Ana Carolina Junqueira Ferolla

**Estudo da pele fotoenvelhecida antes e após
esfoliação química com o ácido pirúvico 80% :
análise clínica, histopatológica e imunohistoquímica
da proliferação celular**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Cucé

São Paulo
2003

Eu dedico este trabalho...

A minha família

Meus pais, Francisco e Maria Aparecida

Minha avó, Olga

Minha irmã, Leticia

Pelo incentivo e apoio em cada minuto na realização desta pesquisa

Pela participação em cada conquista

Pela confiança, pelo incentivo e pelo amor e mais que isso, por não deixarem eu desistir perante os obstáculos

Pela compreensão das horas dedicadas a medicina e que foram suprimidas do nosso convívio familiar

Pela estrutura que me proporcionaram em toda minha formação médica

Vocês investiram e ajudaram

Vocês lutaram ao meu lado

Vocês incentivaram

E principalmente...vocês acreditaram!

“Nenhum edifício se ergue sólido sem uma base forte”

... muito obrigado

Ao Prof Dr Luiz Carlos Cucé

Orientador não apenas deste trabalho, mas incentivador e responsável por toda a minha formação dermatológica

Professor e amigo, sempre ensinando, não apenas a dermatologia mas transmitindo os ensinamentos da vida

Pela confiança depositada em meu trabalho

Pela dedicação, incentivo e ajuda

... muito obrigado

Ao meu querido filho Thiago

Pelos 300 Km de distância que nos separam há quase 10 anos
Pelos minutos, dias e meses que passamos longe
Pelas saudades que sentimos
Pelos aniversários que passamos pelo telefone
Pela minha ausência em momentos importantes de sua vida
Pela paciência, confiança e carinho

... eu dedico não apenas esta
tese, mas todos os momentos de minha vida

Você acreditou, confiou e incentivou meu trabalho
Enquanto eu subtraí os momentos você somou a alegria
Enquanto eu estive ausente você se fez presente
Enquanto eu medi os esforços você venceu os limites
E apesar da distância você contribui
Contribui e retribui
Retribui com o seu amor

... obrigado!... muito obrigado!

A minha luta é a nossa luta
A minha dificuldade é a nossa dificuldade
A minha vitória é a sua vitória
Agora somos cúmplices na vida ...

...Você é o meu maior incentivo!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Evandro A. Rivitti, pelos ensinamentos transmitidos durante a residência, pela oportunidade de ingressar no curso de Pós-graduação e pela confiança em meu trabalho.

A Dra. Miriam N. Sotto, pelo apoio e orientação na avaliação histopatológica e imunohistoquímica deste trabalho.

A Dra. Bogdana Vitoria Kadunc, pioneira no uso do ácido pirúvico e cuja experiência foi importante na realização desta tese.

A Dra. Maria Aparecida C. Vilela, médica dermatologista que conheço desde criança, profissional que sempre admirei e que mais tarde na residência pude aprender com seus ensinamentos.

A Dra. Bhertha Tamura, amiga, irmã, professora e incentivadora... realmente faltam palavras para definir a amplitude de nossa amizade. Minha mestra na dermatologia, alguém em que tento me espelhar não apenas nos conhecimentos, mas na ética profissional, na dedicação pela dermatologia e no carinho como transmite os seus segredos de profissão, sem egoísmo com muita técnica e segurança ...realmente a mão mais amiga que surgiu enviada pelo destino para mudar o rumo de minha vida, alguém em que eu sempre posso confiar.

Ao Prof. Dr. Neil F. Novo e a Prof. Dra. Yara Juliano pela orientação na aplicação do método estatístico e análise dos resultados deste trabalho.

Ao Sr. Cleiton Alves pelo auxílio na realização das lâminas de imunohistoquímica

Aos funcionários do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sem exceção, sempre facilitando e ajudando meu trabalho, sempre prestativos e amigos

Aos Residentes de Dermatologia da Universidade de Santo Amaro

Aos Assistentes de Dermatologia da Universidade de Santo Amaro

As minhas amigas do Ambulatório de Inestética do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelos momentos em que estivemos juntas na realização deste trabalho

A minha amiga Márcia Barros, pelo carinho e dedicação em que me ajudou a passar momentos difíceis de minha vida

A minha amiga Érica Botelho, amiga verdadeira desde a infância, pelo apoio e incentivo

A Luciana Caldas e Lílian Odo, pela colaboração na realização desta tese

A Sra. Rose Spina pela colaboração na correção de português

A Sra. Luciana Cristina Costa, pela colaboração na correção das referências bibliográficas

A Capesp pela bolsa concedida

A minha família

Aos meus amigos

Aos meus pacientes

... Obrigado!

Índice

Resumo

Summary

Lista de abreviaturas

INTRODUÇÃO	1
Envelhecimento Cutâneo	1
Fotoenvelhecimento e Carcinogênese	5
Esfoliações Químicas	8
Alfahidroxiácidos	18
Ácido pirúvico	25
Ki-67: Imunohistoquímica da proliferação celular	28
OBJETIVO	45
CASUÍSTICA	46
Critérios de inclusão	46
Critérios de exclusão	47
Suspensão do paciente da pesquisa	47
MÉTODO	49
Avaliação clínica	49
Acompanhamento pós-pesquisa	50
Critérios de avaliação clínica	50
Critérios de avaliação histopatológica	52
Critérios de avaliação imunohistoquímica	54
Método Estatístico	57
RESULTADOS	58
Clínico	58
Histopatológico	66
Imunohistoquímico	74
DISCUSSÃO	76
CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

Apêndice

 Termo de Consentimento

Lista de abreviaturas

EQ: Esfoliação química

AHA: Alfahidroxiácidos

ACA: Alfacetoácidos

AP: Ácido Pirúvico

AG: Ácido Glicólico

ATA: Ácido Tricloroacético

MIB-1: Molecular Immunology Borstel

5-fu: 5 fluouracil

Resumo

FEROLLA, ACJ. Estudo da pele fotoenvelhecida antes e após esfoliação química com o ácido pirúvico 80% : análise clínica, histopatológica e imunohistoquímica da proliferação celular. São Paulo, 2003, Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Neste estudo foi avaliado o fotoenvelhecimento cutâneo dos membros superiores clínica, anatomo e imunohistoquimicamente, em 22 pacientes do sexo feminino, com idade acima de 50 anos, antes e após quatro sessões de esfoliação química com ácido pirúvico 80% com intervalo quinzenal. Clinicamente foram avaliados o envelhecimento cutâneo por meio da elastose clínica, rugas profundas e superficiais; lesões de queratose actínica e melanose solar. As biópsias foram avaliadas pela coloração hematoxilina-eosina e posteriormente coradas pelo marcador imunohistoquímico Ki-67, marcador de proliferação celular. A avaliação anatomopatológica foi embasada no estudo das alterações epidérmicas (hiperqueratose, presença de acantose ou atrofia, atipia celular e retificação da epiderme), enquanto a alteração dérmica foi avaliada pela degeneração basofílica do colágeno. As células coradas pelo marcador imunohistoquímico de proliferação celular, o Ki-67, foram contadas e comparadas antes e após as quatro esfoliações. Concluímos que o ácido pirúvico 80% se mostrou eficaz no tratamento clínico do fotoenvelhecimento (77,3%) e na queratose actínica (72,7%); resultados estatisticamente significantes, porém tanto a avaliação das lesões de melanose solar quanto a avaliação histopatológica epidérmica e dérmica não foram estatisticamente significantes. O Ki-67, marcador da proliferação celular se mostrou aumentado na maioria dos pacientes (52,63%), resultado este também estatisticamente não significativo.

