vosotros produce así el  
querer como el hacer, por su buena voluntad".*

(Filipenses 2;13)

## Resumo

O câncer de Pele não melanoma é o tipo de câncer mais prevalente no Brasil e no mundo. Embora, possua baixa letalidade, apresenta malignidade local, podendo invadir e destruir tecido adjacente, representando alto impacto na saúde do paciente. Os tratamentos convencionais para lesões de carcinoma basocelular (CBC) abrangem técnicas de aplicação tópica e mais classicamente a cirúrgica. A via cirúrgica é um dos procedimentos mais eficientes. No entanto, esta técnica exige infraestrutura especializada, além de, em geral, a internação do paciente, e apresenta a possibilidade de reduções de funcionalidade anatômica e estética no local da lesão tratada. A Terapia Fotodinâmica tópica é uma técnica que oferece vantagens como excelente resultado estético especialmente quando trata das lesões superficiais de grande área, aplicação do procedimento em ambiente ambulatorial e apresenta um mínimo impacto funcional do local tratado. A Terapia Fotodinâmica Fracionada é uma modificação da técnica convencional, na qual é aplicada a dose total de luz, em etapas separadas por um intervalo de tempo (período de escuro). Este período permite reoxigenação do tecido, redistribuição e acúmulo da Protoporfirina IX (PpIX), que favorece maior dano celular com repercussão positiva na resposta final ao tratamento. As taxas de cura usando esse protocolo, em alguns estudos são semelhantes ao protocolo convencional. No entanto, no Brasil, nenhum estudo usando esta técnica para tratamento de CBC tem sido publicado. Dessa forma, foi avaliado a resposta completa e parcial aos quatro diferentes protocolos da Terapia Fotodinâmica fracionada, após 30 dias do tratamento. O estudo mostrou uma resposta completa de 65.8%, 67.6%, 72.7% e 95.4% no grupo 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Observamos que, o tempo de escuro e a dose de irradiação são parâmetros que apresentam grande importância para a resposta final ao tratamento. Nossos resultados sugerem que a Terapia Fotodinâmica Fracionada é uma técnica que possui excelente resultado estético e resposta promissora quando avaliada 30 dias após o tratamento. Porém, será necessário um seguimento de maior tempo para melhores entendimentos do comportamento das lesões tratadas.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica fracionada, tempo de escuro, dose de irradiação, Carcinoma Basocelular, Protocolo clínico.

## Abstract

Non-melanoma skin cancer is the most prevalent type of cancer in Brazil and worldwide. Although, it has low lethality, it presents local malignancy, and the ability to invade and destroy adjacent tissues, representing high impact on the health of the patient. Conventional treatments for basal cell carcinoma (CBC) lesions include topical and, more usually, surgical techniques. The surgical treatment is one of the most efficient procedures. However, this technique requires specialized infrastructure, in addition to frequently requiring patient hospitalization, and presenting the possibility of anatomical and aesthetic functionality reductions at the site of the treated lesion. Topical Photodynamic Therapy is a technique that offers advantages as: excellent aesthetic result - especially when treating large area superficial lesions, possibility of application for outpatients in ambulatory, and presenting a minimum functional impact of the treated anatomical site. Fractionated Photodynamic Therapy is a modification of the usual technique in which the full dose of light is delivered in steps separated by a periods of time ("dark intervals"). This period allows re-oxygenation of the tissue, re-distribution and accumulation of protoporphyrin IX (PpIX) that leads to greater cellular damage with positive repercussion in the final response to treatment. The cure rates using this protocol in some studies are similar to the conventional protocol. However, in Brazil, no studies using this technique for treatment of BCC have been published. Thus, we proposed to evaluate the complete and partial response to the four different protocols of fractional Photodynamic Therapy, when evaluated after 30 days of treatment. The study showed a complete response of 65.8%, 67.6%, 72.7% and 95.4% in the groups 1, 2, 3 and 4, respectively. We observed that the dark interval and the irradiated light dose are parameters of great importance for the final response to the treatment. Our results suggest that Fractionated Photodynamic Therapy is a technique with excellent aesthetic result and complete response when evaluated 30 days after treatment. However, a longer follow-up will be necessary for better understanding of the behavior of the lesions treated.

Keywords: Fractionated photodynamic therapy, complete response, dark time, irradiation dose, basal cell carcinoma, Clinical protocol.

## Lista de Figuras

Figura 1: Carcinoma escamocelular localizado no dedo da mão Esquerda. (Fonte: autoria própria).....	19
Figura 2: CBC nodular-ulcerado. Na foto se observam as telangectasias (a) e leve pigmentação (b). Fonte: autoria própria. ....	20
Figura 3: CBC pigmentado. Fonte: autoria própria.....	21
Figura 4: CBC superficial. Fonte: autoria própria.....	22
Figura 5: Fórmula molecular do ALA modificado de (WIKIMEDIA, 2016).....	27
Figura 6: Fórmula molecular do MAL modificado de (WIKIMEDIA, 2017). ....	28
Figura 7: A ação fotodinâmica ocorre mediante a interação de três componentes: fotossensibilizador (FS), luz e o oxigênio molecular (O <sub>2</sub> ). Fonte: autoria própria.....	28
Figura 8: TFD com luz solar.(PÉREZ; GARCÍA; GILABERTE, 2014).....	29
Figura 9 Uso de LASER e fibra optica na terapia fotodinâmica. Fonte: autoria própria.: .....	30
Figura 10 Uso de LEDs para terapia fotodinâmica. Fonte: autoria própria. ....	31
Figura 11: Metabolismo do grupo heme. O ALA é sintetizado a partir da glicina e succinil-CoA. Após ser metabolizado por diferentes enzimas é convertido em protoporfirina IX. Fonte: autoria própria. ....	33
Figura 12: janela óptica biológica, faixa espectral entre 600 a 800 nm modificado de(BAGNATO V. S., 2015).....	33
Figura 13: Diagrama de Jablonski modificado.....	35
Figura 14: Equipamento LINCE® . A ponteira da esquerda emite luz num comprimento de onda de 630±10nm. A ponteira da direita emite luz num comprimento de onda de 400±10nm.....	44

Figura 15: Aplicação do protocolo de TFDf; A) aplicação do creme MAL 20% após o preparo da lesão; B - C) posicionamento do curativo para evitar a exposição solar do creme MAL 20%; D) Iluminação da lesão com uma dose de 150 J/cm<sup>2</sup>, uma intensidade de 125mW/cm<sup>2</sup> e um tempo de 20 minutos..... 46

Figura 16: Evolução no tempo do protocolo aplicado ao grupo 1 (G1). Primeira etapa: preparo da lesão que consta de limpeza, curetagem, coleta de fotos, aplicação do creme MAL 20%, tempo de incubação de 3h e verificação da PpIX, irradiação com uma dose de 150 J/cm..... 47

Figura 17: Evolução no tempo do protocolo aplicado ao grupo 2 (G2). Primeira etapa: preparo da lesão que consta de limpeza, curetagem, coleta de fotos, aplicação do creme MAL 20%, tempo de incubação de 3h e verificação da PpIX, irradiação com uma dose de 150 J/cm; Segunda etapa: inicia imediatamente termina a primeira irradiação, com reaplicação de creme MAL 20%, tempo de escuro de 60 minutos e irradiação com uma dose de 100 J/cm<sup>2</sup>. ..... 47

Figura 18: Evolução no tempo do protocolo aplicado ao grupo 3 (G3). Primeira etapa: preparo da lesão que consta de limpeza, curetagem, coleta de fotos, aplicação do creme MAL 20%, tempo de incubação de 3h e verificação da PpIX, irradiação com uma dose de 150J/cm<sup>2</sup>; Segunda etapa: inicia imediatamente após terminada a primeira irradiação, com reaplicação de creme MAL 20%, tempo de escuro de 90 minutos e irradiação com uma dose de 100J/cm<sup>2</sup>. ..... 48

Figura 19: Evolução no tempo do protocolo aplicado ao grupo 4 (G4). Primeira etapa: preparo da lesão que consta de limpeza, curetagem, coleta de fotos, aplicação do creme MAL 20%, tempo de incubação de 3h e verificação da PpIX, irradiação com uma dose de 150J/cm; Segunda etapa: inicia imediatamente termina a primeira irradiação, com

reaplicação de creme MAL 20%, tempo de escuro de 90 minutos e irradiação com uma dose de 150J/cm <sup>2</sup> . .....	49
Figura 20: Evolução no tempo do protocolo de Terapia Fotodinâmica convencional (TFDc). Primeira etapa: preparo da lesão que consta de limpeza, curetagem, coleta de fotos, aplicação do creme MAL 20%, tempo de incubação de 3h e verificação da PpIX, irradiação com uma dose de 150J/cm <sup>2</sup> ; Terminada esta sessão um intervalo de 7 dias; Segunda etapa: são repetidos os mesmos procedimentos que na primeira sessão. ....	49
Figura 21: Distribuição dos pacientes participantes neste estudo por sexo. Do sexo feminino participaram 84 (51%) pacientes, do sexo masculino 80 (49%). .....	52
Figura 22: Distribuição das lesões segundo o subtipo clínico. Das 220 lesões tratadas 195 (76%) foram do subtipo nodular e 63 (24%) do subtipo superficial. ....	53
Figura 23: Distribuição das lesões por localização. Cabeça e pescoço com 56% (146 lesões), tronco 25% (64 lesões), membros superior e inferior com 19% (48 lesões). .....	53
Figura 24: Lesão tratada com o protocolo G1; A) Lesão de carcinoma Basocelular (CBC); B) Fluorescência da PpIX antes da irradiação na primeira etapa do tratamento; C) Fluorescência da PpIX antes da irradiação da segunda etapa do tratamento (após 30 minutos do tempo de escuro); D) consumo da PpXI após a segunda iluminação. ....	55
Figura 25: Lesão tratada com o protocolo G2; A) Lesão de carcinoma Basocelular (CBC); B) Fluorescência da PpIX antes da irradiação na primeira etapa do tratamento; C) Fluorescência da PpIX antes da irradiação da segunda etapa do tratamento (após 60 minutos do tem .....	57
Figura 26: Lesão tratada com o protocolo G3; A) Lesão de carcinoma Basocelular (CBC); B) Fluorescência da PpIX antes da irradiação na primeira etapa do tratamento; C) Fluorescência da PpIX antes da irradiação da segunda etapa do tratamento (após 90 minutos do tempo de escuro); D) consumo da PpXI após segunda iluminação. ....	59

- Figura 27: Lesão tratada com o protocolo G4; A) Lesão de carcinoma Basocelular (CBC); B) Fluorescência da PpIX antes da irradiação na primeira etapa do tratamento; C) Fluorescência da PpIX antes da irradiação da segunda etapa do tratamento (após 90 minutos do tempo de escuro); D) consumo da PpXI após segunda iluminação..... 60
- Figura 28: Gráfico que representa o comportamento da resposta ao tratamento com diferentes protocolos de aplicação. G1, tempo de escuro 30 min, dose 100J/cm<sup>2</sup>; G2, tempo de escuro 60 min, dose 100J/cm<sup>2</sup>; G3, tempo de escuro 90 min, dose 100J/cm<sup>2</sup>; G4, tempo de escuro 90 min, dose 150J/cm<sup>2</sup>; TFDc, consta de duas sessões com intervalo de 7 dias entre cada, tempo de incubação do creme é de 3 horas e a dose de irradiação de 150J/cm<sup>2</sup> para cada sessão..... 64
- Figura 29: Análise do número de lesões que apresentaram RC/RP por subtipo de CBC nodular e superficial para cada grupo..... 65
- Figura 30: Análise do número de lesões que apresentaram RC/RP por subtipo de CBC nodular e superficial no total das lesões..... 66
- Figura 31: Análise do número de lesões que apresentaram RC/RP por localização para cada grupo..... 67
- Figura 32: A, C,E,G) Carcinoma Basocelular; B, D, F, H) Pele cicatrizada após 30 dias do tratamento..... 68
- Figura 33: Avaliação do score de dor no tempo de iluminação da lesão. A. Grupos submetidos a TFDf; B. Grupo controle, TFDc. A dor relatada na segunda sessão foi sempre menor do que na primeira sessão nos grupos avaliados..... 70

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros aplicados nos diferentes grupos de TFDf .....	50
Tabela 2: Valor P para os grupos 1 a 4 e TFD convencional. Tempo de escuro ( $T_e$ ), Dose de irradiação na segunda sessão ( $D_2$ ), Expressão que resulta da multiplicação o $T_e$ vezes $D_2$ (P). .....	63

## Lista de Abreviaturas e Siglas

CPNM	Carcinoma de pele não melanoma
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
CBC	Carcinoma Basocelular
CEC	Carcinoma espinocelular
TFD	Terapia Fotodinâmica
FS	Fotossensibilizador
ALA	Ácido 5 aminolevulónico
PpIX	Protoporfirina IX
MAL	Metil Aminolevulinato.
CBCs	Carcinoma Basocelular do subtipo superficial
CBCn	Carcinoma Basocelular do subtipo nodular
HpD	Derivado de hematoporfirina
LASER	Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LEDs	Diodos emissores de luz
ALAs	Ácido aminolevulínico sintetase
PBG	Porfobilinogênio
ALAd	ALA desidratase
QA	Queratose Actínica
DB	Doença de Bowem
RC	Resposta completa
CBCp	Carcinoma Basocelular do tipo pigmentado
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
USP	Universidade de São Paulo

BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento
TFDf	Terapia Fotodinâmica Fracionada
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
RP	Resposta Parcial
TFDc	Terapia Fotodinâmica convencional
D <sub>2</sub>	Segunda iluminação

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>1.1</b>	<b>CÂNCER DE PELE</b>	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>TERAPIA FOTODINÂMICA</b>	<b>24</b>
1.2.1	Breve histórico	25
1.2.2	Componentes básicos e mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica	28
1.2.3	Usos da TFD na Dermatologia	35
<b>1.3</b>	<b>Terapia Fotodinâmica Fracionada</b>	<b>39</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiais</b>	<b>43</b>
3.1.1	Pacientes	43
3.1.2	Equipamento	44
3.1.3	Medicamento	44
<b>3.2</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>45</b>
3.2.1	Registro Fotográfico	45
3.2.2	Protocolo de tratamento	45
3.2.3	Avaliação da Dor	50
3.2.4	Avaliação 30 dias após o tratamento	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>PERPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>74</b>

# 1 Introdução

## 1.1 CÂNCER DE PELE

Existem diversos tipos de câncer de pele, sendo o câncer de pele não melanoma (CPNM) o mais prevalente no Brasil e no mundo. Embora, possua baixa letalidade, apresenta malignidade local, podendo invadir e destruir tecidos adjacentes, inclusive ósseo, representando alto impacto na saúde do paciente (SAMPAIO S.; RIVITTI E., 2001).

No Brasil, o CPNM corresponde a 30% de todos os cânceres registrados. É o primeiro mais incidente nas Regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste nos homens e nas mulheres, neste último gênero, a região Nordeste se inclui também (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA, 2016).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se que no país ocorreram cerca de 175 mil casos novos de CPNM em 2017. Entre os homens, 80.850 novos casos e 94.910 entre mulheres. Os valores correspondem a um risco estimado de 81 casos novos a cada 100 mil homens e 91 a cada 100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA, 2016).

O CPNM se apresenta principalmente sob duas formas: o carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma escamocelular (CEC). O CEC é menos frequente e mais agressivo quando comparado com o CBC. Pode ocorrer em pele normal, porém está frequente associado a lesões precursoras como a queratose actínica (SAMPAIO S.; RIVITTI E., 2001) (ALAM; RATNER, 2001) Figura 1. Estas lesões constituídas por células atípicas da camada espinhosa de epiderme tem um maior potencial de apresentar metástase (SAMPAIO S.; RIVITTI E., 2001)

Figura 1: Carcinoma escamocelular localizado no dedo da mão Esquerda. (Fonte: autoria própria)



O CBC é o câncer de pele mais comum, e apresenta um crescimento lento e infiltração local (BATH-HEXTALL et al., 2007a). Pode ser considerado de baixa capacidade de originar metástases com uma incidência entre 0.1% - 0.8% (VON DOMARUS; STEVENS, 1984) (DANHOF; LEWIS; BROWN, 2018). A letalidade desta doença é quase nula, estimada <0.1% (VON DOMARUS; STEVENS, 1984).(SAMPAIO S.; RIVITTI E., 2001) (CALLENS et al., 2016).

Histologicamente, o CBC caracteriza-se pela presença de massas de células basalióides, que se dispõem perifericamente em paliçada. As massas tumorais são circundadas por um estroma mucinoso, que sofre retração evidenciando-se fendas entre o parênquima normal e o tumoral quando observadas após o processo de fixação com solução formalina (SEXTON; JONES; MALONEY, 1990) (SAMPAIO S.; RIVITTI E., 2001).

As formas clínicas do CBC são variadas entre as quais se encontram pápulas, nódulos, ulcerações, infiltrações, placas e atrofia. A apresentação clínica mais frequente é a nodular representada por uma pápula rósea perolada, com bordas delimitadas e as vezes com finas telangectasias. Este nódulo cresce lentamente e pode se ulcerar motivo pelo qual o tipo clínico é denominado nódulo-ulcerado (SAMPAIO S.; RIVITTI E., 2001) Figura 2.

Figura 2: CBC nodular-ulcerado. Na foto se observam as telangectasias (a) e leve pigmentação (b). Fonte: autoria própria.



Existem múltiplas classificações das formas clínicas e numerosos tipos de CBC, porém os mais comuns são: nodular-ulcerativo 2) pigmentado; 3) esclerodermiforme; 4) superficial. O CBC pigmentado é morfológicamente similar ao CBCn e mais comumente encontrado em paciente com fototipos altos (SAMPAIO S.; RIVITTI E., 2001), como demonstrado na figura 3.

Figura 3: CBC pigmentado. Fonte: autoria própria.



O CBC esclerodermiforme é uma variante caracterizada por uma placa branca-amarelha, escleroatrófica, dura, lisa, bordas mal definidas e sem ulceração. Esta lesão é de mal pronóstico pelo risco de recorrência e infiltração (SAMPAIO S.; RIVITTI E., 2001) (CHINEM; MIOT, 2011a).

O CBC superficial é caracterizado por uma placa eritemato descamativa de crescimento lento (Figura 4), localizado frequentemente no tronco e membros (SAMPAIO S.; RIVITTI E., 2001). Pelas suas características clínicas, o diagnóstico diferencial é feito com exclusão de psoríase, doença de Bowen e melanoma amelanótico (NAPOLITANO et al., 2014) (Figura 4).

Figura 4: CBC superficial. Fonte: autoria própria.



Várias condições estão relacionadas com o desenvolvimento do câncer de pele, desde a presença de mutações genéticas, bem como fatores ambientais e atividades ocupacionais (SAMPAIO S.; RIVITTI E., 2001) (CHINEM; MIOT, 2011b) (BATH-HEXTALL et al., 2007a).

Doenças genéticas como xeroderma pigmentoso e síndrome do nevo basocelular são genodermatoses que incrementam o risco de apresentação desta doença (SEGURA et al., 2011). Os pacientes imunossuprimidos, por exemplo os transplantados renais, apresentam uma maior incidência de CPNM quando comparados com a população imunocompetente (HAYASHIDA et al., 2015).

O maior fator de risco para o aparecimento do tumor é a exposição excessiva e crônica ao sol. O CBC ocorre nos fototipos de pele mais claros, geralmente em pacientes maiores de 40 anos e com exposição crônica a radiação ultravioleta e ou uso regular de câmeras de bronzeado artificial. Outro fator importante é a exposição solar ocupacional, como o caso de fazendeiros, operários de construção, entre outros (SAMPAIO S.; RIVITTI E., 2001) (BATH-HEXTALL et al., 2008).