Summary

FEROLLA, ACJ. Study of the photodamage skin before and after chemical exfoliation with pyruvic acid at 80% : clinical, anatomical and immunohistochemical analyses of cellular proliferation. São Paulo, 2003, Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

This study assessed skin photoaging of the upper limbs by clinical, anatomical and immunohistochemical analyses in 22 female patients, aged over 50 years, before and after 4 sessions of chemical exfoliation with pyruvic acid at 80% within quartely intervals. From a clinically perspective, we assessed skin aging by clinical elastosis, deep or superficial wrinkles, actinic keratosis and solar melanosis damage before and after 4 exfoliations. Biopsies were assessed by hematoxylin-eosin staining and later stained with the immunohistochemical marker Ki-67, a marker of cellular proliferation. Clinical pathology analysis was based on the study of epidermal abnormalities (hyperkeratosis, acanthosis and atrophy, cellular atypia and epidermal rectification), whereas dermal abnormalities were assessed by collagen basophilic degeneration. The cells stained by the immunohistochemical marker of cellular proliferation Ki-67 were counted and compared before and after the 4 exfoliations. The purpose of the study was to investigate the use of pyruvic acid in the treatment of photoaging, assessing its clinical abnormalities, action in actinic keratosis and solar melanosis damage, as well as epidermal and dermal abnormalities in the clinical pathology and the repercussions in cell proliferation. Clinical pathology analysis was based on the study of epidermal abnormalities (hyperkeratosis, acanthosis and atrophy, cellular atypia and epidermal rectification), whereas dermal abnormalities were assessed by collagen basophilic degeneration. The cells stained by the immunohistochemical marker of cellular proliferation Ki67 were counted and compared before and after the 4 exfoliations. We concluded that pyruvic acid at 80% was effective for clinically managing photoaging (77,3%) and actinic keratosis (72,7%). These results were statistically significant whereas the results for dermal and epidermal histopathology assessment of solar melanosis damage were not. Ki-67, a marker of cell proliferation, was increased in most of the patients (52,63%), but did not result in statistically significant differences.

INTRODUÇÃO

Envelhecimento Cutâneo

Envelhecimento cronológico e fotoenvelhecimento - manifestações clínicas e histopatológicas.

O envelhecimento cutâneo pode ser dividido em envelhecimento cronológico e fotoenvelhecimento (GARMYN, 1992; ROENIGK, 1995; SAMPAIO e RIVITTI, 1998c; LAWRENCE, 2001).

O envelhecimento cronológico ou intrínseco é determinado geneticamente. Na clínica apresenta-se por atrofia da pele em grau variável que é evidenciada pelo adelgaçamento difuso, ressecamento e pregueamento cutâneo. A pele torna-se ligeiramente amarelada com perda da elasticidade e da turgescência. Os pêlos diminuem de volume, em número e se tornam esbranquiçados; enquanto as unhas ficam frágeis e sem brilho. Há diminuição progressiva da secreção sebácea e sudorípara, além do conteúdo de água da derme tornando a pele mais ressecada. Ocorre reabsorção óssea do terço inferior da face e queda da pele devido

aos efeitos da gravidade. Movimentos musculares repetidos criam linhas de expressão principalmente na fronte, glabella, região periocular e perioral. Ocorre atrofia progressiva da gordura que resulta em concavidade da área temporal e bochechas (ROENIGK, 1995; COLEMAN , 2000; FUSCO, 2001).

Na histopatologia a epiderme apresenta-se afinada com diminuição do número e do volume das células. O citoplasma celular apresenta vacúolos, enquanto o núcleo exhibe alterações na forma e tamanho. Na parte superior do estrato espinhoso encontra-se grande quantidade de glicogênio. Ocorre aplainamento da junção derme-epiderme com desaparecimento das suas papilas causando aumento da fragilidade cutânea, pois há diminuição da coesão celular. Os melanócitos dopa positivos diminuem 10% a cada ano com exceção nas lesões melanocíticas nas áreas fotoexpostas. Na derme ocorre redução do número de fibroblastos e diminuição da capacidade de biossíntese do colágeno, resultando em alterações da cicatrização. As fibras elásticas dérmicas inicialmente engrossam para depois afinarem devido à degeneração e rompimento das mesmas. A microcirculação diminui em decorrência da regressão e desorganização dos pequenos vasos. Há alteração no conteúdo de hidrato de carbono dos lípidos, ácido glutâmico e lisina, além de redução de cerca de 50% dos mastócitos na pele, o que diminui as reações de hipersensibilidade cutânea (GARMYN, 1992; ROENIGK, 1995; SAMPAIO e RIVITTI, 1998c; KADUNC, 1998; LAWRENCE, 2001).

O fotoenvelhecimento se dá por alterações degenerativas causadas pela exposição crônica ao sol com alterações no balanço entre a proliferação epidérmica e a diferenciação celular, levando a um grande risco de ocorrer fotocarcinogênese (GARMYN, 1992; ROENIGK, 1995; LAWRENCE, 2001).

As alterações clínico-morfológicas que caracterizam a pele fotoagredida são: aspereza, irregularidade da superfície, despigmentação mosqueada provocada por melanócitos superestimulados pelos raios ultravioleta, telangiectasias que surgem pelo alargamento de pequenos vasos e rugas finas ou rítides actínicas, que surgem devido ao enfraquecimento dos tecidos de suporte e perda da elasticidade. De modo geral, os vasos cutâneos diminuem e isso se revela pela coloração amarelo-citrina que a pele envelhecida adquire. Os casos extremos de fotoenvelhecimento clinicamente apresentam aspecto geométrico romboidal na nuca descrito como **cútis romboidalis nuchae** (GARMYN, 1992; ROENIGK, 1995; KADUNC, 1998; FUSCO, 2001; LAWRENCE, 2001).

Para avaliação correta do grau e tipo de fotoenvelhecimento cutâneo foram descritos tipos diferentes de classificação:

Quadro 1 - Classificação da pele frente aos raios ultravioleta (FITZPATRICK, 1988).

I branca	sempre queima, nunca bronzeia
II branca	usualmente queima
III branca	queimadura leve
IV branca	raramente queima, bronzeia mais que a média
V pigmentada	raramente queima, bronzeia profusamente
VI negra	nunca queima, profundamente pigmentada

Quadro 2 - Classificação de Glogau: avalia o fotodano, quantificando as rugas (GLOGAU, 1994).

Tipo 1 (leve)	sem rugas
Tipo 2 (moderado)	rugas dinâmicas
Tipo 3 (avançado)	rugas estáticas
Tipo 4 (severo)	somente rugas

A avaliação anatomopatológica no fotoenvelhecimento mostra alterações epidérmicas como hiperqueratose, atrofia com hipogranulose, displasias, atipias focais, perda da polaridade celular, melanócitos hiperplásicos com dispersão localizada de melanina entre os queratinócitos e retificação da junção dermoepiderme. Na derme há presença de longa faixa de material eosinofílico chamado zona Grenz, localizada logo abaixo da epiderme. Abaixo desta há um acúmulo de fibras organizadas em massas amorfas caracterizando a degeneração basofílica do colágeno. Os

fibroblastos estão diminuídos em número e perdem a capacidade de produzir fibras elásticas e colágenas normais. As fibras colágenas se apresentam afinadas e achatadas e ocorre uma redução no colágeno e nos precursores do colágeno tipo I e III. Há um aumento dos glicosaminoglicans, presença de infiltrado linfocitário, associada à diminuição da rede vascular e fragilidade capilar (KADUNC, 1998; LEVER e SCHAUMBURG-LEVER, 1991; MOLONEY, 1992; LAWRENCE, 2001; FUSCO, 2001).

As células de Langerhans estão diminuídas na pele fotoenvelhecida, essa redução contribui para alteração imune e aumento da suscetibilidade da pele ao câncer (LAWRENCE, 2001; FUSCO, 2001). Dittmar., 1999, observaram que luz UVA1 e UVB *in vivo* diminuem a função das células de Langerhans apresentadoras de antígenos.

Fotoenvelhecimento e Carcinogênese

O câncer de pele é um tipo de neoplasia comum, principalmente nos caucasianos, e possui relação importante com a exposição solar. Estudos em rato, em 1920, demonstraram que a luz UV pode causar câncer de pele (FITZPATRICK, 1993b,c; SAMPAIO e RIVITTI, 1998a).

A luz UV causa alterações mutagênicas no DNA celular. Atinge os queratinócitos, melanócitos e fibroblastos, que agem como cromóforos por meio da produção de radicais livres que podem levar à quebra do DNA, injúria da membrana celular e podem interferir com as enzimas celulares;

aumentando dessa maneira a probabilidade de câncer cutâneo (GARMYN.,1992; ROENIGK, 1995; SAMPAIO e RIVITTI, 1998b; LAWRENCE, 2001; FUSCO, 2001; ALBERT e OSTHEIMER, 2002; MOYAL e FOURTANIER, 2002; AL MAHROOS, 2002).

Os raios UV estão dentro do espectro eletromagnético solar de 290-400 nm, sendo o UVB (290-320 nm) o responsável pela carcinogênese e contribuição na imunossupressão. O UVB é o agente carcinogênico mais importante, causando alterações no DNA da célula, no sistema imune e reagindo com agentes químicos fotoativos exógenos (ANANTHASWAMY, 2002; DE GRUJL, 2002). A depleção da camada de ozônio às custas dos fluoroclorocarbonos aumenta a incidência dos raios UVA, UVB e UVC, e conseqüentemente do câncer de pele. O UVA (que é dividido em UVA1 = 340 - 400 e UVA2 = 320 - 340) é o responsável pelo fotoenvelhecimento e auxilia na carcinogênese (ROENIGK, 1995; SAMPAIO e RIVITTI, 1998b; MOYAL e FOURTANIER, 2002).

Alguns estudos demonstraram que o UVB é 1000 vezes mais eficiente que o UVA na fotocarcinogênese, mas isso não exclui a luz UVA na epidemiologia do câncer de pele. Estudos em ratos com pequenas doses de UVA levaram ao aparecimento de tumores cutâneos (FITZPATRICK, 1993a,b; SAMPAIO e RIVITTI,1998b).

A transformação das células da epiderme para um fenótipo maligno e as alterações imunológicas específicas, que resultam no aparecimento de células T com atividade específica para tumores induzidos pela radiação UV, possuem embasamento no fato dos pacientes com xeroderma pigmentoso

apresentarem inúmeros tumores de pele devido à alteração na reparação do DNA celular; por outro lado, alguns estudos, demonstram que células de pacientes sem xeroderma pigmentoso, mas com inúmeras queratoses actínicas, também possuem uma capacidade menor de reparação do DNA quando comparadas as células de pacientes normais (Fitzpatrick, 1993b).

A lesão pré-cancerosa mais comum é a queratose actínica, que também está relacionada à exposição solar. É uma displasia da epiderme com alteração da polaridade e atipia celular. Cerca de 12, 13% de pacientes não tratados podem evoluir para carcinoma espinocelular, por isso a importância do tratamento e da profilaxia dessas lesões (Fitzpatrick, 1993a). Dodson., em 1991, definiram que as queratoses actínicas possuem um risco de 6,1 a 10,2% de transformação em espinocelular em um período de 10 anos.

No Brasil, há relatos de que os tumores malignos de pele são estimados em 25% de todos os tipos de câncer. Quando se refere a câncer não melanoma, os dois tipos de câncer cutâneo mais freqüentes são o carcinoma basocelular (que corresponde a 70% dos casos) e o espinocelular (a 25%), cujas taxas de mortalidade são baixas. Cerca de 2% dos carcinomas espinocelulares levam à morte (SAMPAIO e RIVITTI, 1998a).

Muitas são as formas de tratamento da pele fotoenvelhecida, tanto no aspecto estético como na profilaxia do câncer de pele. O tratamento e a prevenção das queratoses actínicas podem ser feitos com substâncias químicas ou mecânicas, ou ainda por meio de métodos cirúrgicos como a eletrocoagulação, crioterapia ou laserterapia (LAWRENCE., 1995; SAMPAIO e RIVITTI, 1998c; CHIARELLO, 2000; BRODY., 2000).

Os *peelings* químicos revertem o fotoenvelhecimento na pele humana e se mostram eficazes no tratamento da pele actínica e profilaxia das lesões pré-malignas e malignas (CLARK,1996; MARRERO, KATZ, 1998; TUNG, 2000; BUTLER, 2001; MONHEIT, 2001; MONHEIT, CHASTAIN, 2001).