A prevenção primária é o primeiro e mais importante passo para evitar este tipo de tumor. A fotoproteção química com uso regular de protetores solares atua bloqueando parcial ou totalmente os raios ultravioletas que incidem sobre a pele. A utilização de vestuários como chapéus, camisas de manga comprida e guarda-chuva podem servir também como filtro solar (SCHALKA et al., 2014).

Os tratamentos convencionais para lesões de carcinoma basocelular abrangem técnicas de aplicação tópica e mais classicamente cirúrgica. A via cirúrgica é o procedimento padrão ouro (BATH-HEXTALL et al., 2007a) (BICHAKJIAN et al., 2018). No entanto, esta técnica exige infraestrutura especializada e profissionais com alta qualificação, além de, em geral, exigir a internação do paciente, e apresentar a possibilidade de reduções de funcionalidade anatômica e estética no local da lesão tratada.

Entre as terapias não cirúrgicas usadas para o tratamento do CBC se encontram radioterapia, crioterapia, Fluorouracil e imiquimode e mas recentemente o uso de inibidores do receptor “Smoothened”(SMO) na via “Hedgehog” (BATH-HEXTALL et al., 2007b), assim como a TFD (DANHOF; LEWIS; BROWN, 2018).

A radioterapia é usada especialmente para situações onde a cirurgia é contraindicada ou não viável. Diferentes técnicas e formas de radiação são usados nesses casos mas o pobre resultado estético, e as múltiplas sessões necessárias para o tratamento e o risco de lesões malignas secundárias limitam seu uso (BICHAKJIAN et al., 2018).

O fluorouracil e imunomoduladores tópicos são usados como terapia antineoplásica especialmente em CBC de baixo risco, em diferentes protocolos, com taxas de cura inferiores á cirurgia (BATH-HEXTALL et al., 2014) (BATH-HEXTALL et al., 2007b), alto custo do tratamento, e reações inflamatórias importantes que limitam seu uso, mas com algumas vantagens como facilidade de aplicação e resultado estético.

O vismodegib e sonidegib são medicamentos que inibem o receptor SMO. Este último quando ativado participa na transcrição do fator Gli que leva sinais ao núcleo da célula iniciando assim a transcrição de genes que controlam a proliferação celular. (DANHOF; LEWIS; BROWN, 2018). Estes dois medicamentos, para o tratamento de CBC metastático ou localmente avançado, tem demonstrado taxas de cura entre 43-60%. Os principais feitos adversos reportados são formação de tumores adicionais (especialmente CEC) e resistência ao medicamento (MEANI et al., 2014), fato que poderia limitar futuramente seu uso.

A Terapia Fotodinâmica tópica é uma técnica de aplicação tópica, de fácil aplicação, indicada para CBC de pequeno porte e que oferece vantagens como excelente resultado estético, aplicação do procedimento em ambiente ambulatorial e um mínimo impacto funcional do local tratado (SALVIO et al., 2016a). A técnica pode ser aplicada também como terapêutica adjuvante especialmente em pacientes com risco cirúrgico (BLANCO et al., 2016).

## **1.2 TERAPIA FOTODINÂMICA**

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica amplamente usada para afecções da pele de caráter benigno e maligno. Além de suas aplicações na área da Dermatologia, a TFD também possui aplicações na Gastroenterologia (GRAY; FULLARTON, 2013), no tratamento do colangiocarcinoma, esôfago de Barret, câncer gástrico precoce (OINUMA; NAKAMURA; NISHIWAKI, 2016), e podem ser usado em outras áreas como, a Neurologia, Mastologia, Urologia, Pneumologia, Ginecologia e outros diversos campos de médicos (CHILAKAMARTHI; GIRIBABU, 2017)(GERALDE et al., 2017). Especificamente na área da Oncologia, tem-se usado a TFD para tratamento de diferentes condições, como terapia isolada ou adjuvante (CALLENIS et al., 2016) (ANDRADE et al., 2013b)(RAMIREZ et al., 2014)(QUIRK et al., 2015)(INOUE, 2017). A ação fotodinâmica também tem sido amplamente estudada e aplicada para fins não oncológicos, como para o controle microbiológico na Odontologia e Ginecologia (AKRAM et al., 2017)(INADA et al., 2012)(BLANCO et al., 2017b)(SANTEZI et al., 2016), e para fins cosméticos como rejuvenescimento facial (LE PILLOUER-PROST; CARTIER, 2016).

Três elementos são fundamentais na TFD: (1) a presença do fotossensibilizador (FS), (2) molécula que absorve luz para desencadear uma série de reaçõesfotoquímicas; a luz em um comprimento de onda específico; (3) e o oxigênio molecular presente no tecido a ser tratado. O FS pode ser disponibilizado no tecido através de sua aplicação sistêmica por via endovenosa (ROBERTS; CAIRNDUFF, 1995), via inalatória (GERALDE et al., 2017), ou via tópica (AGOSTINIS et al., 2011a). A forma que vem sendo mais comumente empregada, é a aplicação tópica do ácido 5-aminolevulínico (ALA), um pró-fármaco de segunda geração, que é convertido em protoporfirina IX (Pp IX), um FS endógeno formado dentro das mitocôndrias das células. Além do ALA, sua forma

metilada, o metil aminolevulinato (MAL, um éster do ALA) é também frequentemente usado para indicações dermatológicas da TFD.

Diferentes protocolos clínicos de TFD têm sido aplicados usando ALA e especialmente MAL para tratamento do CBC principalmente dos subtipos superficial (CBCs) e nodular (CBCn). Porém, o protocolo mais amplamente usado consiste de 2 sessões de TFD separadas por 7 dias (SOLER et al., 2001)(HORN et al., 2003)(VINCIULLO et al., 2005)(BRAATHEN et al., 2007)(FOLEY et al., 2009)(CHRISTENSEN et al., 2010) (RAMIREZ et al., 2014). A maior limitação deste protocolo é o custo mais elevado da técnica, produto da segunda sessão, tanto por investimento de tempo como de operações logísticas. Outro limitante está associado à dor e desconforto experimentado pelos pacientes durante a segunda sessão, devido ao estado mais friável do tecido em cicatrização, produto da primeira sessão. Nosso objetivo neste estudo foi propor um protocolo que otimizasse o tempo de aplicação da TFD, facilitando a adesão dos pacientes à terapia e conservando ou melhorando as taxas de cura observadas no protocolo convencional.

### 1.2.1 Breve histórico

A TFD teve início, no século XX, em Munique, Alemanha. Em seu experimento, Oscar Raab, estudante de medicina, evidenciou os efeitos letais sobre o protozoário, *Paramecium*, quando associada luz e acridina, como medicamento fotossensível (DOUGHERTY, 1984) (ACKROYD et al., 2001). No entanto, o termo "ação fotodinâmica" foi introduzido alguns anos mais tarde, por Jodlbauer e von Tappeiner, que juntos demonstraram a necessidade do oxigênio para as reações com fotossensibilizadores. Eles também foram os primeiros a reportar uma aplicação clínica da ação fotodinâmica, mostrando que a aplicação tópica de eosina ativada pela luz do sol, ou pela luz de uma lâmpada de arco era eficiente no tratamento de câncer de pele (ROBERTS; CAIRNDUFF, 1995)(DOUGHERTY et al., 1998).

Em 1975, Dougherty e colaboradores, usando uma substância fotossensível, o derivado de hematoporfirina (HpD), de administração sistêmica, reportaram o primeiro caso de tratamento por meio da TFD em modelo animal com câncer de mama (DOUGHERTY; GOMER; WEISHAUPT, 1976). Posteriormente, em 1976, Kelly e Snell, no hospital St. Mary's de Londres aplicaram a TFD pela primeira vez em humanos,

tratando pacientes com câncer de bexiga (DOUGHERTY et al., 1978)(ACKROYD et al., 2001).

Na área da Dermatologia, o grupo de investigação do Instituto de Câncer Roswell Park, em Buffalo, EUA (1978), publicaram os resultados do estudo realizado em 25 pacientes com 113 lesões de câncer de pele. Nesse estudo, Dougherty e sua equipe usaram HpD, associado a luz vermelha para tratar NMSC CBC e CEC, melanoma e metástase na pele de outros tumores primários. Os resultados evidenciaram resposta completa em algumas lesões resultados que encorajaram a realização de outros estudos clínicos (DOUGHERTY et al., 1978).

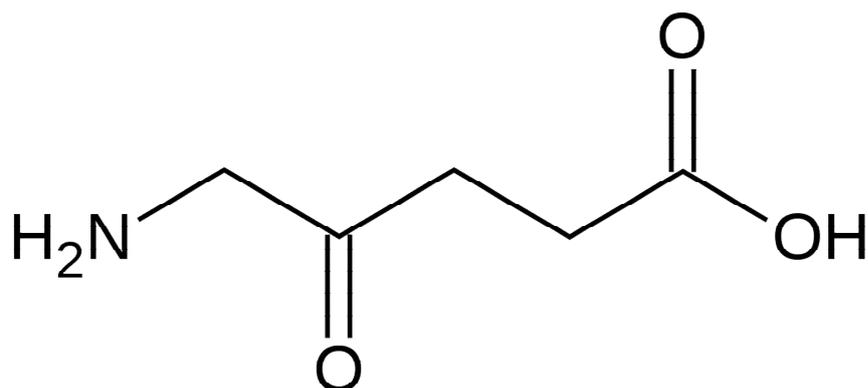
Em 1993, o Photofrin®, um HpD, foi aprovado no Canadá para tratamento de câncer de bexiga; em 1994 foi aprovado no Japão para câncer de pulmão em estágio inicial; em 1995 obteve aprovação da FDA nos EUA para o tratamento de câncer de esôfago. Posteriormente o Photofrin® obteve aprovação para outras neoplasias e em outros países. A maior desvantagem do Photofrin®, bem como de outros HpD, é a fotossensibilidade sistêmica à qual o paciente fica exposto, por um período de até 3-4 semanas, com risco de queimadura cutânea se houver exposição da pele ao sol (ALLISON; MOTA; SIBATA, 2004).

Em 1990, uma nova molécula foi sintetizada para uso em TFD, denominada ácido aminolevulínico (ALA). Embora, possa ser administrada por via sistêmica, a administração pela via tópica e mais comumente utilizada devido sua ação localizada e de baixa ou inexistente fotossensibilidade pós-tratamento, característica de grande utilidade especialmente na Dermatologia. Esta molécula é um precursor da PpIX que é, o verdadeiro FS para a TFD. Depois da aplicação do ALA no tecido, ocorre sua absorção por parte das células, onde uma série de reações ocorrem e culminam na formação da PpIX nas mitocôndrias (ALLISON; MOTA; SIBATA, 2004). A partir da descoberta do ALA como precursor de PpIX, muitos trabalhos clínicos foram publicados apresentando resultados positivos tanto em tumores, como em lesões potencialmente malignizáveis e lesões não-oncológicas (BAGNATO et al., 2005) (CHRISTENSEN et al., 2010)(ANDRADE et al., 2013a).

O Levulam® Kerastick® (ALA 20%) foi o primeiro composto a base de ALA a ser aprovado para comercialização em 2000 (ALLISON; MOTA; SIBATA, 2004) (Figura 5: Fórmula molecular do ALA Figura 5). Atualmente, o BF-200 ALA é aprovado nos

Estados Unidos para tratamento de queratose actínica e campos de cancerização, na apresentação de gel (Ameluz®).

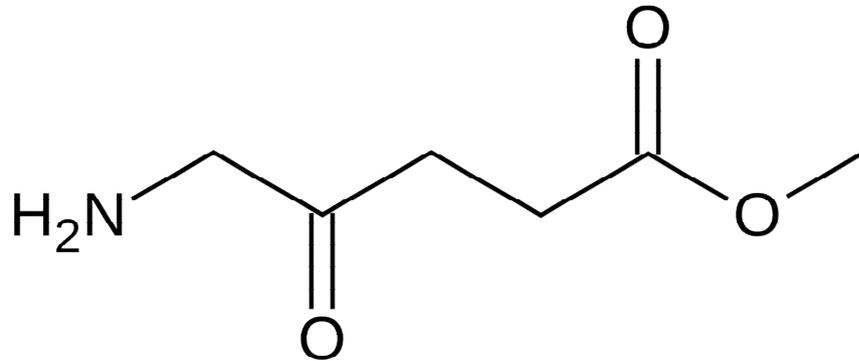
Figura 5: Fórmula molecular do ALA modificado de (WIKIMEDIA, 2016)



Outro precursor de PpIX é o MAL (aminolevulinato de metila) que apresenta uma estrutura lipofílica que favorece a penetração do composto na pele e conseqüentemente a produção de PpIX (Figura 6). Este composto foi aprovado para tratamento de CBC e queratose actínica na União Europeia, e é usado amplamente para aplicações dermatológicas, em especial, para tratamento de CBC. Outros ésteres do ALA como o butil, hexil e octil também vem sendo usados em aplicações em Dermatologia (DE ROSA et al., 2004) (LOPEZ et al., 2004) (FOTINOS et al., 2006).

|

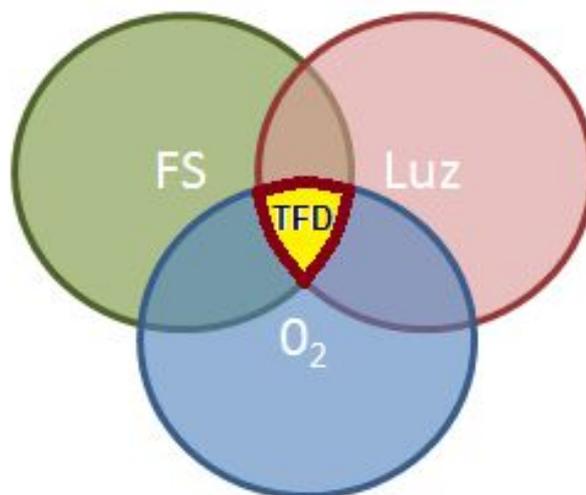
Figura 6: Fórmula molecular do MAL modificado de (WIKIMEDIA, 2017).



### 1.2.2 Componentes básicos e mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica

A TFD é uma técnica baseada na interação de três elementos que, quando associados, gera morte da célula alvo (Figura 7). O oxigênio presente nas células, o FS e a luz, num comprimento específico. Estes três elementos após interagirem, formam diferentes produtos que levam ao dano e morte celular por diferentes vias.

Figura 7: A ação fotodinâmica ocorre mediante a interação de três componentes: fotossensibilizador (FS), luz e o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>). Fonte: autoria própria.



- Fontes de luz

A fonte de luz para TFD é escolhida basicamente de modo que seu espectro de emissão corresponda ao espectro de absorção do FS que será utilizado. Além disso, a fonte deve ter potência luminosa adequada além de permitir entrega de luz adequada e eficiente ao tecido-alvo (WILSON; PATTERSON, 2008).

A luz do sol e as lâmpadas foram as primeiras fontes de luz a serem usadas para aplicações da TFD recentemente. A luz solar, apesar de ser multiespectral e de alta potência ( $1000 \text{ W/m}^2$ ) não pode ser facilmente focalizada na região de interesse e dificulta aplicações de órgãos internos. Além disso, a luz solar apresenta influencia do lugar geográfico da aplicação e suas condições meterologicas podem interferir na entrega da luz necessária para o tratamento se perdendo o controle do período de iluminação (PÉREZ; GARCÍA; GILABERTE, 2014) (Figura 8).

Figura 8:TFD com luz solar.(PÉREZ; GARCÍA; GILABERTE, 2014)



As lâmpadas de arco e as lâmpadas de projetores de slides, que também possuem amplo espectro de emissão, abrangendo quase todos os comprimentos de onda da luz

visível e do infravermelho próximo, possibilitando a ativação de vários tipos de FS, foram utilizadas com sucesso. As lâmpadas ainda são empregadas na atualidade, e apresentam a vantagem de poderem ser espectralmente filtradas para adequação os diferentes fotossensibilizadores. Porém, as lâmpadas não são eficientemente acopladas às fibras ópticas, de modo que não possibilitam uso via endoscopia (WILSON; PATTERSON, 2008).

Os LASER (do inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* ou Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) são sistemas que facilitaram a aplicação da TFD, pois conjugam diversas características especiais, como: alta potência de saída, disponível em diversos comprimentos de onda e pode ser eficientemente acoplado em fibras ópticas para aplicações endoscópicas. No início das aplicações de TFD, os lasers eram muito caros, grandes e precisavam de um complexo sistema de refrigeração; com a evolução tecnológica, o desenvolvimento de lasers mais compactos, mais fáceis de operar (Figura 9; **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) e de menor custo contribuiu para os avanços clínicos da TFD (BRANCALEON; MOSELEY, 2002).

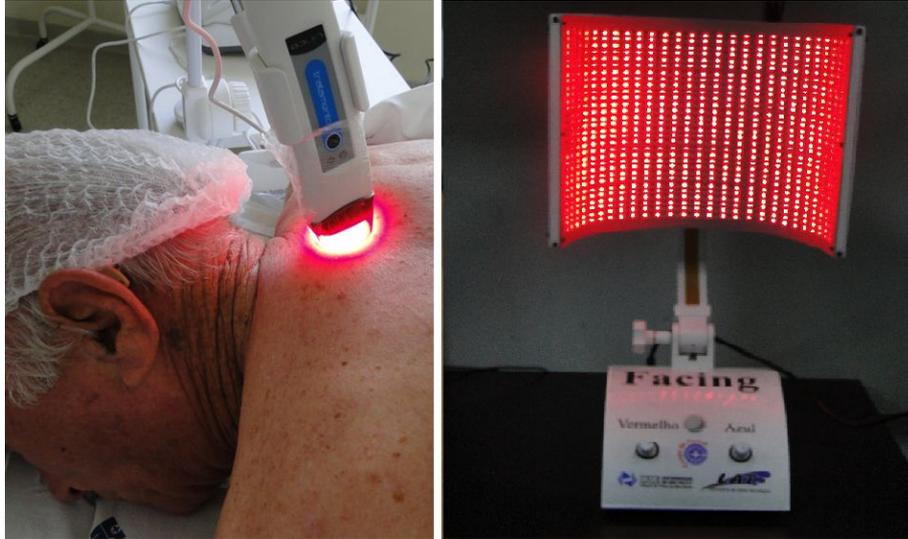
Figura 9 Uso de LASER e fibra optica na terapia fotodinâmica. Fonte: autoria própria.:



Mais recentemente, os equipamentos a base de LEDs (diodos emissores de luz) têm sido utilizados. Estes apresentam vantagens como custo reduzido, fácil manuseio e manutenção, além apresentar vida útil superior à do Laser. Os LEDs também podem ser dispostos em arranjos com diferentes geometrias (Figura 10), permitindo o desenvolvimento de dispositivos mais anatômicos para tratamento de diferentes regiões do corpo, desde cavidades até superfícies amplas. O acoplamento em fibra óptica também é possível, com eficiência relativamente boa. A principal desvantagem dos LEDs é a eficiência na conversão de energia elétrica em luminosa, que é baixa e acaba resultando

em aquecimento. Assim, os equipamentos a base de LEDs precisam de um eficiente sistema de dissipação de calor (WILSON; PATTERSON, 2008).

Figura 10 Uso de LEDs para terapia fotodinâmica. Fonte: autoria própria.