Esfoliações Químicas

Esfoliações químicas ou quimioesfoliações, quimioabrasão, quimiocirurgia superficial, *lifting* químico e *peeling* químico são métodos por meio dos quais se usam diferentes agentes cáusticos para se obter a destruição controlada e conseqüente regeneração da epiderme e parte da derme. Esta regeneração epidérmica ocorre pela migração de queratinócitos íntegros a partir do epitélio residual dos anexos e margens laterais, por isso a necessidade de preservar os anexos cutâneos; enquanto a dérmica ocorre com a formação de novo tecido conectivo dérmico. O termo *peeling* se originou da palavra inglesa “peel” que significa descascar, desprender (KADUNC, 1998).

A história da evolução da esfoliação química, minuciosamente descrita por Kadunc (1998) e Brody (2000), nos mostra que os benefícios da esfoliação química são de caráter secular. Os egípcios no ano 3100 a.C. usavam sais, alabastro, óleos de animais e banhos de leite para obter uma esfoliação da pele; enquanto os turcos usavam o fogo; a mulher indiana, urina e pedra pome; a francesa, borra de vinho; e os ciganos húngaros,

fórmulas esfoliantes secretas. Os primeiros estudos com substâncias para esfoliação química foram realizados por Ferdinand Hebra, em 1800, que usou agentes esfoliativos para tratamento de efélides e melasma. Telbury Fox (1871), descreveu o uso localizado do fenol 20% para clarear a pele e, em 1881, Henry Piffard, mencionou a inflamação causada pelo óleo de cróton; um ingrediente da fórmula dos *peelings* de fenol. Em 1882, o dermatologista alemão Unna, relatou a propriedade esfoliativa de substâncias como o ácido salicílico, o resorcinol, o fenol e o ácido tricloroacético (ATA).

A primeira fórmula para esfoliação química cientificamente documentada foi a pasta de resorcina de UNNA, em 1882.

resorcinol = 40,0g / ichthamol = 10,0g/ petrolatum = 10,0g / pasta forte de Zn = 40,0g
--

George Miller Mackee, dermatologista inglês, em 1903, usou o *peeling* de fenol para cicatriz de acne, mas publicou seus resultados somente em 1952. Seu colega George Henry Fox escreveu o tratamento de efélides faciais com fenol em seu livro em 1905. O primeiro artigo americano sobre o fenol foi do dermatologista Douglas Montgomery da Califórnia em 1917. Posteriormente à Primeira Guerra Mundial ocorreu um período que marcou historicamente a intensificação da prática da esfoliação química. La Gassé, dermatologista francês, em 1918, praticou esfoliações ocluídas com fenol para tratamento de queimaduras faciais com pólvora. Sua filha, Antoinelle, em 1927, imigrou para a Califórnia onde iniciou nos salões de beleza de Los

Angeles a prática de esfoliações químicas com fenol denominada na época de “lay peelers”. No mesmo ano, Bames é o primeiro cirurgião plástico a escrever sobre “peelings” faciais superficiais com resorcinol. Descreveu também as complicações com fenol e a importância da divisão da face em áreas para que os *peelings* pudessem ser realizados semanalmente em cada local, evitando dessa maneira intoxicações ou nefrite.

Em 1930 e 1940, a técnica de esfoliação química com fenol se difundiu pela Flórida com algumas complicações, pois a poderosa ação cáustica e tóxica da substância era desconhecida nessa época. Em 1941, Joseph Eller e Shirley Wolff, sua assistente, publicaram as fórmulas dos *peelings* usadas até então para esfoliação e observaram variações mais potentes da fórmula do ácido salicílico, ácido láctico e resorcinol. Monash, 1945, aplicou ATA para xantelasma palpebral, verrugas planas, molusco contagioso, pitíriase versicolor, eczema liquinificado e lúpus eritematoso. Usou soluções de ATA diluídas, pois já havia observado formação de quelóide e cicatrizes. Em 1946, Urkov, cirurgião americano, descreveu com detalhes as esfoliações superficiais aplicando uma mistura de resorcinol com ácido láctico e salicílico ocluídos para esfoliação profunda de cicatrizes. Samuel Ayres, em 1960, combinou ATA com os experimentos de Monash (1945) e, baseado em suas conclusões clínicas e histológicas em relação ao ATA e fenol, concluiu que o primeiro era o agente mais cáustico. Max Jessner, em 1960, utilizou a combinação de ácido salicílico, ácido láctico e resorcinol. Entre 1952 e 1960 houve um hiato na literatura com respeito às esfoliações químicas. As atenções se voltam para os primeiros

artigos sobre dermoabrasão. Em 1960, Brown., estudaram as mudanças histológicas induzidas pelo fenol. Procuraram modificar sua formulação associando-o a outros fármacos, tentando neutralizá-lo e diminuindo seus efeitos cáusticos. Baker, em 1962, publicou a formulação do fenol saponificado e foi este trabalho que definiu as esfoliações químicas como procedimentos éticos. Nesse mesmo ano, Litton, também publicou seus estudos com fenol em 50 pacientes. Sua fórmula se diferenciava da de Baker pelo fato de poder ser armazenada (KADUNC, 1998; BRODY., 2000). Ayres (1962) fez as primeiras indicações dos *peelings* para o fotoenvelhecimento e considerou o ATA extremamente potente e com ação cáustica maior que o fenol quando usado em sua concentração máxima. Resnik (1976) publicou as avaliações das esfoliações químicas com ATA: superficiais, as concentrações até 20%, médias até 35% e profundas as esfoliações com concentrações entre 50 e 70%.

Na década de 1980, os autores tentaram aprofundar as esfoliações com ATA em concentrações menores para obter resultados tão bons quanto o fenol, porém com menor risco. Surgem as esfoliações químicas combinadas que consistem de procedimentos esfoliativos prévios ao ATA, a fim de se obter uma esfoliação média. Brody e Harley (1986) descreveram a associação de neve carbônica com ATA 35% e, juntamente com Monhert, em 1989, descreveram a combinação da solução de Jessner e ATA 35%, obtendo a queratólise e coagulação de proteínas de cada uma das substâncias respectivamente. Harris, Noodleman, em 1994, associaram ATA 35% com abrasão manual com

lixa d'água e Maldonado, em 1997, descreveu a abrasão manual sobre pequenas áreas tratadas com fenol 88%.

A resorcina foi outra substância utilizada para esfoliação, mas com caráter superficial. Pode ser usada diluída em soluções e associadas a outros queratolíticos como solução de Jessner ou sob a forma de pastas.

O ácido salicílico é um betahidroxiácido com propriedades queratolíticas usado para esfoliação superficial e geralmente associado à resorcina.