- **Fotossensibilizador**

De maneira geral, um composto é considerado um fotossensibilizador ideal para TFD quando apresenta as seguintes propriedades:

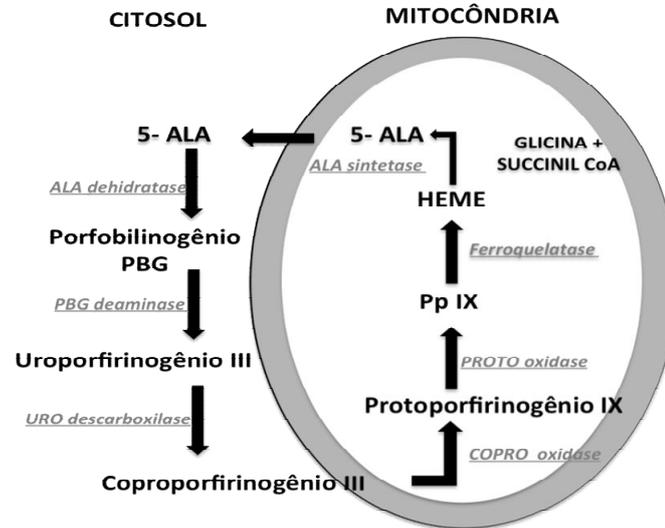
- ✓ alta absorção em comprimentos de onda no intervalo 700 a 850 nm, onde a penetração da luz no tecido é máxima;
- ✓ alto rendimento quântico de oxigênio singleto;
- ✓ ser fluorescente, facilitando, assim, o monitoramento de sua biodistribuição;
- ✓ alta estabilidade;
- ✓ solúvel em água;
- ✓ baixa toxicidade no escuro;
- ✓ rápida eliminação pelas células/ tecidos saudáveis; e,
- ✓ alta seletividade por células alteradas.

Além dessas características, em Dermatologia, uma outra propriedade interessante para escolha do FS é a possibilidade de aplicação local e tópica. Nesse sentido, os

precursores de PpIX segunda geração tipo ALA e posteriormente seus derivados como ésteres de ALA do tipo (metil, etil, propil, butil, pentil, hexil e octil) estão sendo as principais escolhas para TFD. Estas moléculas são pró-fármacos que, dentro da célula, participando do ciclo bioquímico do grupo HEME são convertidos enzimaticamente em PpIX (JUZENIENE et al., 2002) (Figura 5) (Figura 6).

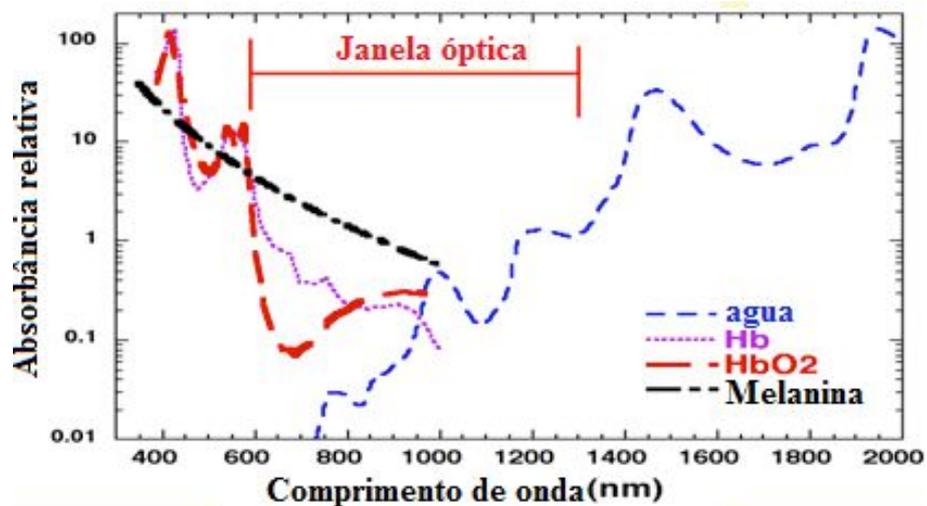
O grupo HEME faz parte da hemoglobina e de outras estruturas importantes do metabolismo. Sua biossíntese ocorre no interior da célula (citosol e mitocôndria) quando, pela associação da Glicina e da Succinil-CoA, é formada uma molécula de ALA, na presença da enzima ácidoaminolevulínico sintetase (ALAs). Posteriormente, duas moléculas de ALA se condensam para formar duas moléculas de água e porfobilinogênio (PBG), na presença da enzima ALA desidratase (ALAd), e quatro moléculas de PBG formam uroporfirinogênio III. Consecutivamente, este é convertido em coproporfirinogênio III e exposto à enzima coproporfirinogênio oxidase III para produzir protoporfirinogênio IX. Este último é convertido finalmente em PpIX, pela ação da protoporfirinogênio oxidase (Figura 11). Quando o ALA é administrado em excesso, ocorre um acúmulo rápido de PpIX que induz sua difusão a várias organelas intracelulares, alvos da TFD (DOUGHERTY; MARCUS, 1992).

Figura 11: Metabolismo do grupo heme. O ALA é sintetizado a partir da glicina e succinil-CoA. Após ser metabolizado por diferentes enzimas é convertido em protoporfirina IX. Fonte: autoria própria.



A PpIX apresenta 5 bandas de absorção, apesar da região do 630 nm não ser a mais eficiente, esta é banda mais usada para aplicações em Dermatologia, uma vez que se encontra dentro da janela óptica biológica (600 a 800 nm) (Figura 12), faixa espectral onde substâncias como a melanina, hemoglobina e a água possuem mais baixa absorção, levando a uma considerável penetração no tecido biológico (AGOSTINIS et al., 2011a).

Figura 12: janela óptica biológica, faixa espectral entre 600 a 800 nm modificado de(BAGNATO V. S., 2015)



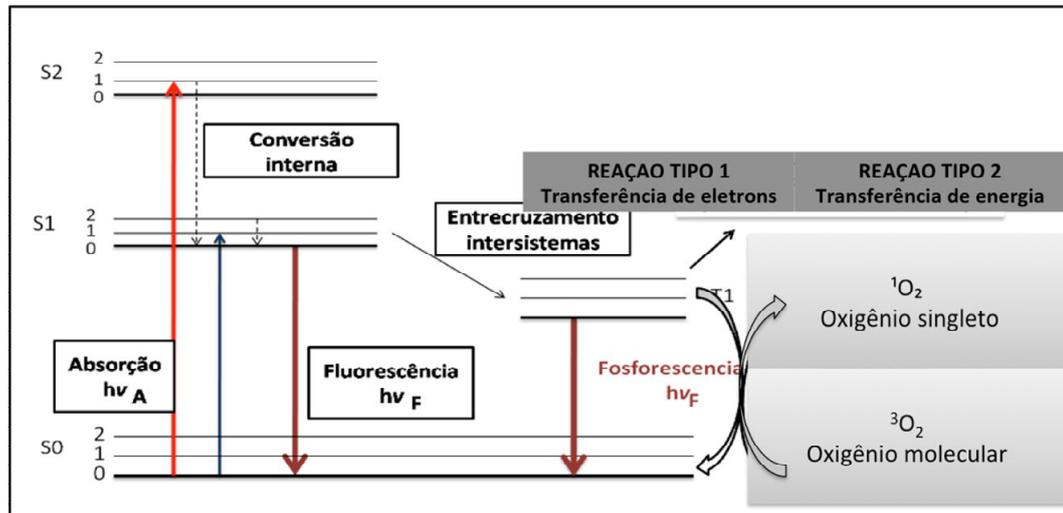
Após o FS absorver a luz, este participa de dois tipos de reações que levarão finalmente à morte celular por apoptose, necrose ou autofagia celular (AGOSTINIS et al.,

2011b). Estas vias de morte celular dependem do FS e de sua localização dentro da célula (REINERS et al., 2010). A necrose caracterizada por vacuolização, inchaço e degradação da membrana participa na morte celular induzida por TFD (REINERS et al., 2010). A autofagia e apoptose compreendem mecanismos de morte celular mais organizados, sendo a apoptose a maior via de morte quando usada esta técnica (REINERS et al., 2010)(ANDRZEJAK; PRICE; KESSEL, 2011)(KESSEL, 2006)(AGARWAL et al., 1991).

O FS ativado passa de um estado de repouso a um estado de ativação denominado triplete e, nesse estado, pode participar da reação tipo I ou II. Na reação tipo I, as moléculas interagem com substratos biológicos (fosfolipídios, colesterol, proteínas, entre outros) para gerar finalmente radicais altamente reativos como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical superóxido ( $O_2\bullet$ ) e radical hidroxila ( $OH\bullet$ ) (DOUGHERTY; MARCUS, 1992) (ANDRADE et al., 2013b).

A reação típica da TFD é a tipo II, na qual existe transferência de energia para o oxigênio celular resultando numa forma altamente reativa de oxigênio denominado oxigênio singlete. Este último interage com organelas intracelulares vitais para o funcionamento celular como mitocôndria, retículo endoplasmático, membrana plasmática que quando lesionadas leva à morte celular (Figura 13) (DOUGHERTY et al., 1998) (ANDRADE et al., 2013b) (REINERS et al., 2010).

Figura 13: Diagrama de Jablonski modificado.



O FS após absorver um fóton passa do estado fundamental ao estado excitado, podendo participar de dois tipos de reações. Na reação tipo I o FS em seu estado excitado participa em reações de transferência de elétrons gerando radicais ou íons radicais. Na reação tipo II é formado oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) através da transferência de energia entre o FS excitado e o oxigênio molecular ( $^3O_2$ ).

### 1.2.3 Usos da TFD na Dermatologia

O primeiro uso na área da Dermatologia da TFD foi para tratamento de câncer de pele, porém, esta técnica tem sido usada também para aplicações não oncológicas tais como acne, micose superficiais, fotorejuvenecimento entre outros (KIM; JUNG; PARK, 2015)(DA SILVA et al., 2015)(BARBARIC et al., 2017)(MEGNA et al., 2017).

Diferentes protocolos têm sido aplicados para o tratamento de CBC usando TFD tópica. Em 2001, foi publicado um estudo conduzido por Soler e colaboradores, no qual foram tratadas lesões do tipo nodular CBCn e CBCs entre outras lesões. A medicação usada para este estudo foi MAL creme, o tempo entre a aplicação do creme e irradiação variou de 3 a 24h e a dose total aplicada foi de  $64J/cm^2$  para CBCs e  $78J/cm^2$  para CBCn. Das lesões tratadas, 93% receberam uma única sessão e as lesões restantes duas ou três, segundo o tipo histológico. Das 310 lesões que responderam ao tratamento, durante o

período de seguimento (35 meses), foi observada uma recorrência de 11% (33 lesões), das quais 29 (87.8%) foram tratadas com uma sessão. A partir desses resultados, os autores hipotetizaram que sessões repetidas poderiam trazer melhores resultados, especialmente para tratamento de CBC (SOLER et al., 2001).

Em 2007, foi publicado um consenso internacional do uso da TFD para tratamento de CPNM. O documento foi elaborado com base na literatura científica publicada até o momento da revisão. O grau de recomendação para o tratamento de CBCs e CBCn (lesões até 2 mm de profundidade) foi A1 (forte recomendação) e para lesões de CEC foi de C2 (mínimas evidências a favor) (BRAATHEN et al., 2007).

Um grupo norueguês de TFD, em 2010, publicou as diretrizes para o uso prático da TFD, propondo o protocolo convencional que consiste na aplicação da técnica para lesões do tipo Queratose Actínica (QA), Doença de Bowem (DB), CBCs e CBCn, usando MAL creme, com três horas de espera entre a aplicação do creme e a irradiação e duas sessões com um intervalo de tempo entre cada de 7 a 15 dias (CHRISTENSEN et al., 2010).

Diferentes publicações tem mostrado resposta completa entre 73-100% quando tratadas lesões de CBC com TFD em 2 sessões (BAGNATO et al., 2005), (SOLER et al., 2001), (HORN et al., 2003), (VINCIULLO et al., 2005), (FOLEY et al., 2009) (BLANCO, 2016).

Nosso grupo de pesquisa, em 2014, publicou os resultados preliminares do projeto multicêntrico, cujo protocolo consistia na aplicação de duas sessões de TFD, com intervalo de sete (7) dias entre cada. A porcentagem de resposta completa (RC) foi de 76.5%. Foi observado melhor resposta em CBCs e em centros terapêuticos que possuíam experiência previa na técnica (RAMIREZ et al., 2014).

Buzzá et. al., publicou em 2015, os resultados preliminares da segunda fase de implementação do projeto, onde centros de vários países da América Latina participaram. Os autores observaram um comportamento semelhante quanto à RC das lesões tratadas, em comparação com os dados coletados no Brasil. A taxa de cura encontrada foi de 75%, resultado associado, principalmente, à inexperiência na técnica no começo da participação no projeto (BUZZÁ et al., 2015).

Um fator importante relacionado à taxa de resposta no tratamento de CBC com TFD é o tamanho da lesão, observando-se melhores resultados em lesões menores que 20-

30 mm diâmetro. Em 2003, foi realizado um estudo multicêntrico, com o objetivo de tratar lesões de CBC consideradas como de difícil tratamento. A TFD foi realizada com MAL 16%, usando 2 sessões separadas por 7 dias. O tempo de espera após a aplicação do creme foi de 3h e uma dose total de  $75 \text{ J/cm}^2$  foi aplicada. Após 3 meses de tratamento, foi observado uma cura de 92% para CBCs e de 87% para CBCn. Uma maior porcentagem de recorrência aos 24 meses do tratamento foi observado em lesões com diâmetros  $>30\text{mm}$  quando comparado com lesões de tamanho 16-30mm e  $<15\text{mm}$  (33%, 16% e 4% respectivamente) (HORN et al., 2003).

Outro fator que apresenta impacto na resposta positiva à terapia está associado à experiência do profissional. Ramirez et al., 2014, apresentou os resultados preliminares do estudo, no qual, foram avaliados 294 pacientes com 366 lesões tratadas com o protocolo proposto pelo grupo coordenador do estudo. Esse protocolo consistiu na aplicação da técnica em CBCs, CBCn e CBC pigmentado (CBCp) com diâmetro menor que 20mm. Após delimitação da lesão, foi realizada a aplicação do MAL 20% durante 3 horas sob oclusão. Em seguida, a lesão foi irradiada com uma dose de luz de  $150\text{J/cm}^2$ , uma intensidade de  $125\text{mW/cm}^2$  e um tempo de 20 minutos, no comprimento de onda de 635 nm. A segunda sessão, na qual, foi repetido o procedimento realizou-se com 7 dias de intervalo. Uma RC foi observada em 80.4% das lesões de CBCs, 74.1% para CBCn e 50% para CBCp. Fatores tais como inexperiência do centro participante, uso da técnica em lesões maiores de 2mm e aplicação em lesões CBCp respondem pelas porcentagens de resposta parciais ao protocolo (RAMIREZ et al., 2014).

Estes resultados foram também observados em outro estudo clínico realizado em lesões de CBC também classificadas como de difícil tratamento, definidas assim, pela presença de características tais como tamanho, localização na região H da face e presença de fatores para complicações cirúrgicas. Após 24 meses de acompanhamento a RC foi, para as lesões entre 3-10mm, 11-20mm e 20-62mm, de 84%, 80% e 70% respectivamente (VINCIULLO et al., 2005).

A produção de PpIX avaliada através de imagem de fluorescência de campo amplo foi realizada por Blanco e colaboradores. Neste estudo foram coletadas imagens em 2 momentos de cada sessão (com intervalo de 7 dias entre cada) de TFD: antes da iluminação (após de três horas da aplicação do medicamento MAL ou ALA) e depois da iluminação. Foi observado nas 8 lesões avaliadas uma maior produção da PpIX na segunda sessão de tratamento quando comparada com a primeira. Mostrou-se que

localização da lesão e produção da PpIX também estão relacionados com o resposta ao tratamento (BLANCO et al., 2015).

Em quanto a custos das terapias tópicas, uma estimativa de gastos foi realizada na Espanha, na qual foi comparado o custo de tratamento do CBC e da doença de Bowen usando terapia tópica com TFD com MAL e Imiquimod comparado com cirurgia. A conclusão do estudo demonstrou que as terapias tópicas custavam em média a metade do valor da cirurgia convencional (AGUILAR et al., 2010).

No Brasil, em 2011, foi publicado um estudo, em que, se realizou um levantamento das informações referentes ao custo do tratamento por lesão de CPNM, no serviço público. Este estudo mostrou uma média de R\$ 1.172,00 por lesão, usando preferencialmente cirurgia como opção terapêutica. O valor do tratamento para o câncer de pele do tipo melanoma está entre R\$ 13.062,00 ± 16.848,00 por lesão. Entretanto, devido à elevada incidência do CBC/CEC, o custo total do CPNM se torna superior ao gasto para o tratamento do melanoma (PAULO; PAULO, 2011).

No Brasil, devido a grande heterogeneidade cultural, demográfica, socioeconômica e política interferem e limita a qualidade da assistência prestada, das informações fornecidas, a capacidade diagnóstica e o acesso a tecnologia de ponta em alguns regiões menos favorecidas. Neste sentido, uma iniciativa brasileira, coordenada pelo Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP), com financiamento do Banco Nacional de Desenvolvimento (BNDES) e outras instituições de fomento à pesquisa, planejaram e desenvolveram um estudo clínico multicêntrico de abrangência nacional, na sua primeira etapa, e internacional na segunda fase. Para todos os participantes foi disponibilizado o medicamento MAL (PDTPharma, Cravinhos, Brasil), o equipamento (LINCE - Light-in-Cell, MMOptics®, São Carlos-Brasil) e um treinamento constituído por uma parte teórica e prática, com o intuito de facilitar a aplicação da técnica da TFD em diferentes regiões do país seguindo um mesmo protocolo clínico (BLANCO, 2016).

Um dos grandes limitantes da TFD é a sensação de dor experimentada pelo paciente durante e depois da aplicação da técnica. Na literatura encontramos relatos das principais reações adversas à TFD, sendo que dor, alterações na cicatrização e mudanças na pigmentação são as mais frequentes.

A dor durante e depois do tratamento é uns dos maiores limitantes da técnica. Esta sensação, que é subjetiva, tem sido amplamente estudada na TFD. Fatores como intensidade de irradiação (maior de 150mW/cm<sup>2</sup>), localização (face), tamanho e quantidade das lesões, prévias aplicações do procedimento, etnia, gênero e idade estão associados com maior percepção de dor (GHOLAM et al., 2009)(VIRGILI et al., 2010)(IBBOTSON, 2011).

Blanco et al., 2016, no estudo realizado em 728 pacientes e 866 lesões observou que a intensidade da dor depende da região anatômica, tempo de iluminação e número de sessões durante a TFD. A severidade da sensação é maior na segunda sessão do tratamento, diminuindo após 10 minutos de iluminação. Por outro lado, lesões localizadas em membros superiores e tronco são menos dolorosas ao tratamento (BLANCO et al., 2017a) quando comparadas com lesões localizadas em face

A maior intensidade da dor, na segunda sessão, pode estar relacionada à fragilidade do tecido e maior sensibilidade do mesmo, produto do processo inflamatório gerado na primeira sessão (LINDEBURG; BROGAARD; JEMEC, 2007)(BLANCO et al., 2017a).

### **1.3 Terapia Fotodinâmica Fracionada**

A TFD Fracionada (TFDf) é uma modificação da técnica convencional, na qual é aplicada a dose total de luz, em etapas separadas por um intervalo de tempo (tempo de escuro).

Várias hipótese foram geradas com o intuito de explicar o princípio do fracionamento da dose de luz: reoxigenação dos tecidos irradiados no período de escuro (VAN DER VEEN et al., 1999); redistribuição e acumulação da PpIX em estruturas vasculares entre outros levando a maior vulnerabilidade das células submetidas a uma primeira irradiação para a segunda (DE HAAS et al., 2006a)(STAR et al., 2006b).

O conceito de TFDf iniciou com Van der veen e colaboradores, na década de noventa, que aplicaram em modelo animal a TFD usando duas iluminações por um período de escuro de 6h para uma mesma lesão. Eles observaram macroscopicamente 2 a 4 vezes maior dano na pele tratada com TFDf quando comparada ao protocolo de iluminação única (VAN DER VEEN et al., 1999).

Robison et. al., 2000, observou que no período de escuro ocorre produção de PpIX consumida posteriormente, na segunda iluminação, levando a um maior dano da pele dos camundongos quando comparada a iluminação única (ROBINSON et al., 2000).

Estudos em culturas de células (queratinócitos) mostrou que a morte celular foi maior com a TFDf do que com irradiação única (DE BRUIJN et al., 2013). Em estudo realizado em modelo animal, o mesmo grupo de pesquisadores reportou maior dano cutâneo e diminuição do CD114 e VE caderina, componente de integralidade vascular, após aplicação da TFDf (usando BF 200 ALA) quando comparada com TFD com iluminação única (BRUIJN et al., 2012).

Em 2006, foi publicado o primeiro estudo clínico usando TFDf, em 15 pacientes, usando ALA solução, em 86 lesões de CBCs. Depois da aplicação da medicação, foram realizadas duas iluminações com uma dose  $45\text{J}/\text{cm}^2$  cada e um tempo de escuro de 2 horas. O seguimento clínico, após 32 meses, constatou uma RC em 86% das lesões tratadas, e após 58 meses a resposta completa foi de 84% (STAR et al., 2006a).

Dois protocolos de aplicação foram comparados por Haas e colaboradores. O grupo da TFD com iluminação única ( $75\text{J}/\text{cm}^2$ ) e TFDf com duas iluminações de  $20 + 80\text{J}/\text{cm}^2$  e com um tempo de escuro de 2 horas. As lesões tratadas foram do tipo CBCs, 243 lesões tratadas com uma única iluminação e 262 com TFDf. Após 12 meses de tratamento, observou-se RC de 97% das lesões tratadas com TFDf e 89% das tratadas em uma única irradiação (DE HAAS et al., 2006a).

Roozeboom e colaboradores realizaram um estudo comparando a TFDf com a cirurgia em lesões do tipo CBCn. Neste estudo, creme contendo ALA foi aplicado topicamente e a dose de luz total entregue foi de  $150\text{J}/\text{cm}^2$ ; esta dose de luz foi dividida em duas irradiações com um tempo de escuro de 1h. Após o seguimento por 5 anos, no grupo da TFDf foi observada uma RC de 65% nos tumores  $>1,7\text{mm}$  de espessura e 94% para lesões  $<0,7\text{mm}$ . A recidiva total no grupo TFDf foi de 30.7% e de 2.3% para o grupo da cirurgia (ROOZEBOOM et al., 2013).

As lesões pré-malignas do tipo QA, também foram avaliadas com este protocolo de tratamento. Sotiriu et. al., 2011, comparou o protocolo de irradiação única ( $75\text{J}/\text{cm}^2$ ) com irradiação fracionada ( $20\text{J}/\text{cm}^2 + 80\text{J}/\text{cm}^2$ ), um tempo de escuro de 2 horas e aplicação de ALA durante 3 horas antes da irradiação. Neste estudo, participaram 33 pacientes com 233 lesões. Três meses depois do tratamento, foi observada RC em 89.05%

do grupo iluminação única e em 96.12% do grupo TFDf. No seguimento por 12 meses, as porcentagens caíram para 85.4 e 93.79% respectivamente (SOTIRIOU et al., 2012).

ATFDf apresenta taxas de cura semelhantes a TFD convencional, oferecendo a vantagem adicional, em nosso contexto, de maior facilidade com relação ao transporte e à comodidade de ter a lesão tratada de maneira ambulatorial no mesmo dia em que recebe o diagnóstico.

Considerando a maior sensação dolorosa associada à segunda sessão de TFD, além da dificuldade logística que muitos pacientes enfrentam por terem que se deslocar de seu município de origem para outra localidade que ofereça o tratamento, e acrescentando a esses fatores, o custo mais alto da técnica quando esta é realizada em duas sessões (separadas por intervalo de 7 dias), o desenvolvimento de um protocolo clínico que seja igualmente eficiente, porém aplicado em um único dia, pode aumentar a adesão dos pacientes à técnica. Com base na literatura e na experiência prévia de nosso grupo de pesquisa, este trabalho propõe um novo protocolo de aplicação de TFD com o intuito de concentrar a aplicação da técnica em um único dia, realizando as duas sessões de TFD separadas por um intervalo curto de tempo de escuro.

## 2 Objetivos

Propor, aplicar e analisar protocolos usando o fracionamento da luz com o intuito de otimizar o tempo de aplicação da TFDc, mantendo as porcentagens de resposta completa ou superando as mesmas.

Avaliar a porcentagem de resposta completa, após 30 dias do tratamento dos protocolos propostos.

Analisar a resposta ao tratamento segundo, localização e subtipo histológico da lesão.

Avaliar a dor percebida pelo paciente durante a aplicação da TFDf.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Pacientes

Fizeram parte do estudo 141 pacientes com 220 lesões, do ambulatório de Pele e tecidos moles, do Hospital Fundação Amaral Carvalho, localizado na cidade de Jau, São Paulo. Do total, 74 (52%) pacientes foram do sexo feminino e 67 (48%) do sexo masculino. As idades variam entre 28-92 anos, com média de 67,7 anos.

Após triagem dos pacientes, realizada de acordo com os critérios de inclusão deste protocolo clínico, os mesmos foram cadastrados e convidados a participar deste estudo.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Amaral Carvalho número de parecer: No. 1.507.028 sendo que todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

- Critérios de inclusão
  - ✓ Pacientes de ambos sexos;
  - ✓ Maiores de 18 anos;
  - ✓ Com lesões malignas do tipo CBC subtipo superficial e nodular (segundo a Classificação Internacional de Doenças CID 10, código D04.9) com diâmetro máximo de 2 (dois) centímetros;
  - ✓ Pacientes com lesões múltiplas também foram tratados, desde que cada lesão se enquadre nas características descritas no item anterior.
  
- Critérios de exclusão
  - ✓ Pacientes com alergia a qualquer um dos excipientes presente na fórmula;
  - ✓ Pacientes com carcinoma basocelular infiltrativo subtipo histológico micro-infiltrativo, esclerodermiforme e plano-cicatricial, terebrante, assim como carcinoma espinocelular ou epidermóide e melanoma;
  - ✓ Pacientes com porfiria;
  - ✓ Menores de 18 anos;

- ✓ Mulheres grávidas e lactantes.
- ✓ Doenças fotossensíveis, por exemplo, lúpus.

### 3.1.2 Equipamento

O equipamento usado nesta pesquisa foi um sistema de iluminação à base de diodos emissores de luz (LEDs), disponível no mercado como LINCE®, (MMOptics, Brasil). Este equipamento possui duas ponteiros. A primeira usada para visualizar a fluorescência que emite num comprimento de onda de  $400\pm 10\text{nm}$  e potencia máxima de saída de  $50 \pm 10 \text{ mW/ cm}^2$ . A outra ponteira usada para iluminação da lesão, possui 5 LEDs e sua potencia pode ser ajustada entre 50 e  $150 \text{ J/cm}^2$ . Esta ponteira emite num comprimento de onda de  $630\pm 10\text{nm}$  (Figura 14).

Figura 14: Equipamento LINCE® . A ponteira da esquerda emite luz num comprimento de onda de  $630\pm 10\text{nm}$ . A ponteira da direita emite luz num comprimento de onda de  $400\pm 10\text{nm}$



### 3.1.3 Medicamento

O fármaco utilizado foi MAL creme, na concentração de 20% (200 mg/g) produzido pela PDT- Pharma, Cravinhos, SP, Brasil.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Registro Fotográfico

Após a inclusão do paciente, as lesões foram submetidas a registro fotográfico com luz convencional com o intuito de assinalar a localização e tamanho para posterior acompanhamento.

Também foi realizado um registro fotográfico usando um visor de fluorescência (LINCE®, MMOptics, Brasil) que emite luz no comprimento de onda  $400\pm 10\text{nm}$  com o intuito de visualizar a produção da PpIX e o consumo da mesma após a irradiação nas duas etapas do protocolo.

### 3.2.2 Protocolo de tratamento

Todas as lesões que fizeram parte deste estudo foram submetidas a 2 etapas do tratamento. Os parâmetros e procedimentos realizados na primeira etapa foram idênticos para todos os grupos.

- Primeira etapa

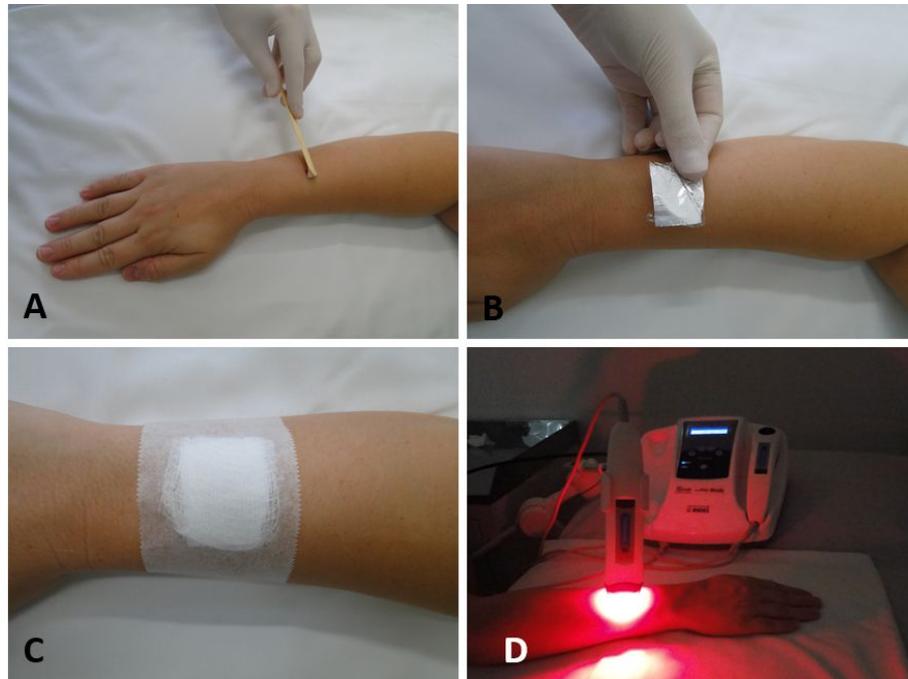
Antes do procedimento, é realizado um preparo da lesão que consiste em limpeza com solução alcoólica de clorexidina 0,5% e uma curetagem. O produto desta curetagem foi coletado e encaminhado para estudo histopatológico realizado na mesma instituição.

Imediatamente após, foi aplicada uma camada espessa do creme contendo MAL 20% e a lesão foi coberta com papel filme de PVC e papel alumínio para evitar a fotoativação (Figura 15).

Após um período de três horas sob oclusão, é retirado o excesso de creme usando uma gaze embebida em solução salina 0,9%.

Uma avaliação e um registro fotográfico da fluorescência da PpIX foi realizado. Posteriormente, as lesões foram iluminadas com uma dose de  $150\text{ J/cm}^2$ , uma intensidade de  $125\text{mW/cm}^2$  e um tempo de 20 minutos.

Figura 15: Aplicação do protocolo de TFDf; A) aplicação do creme MAL 20% após o preparo da lesão; B - C) posicionamento do curativo para evitar a exposição solar do creme MAL 20%; D) Iluminação da lesão com uma dose de 150 J/cm<sup>2</sup>, uma intensidade de 125mW/cm<sup>2</sup> e um tempo de 20 minutos.



- Segunda etapa

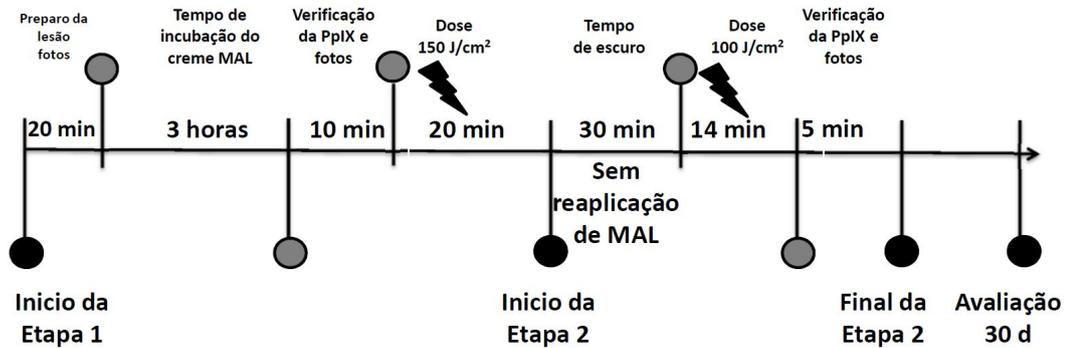
Os parâmetros e procedimentos realizados na segunda etapa variaram segundo o protocolo aplicado no grupo como descrito na (Tabela 1). Os três parâmetros modificados reaplicação do creme, tempo de escuro e dose de irradiação são aqueles que apresentam influência na resposta à TFD. O primeiro, necessário para aportar em quantidades suficientes o FS as células, o segundo é importante para lograr o efetivo transporte e incorporação do FS na célula e o terceiro relacionado diretamente com penetração da luz e volume de morte tumoral.

Os procedimentos feitos em cada protocolo são descritos a seguir:

- ✓ Protocolo de aplicação grupo 1 (G1): após a primeira irradiação, o tempo de escuro foi de 30 minutos, não houve reaplicação do creme MAL 20%. Quando terminado esse tempo foi realizada uma iluminação com um intensidade de 125mW/cm<sup>2</sup>, com uma total de 100 J/cm<sup>2</sup>. (Figura 16)

Figura 16: Evolução no tempo do protocolo aplicado ao grupo 1 (G1). Primeira etapa: preparo da lesão que consta de limpeza, curetagem, coleta de fotos, aplicação do creme MAL 20%, tempo de incubação de 3h e verificação da PpIX, irradiação com uma dose de 150 J/cm.

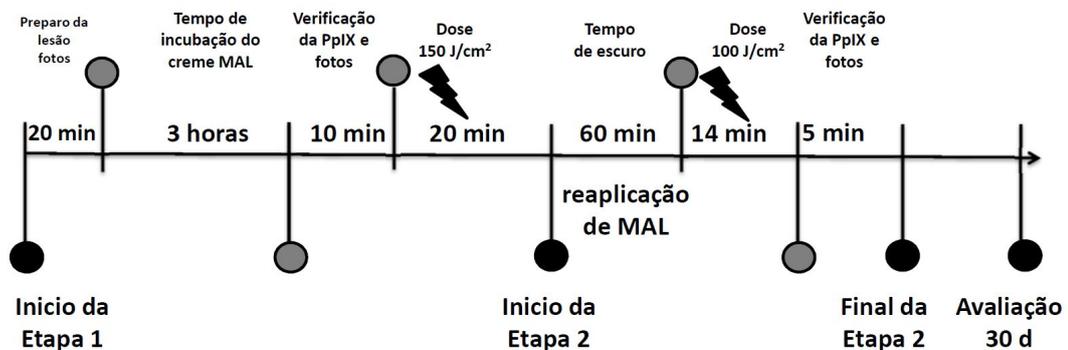
### Protocolo clínico Grupo 1



- ✓ Protocolo de aplicação grupo 2 (G2): Imediatamente após a primeira irradiação, foi realizada uma reaplicação de creme MAL 20%. O tempo de escuro neste protocolo foi de 60 minutos, terminado este tempo foi feita a iluminação com uma intensidade de 125mW/cm<sup>2</sup> e com uma dose de 100 J/cm<sup>2</sup>. (Figura 17)

Figura 17: Evolução no tempo do protocolo aplicado ao grupo 2 (G2). Primeira etapa: preparo da lesão que consta de limpeza, curetagem, coleta de fotos, aplicação do creme MAL 20%, tempo de incubação de 3h e verificação da PpIX, irradiação com uma dose de 150 J/cm; Segunda etapa: inicia imediatamente termina a primeira irradiação, com reaplicação de creme MAL 20%, tempo de escuro de 60 minutos e irradiação com uma dose de 100 J/cm<sup>2</sup>.

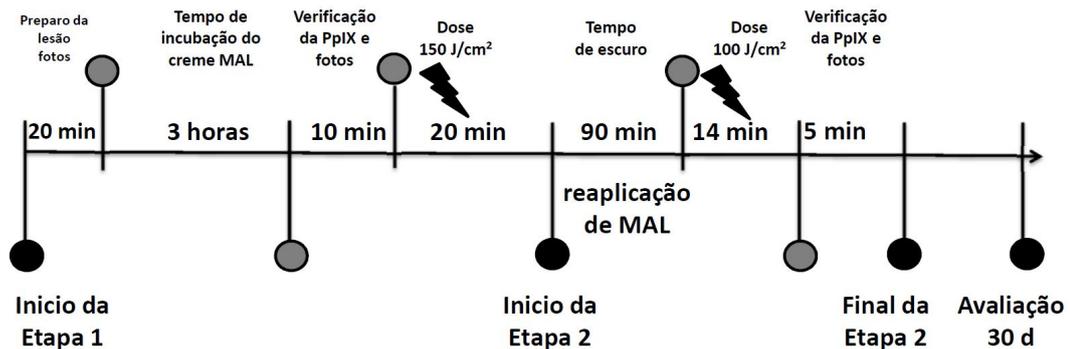
### Protocolo clínico Grupo 2



- ✓ Protocolo de aplicação grupo 3 (G3): Imediatamente após a primeira irradiação, foi realizada uma reaplicação de creme MAL 20%. O tempo de escuro neste protocolo foi de 90 minutos, terminado este tempo foi feita a iluminação com uma intensidade de  $125\text{mW}/\text{cm}^2$  e com uma dose de  $100\text{J}/\text{cm}^2$ . (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**)

Figura 18: Evolução no tempo do protocolo aplicado ao grupo 3 (G3). Primeira etapa: preparo da lesão que consta de limpeza, curetagem, coleta de fotos, aplicação do creme MAL 20%, tempo de incubação de 3h e verificação da PplX, irradiação com uma dose de  $150\text{J}/\text{cm}^2$ ; Segunda etapa: inicia imediatamente após terminada a primeira irradiação, com reaplicação de creme MAL 20%, tempo de escuro de 90 minutos e irradiação com uma dose de  $100\text{J}/\text{cm}^2$ .

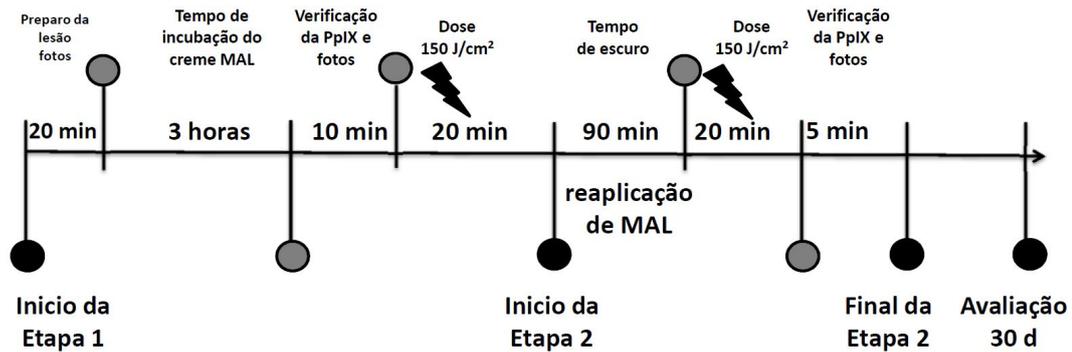
### Protocolo clínico Grupo 3



- ✓ Protocolo de aplicação grupo 4 (G4): Imediatamente após a primeira irradiação, foi realizada uma reaplicação de creme MAL 20%. O tempo de escuro neste protocolo foi de 90 minutos, terminado este tempo foi feita a iluminação com uma intensidade de  $125\text{mW}/\text{cm}^2$  e com uma dose de  $150\text{J}/\text{cm}^2$ . (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**)

Figura 19: Evolução no tempo do protocolo aplicado ao grupo 4 (G4). Primeira etapa: preparo da lesão que consta de limpeza, curetagem, coleta de fotos, aplicação do creme MAL 20%, tempo de incubação de 3h e verificação da PpIX, irradiação com uma dose de 150J/cm<sup>2</sup>; Segunda etapa: inicia imediatamente termina a primeira irradiação, com reaplicação de creme MAL 20%, tempo de escuro de 90 minutos e irradiação com uma dose de 150J/cm<sup>2</sup>.