O ácido retinóico, derivado da tretinoína, foi usado em *peelings* seriados semanais por Cucé, em 2000.

Os alfa-hidroxiácidos (AHA) foram introduzidos na literatura em 1974, por Van Scott e Yu, no tratamento da pele asteatósica e doenças hiperqueratóticas. São elementos que pertencem a um grupo de compostos orgânicos não-tóxicos encontrados em alimentos. O ácido glicólico (AG) é obtido da cana de açúcar, ácido láctico da lactose; o ácido málico, derivado das maçãs; o cítrico, das frutas cítricas; e o ácido tartárico, das uvas. O ácido mandélico é um derivado do ácido glicólico e o lactato de amônio do ácido láctico (KADUNC, 1998; MANALOTO, 1999).

Coleman e Futrell descreveram em 1994 a associação do ácido glicólico com ATA 35%; Marrero e Katz (1995), a associação do 5-fluoracil (5-fu) com ácido glicólico ou Jessner para tratamento de queratose actínica. Tse (1996) comparou a eficácia da associação da solução de Jessner e ATA 35% com a de ácido glicólico e ATA 35% no tratamento do fotoenvelhecimento.

O ácido pirúvico (AP) é a forma *ceto* do ácido láctico, ou seja, possui um radical cetona em substituição ao radical hidroxila do ácido láctico e apresenta propriedade epidermolítica muito acentuada. Em 1991, Griffin e Van Scott, publicaram um estudo recomendando o uso do ácido pirúvico associado ou não ao 5-fluorouracil no tratamento das queratoses actínicas. Moy em 1996, comparou o efeito de vários “peelings” químicos na pele de porco e concluíram que na histopatologia o ácido pirúvico 100% causa um infiltrado inflamatório pouco importante quando comparado ao depósito de colágeno que ocorre após o “peeling” com esta substância. Neste mesmo ano, Cisneros comparou a esfoliação com ácido pirúvico 60% com ATA e laser de CO₂ e ND:YAG Q-Switched e concluiu que a esfoliação química com ácido pirúvico 60% e a combinação de laser de CO₂ e ATA apresentava bons resultados clínicos no fotoenvelhecimento.

Em 1998, Kadunc em tese de defesa de doutorado apresentada à Universidade de São Paulo padronizou a concentração e a profundidade do ácido pirúvico nas esfoliações químicas na pele de porco.

As esfoliações químicas têm indicação tanto terapêutica como cosmética. O seu principal emprego como tratamento químico é na profilaxia do câncer de pele, principalmente do carcinoma espinocelular por meio do tratamento e prevenção das queratoses actínicas (LAWRENCE, 1995; KADUNC, 1998). As esfoliações químicas não possuem efeito profilático nos casos de carcinoma basocelular, pois este procedimento não destrói o folículo piloso que junto com a epiderme originam este tumor (DODSON, 1991; KADUNC, 1998).

Outras indicações das esfoliações químicas são doenças como xeroderma pigmentoso, radiodermite crônica, acne vulgar, rosácea e discromias pigmentares como efélides, lentigos e melasma, verrugas planas, molusco contagioso e como tratamento estético no fotoenvelhecimento (KADUNC, 1998; DUFFY, 1998; COLEMAN, 2000; TUNG, 2000; MONHEIT, 2001).

A profundidade das esfoliações químicas depende do nível da epiderme ou derme atingidas. Podem ser superficiais ou epidérmicas, atingem desde a camada córnea até a interface dermoepidérmica (em torno de 0,06mm); as médias englobam desde a derme papilar até a reticular superior chegando a 0,45mm; enquanto as profundas alcançam a derme reticular média que é o limite para não ocorrer cicatrizes, entre 0,6mm e 0,8mm da superfície cutânea (KADUNC, 1998; COLEMAN, 2000; MONHEIT, 2001). RUBIN (1995) definiu como esfoliação química muito superficial aquela que atinge somente a camada córnea.

Outros fatores importantes que devem ser avaliados em relação à profundidade das esfoliações são (KADUNC, 1998; DUFFY, 1998; COLEMAN, 2000):

1) Características individuais

- idade e grau de fotoenvelhecimento da pele;
- procedimentos realizados anteriormente (como laser, dermoabrasão, radiação, cirurgias) ou uso de medicamentos (como isotretinoína e terapia hormonal).

2) Agente

- substância utilizada (características químicas);
- concentração e frequência de aplicação;
- método de aplicação (volume, atrito, tempo de exposição, necessidade de neutralização, oclusão do procedimento);
- potencial de toxicidade da substância;
- combinação de métodos ablativos (como dermoabrasão, laser e outras esfoliações);
- adição de potencializadores (algumas substâncias como óleo de cróton, septisol, glicerina, polisorbato 20, saponinas trieterpênicas e metilsalicilato podem ser adicionadas aumentando o poder epidermolítico da substância). O óleo de cróton é uma substância vesicante, extraída da semente da planta **Croton Tiglium** que quando adicionada a outra substância aumenta o poder de inflamação e irritação, pois aumenta a quimiotaxia dos fibroblastos e induz a formação do fator de necrose tumoral (KADUNC,1998; STUZIN,1998, HEETER,1999). Segundo Heeter (1999a,b), esta substância é importante na profundidade da esfoliação principalmente com fenol. Stone e Lefer (2001) relatam que o óleo de cróton é importante para o padrão uniforme da esfoliação.

3) Integridade da barreira cutânea

- pré-tratamento (uso diário de ácidos retinóico ou alfa-hidroxiácido);
- preparo prévio da pele à esfoliação (desengorduramento local com álcool, acetona ou éter).

4) Localização anatômica

- número de anexos cutâneos - áreas não faciais possuem menor vascularização e menor número de anexos cutâneos, o que dificulta a reepitelização e leva à formação de cicatrizes inestéticas (SWINERHART, 1992; RUBIN, 1995);
- textura e espessura da pele (tanto nas diferentes unidades estéticas da face como nas diferentes regiões anatômicas do corpo a espessura e textura da pele são diferentes. A face pode ser dividida em onze unidades estéticas: fronte, pálpebras, orelhas, região zigomática e malar, nariz, lábio, queixo e pescoço; todas com textura e espessura variáveis, o que leva a respostas diferentes com as esfoliações).

Como as esfoliações químicas são queimaduras induzidas sobre a pele, são necessários alguns cuidados pós-esfoliação de cinco a doze dias, dependendo da profundidade do procedimento. Os cuidados variam desde limpeza local com água e sabão, hidratação, prevenção de infecção bacteriana ou viral, fissuras e crostas e evitar a exposição solar (KADUNC, 1998; COLEMAN, 2000).