### Protocolo clínico Grupo 4



- ✓ Grupo controle (GC): A segunda etapa foi realizada com os mesmos parâmetros que a primeira etapa. O tempo de intervalo entre as etapas foi de 7 dias. (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

Figura 20: Evolução no tempo do protocolo de Terapia Fotodinâmica convencional (TFDc). Primeira etapa: preparo da lesão que consta de limpeza, curetagem, coleta de fotos, aplicação do creme MAL 20%, tempo de incubação de 3h e verificação da PpIX, irradiação com uma dose de 150J/cm<sup>2</sup>; Terminada esta sessão um intervalo de 7 dias; Segunda etapa: são repetidos os mesmos procedimentos que na primeira sessão.

### Protocolo clínico TFD convencional



Tabela 1: Parâmetros aplicados nos diferentes grupos de TFDf

<b>Grupo/ Parâmetro</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
Reaplicação de creme	Não	Sim	Sim	Sim
Tempo escuro	30 minutos	60 minutos	60 minutos	90 minutos
Dose de irradiação	100J/cm <sup>2</sup>	100J/cm <sup>2</sup>	100J/cm <sup>2</sup>	150J/cm <sup>2</sup>

### 3.2.3 Avaliação da Dor

Durante o tratamento, todos os pacientes foram questionados para avaliarem a intensidade da dor, através de uma escala análoga, considerando-se 0 como ausência de dor e 10 como dor mais severa. E, esta avaliação foi feita de 3 em 3 minutos realizando registro da informação. O método de avaliação foi baseado na media da de dor referida pelos participantes. (BLANCO et al., 2017a).

### 3.2.4 Avaliação 30 dias após o tratamento

Uma avaliação clínica e histopatológica foi realizada 30 dias após o tratamento. Se considerou resposta completa (RC), ausência completa da lesão, na avaliação clínica e histopatológica e resposta parcial (RP), presença da lesão, na avaliação clinica ou histopatológica.

Nesta consulta era avaliada a presença ou ausência da lesão. Se ausente clinicamente, se realizava uma biopsia com *punch* 2 ou 3 mm na localização da lesão prévia.

Se clinicamente a lesão era evidente se encaminhava para exérese cirúrgica.

Os resultados clínicos foram analisados através da frequência relativa onde o percentual foi sempre calculado para o total de sujeitos (RAMIREZ et al., 2014).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A TFD para o tratamento do CBC não infiltrativo é atualmente realizada com a aplicação da terapia em duas sessões com um intervalo de 7 dias. O creme de MAL a 16-20% é aplicado sobre a lesão e incubado por 3 horas. Ao final desse período, a lesão e os tecidos adjacentes são irradiados entregando uma dose de energia de 80 a 150 J/cm<sup>2</sup> (CHRISTENSEN et al., 2010).

Os resultados reportados na literatura e aqueles obtidos por nosso grupo quando usada a TFDc atingem taxas de RC ao redor de 90% (SOLER et al., 2001), (VINCIULLO et al., 2005), (FOLEY et al., 2009), (RAMIREZ et al., 2014), (SALVIO et al., 2016b), (SALVIO et al., 2016a), (SALVIO et al., 2016c), (BLANCO et al., 2017a).

As taxas de RC são bastante satisfatórias, ainda um pouco inferiores ao da ressecção cirúrgica (95%) (MARZUKA; BOOK, 2015), mas apresentando melhor resposta cosmética, assim como a não necessidade de infraestrutura complexa e pessoal especializado. No entanto, o ideal é a TFD apresentar resposta similar ou superior ao tratamento cirúrgico, terapêutica padrão para o câncer de pele não melanoma.

Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a resposta de 4 protocolos distintos de TFDf, buscando um aumento da taxa da RC quando comparado com o grupo controle ou de TFDc. Além disso, os protocolos propostos foram planejados para serem aplicados em uma única sessão clínica, uma modificação relevante na aplicação.

O protocolo convencional (CHRISTENSEN et al., 2010) é realizado em duas sessões clínicas, sendo uma desvantagem em comparação à cirurgia, especialmente quando se considera o esgotamento do sistema público de saúde, que resulta em longos períodos de espera por agendamento de consultas e procedimentos. Outro fator importante que contribui para a desistência ou descontinuidade do tratamento resulta dos grandes deslocamentos que muitos pacientes se submetem para encontrar assistência médica em centros especializados.

Os quatro protocolos propostos no presente estudo constaram de duas etapas, os procedimentos realizados na primeira etapa foram os mesmos para todos os grupos e na segunda etapa os parâmetros reaplicação do creme, tempo de escuro, e dose de irradiação foram modificados.

Esses três parâmetros são aqueles que podem ser clinicamente modificados e que apresentam influência na resposta fotodinâmica. A aplicação do creme está relacionada com o contínuo suprimento de MAL durante todo o período de incubação, assim, as células tumorais estão constantemente incorporando ALA (JUZENIENE et al., 2002)(LOPEZ et al., 2004).

O tempo de escuro, ou tempo de incubação, é necessário para que efetivamente o MAL possa ser transportado pela epiderme e derme e que a produção de PpIX ocorra em quantidades suficientes para o tratamento global do tumor (VAN DER VEEN et al., 1996).

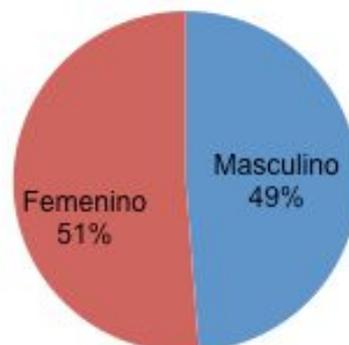
A dose de energia entregue tem efeito direto na resposta fotodinâmica observada, sendo principalmente em profundidade de penetração da luz e volume de morte tumoral (WILSON; PATTERSON, 2008).

Neste estudo foram incluídos 164 pacientes com 258 lesões de CBC procedentes do Departamento de Pele e Tecidos Moles do Hospital Amaral Carvalho de Jaú.

A idade média foi de 67,7 anos com predomínio do sexo feminino 51% (84 lesões) sobre o masculino com 49% (80 lesões) (Figura 21: Distribuição dos pacientes participantes neste estudo por sexo. Do sexo feminino participaram 84 (51%) pacientes, do sexo masculino 80 (49%).; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

Figura 21: Distribuição dos pacientes participantes neste estudo por sexo. Do sexo feminino participaram 84 (51%) pacientes, do sexo masculino 80 (49%).

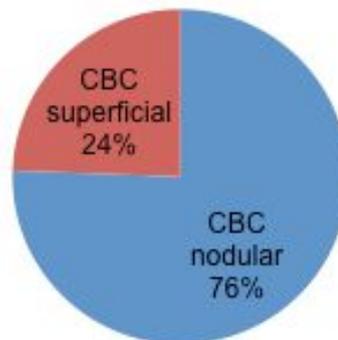
### Distribuição das lesões por sexo



O subtipo de CBC mais frequentemente tratado neste estudo foi o nodular sendo 76% (195 lesões) e menos frequente o CBC superficial com 24% (63 lesões) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Figura 22: Distribuição das lesões segundo o subtipo clínico. Das 220 lesões tratadas 195 (76%) foram do subtipo nodular e 63 (24%) do subtipo superficial.

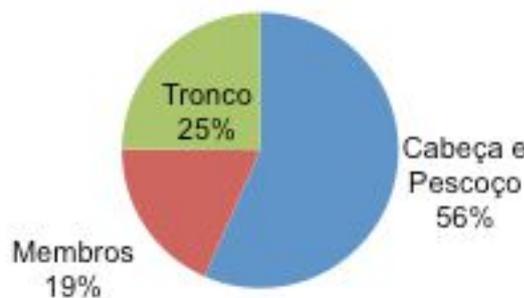
### Distribuição das lesões por subtipo



A localização predominante das lesões foi: cabeça e pescoço com 56% (146 lesões), seguido pelo tronco com 25% (64 lesões) e membros superior e inferior com 19% (48 lesões) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Figura 23: Distribuição das lesões por localização. Cabeça e pescoço com 56% (146 lesões), tronco 25% (64 lesões), membros superior e inferior com 19% (48 lesões).

### Distribuição das lesões por localização



No grupo 1, participaram 27 pacientes com 38 lesões em idades entre 50-80 anos (media 68,8), sendo 55,5% de sexo masculino (15 pacientes) e 44,5% de sexo feminino

(12 pacientes). As lesões tratadas classificadas como CBC do subtipo nodular foram 27 (71%) e do subtipo superficial 11 (29%). As lesões localizadas em cabeça e pescoço foram 23 (60,6%), membros superiores 1 (2,6%) e tronco 14 (36,8%) lesões.

O protocolo aplicado neste grupo constava de um tempo de escuro de 30 minutos, sem reaplicação do creme e a dose de irradiação na segunda etapa foi  $100 \text{ J/cm}^2$  (Figura 16). Nesse protocolo, o tempo total de aplicação da técnica foi de 4 h e 39 minutos.

Evolução no tempo do protocolo aplicado ao grupo 1 (G1). Primeira etapa: preparo da lesão que consta de limpeza, curetagem, coleta de fotos, aplicação do creme MAL 20%, tempo de incubação de 3h e verificação da PpIX, irradiação com uma dose de  $150 \text{ J/cm}^2$ ; Segunda etapa: inicia imediatamente termina a primeira irradiação neste protocolo, não houve reaplicação de creme, tempo de escuro foi de 30 minutos, a irradiação com uma dose de  $100 \text{ J/cm}^2$ .

Observamos que o porcentual de RC avaliada com biópsia e análise histopatológica realizada 30 dias após da aplicação do TFDf foi de 65,8%. Das 13 lesões que apresentaram resposta parcial (RP), 9 lesões foram do tipo nodular e 4 do tipo superficial. Também observamos que 92,3% (12) das lesões com RP estavam localizadas na região da cabeça e pescoço. Esse resultado mostrou que a técnica nessas condições, não é eficiente e se torna inviável.

Entre as possíveis explicações deste resultado está o tempo de escuro curto para atingir concentrações de PpIX suficientes para o sucesso da técnica. Na pele, a produção e acumulação de PpIX vai aumentando com o tempo como demonstrado por alguns estudos sendo detectável através da fluorescência de campo aberto a partir de uma hora após aplicação do ALA (VAN DER VEEN et al., 1996), (IBBOTSON et al., 2006), (ORENSTEIN; KOSTENICH; MALIK, 1997), (DE BRUIJN et al., 2006).

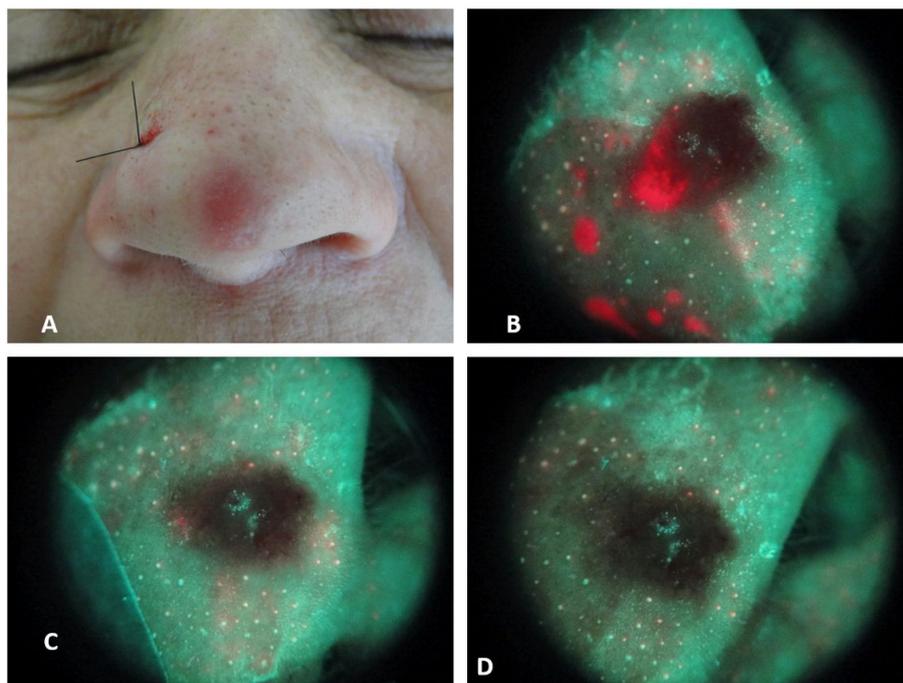
No trabalho publicado por Van der Veen, 1996, onde foi aplicado ALA creme, em pele de rato, e avaliada através da fluorescência a produção de PpIX durante 24 horas. A coleta da informação foi realizada de 2 em 2 horas e observado um rápido aumento da PpIX no tempo até um pico de 10 horas, sendo posteriormente observada uma intensidade da fluorescência menor (VAN DER VEEN et al., 1996). Já em pele sadia de voluntários, Ibbotson e colaboradores observaram aparecimento da fluorescência da PpIX, após uma hora da aplicação do ALA (IBBOTSON et al., 2006).

Outro estudo realizado em CBC, CEC e sarcoma de Kaposi onde foi avaliada a produção de PpIX, após TFD (Dose 170J/cm<sup>2</sup>) mostram o reaparecimento da fluorescência da PpIX após 1h da irradiação(ORENSTEIN; KOSTENICH; MALIK, 1997).

Brujim et.al, em 2006, publicaram os resultados de seu estudo em pele de rato onde foi aplicada diferentes protocolos de TFDf. O tempo de escuro foi de 30 minutos, 1, 1.5 e 2 horas. Observaram um leve aumento da fluorescência da PpIX no protocolo de 30 minutos não estatisticamente significativo. Com tempos de 1, 1.5, 2.0 horas, o aumento da fluorescência da PpIX foi significativamente maior não achando diferencia estatística quando avaliada a fluorescência entre os tempos (DE BRUIJN et al., 2006). Esses resultados corroboram com os do presente estudo, demonstrando que o período de 30 minutos não é suficiente para a produção de PpIX em quantidades efetivas para a TFD.

Na Figura 24 observamos a fluorescência da PpIX (cor vermelha) na primeira etapa do tratamento, antes da irradiação e depois de um tempo de escuro de 30 minutos de uma das lesões tratadas nesta pesquisa. Observamos uma pobre produção da PpIX na segunda etapa comparando com a primeira. E nas condições específicas testadas, acreditamos que o tempo de 30 minutos é muito curto para a produção de PpIX em quantidades suficientes para a reação fotodinâmica, independente da reaplicação do creme MAL 20% imediatamente terminada a iluminação da primeira etapa.

Figura 24: Lesão tratada com o protocolo G1; A) Lesão de carcinoma Basocelular (CBC); B) Fluorescência da PpIX antes da irradiação na primeira etapa do tratamento; C) Fluorescência da PpIX antes da irradiação da segunda etapa do tratamento (após 30 minutos do tempo de escuro); D) consumo da PpXI após a segunda iluminação.



Além do tempo de escuro, outro fator que contribui para a pequena produção de PpIX no tumor após a primeira etapa, é uma quantidade insuficiente de ALA presente no tumor. Desta maneira, para continuar o estudo decidimos aumentar o tempo de escuro e realizar uma reaplicação do creme MAL 20% imediatamente terminada a primeira etapa do protocolo, otimizando esses dois parâmetros.

Os parâmetros escolhidos para o grupo 2, foram a reaplicação do creme MAL 20%, um tempo de escuro de 60 minutos e uma dose de irradiação de  $100 \text{ J/cm}^2$  como ilustrado na **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Nesse protocolo, o tempo total de aplicação da técnica foi de 5 h e 9 minutos.

Neste grupo foram tratados 25 pacientes com 34 lesões em idades entre 43-81 anos (média 64,6), sendo 40 % de sexo masculino (10 pacientes) e 60 % de sexo feminino (15 pacientes). As lesões tratadas foram classificadas como CBC do subtipo nodular 52,9% (18 lesões) e do subtipo superficial 47,1% (16 lesões). As lesões localizadas em cabeça e pescoço, membros superiores/inferiores e tronco foram de 22, 2 e 10, respectivamente.

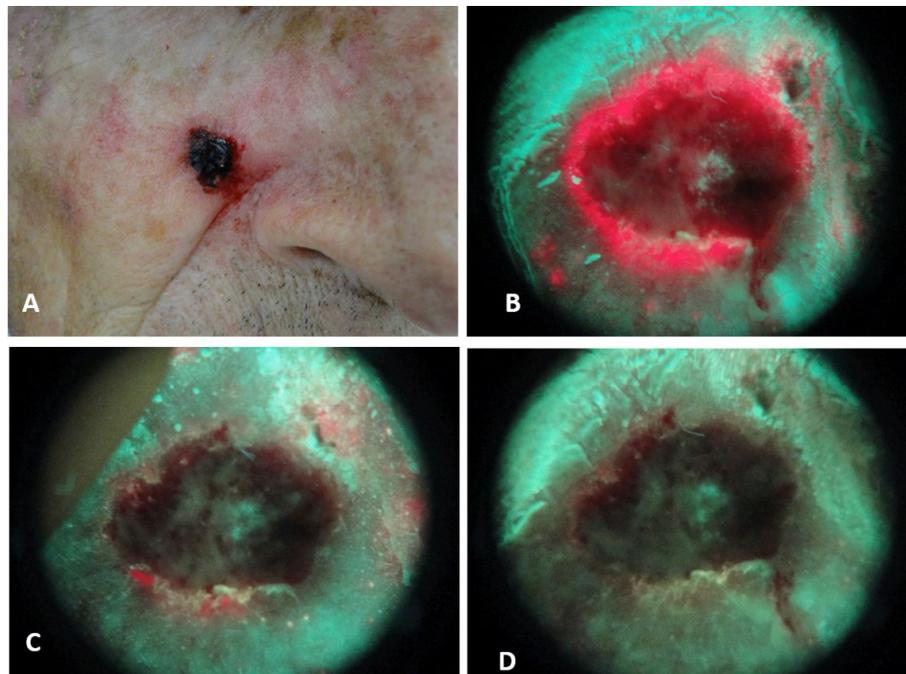
Os resultados que obtivemos de RC avaliada com biópsia e histopatologia realizada 30 dias após da aplicação do TFDf foi de 67,6%. Das 11 lesões que apresentaram RP, 8 lesões foram do tipo nodular e 3 do tipo superficial. Também observamos que 81,8% (9) dessas lesões estavam localizadas na região da cabeça e

pescoço. Este resultado mesmo que superior ao do grupo 1 é ainda pouco efetivo e preciso melhor avaliado (Figura 25).

Após a aplicação do creme ALA (substrato) existe uma série de processos que envolvem várias enzimas para a geração da PpIX (AGOSTINIS et al., 2011a). Neste protocolo realizamos uma reaplicação do creme imediatamente após a iluminação da primeira etapa com o intuito de entregar continuamente substrato para induzir a formação endógena de PpIX.

O resultado sugere que o tempo curto de incubação do creme (1h) seria insuficiente para desencadear a essas reações enzimáticas, levando a uma produção escassa e insuficiente da PpIX. Também consideramos importante o fato das células terem passado por um importante choque como resultado da primeira etapa da técnica que diminuiria sua capacidade de produção da PpIX, de forma rápida, para atingir concentrações suficientes em tempos curtos.

Figura 25: Lesão tratada com o protocolo G2; A) Lesão de carcinoma Basocelular (CBC); B) Fluorescência da PpIX antes da irradiação na primeira etapa do tratamento; C) Fluorescência da PpIX antes da irradiação da segunda etapa do tratamento (após 60 minutos do tem



Em seu estudo, Bruijn e colaboradores (2006) além de avaliarem a produção de PpIX nos diferentes tempos de escuro (mencionado previamente) avaliou clinicamente a pele de rato, submetida a TFDf, em diferentes protocolos variando o tempo de escuro (0,5;

1; 1,5; e 2 horas ) e comparou os resultados com um protocolo de TFD em iluminação única. O resultado da avaliação clínica com parâmetros como eritema e formação de crosta, entre outros, evidenciou um maior dano da pele irradiada quando submetida a TFDf com tempos de escuro prolongados, sendo que a terapia realizada em 2 horas, indica que esse protocolo resultou em maior dano clínico (DE BRUIJN et al., 2006). Esses resultados estão de acordo com os encontrados neste trabalho evidenciando que um maior tempo de escuro pode favorecer uma melhor resposta ao tratamento.

Com o intuito de melhorar a eficiência da técnica propusemos testar um terceiro protocolo aumentando para 90 minutos o tempo de escuro após reaplicação do creme e mantendo a dose de irradiação da segunda etapa em  $100\text{J}/\text{cm}^2$ , como visualizado na **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Nesse protocolo, o tempo total de aplicação da técnica foi de 5h e 39 min.

Neste terceiro grupo foram tratados 37 pacientes com 61 lesões em idades entre 31-83 anos (media 61,2), sendo 37.9% de sexo masculino (14 pacientes) e 62.1 % de sexo feminino (23 pacientes). As lesões tratadas foram classificadas como CBC do subtipo nodular (43 lesões) e do subtipo superficial (17 lesões). As lesões localizadas em cabeça e pescoço foram 33 lesões, em membros superiores 8 e em tronco 20 lesões.

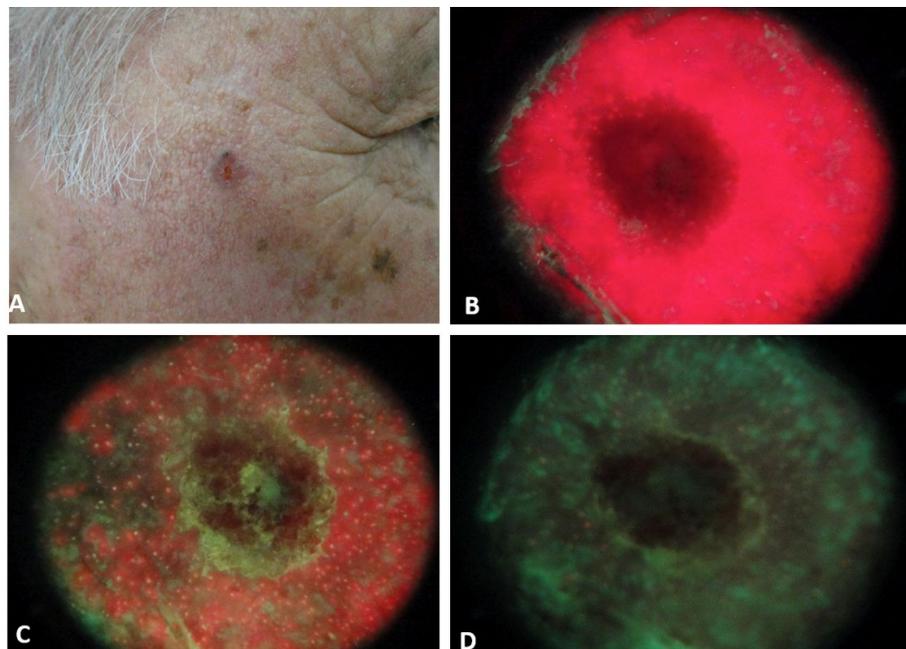
Após 30 dias de tratamento foi observada uma RC de 82% das lesões tratadas. Das 11 lesões que apresentaram apenas RP, 8 lesões foram do tipo nodular e 3 do tipo superficial. Também observamos que 72,7% (8) dessas lesões estavam localizadas na região da cabeça e pescoço.

Comparando o grupo 2 com o grupo 3 observamos uma melhora da resposta ao tratamento de 14,4%. Obtivemos este resultado mudando um único parâmetro, o tempo de escuro, que passou de 60 minutos a 90 minutos.

O tempo de escuro ou período de escuro é o tempo compreendido entre a reaplicação do MAL 20%, que ocorre imediatamente ao final da primeira iluminação (primeira etapa), e o início da segunda iluminação (segunda etapa) do tratamento (Figura 26).

Nesse tempo a reação fotodinâmica é interrompida reduzindo assim o consumo de oxigênio molecular, o que, associado ao retorno da microcirculação, incrementa os níveis de oxigênio que serão usados na segunda etapa do tratamento otimizando os efeitos da TFD (CURNOW; HALLER; BOWN, 2000)(DE HAAS et al., 2006b).

Figura 26: Lesão tratada com o protocolo G3; A) Lesão de carcinoma Basocelular (CBC); B) Fluorescência da PpIX antes da irradiação na primeira etapa do tratamento; C) Fluorescência da PpIX antes da irradiação da segunda etapa do tratamento (após 90 minutos do tempo de escuro); D) consumo da PpIX após segunda iluminação.



Durante o tempo de escuro, outros mecanismos celulares estão associados à resposta das células à TFDf, tais como: redistribuição da PpIX e/ou mudanças moleculares e de estruturas-alvo que podem incrementar a morte da célula por autofagia ou apoptose

na segunda etapa do tratamento (BRUIJN et al., 2012)(DE BRUIJN et al., 2016). Como mencionado anteriormente, tempos de escuro mais prolongados estão relacionados com maior produção de PpIX e melhor resposta ao tratamento (DE BRUIJN et al., 2006).

Nesse ponto da pesquisa observamos que o percentual da resposta ao tratamento quando avaliada após 30 dias, era comparável com resultados de alguns estudos publicados de TFD com protocolo convencional com duas sessões espaçadas de 7 dias (VINCIULLO et al., 2005), (FOLEY et al., 2009), (RAMIREZ et al., 2014), (SALVIO et al., 2016a). Porém, em nosso grupo, já tínhamos alcançado melhores taxas de cura com o protocolo convencional e segundo a proposta inicial do trabalho decidimos aplicar um protocolo diferente (SALVIO et al., 2017)(SALVIO et al., 2016b).

Para continuar a pesquisa decidimos modificar o protocolo. Tínhamos duas opções, aumentar o tempo de escuro ou aumentar a dose de irradiação aplicada. A primeira opção violaria o princípio de nossa proposta de otimização temporal na aplicação da TFD, por isso, decidimos aumentar a dose de luz entregue ao tecido.

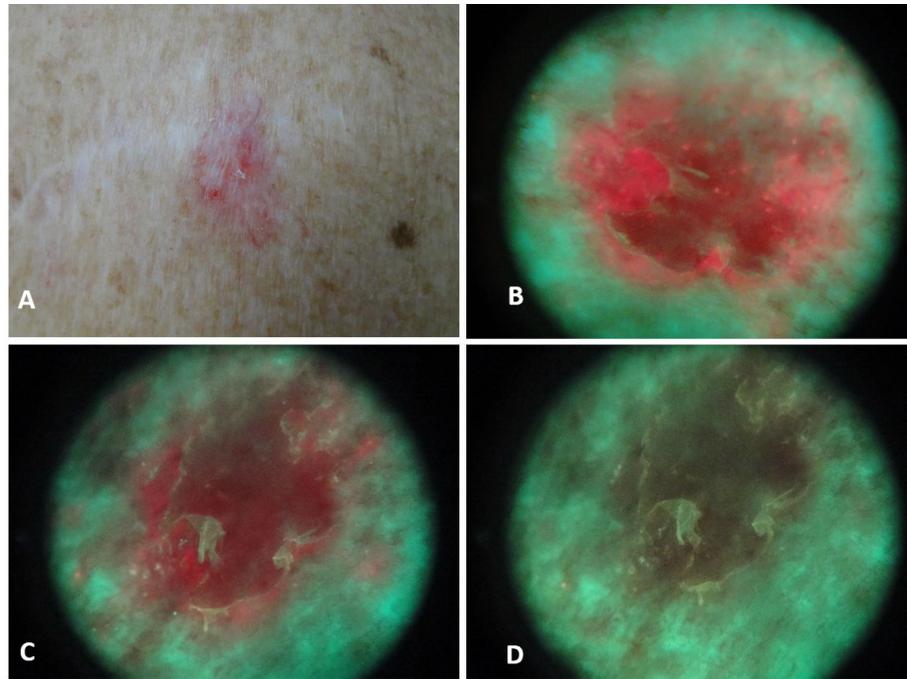
No grupo 4 foi aplicado um quarto protocolo que constava de um tempo de escuro de 90 minutos com reaplicação de creme e uma dose de  $150\text{J}/\text{cm}^2$  (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). A hipótese aqui testada foi para verificar se o aumento da dose de luz entregue na segunda irradiação influenciava e melhorava a resposta ao tratamento. Nesse protocolo, o tempo total de aplicação da técnica foi de 5h e 45 min.

Foram tratados com este protocolo 53 pacientes com 87 lesões em idades entre 28-92 anos (média 60,1), sendo 54,7 % de sexo masculino (29 pacientes) e 45,3% de sexo feminino (24 pacientes). As lesões tratadas classificadas como CBC do subtipo nodular foram 68 e do subtipo superficial 19. As lesões localizadas em cabeça e pescoço foram 48, membros superiores 7 e tronco 32 lesões.

Após 30 dias de tratamento foi observada uma RC de 95,4% das lesões tratadas. As 4 lesões que apresentaram apenas RP foram do tipo tipo nodular. Também observamos que 50 % (2) dessas lesões estavam localizadas na região da cabeça e pescoço.

Comparando o grupo 3 e o grupo 4 observamos uma melhora na resposta de 13,4% com o aumento da dose de irradiação (Figura 27).

Figura 27: Lesão tratada com o protocolo G4; A) Lesão de carcinoma Basocelular (CBC); B) Fluorescência da PpIX antes da irradiação na primeira etapa do tratamento; C) Fluorescência da PpIX antes da irradiação da segunda etapa do tratamento (após 90 minutos do tempo de escuro); D) consumo da PpIX após segunda iluminação.



Considerando a segunda etapa de TFD, a dose de luz entregue em G4 foi 50% maior que a dose de luz entregue em G3. O maior porcentual de RC obtida em G4 deve-se ao fato de que iluminar a lesão por um tempo 50% maior, faz com que o tratamento tenha possivelmente atingido profundidades maiores.

De acordo com trabalho do nosso grupo de pesquisa (FERREIRA et al., 2007), considerando que haja FS e oxigênio em quantidades suficientes durante todo o tempo de iluminação, a profundidade de necrose induzida pela TFD pode ser descrita pela equação a seguir:

$$d_{nec} = \delta \ln \frac{D_0}{D_{th}}$$

Onde  $D_0$  é a dose total de luz entregue na superfície do tecido,  $D_{th}$  é a dose *threshold* ou dose limiar, que é a dose de luz mínima necessária para que ocorra necrose tecidual e  $\delta$  é a profundidade de penetração efetiva da luz.

Considerando que o valor de  $D_{th}$  seja constante em todo o tecido-alvo, quando aumenta-se  $D_0$  em 50%, a profundidade de necrose induzida pela TFD será maior, pois:

$$d'_{nec} = \delta \ln \frac{1.5D_0}{D_{th}} = \delta \ln(1.5) + \delta \ln \frac{D_0}{D_{th}} \cong 0.4\delta + d_{nec}$$

Equação 2

Vemos que a profundidade de necrose induzida sofre um acréscimo de  $0.4\delta$ . Assim, o maior número de RC obtida em G4 pode estar associado a uma maior profundidade de necrose induzida com este protocolo.

Uma outra explicação para este melhor resultado em G4, considera que quando em dado volume de lesão, há células com diferentes valores de  $D_{th}$ , então, aumentando  $D_0$  em 50%, garantimos que células com  $D_{th}$  até 50% maior, ou seja, células mais resistentes à TFD, também sejam levadas à morte (DE FARIA et al., 2016), (FARIA, 2017).

O grupo controle foi submetido ao protocolo convencional realizado em duas etapas separadas por 7 dias entre cada sessão (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Os parâmetros escolhidos e aplicados em cada sessão foram idênticos sendo aplicado o creme MAL 20%, 3 horas de tempo de incubação e uma dose de irradiação de  $150 \text{ J/cm}^2$ . Nesse protocolo, o tempo total de aplicação da técnica foi de 7 h e 45 min (excluindo os 7 dias de intervalo entre as sessões).

No grupo participaram 22 pacientes com 38 lesões em idades entre 31-83 anos (média 61,2), sendo 37.9% de sexo masculino (14 pacientes) e 62.1 % de sexo feminino (23 pacientes). As 38 lesões tratadas foram classificadas como CBC do subtipo nodular. As lesões localizadas em cabeça e pescoço foram 20 lesões, em membros superiores 5 e em tronco 13 lesões.

Após 30 dias de tratamento foi observada uma RC de 81,6% das lesões tratadas. As 7 lesões que apresentaram RP todas foram do tipo nodular. Também observamos que 85,7% (6) dessas lesões estavam localizadas na região da cabeça e pescoço.

Analisando os protocolos aplicados nos diferentes grupos observamos que dois parâmetros apresentam grande importância para a resposta final ao tratamento: o tempo de escuro e a dose de irradiação. Com o objetivo de possibilitar a comparação entre os protocolos investigados, propusemos uma figura de mérito P ( $P = T_e \cdot D_2$ ) que resulta da multiplicação entre o tempo de escuro e a dose de energia entregue, uma vez que os dois apresentam uma influência positiva na resposta fotodinâmica. A Figura 28 é uma representação gráfica da comparação entre a taxa de resposta ao tratamento (RC) em porcentagem em função da figura de mérito P.

Para construção deste gráfico, duas considerações foram feitas: 1) a não reaplicação do creme no grupo 1 foi desconsiderada, devido a acreditarmos que o tempo de escuro curto inviabilizava a produção de PpIX independente da aplicação de creme MAL. 2) no protocolo convencional foram realizadas 2 sessões ou etapas separadas por 7 dias. Para fazer a comparação com esse protocolo, nesta análise, consideramos que esses 7 dias (tempo entre cada etapa) poderiam ser desconsiderados, uma vez que baseamos nossa análise na segunda etapa do tratamento.

Feitos esses dois esclarecimentos, no eixo vertical está representada a taxa de RC e no eixo horizontal o resultado da multiplicação do coeficiente tempo de escuro vezes a dose da segunda iluminação ( $D_2$ ) (minutos x Joules/cm<sup>2</sup>). Os valores de P para cada grupo estão apresentados na Tabela 2.

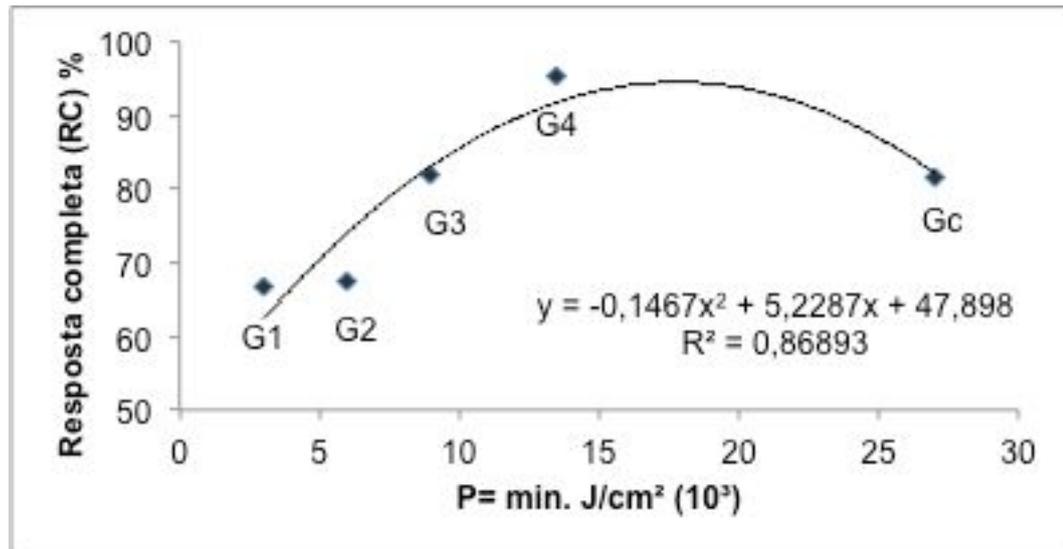
Tabela 2: Valor P para os grupos 1 a 4 e TFD convencional. Tempo de escuro ( $T_e$ ), Dose de irradiação na segunda sessão ( $D_2$ ), Expressão que resulta da multiplicação o  $T_e$  vezes  $D_2$  (P).

<b>Protocolo de aplicação / Grupo</b>	<b>Te (minutos)</b>	<b>D<sub>2</sub> (J/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>P (min * J/cm<sup>2</sup>)</b>
<b>1</b>	30	100	3 * (10) <sup>3</sup>
<b>2</b>	60	100	6 * (10) <sup>3</sup>
<b>3</b>	90	100	9 * (10) <sup>3</sup>
<b>4</b>	90	150	13.5 * (10) <sup>3</sup>
<b>TFD convencional (TFDc)</b>	180	150	27 * (10) <sup>3</sup>

Como observamos na Figura 28, existe uma melhora da resposta ao tratamento gradual associado com o coeficiente P. O grupo 4 apresenta a melhor resposta ao tratamento com uma RC de 95,4%, sendo inclusive, melhor que a TFD convencional. Observamos também como os dois parâmetros Te e D<sub>2</sub> são de extrema importância e influenciam a resposta ao tratamento.

Haas e colaboradores em 2006 publicaram um estudo onde foi aplicada TFDf num protocolo de irradiação de 20 J/cm<sup>2</sup> - 80J/cm<sup>2</sup> (primeira e segunda etapa do tratamento respectivamente) em lesões de CBCs e CBCn, doença de DB e QA. Para CBCs encontraram uma RC 91% num acompanhamento de 24 meses. Para CBCn observou-se nesse tempo de acompanhamento uma taxa de cura de 50%. (SOTIRIOU et al., 2012), comparou o protocolo de TFDf com TFD numa única iluminação em lesões de queratose actínica localizada em face e couro cabeludo. Após um seguimento de 3 meses, observou um RC de 89,5% e 96,1% para TFD única sessão e TFDf respectivamente.

Figura 28: Gráfico que representa o comportamento da resposta ao tratamento com diferentes protocolos de aplicação. G1, tempo de escuro 30 min, dose 100J/cm<sup>2</sup>; G2, tempo de escuro 60 min, dose 100J/cm<sup>2</sup>; G3, tempo de escuro 90 min, dose 100J/cm<sup>2</sup>; G4, tempo de escuro 90 min, dose 150J/cm<sup>2</sup>; TFDc, consta de duas sessões com intervalo de 7 dias entre cada, tempo de incubação do creme é de 3 horas e a dose de irradiação de 150J/cm<sup>2</sup> para cada sessão.



Embora, os resultados apresentados no presente trabalho correspondam a um acompanhamento feito por até 30 dias após o tratamento, estes sugerem que o protocolo proposto torna-se interessante para tratamento nestes tipos de lesões com taxas de respostas comparáveis a outros estudos. Porém, se torna necessário continuar com as avaliações periódicas próprias do tipo da doença tratada.

Quando comparamos os resultados obtidos neste trabalho com os resultados do grupo controle onde foi aplicada a TFDc, observamos melhores taxas de RC na avaliação de 30 dias sendo observada uma melhora de 13,8%.