As esfoliações químicas podem apresentar contra-indicações e complicações que são citadas na tabela abaixo (KADUNC, 1998; COLEMAN, 2000; BRODY, 2001; RESNIK e RESNIK, 2001).

Contra-indicações gerais da esfoliação química

- ❖ história de herpes simples labial ativo ou recente
- ❖ gravidez
- ❖ grandes superfícies corporais no caso do ácido salicílico, resorcina ou fenol pelo risco de intoxicação
- ❖ alergia, principalmente nos casos de resorcina
- ❖ exposição solar
- ❖ dermatite atópica
- ❖ expectativa irreal
- ❖ pele tipo IV, V e VI
- ❖ terapia hormonal
- ❖ radiodermite crônica ou cicatrizes de queimaduras (devido a diminuição do número de anexos cutâneos)
- ❖ pacientes HIV positivo quando CD4 menor que 500
- ❖ instabilidade emocional
- ❖ doenças cardíacas, hepáticas, renais principalmente no caso do fenol
- ❖ predisposição pessoal ou familiar de quelóide
- ❖ uso recente de isotretinoína
- ❖ ritidoplastia recente

Complicações gerais da esfoliação química

- ❖ alergia de contato durante ou após o procedimento
- ❖ alterações sistêmicas relacionadas a absorção da medicação como no caso do fenol e ácido salicílico
- ❖ infecções virais e bacterianas
- ❖ hiperpigmentação pós inflamatória
- ❖ dermatite acneiforme
- ❖ eritema persistente (apenas considerado como complicação quando mantido por mais de 6 meses)
- ❖ milia
- ❖ cicatrizes
- ❖ hipopigmentação
- ❖ linhas de demarcação

Na histopatologia, de um modo geral, as esfoliações químicas podem ser divididas em três fases, segundo Brody (1989):

- ❖ 1) Fase aguda. inicia-se logo após a aplicação da substância e dura cerca de 72 horas. Os sinais de agressão compreendem desde o simples destacamento dos corneócitos na junção com o estrato granuloso (nas esfoliações superficiais) à destruição completa de todas as estruturas até a derme reticular média (como ocorre nas esfoliações profundas);
- ❖ 2) Fase de reepitelização. ocorre por volta do sétimo dia e se apresenta com diminuição da camada córnea, aumento da camada granulosa e melhora das atipias celulares com espessamento geral da epiderme;
- ❖ 3) Fase tardia. é a fase da regeneração dérmica. Inicia-se na terceira semana após a esfoliação e pode durar até seis meses.

Alfahidroxiácidos

Os alfa-hidroxiácidos (AHA) possuem seus benefícios conhecidos desde a Antiguidade. Cleópatra aplicava leite (ácido láctico) em sua face; as mulheres árabes, inglesas e espanholas, suco de limão (ácido cítrico); as francesas, vinho tinto (ácido tartárico) e as mulheres da Polinésia, o caldo extraído da cana de açúcar (ácido glicólico) (ROENIGK, 1995; SLAVIN, 1998; DUFFY, 1998; KADUNC, 1998; MANALOTO, 1999; GRIFFITHS, 1999).

Os AHA são classificados conforme o número de carbonos. O ácido glicólico, láctico e mandélico são monocarboxílicos. Os demais são

considerados policarboxílicos, sendo que o málico e o tartárico são dicarboxílicos e o ácido cítrico, tricarboxílico. Os policarboxílicos possuem propriedades antioxidantes em maior proporção que os monocarboxílicos (SLAVIN, 1998).

Van Scott e Yu (1974) descreveram a influência dos AHA no processo de queratinização em doenças com anormalidade na queratinização e chamaram a atenção para o fato desta substância não ser queratolítica como o ácido salicílico ou a uréia. Em uma revisão em 1984, estes mesmos autores detalharam os efeitos dos AHA na adesão dos corneócitos na microscopia ótica. Afirmaram que estes não causam a desagregação dos corneócitos na parte superior da camada córnea como ocorre com as substâncias queratolíticas, mas diminuem a coesão celular na parte inferior desta mesma camada. Os autores acreditavam que os AHA competiam com o sulfato e fosfato na reação da transferase sulfato, fosfotransferase ou quinase, que são envolvidas na formação dos mucopolissacarídeos sulfatados e fosforilados, glicoproteínas, esteróis e lipídeos. Esta interferência poderia resultar em grupos sulfato e fosfato, poucos eletronegativos na parede externa dos queratinócitos e corneócitos diminuindo as forças de coesão.

No tratamento tópico do fotoenvelhecimento com AHA vários são os autores citados na literatura. Ridge (1990) relatou o uso do lactato de amônio 12% (derivado do ácido láctico) nas rugas finas periorbitárias. Lavker (1992) estudou a ação dessa mesma substância nas atrofia cutâneas resultantes do uso de corticóide e mostrou que em quatro semanas de tratamento houve 19% de aumento da espessura da epiderme e aumento da

quantidade de substância fundamental dérmica, demonstrando a ação dermoepidérmica desta substância.

Elson (1993) associou o uso de tretinoína em tratamento domiciliar com alfafidroxiácido diário e esfoliações químicas com ácido glicólico e verificou que os AHA propiciam melhor absorção de outras substâncias.

Colleman e Futrell (1994) combinaram ácido glicólico 70% e ATA 35% no tratamento do fotoenvelhecimento acentuado. Marrero e Katz (1995) associaram 5-fu ao AG no tratamento das queratoses actínicas. Ditre (1996) revisou clínica, histológica e ultraestruturalmente dezessete pacientes, que tinham fotoenvelhecimento de moderado a severo, e aplicou AHA (lático, glicólico, ou cítrico) a 25% com pH 3,5 em um dos antebraços e uma loção placebo no outro membro por seis meses. O autor detectou um aumento estatisticamente significativo na espessura da pele. No exame histológico observou um aumento na espessura epidérmica, melhora da distribuição da melanina e melhora das fibras elásticas. Na microscopia eletrônica houve um aumento das fibrilas de ancoragem e diminuição dos desmossomas.

Stiller em 1996, avaliou clinicamente a ação do ácido glicólico e lático a 8% com a de seus veículos cremosos na face e braços de humanos e após 22 semanas concluiu que houve um modesto benefício nos sinais de fotoenvelhecimento: hiperpigmentação moteada, rugas finas, sulcos, flacidez, tom amarelado da pele, telangiectasias e aspereza.

Griffin (1996), com o uso do ácido glicólico, lático ou cítrico 25%, observou degranulação de mastócitos e aumento do fator XIII nos

dendrócitos pelas células dendríticas dérmicas, mostrando dessa forma a ação dos AHA na derme.

Moy (1996) mostrou que a aplicação de ácido glicólico em culturas de fibroblastos estimula a produção de colágeno (apud LAWRENCE, 2001).

Tse (1996) defendeu o uso dos AHA nas esfoliações superficiais e comparou a associação do ATA e Jesnner com ATA e AG, definindo esta última como mais efetiva no tratamento das queratoses actínicas. Na histopatologia o autor descreveu um processo inflamatório inicial maior na associação do Jesnner e ATA, quando comparado ao AG e ATA, mas os efeitos dérmicos tardios como expansão da zona Grenz e formação de fibras elásticas novas (pela coloração de Verhoff) foi mais significativa na associação de AG e ATA.

Bernstein (1997) usou ácido cítrico 20% no fotoenvelhecimento dos antebraços por três meses, em um estudo duplo cego, e encontrou diferenças estatisticamente significativa na espessura da pele na avaliação clínica e da epiderme histopatologicamente, bem como, aumento de glicosaminoglicans dérmicos por meio do estudo imunohistoquímico e na avaliação histométrica.

Para definir melhor o mecanismo de ação, Bergfeld (1997) comparou o ácido glicólico 10%, parcialmente tamponado, pH 3,8% e ácido livre 5,17%, em conjunto com ácido glicólico não-tamponado a 50%, pH 1,2% ácido livre 49,88% com irritação mecânica com esponja em 28 pacientes com fotoenvelhecimento no dorso das mãos por dezesseis semanas e

encontrou uma melhora no fotoenvelhecimento severo, textura e rugas no lado tratado com ácido.

Os AHA quando comparados a tretinoína 0,025% e ao ácido salicílico 5% mostraram proliferação epidérmica e aumento na espessura e ativação do fator XIII nos dendrócitos, embora a tretinoína apresentou efeitos mais pronunciados (LAWRENCE, 2001).

Javahereri (2001), Sarkar, Hurley, ambos em 2002, demonstraram a ação do ácido glicólico no tratamento do melasma.

Alam (2002) comparou a esfoliação com AG com microdermoabrasão e definiu as esfoliações como mais bem toleradas pelos pacientes.

Cox (2003) utilizou ácido glicólico 70% associado ao ATA 40%, uma esfoliação médio profunda, no tratamento da pele fotoenvelhecida não facial, principalmente no tratamento das queratoses actínicas e relatou, como complicação rara, o desenvolvimento de queratoacantomas após a esfoliação. Denominou esta técnica de “Cook body Peel”.

Na histopatologia os AHA causam diminuição da espessura e compactação da camada córnea, aumento da camada granulosa, normalização do padrão das cristas epiteliais e atípias basais, dispersão da melanina e aumento da espessura da epiderme. Em concentração mais alta ocorre a epidermólise que é a separação ou destacamento total dos queratinócitos. Ocorrem alguns efeitos dérmicos como: aumento da síntese de colágeno, melhora da qualidade das fibras elásticas que se apresentam menos fragmentadas e estímulo da síntese de glicosaminoglicans e conseqüente aumento da substância fundamental, especialmente do ácido

hialurônico. Quando a coesão do estrato córneo é diminuída, novas células são estimuladas a crescer a partir da camada basal (ROENIK, 1995; MOY, 1996; SLAVIN, 1998; DUFFY, 1998; MANALOTO e ALSTER, 1999; GRIFFITHS, 1999; TUNG, 2000).

Quanto menor a partícula do ácido, mais efetiva é a penetração e mais profunda a ação. O ácido glicólico é o que possui menor estrutura molecular seguido pelo ácido láctico, málico, tartárico e cítrico (SLAVIN, 1998).

A fração de AHA livre presente na formulação é a unidade da solução que pode penetrar no estrato córneo intacto; esta aumenta conforme o pH diminui, fazendo com que o ácido livre presente aumente a sua penetração. Para diminuir o pH é necessária uma concentração suficiente de ácido que deve ser maior que 10% (ROENIGK, 1995; SLAVIN, 1998; LAWRENCE, 2001). Os AHA na concentração 0-2% aumentam a hidratação, 2-4% aumentam a produção de ácido hialurônico, 4-8% aumentam o “*turn over*” das células espinhosas e a 8-12% aumentam significativamente o “*turn over*” celular e o depósito de colágeno, as fibras elásticas se tornam menos fragmentadas e em torno de 20% das atipias celulares basais são revertidas, além da melhora da uniformização do padrão da melanina (ROENIGK, 1995; SLAVIN, 1998; LAWRENCE, 2001).

O pH depende da quantidade de ácido presente e do veículo empregado. Os AHA são solúveis em água e se houver uma quantidade de óleo presente no veículo ou na pele, a atividade diminui. A irritação do AHA é diretamente relacionada ao pH da solução, mas não a concentração do produto (esta é importante para se obter um pH baixo), sendo assim, se

aumentar o pH, diminui a irritação, mas também diminui a fração de AHA livre e altera as características do ácido e seus efeitos terapêuticos (SLAVIN, 1998).

O grupo dos AHA é o único grupo de ácidos que pode ser neutralizado após o início de sua ação na pele por meio do aumento do pH e diluição da concentração da substância química. Alguns autores preferem adicionar bicarbonato de sódio, pois reage com o ácido neutralizando-o, enquanto outros consideram que esta substância causa um processo esfoliativo e dano tecidual local (SLAVIN, 1998; DUFFY, 1998).

Os AHA não possuem potencial de toxicidade, sendo por isso utilizado em grandes áreas corpóreas e em qualquer localização do corpo. Não são fotossensíveis como outras substâncias e as complicações são diretamente relacionadas com a profundidade do ácido (BRODY, 1996; SLAVIN, 1998; DUFFY, 1998; GRIFFITHS, 1999; FLYNN e COLEMAN, 2000; COOK e COOK, 2000; LAWRENCE, 2001).

As contra-indicações dos AHA podem ser relativas, como doenças hepáticas, renais, história de herpes labial, tabagismo importante, idade, uso prévio de isotretinoína (pois essa diminui o número de unidades pilossebáceas podendo levar a cicatrizes), ou absolutas, como gravidez, Síndrome da imunodeficiência adquirida e expectativas irreais (KADUNC, 1998; COLEMAN, 2000).

Ácido pirúvico

O ácido pirúvico é a forma ceto do ácido láctico, pois possui um radical cetona na posição alfa em substituição ao radical hidroxila do ácido láctico sendo denominado como alfacetoácido (ACA). Pode ocorrer interconversão fisiológica entre estas duas substâncias (KADUNC,1998).

O ácido pirúvico é um elemento intermediário no metabolismo do açúcar e na degradação enzimática dos carboidratos onde é convertido em acetaldeído e CO_2 pela carboxilase. No tecido muscular, o ácido pirúvico proveniente do glicogênio é reduzido a ácido láctico durante o exercício e parcialmente retransformado em glicogênio durante o repouso. O fígado pode converter ácido pirúvico em alanina por aminação e, na fermentação da cana de açúcar, o ácido pirúvico é convertido em ácido láctico pela dehidrogenase láctica (VIEIRA, 1979; KADUNC, 1998).