Esta melhora se torna interessante devido a vários fatores. Além de oferecer através deste protocolo melhores taxas de resposta, existe uma otimização do tempo de tratamento ao que será submetido o paciente. O CBC é uma doença que embora possa aparecer em qualquer tipo de idade é muito mais frequente em idosos. No hospital Amaral Carvalho (Jaú, SP) onde foi realizada este trabalho são atendidos um número de pacientes consideráveis nessa faixa etária, que muitas vezes precisam se deslocar de municípios vizinhos para receber o tratamento. Estas viagens se tornam cansativas e desestimulam a adesão ao tratamento. Por isso, torna-se importante aperfeiçoar o protocolo de tratamento que não necessite de internação e que ainda possa ser realizado num mesmo dia facilitando a adesão por parte dos pacientes ao mesmo.

O CBCn foi o subtipo de lesão que teve maior porcentagem de RP. Das 198 lesões do tipo nodular tratadas neste estudo, 36 lesões (18,1%) apresentaram RP observando uma quantidade maior para o grupo 1 com 9 lesões(5,7%), quando comparada com os grupo G2 8 (5,0%), G3 8 (5,0%), G4 4 (2,5%) Figura 29 e Figura 30.

Figura 29: Análise do número de lesões que apresentaram RC/RP por subtipo de CBC nodular e superficial para cada grupo.

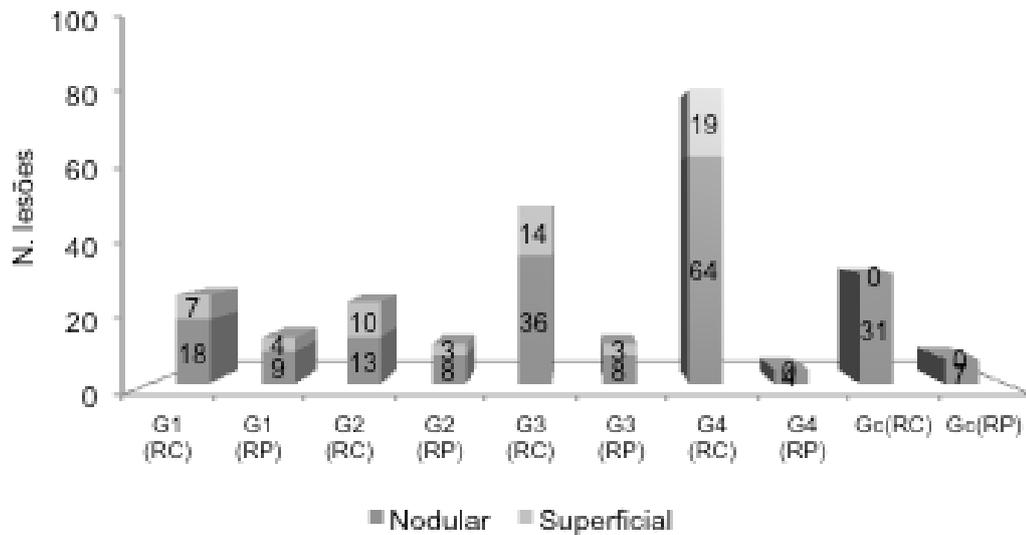
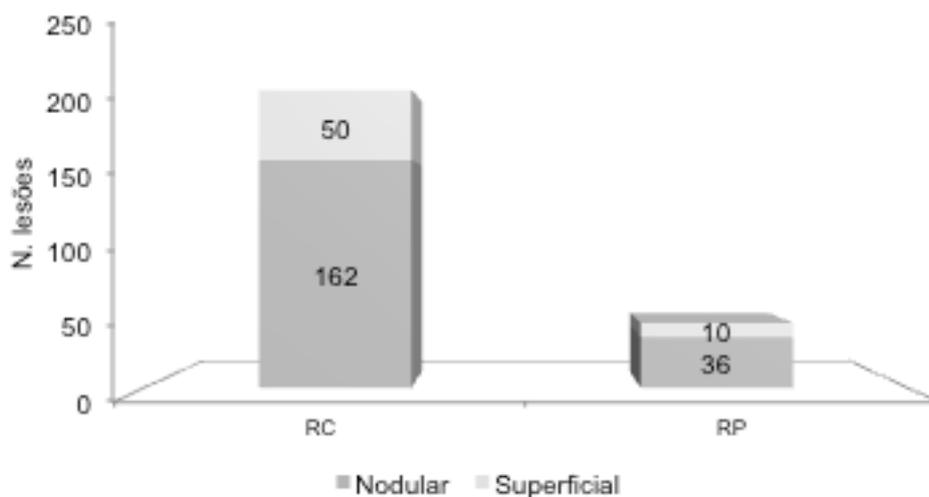


Figura 30: Análise do número de lesões que apresentaram RC/RP por subtipo de CBC nodular e superficial no total das lesões.



Este comportamento é observado em vários estudos quando realizada a TFD tópica (SURRENTI et al., 2007), (FANTINI et al., 2011), (RAMIREZ et al., 2014). O CBC é clinicamente dividido em 5 subtipos sendo o nodular, localizado em cabeça e pescoço a forma mais comum e o CBCs o menos frequente localizado principalmente em tronco e ombros (CHINEM; MIOT, 2011b), distribuição observada também neste estudo.

O CBCn, nos estudos histopatológicos é definido como agregados de células basalóides que eventualmente podem apresentar padrão cístico, com necrose central ou pigmentação. O macronodular ainda pode ser menos uniforme que o micronodular e quando comparado com o CBCs pode atingir camadas mais profundas (CHINEM; MIOT, 2011b). Estas características fazem com que o subtipo CBCn apresente uma resposta menos favorável a TFD tópica especialmente quando a lesão tem espessura maior que 2 mm.

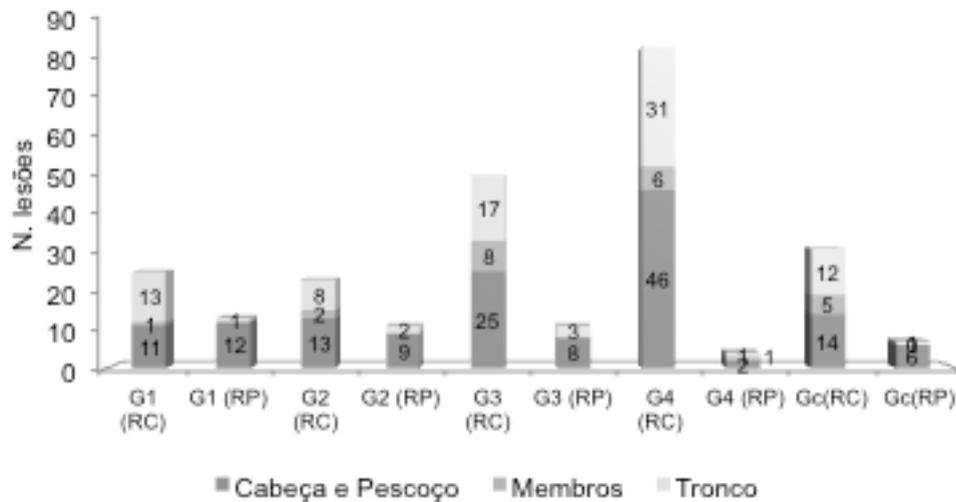
Além disso, a experiência do especialista na técnica pode ser determinante na resposta a TFD. Em nossos trabalhos anteriores (RAMIREZ et al., 2014) (BUZZÁ et al., 2015) observamos que centros de tratamento experientes na técnica apresentavam melhores resultados quando comparados com os não experientes. Nesse estudo, esse resultado foi principalmente associado à uma não correta indicação da lesão a ser tratada e habilidade do clínico para a realização de procedimentos, tais como a curetagem e preparo da lesão para a técnica (RAMIREZ et al., 2014).

Entretanto, este estudo mostrou que o protocolo aplicado para o grupo G4 obteve a maior taxa de RC e a mínima taxa de RP para CBCn com 2,5% (4 lesões) do total das lesões tratadas. Aos 30 dias de acompanhamento, esta porcentagem é comparável com a

técnica padrão ouro para tratamento de CBCn, que é a cirurgia (CHINEM; MIOT, 2011b)(ROOZEBOOM et al., 2013).

Outro aspecto interessante que foi observado neste estudo associado à resposta ao tratamento foi o impacto que teve o protocolo aplicado no G4 em todas as regiões do corpo. Na Figura 31 observamos que o protocolo aplicado obteve o menor porcentagem de RP ainda na região da cabeça e pescoço.

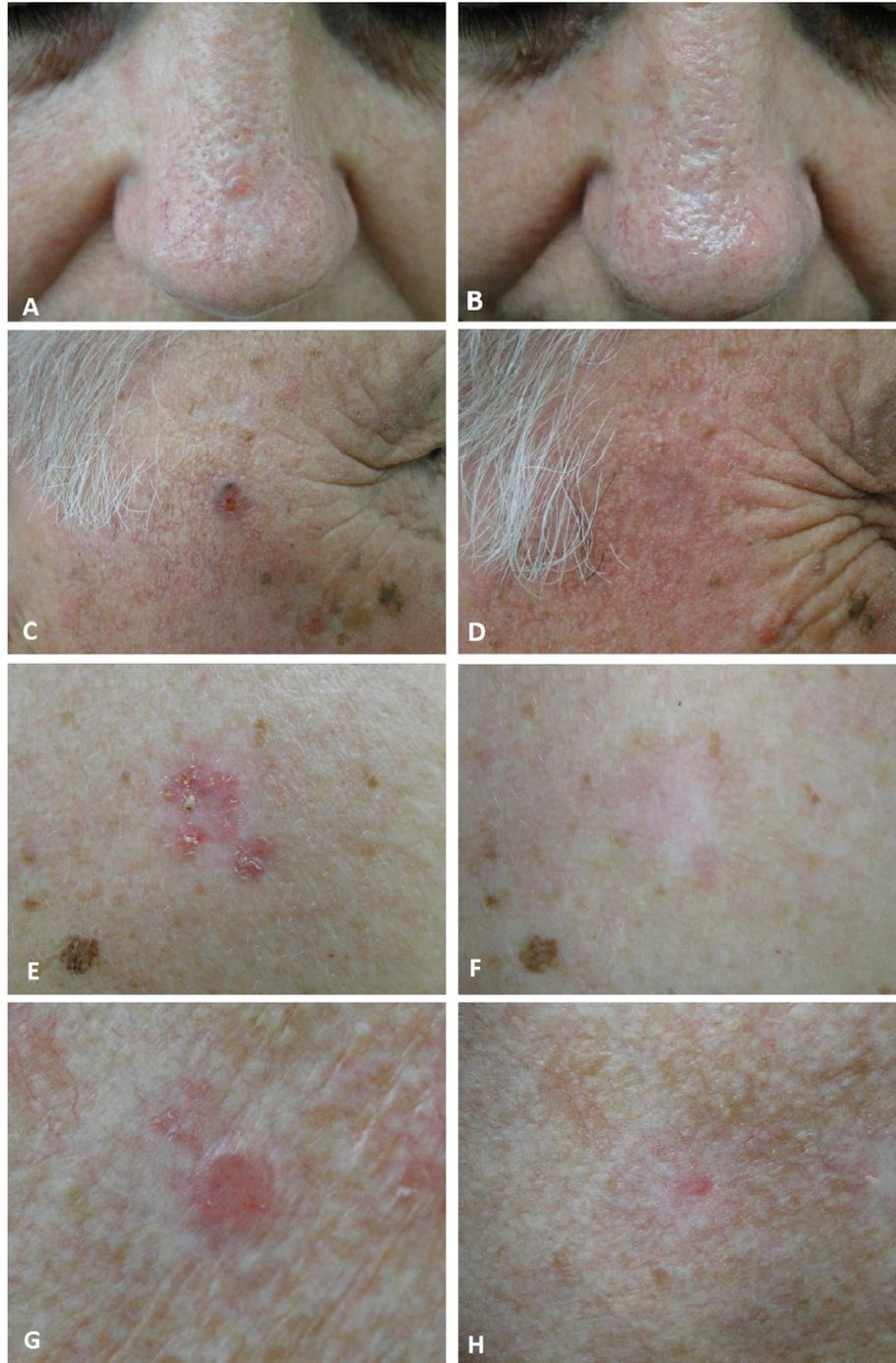
Figura 31: Análise do número de lesões que apresentaram RC/RP por localização para cada grupo.



O CBC surge em regiões que tiveram exposição solar crônica. A face é a localização mais frequente com aproximadamente 80%. Este segmento, especificamente na região H é considerado de maior risco para recorrência e agressividade da lesão (CHINEM; MIOT, 2011b). Os resultados constataram uma melhor RC quando aplicado o protocolo do grupo 4, inclusive em lesões localizadas em cabeça e pescoço. Embora essa resposta seja global e, também, por regiões de localização da lesão, e a avaliação aqui discutida foi realizada com 30 dias de acompanhamento, período curto para avaliar recorrência dessa doença.

A TFD é considerada uma técnica que, além de eficiente para CBC não infiltrativo, apresenta resultado estético superior a outros tratamentos. Neste estudo, aplicando TFD observamos resultados estéticos excelentes comparáveis aos observados em outros estudos desenvolvidos pelo grupo (SÁLVIO AG, BLANCO KC, SILVA AP, BUZZA HH, INADA NM, 2016) (Figura 32)

Figura 32: A, C,E,G) Carcinoma Basocelular; B, D, F, H) Pele cicatrizada após 30 dias do tratamento.

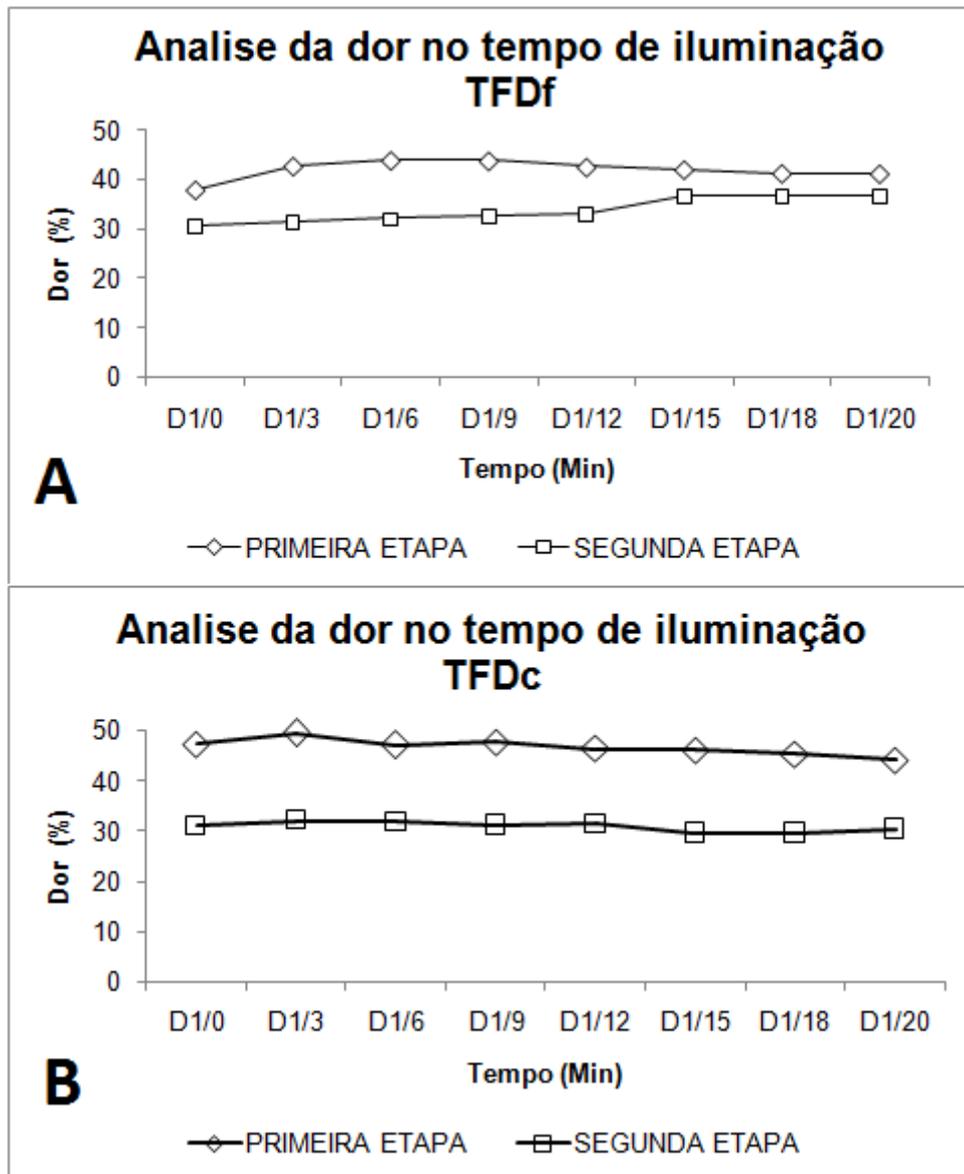


Comparando G1 com TFDc, nossos dados sugerem que a segunda etapa é extremamente importante para garantir o alto índice de RC. E entre G1 e G2, vemos que

a reaplicação do MAL com curto tempo de escuro  $\leq 1h$  é equivalente a não reaplicação deste medicamento.

A dor têm sido uns dos maiores limitantes da técnica. Esta reação esperada durante a iluminação é mensurada e relatada como sendo leve, moderada ou intensa dependendo da localização da lesão, área de tratamento, intensidade da irradiação, fototipo de pele, sexo, entre outros fatores. Na figura 33 observamos que, a dor relatada pelo paciente foi de menor intensidade na segunda etapa do tratamento, quando comparada com a primeira, tanto no grupo controle como nos grupos onde foi aplicado os protocolos de TFDf. Publicação previa de nosso grupo avaliando a dor, quando aplicada a TFDc (usando parâmetros idênticos aos usados neste trabalho, mas com um número de participantes maior) demonstram que, a dor descrita pelo paciente na segunda etapa é de menor intensidade quando comparada com a primeira (BLANCO et al., 2017a).

Figura 33: Avaliação do score de dor no tempo de iluminação da lesão. A. Grupos submetidos a TFDf; B. Grupo controle, TFDc. A dor relatada na segunda sessão foi sempre menor do que na primeira sessão nos grupos avaliados.



A dor é uma sensação subjetiva e depende de cada indivíduo. O tecido no momento da segunda irradiação encontrasse num processo de inflamação e de choque, resultndo numa provável menor sensão a novos estímulos Este achado é importante porque torna a TFD nessas condições mais atrativa em termos de eficiência, resultado estético e diminuição de efeitos adversos.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A TFD em geral é uma técnica de aplicação ambulatorial tanto em ambiente hospitalar como de consultório particular. É de fácil aplicação não precisando de grandes infraestruturas ou pessoal especializado para sua execução.

Num ambiente de consultório particular, apesar do longo tempo total do procedimento, o contato médico ocorre somente em algumas etapas do procedimento (identificação e curetagem da lesão) e/ou intervenção por motivo de dor intensa. As demais etapas da técnica podem ser executadas e auxiliadas por um profissional de enfermagem treinado, o que viabiliza a rotina do dermatologista otimizando seu tempo.

No sistema público brasileiro, além do menor custo da técnica em comparação com outros procedimentos terapêuticos, por sua simplicidade na aplicação e ausência de necessidade de infraestrutura especializada associado aos problemas próprios de esgotamento do sistema que resulta em grandes esperas com piora do quadro, esta técnica se torna interessante e aplicável otimizando os próprios recursos públicos.

Para o paciente este protocolo também oferece benefícios visto que, facilita e agiliza o tratamento do CBC oferecendo eficiência quanto à RC e excelentes resultados estéticos. Considerando o tempo do procedimento, embora longo, durante os períodos de espera tanto na primeira etapa como na segunda não obriga internação, restrição de deslocamento ou isolamento, só requer cuidados com a luz solar e com o curativo. Tudo isso contribui a aceitação do tratamento tornando-o atrativo para todas as faixas etárias.

## **6 PERPECTIVAS FUTURAS**

Os pacientes que participaram nesta pesquisa continuaram nas avaliações clínicas periódicas conforme rotina do ambulatório de pele do Hospital Amaral Carvalho.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos quanto a realização da TFDf permitem as seguintes conclusões

- ✓ Dos 4 protocolos testados observou-se melhor RC no protocolo 4/ G4, quando avaliada a resposta 30 dias após o tratamento.
- ✓ Os parâmetros reaplicação da MAL e o DLI são importantes para o sucesso da TFDf. Neste estudo, o DLI 90 minutos foi suficiente para alcançar uma RC 94.5% quando as duas irradiações são realizadas com uma dose de 150 J/cm<sup>2</sup> e 125mW/cm<sup>2</sup>.
- ✓ As lesões localizadas em cabeça e pescoço apresentam o maior porcentual de RP ao tratamento quando avaliadas em 30 dias.
- ✓ O CBCn em todos os grupos obteve o maior porcentual de RP quando avaliado após 30 dias porém, o grupo 4 obteve a menor taxa de RP entre os grupos.
- ✓ A dor durante a segunda sessão foi percebida de menor intensidade quando comparada com a primeira.
- ✓ A TFDf é uma opção de tratamento tópico para o CBC que apresenta excelentes taxas de RC quando realizada a avaliação 30 dias após o procedimento.

## 8 REFERENCIAS

- ACKROYD, R. et al. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656, 2001.
- AGARWAL, M. L. et al. Photodynamic Therapy Induces Rapid Cell Death by Apoptosis in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. **Cancer Research**, v. 51, n. 21, p. 5993 LP-5996, 1 nov. 1991.
- AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011a.
- AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic Therapy of Cancer : An Update. **American Cancer Society**, v. 61, p. 250–281, 2011b.
- AGUILAR, M. et al. A cost analysis of photodynamic therapy with methyl aminolevulinate and imiquimod compared with conventional surgery for the treatment of superficial basal cell carcinoma and Bowen’s disease of the lower extremities. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV**, v. 24, n. 12, p. 1431–1436, dez. 2010.
- AKRAM, Z. et al. Efficacy of photodynamic therapy versus antibiotics as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of periodontitis: A systematic review and meta-analysis. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, maio 2017.
- ALAM, M.; RATNER, D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. **The New England journal of medicine**, v. 344, n. 13, p. 975–983, mar. 2001.
- ALLISON, R. R.; MOTA, H. C.; SIBATA, C. H. **Clinical PD/PDT in North America: An historical review** **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2004.
- ANDRADE, C. T. et al. Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancer In Highlights in Skin Cancer. In: **Highlights in Skin Cancer**. [s.l: s.n.]. p. 233–248.
- ANDRADE, K. C. et al. Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancer. In: VEREECKEN, P. (Ed.). **Highlights in Skin Cancer**. Rijeka: InTech, 2013b.
- ANDRZEJAK, M.; PRICE, M.; KESSEL, D. H. Apoptotic and autophagic responses to photodynamic therapy in 1c1c7 murine hepatoma cells. **Autophagy**, v. 7, n. 9, p. 979–984, 2011.

- BAGNATO, V. S. et al. PDT experience in Brazil: A regional profile. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, n. 2, p. 107–118, jun. 2005.
- BARBARIC, J. et al. Light therapies for acne: abridged Cochrane systematic review including GRADE assessments. **The British journal of dermatology**, mar. 2017.
- BATH-HEXTALL, F. et al. Interventions for preventing non-melanoma skin cancers in high-risk groups. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 4, p. CD005414, out. 2007a.
- BATH-HEXTALL, F. et al. Surgical excision versus imiquimod 5% cream for nodular and superficial basal-cell carcinoma (SINS): a multicentre, non-inferiority, randomised controlled trial. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 1, p. 96–105, 1 jan. 2014.
- BATH-HEXTALL, F. J. et al. Interventions for basal cell carcinoma of the skin. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 1, p. CD003412, jan. 2007b.
- BATH-HEXTALL, F. J. et al. Interventions for preventing non-melanoma skin cancers in high-risk groups ( Review ). n. 4, 2008.
- BICHAKJIAN, C. et al. Guidelines of care for the management of basal cell carcinoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 540–559, 1 mar. 2018.
- BLANCO, K. C. et al. **Fluorescence guided PDT for optimization of the outcome of skin cancer treatment** *Frontiers in Physics* , 2015.
- BLANCO, K. C. et al. **PDT Brazil - A New Approach for Basal Cell Carcinoma Treatment***Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. [s.l.] Elsevier, 7 fev. 2016.  
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.07.188>>.
- BLANCO, K. C. et al. A Multicenter Clinical Study of Expected and Unexpected Side Reactions During and After Skin Cancer Treatment by Photodynamic Therapy. **Skinmed**, v. 15, n. 2, p. 113–118, 2017a.
- BLANCO, K. C. et al. **Treatment of Recurrent Pharyngotonsillitis by Photodynamic Therapy**.*Photodiagnosis and photodynamic therapy*Netherlands, fev. 2017b.
- BLANCO, K. I. N. S. A. V.-F. J. B. V. Clinical Photodynamic Therapy Review and the Brazilian Experience. **Journal of Tumor**, v. 4, n. 2, 2016.
- BRAATHEN, L. R. et al. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma

- skin cancer: An international consensus. **J Am Acad Dermatol**, v. 56, n. 1, p. 125–143, 2007.
- BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy . **Laser and Non-laser Light Sources for**. n. FEBRUARY, p. 173–186, 2002.
- BRUIJN, H. S. DE et al. in fl uence of PpIX concentration and illumination parameters. p. 2–5, 2012.
- BUZZÁ, H. H. et al. Photodynamic therapy: Progress toward a scientific and clinical network in Latin America. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2015.
- CALLENS, J. et al. Epidemiology of basal and squamous cell carcinoma in Belgium: the need for a uniform and compulsory registration. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 30, n. 11, p. 1912–1918, 2016.
- CHILAKAMARTHI, U.; GIRIBABU, L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. **Chemical record (New York, N.Y.)**, jan. 2017.
- CHINEM, V. P.; MIOT, H. A. Epidemiology of basal cell carcinoma. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 2, p. 292–305, 2011a.
- CHINEM, V. P.; MIOT, H. A. Epidemiology of basal cell carcinoma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 2, p. 292–305, 2011b.
- CHRISTENSEN, E. et al. Guidelines for practical use of MAL-PDT in non-melanoma skin cancer: REVIEW ARTICLE. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, n. 5, p. 505–512, 2010.
- CURNOW, A.; HALLER, J. C.; BOWN, S. G. Oxygen monitoring during 5-aminolaevulinic acid induced photodynamic therapy in normal rat colon. Comparison of continuous and fractionated light regimes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 58, n. 2–3, p. 149–155, 2000.
- DA SILVA, A. P. et al. Development and comparison of two devices for treatment of onychomycosis by photodynamic therapy. **Journal of biomedical optics**, v. 20, n. 6, p. 61109, jun. 2015.
- DANHOF, R.; LEWIS, K.; BROWN, M. Small Molecule Inhibitors of the Hedgehog Pathway in the Treatment of Basal Cell Carcinoma of the Skin. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 19, n. 2, p. 195–207, 2018.

- DE BRUIJN, H. S. et al. Fractionated illumination after topical application of 5-aminolevulinic acid on normal skin of hairless mice: The influence of the dark interval. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 85, n. 3, p. 184–190, 2006.
- DE BRUIJN, H. S. et al. Light fractionated ALA-PDT enhances therapeutic efficacy in vitro; the influence of PpIX concentration and illumination parameters. **Photochemical & Photobiological Sciences**, p. 241–245, 2013.
- DE BRUIJN, H. S. et al. Light fractionation significantly increases the efficacy of photodynamic therapy using BF-200 ALA in normal mouse skin. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–20, 2016.
- DE FARIA, C. M. G. et al. Determination of the threshold dose distribution in photodynamic action from in vitro experiments. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 168–175, 2016.
- DE HAAS, E. R. et al. Fractionated illumination significantly improves the response of superficial basal cell carcinoma to aminolevulinic acid photodynamic therapy. **J Invest Dermatol**, v. 126, n. 12, p. 2679–2686, 2006a.
- DE HAAS, E. R. M. et al. Fractionated illumination significantly improves the response of superficial basal cell carcinoma to aminolevulinic acid photodynamic therapy. **The Journal of investigative dermatology**, v. 126, n. 12, p. 2679–2686, 2006b.
- DE ROSA, F. S. et al. In vitro metabolism of 5-ALA esters derivatives in hairless mice skin homogenate and in vivo PpIX accumulation studies. **Pharmaceutical research**, v. 21, n. 12, p. 2247–2252, dez. 2004.
- DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors  
Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors1. v. 38, n. August, p. 2628–2635, 1978.
- DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 2, n. 2, p. 83–116, 1 jan. 1984.
- DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.
- DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; WEISHAAPT, K. R. Energetics and Efficiency of Photoinactivation of Murine Tumor Cells Containing Hematoporphyrin. **Cancer Research**, v. 36, n. 7 Part 1, p. 2330 LP-2333, 1 jul. 1976.

- DOUGHERTY, T. J.; MARCUS, S. L. Photodynamic therapy. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 28A, n. 10, p. 1734–1742, 1992.
- FANTINI, F. et al. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: Clinical and pathological determinants of response. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 8, p. 896–901, 2011.
- FARIA, C. M. G. **Distribuições de limiar de dose e suas causas e consequências em Terapia Fotodinâmica**. [s.l: s.n.].
- FERREIRA, J. et al. Experimental determination of threshold dose in photodynamic therapy in normal rat liver. **Laser Physics Letters**, v. 4, n. 6, p. 469–475, 2007.
- FOLEY, P. et al. Photodynamic therapy with methyl aminolevulinate for primary nodular basal cell carcinoma: results of two randomized studies. **Int J Dermatol**, v. 48, n. 11, p. 1236–1245, 2009.
- FOTINOS, N. et al. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives. **Photochemistry and photobiology**, v. 82, n. 4, p. 994–1015, 2006.
- GERALDE, M. C. et al. Pneumonia treatment by photodynamic therapy with extracorporeal illumination - an experimental model. **Physiological reports**, v. 5, n. 5, mar. 2017.
- GHOLAM, P. et al. Factors influencing pain intensity during topical photodynamic therapy of complete cosmetic units for actinic keratoses. p. 213–218, 2009.
- GRAY, J.; FULLARTON, G. M. Long term efficacy of Photodynamic Therapy (PDT) as an ablative therapy of high grade dysplasia in Barrett's oesophagus. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 4, p. 561–565, dez. 2013.
- HAYASHIDA, M. Z. et al. Epidemiology and clinical evolution of non-melanoma skin cancer in renal transplant recipients : a single-center ~ o Paulo , Brazil experience in S a. p. 383–388, 2015.
- HORN, M. et al. Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy in patients with basal cell carcinoma prone to complications and poor cosmetic outcome with conventional treatment. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. 6, p. 1242–1249, 2003.
- IBBOTSON, S. H. et al. Characteristics of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in human skin in vivo. **Photodermatology Photoimmunology and**

- Photomedicine**, v. 22, n. 2, p. 105–110, 2006.
- IBBOTSON, S. H. Adverse effects of topical photodynamic therapy. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 27, n. 3, p. 116–130, jun. 2011.
- INADA, N. M. et al. Photodiagnosis and treatment of condyloma acuminatum using 5-aminolevulinic acid and homemade devices. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 1, p. 60–68, 2012.
- INOUE, K. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer. **International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association**, v. 24, n. 2, p. 97–101, fev. 2017.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].
- JUZENIENE, A. et al. Topical application of 5-aminolevulinic acid and its methylester, hexylester and octylester derivatives: considerations for dosimetry in mouse skin model. **Photochemistry and photobiology**, v. 76, n. 3, p. 329–334, 2002.
- KESSEL, D. Death pathways associated with photodynamic therapy. **Medical Laser Application**, v. 21, n. 4, p. 219–224, 2006.
- KIM, M.; JUNG, H. Y.; PARK, H. J. Topical PDT in the Treatment of Benign Skin Diseases: Principles and New Applications. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 23259–23278, set. 2015.
- LE PILLOUER-PROST, A.; CARTIER, H. Photodynamic Photorejuvenation: A Review. **Dermatologic Surgery**, v. 42, n. 1, 2016.
- LINDEBURG, K. E. K.; BROGAARD, H. M. V.; JEMEC, G. B. E. Pain and photodynamic therapy. **Dermatology**, v. 215, n. 3, p. 206–208, 2007.
- LOPEZ, R. F. V. et al. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 1, p. 77–94, jan. 2004.
- MARZUKA, A. G.; BOOK, S. E. Basal cell carcinoma: Pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 88, n. 2, p. 167–179, 2015.
- MEANI, R. E. et al. Emergence of chemoresistance in a metastatic basal cell carcinoma

patient after complete response to hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449).

**Australasian Journal of Dermatology**, v. 55, n. 3, p. 218–221, 2014.

MEGNA, M. et al. Photodynamic Therapy and Skin Appendage Disorders: A Review. **Skin appendage disorders**, v. 2, n. 3–4, p. 166–176, jan. 2017.

NAPOLITANO, M. et al. Amelanotic melanoma mimicking cutaneous epitheliomas. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 70, n. 4, p. e75-6, abr. 2014.

OINUMA, T.; NAKAMURA, T.; NISHIWAKI, Y. Report on the National Survey of Photodynamic Therapy (PDT) for Gastric Cancer in Japan (a secondary publication). **LASER THERAPY**, v. 25, n. 2, p. 87–98, 29 jun. 2016.

ORENSTEIN, A.; KOSTENICH, G.; MALIK, Z. The kinetics of protoporphyrin fluorescence during ALA-PDT in human malignant skin tumors. **Cancer Letters**, v. 120, n. 2, p. 229–234, 1997.

PAULO, D. S.; PAULO, S. Estimativa do custo do tratamento do câncer de pele tipo. v. 86, n. 4, p. 657–662, 2011.

PÉREZ, L.; GARCÍA, J.; GILABERTE, Y. Terapia fotodinámica con luz de día en España: ventajas y limitaciones. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 105, n. 7, p. 663–674, 1 set. 2014.

QUIRK, B. J. et al. Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors – Where do we stand? **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 530–544, set. 2015.

RAMIREZ, D. P. et al. Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response: Preliminary results of a national Brazilian project. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 1, 2014.

REINERS, J. J. et al. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. **Autophagy**, v. 6, n. 1, p. 7–18, 2010.

ROBERTS, D. J.; CAIRNDUFF, F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. **Br J Plast Surg**, v. 48, n. 6, p. 360–370, 1995.

ROBINSON, D. J. et al. Topical 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy of hairless mouse skin using two-fold illumination schemes: PpIX fluorescence kinetics, photobleaching and biological effect. **Photochemistry and photobiology**, v. 72, n. 6, p. 794–802, 2000.

- ROOZEBOOM, M. H. et al. Fractionated 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy after partial debulking versus surgical excision for nodular basal cell carcinoma: A randomized controlled trial with at least 5-year follow-up. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 2, p. 280–287, 2013.
- SALVIO, A. G. et al. PDT Brazil - Comparison of response according two clinical trials for basal cell carcinoma treatment with MAL-PDT: the beginning of PDT Brazil project. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 372, 7 fev. 2016a.
- SALVIO, A. G. et al. **Long- term follow-up of nodular basal cell carcinoma after Photodynamic Therapy** **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. [s.l.] Elsevier, 7 fev. 2016b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.07.195>>.
- SALVIO, A. G. et al. **Evaluation of 120 patients treated through MAL 15% Photodynamic Therapy using a new light source device for large area of upper limbs** **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. [s.l.] Elsevier, 7 fev. 2016c. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.07.192>>.
- SALVIO, A. G. et al. What is better for nodular basal cell carcinoma: ALA PDT or MAL PDT? **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 374, jun. 2017.
- SÁLVIO AG, BLANCO KC, SILVA AP, BUZZA HH, INADA NM, B. V. Non-Invasive Treatment of Extensive Eyelid Cancerous Lesion by Photodynamic Therapy: A Case Report. **Aesthet Reconstr Surg**, v. 1:5, 2016.
- SAMPAIO S.; RIVITTI E. **DERMATOLOGIA**. Segunda ed ed. São Paulo: Artes Medicas Ltda, 2001.
- SANTEZI, C. et al. Potential of curcumin-mediated photodynamic inactivation to reduce oral colonization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 46–52, set. 2016.
- SCHALKA, S. et al. Brazilian Consensus on Photoprotection. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 6 suppl 1, p. 1–74, dez. 2014.
- SEGURA, S. et al. Non-invasive management of non-melanoma skin cancer in patients with cancer predisposition genodermatosis: A role for confocal microscopy and photodynamic therapy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 7, p. 819–827, 2011.
- SEXTON, M.; JONES, D. B.; MALONEY, M. E. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma. Study of a series of 1039 consecutive neoplasms. **Journal of the American**

**Academy of Dermatology**, v. 23, n. 6 Pt 1, p. 1118–1126, dez. 1990.

SOLER, A. M. et al. A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5-aminolaevulinate-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 3, p. 467–471, 2001.

SOTIRIOU, E. et al. Single vs. fractionated photodynamic therapy for face and scalp actinic keratoses: A randomized, intraindividual comparison trial with 12-month follow-up. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, n. 1, p. 36–40, 2012.

STAR, W. et al. Topical 5-Aminolevulinic Acid Mediated Photodynamic Therapy of Superficial Basal Cell Carcinoma Using Two Light Fractions with a Two-hour Interval: Long-term Follow-up. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 86, n. 5, p. 412–417, 2006a.

STAR, W. M. et al. Topical 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy of superficial basal cell carcinoma using two light fractions with a two-hour interval: long-term follow-up. **Acta Derm Venereol**, v. 86, n. 5, p. 412–417, 2006b.

SURRENTI, T. et al. Efficacy of photodynamic therapy with methyl aminolevulinate in the treatment of superficial and nodular basal cell carcinoma: an open-label trial. **European journal of dermatology : EJD**, v. 17, n. 5, p. 412–415, 2007.

VAN DER VEEN, N. et al. Kinetics and localisation of PpIX fluorescence after topical and systemic ALA application, observed in skin and skin tumours of UVB-treated mice. **British journal of cancer**, v. 73, n. 7, p. 925–30, abr. 1996.

VAN DER VEEN, N. et al. Photodynamic effectiveness and vasoconstriction in hairless mouse skin after topical 5-aminolevulinic acid and single- or two-fold illumination. **Photochem Photobiol**, v. 70, n. 6, p. 921–929, 1999.

VINCIULLO, C. et al. Photodynamic therapy with topical methyl aminolaevulinate for “difficult-to-treat” basal cell carcinoma. **British Journal of Dermatology**, v. 152, n. 4, p. 765–772, 2005.

VIRGILI, A. et al. **Photodynamic therapy: parameters predictive of pain.** **The British journal of dermatology** England, fev. 2010.

VON DOMARUS, H.; STEVENS, P. J. Metastatic basal cell carcinoma. Report of five cases and review of 170 cases in the literature. **Journal of the American Academy of**

**Dermatology**, v. 10, n. 6, p. 1043–1060, jun. 1984.

WIKIMEDIA, C. **File:ALAS Reaction Mechanism Image.jpg --- Wikimedia Commons**, the free media repository, 2016. Disponível em:

<[https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:ALAS\\_Reaction\\_Mechanism\\_Image.jpg&oldid=213010756](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:ALAS_Reaction_Mechanism_Image.jpg&oldid=213010756)>

WIKIMEDIA, C. **File:Methyl aminolevulinate.svg --- Wikimedia Commons**, the free media repository, 2017. Disponível em:

<[https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Methyl\\_aminolevulinate.svg&oldid=233905611](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Methyl_aminolevulinate.svg&oldid=233905611)>

WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in medicine and biology**, v. 53, n. 9, p. R61-109, maio 2008.