O ácido pirúvico é produzido a partir da glicose, via glicólise na matriz citoplasmática. Penetra na mitocôndria e é oxidado na membrana interna transformando-se em acetil Coenzima A pelo complexo enzimático denominado sistema de desidrogenase pirúvica que requer magnésio para sua atividade. O ácido pirúvico ocupa uma posição importante não somente no metabolismo de carboidratos como também na integração do metabolismo de carboidratos com o de lipídeos e aminoácidos (VIEIRA, 1979).

O ácido pirúvico apresenta-se como um líquido bastante denso ($d = 1,27\text{g/litro}$), à temperatura ambiente, de cor amarelada, com odor

semelhante ao do ácido acético. O seu peso molecular é 88,06 na sua forma pura, líquida é de 99%. Quando armazenado por períodos longos pode se decompor em CO₂ e acetaldeído provocando a formação de gases (KADUNC, 1998).

Clinicamente após o seu contato com a pele, o ácido pirúvico leva a um branqueamento local que corresponde histologicamente a epidermólise e necrose epidérmica (KADUNC, 1998; MOY, 1996). Moy (1996) afirma que o ácido pirúvico 100% causa epidermólise em 30-60 segundos e que na histopatologia, quando se compara o ácido pirúvico 50% e 100% 24 horas após a aplicação, a primeira concentração não apresenta necrose dermoepidérmica e o infiltrado inflamatório está ausente quando comparado a segunda; mas 21 dias após a esfoliação o infiltrado inflamatório e o crescimento dérmico embora estejam presentes no ácido pirúvico a 50% se apresentam menos importantes que a 100%. A reação do ácido pirúvico 100% um dia após o *peeling* é similar à reação do ATA e fenol. Os autores afirmam que ácido pirúvico causa reação inflamatória não específica mínima no controle de 24 horas, a qual é desproporcional ao depósito de colágeno que ocorre no controle de 21 dias, sugerindo um efeito direto da substância na estimulação do colágeno, ao contrário do ATA e fenol.

O ácido pirúvico pode ser usado topicamente em cremes a 5% para controle da hiperqueratose epidermolítica e espinulosa (VAN SCOTT e YU, 1974), diluído a 10-30% para dissolver lesões queratósicas antes de esfoliação química com ATA (COLLINS, 1989, apud KADUNC, 1998), como agente ablativo para tratamento de lesões hiperplásicas ou verrucosas

(GRIFFIN e VAN SCOTT, 1991; VAN SCOTT e YU, 1989, apud KADUNC, 1998). Nas esfoliações químicas, principalmente nas superficiais, Van Scott e Yu (1989, apud KADUNC, 1998) usaram ácido pirúvico 50%. No mesmo ano, Griffin (apud KADUNC, 1998) usou ácido pirúvico a 40, 60, ou 80% também para esfoliações químicas e encontraram acantólise intraepidérmica e separação dermoepidérmica com colágeno neoformado na derme papilar. Não houve efeitos sistêmicos e os resultados foram bons com concentrações mais altas. Os pacientes com pigmentos profundos tiveram hiperpigmentação sem formação de cicatrizes e os autores concluíram que a esfoliação com o ácido pirúvico foi eficiente no tratamento do fotoenvelhecimento moderado.

Griffin e Van Scott, em 1991, usaram ácido pirúvico 60% isolado e associado ao 5-fu para tratamento de queratoses actínicas localizadas e encontraram na histopatologia uma faixa de colágeno neoformado, espesso e eosinofílico com espessura de 0,02 a 0,32 mm, 3-8 semanas após na área de queratose prévia. Concluíram que o ácido pirúvico 60% isolado é eficaz no tratamento das queratoses actínicas e quando associado ao 5-fu diminui o tempo e efeitos colaterais deste.

Cisneros (1996) definiu o ácido como substância muito potente e julgaram que a concentração a 80% é dolorosa e pode levar a cicatrizes. Usou a 60% em etanol com oito gotas de sabão líquido e uma gota de óleo de cróton, denominando esta fórmula como ácido pirúvico modificado, e julgou que a esfoliação química com o ácido pirúvico a 60% situa-se entre o ATA e o fenol, sendo mais efetivo que o ATA e menos agressivo que o fenol.

Na histopatologia encontrou, na fase aguda, destruição e necrose da epiderme, edema da derme papilar e homogeneização da derme reticular. Após trinta dias verificou hiperplasia epidérmica, espessamento da derme papilar e na reticular aumento dos fibroblastos e das fibras elásticas, além de formação de neocolágeno, angiogênese e maior quantidade de glicosaminoglicans. Usou ácido glicólico 40% ou Jessner nas áreas hiperplásicas neutralizando-as em 2-3 minutos, aplicando depois ácido pirúvico. Observou que a epidermólise ocorre em 1-2 minutos e após 5-10 minutos neutralizaram com água. A reepitelização ocorreu entre 7 a 10 dias.

Kadunc, em 1998, em tese de doutorado apresentada a FMUSP concluiu, em estudo realizado em porcos, que o ácido pirúvico pode ser seguro para esfoliação química, a reepitelização é perfeita, não apresenta risco de toxicidade sistêmica e sua potência aumenta com a elevação de sua concentração, sendo as mais seguras 60, 70 e 80% e o tempo indicado para a esfoliação química é entre cinco e dez minutos.

Ki-67: Imunohistoquímica da proliferação celular

O aparecimento de métodos imunohistoquímicos possibilitou avanços no diagnóstico de algumas doenças, principalmente dos tumores. As técnicas de imunohistopatologia são conhecidas desde 1970, mas apenas foram usadas em 1980. Esses métodos utilizam anticorpos mono ou policlonais que marcam a célula anaplásica por meio de reações com substâncias reveladoras. Os anticorpos monoclonais possuem alto grau de

pureza e são desprovidos de anticorpos de reação cruzada contaminante (ROSE, 1994; FERNANDEZ, 1997; BROWN e GATTER, 1990; LEVER e SCHAUMBURG-LEVER, 1991).

A avaliação da proliferação celular pode mostrar informações sobre o diagnóstico e o prognóstico dos tumores, e por isso a importância do uso destes marcadores (ROSE, 1994; FERNANDEZ, 1997).

O Ki-67 é um anticorpo monoclonal que avalia a fração de crescimento dos tecidos normais, reacionais e neoplásicos (BROWN e GATTER, 1990). Com o seu uso pode-se observar uma correlação entre a intensidade da proliferação celular de um tumor, variação prognóstica, tamanho e grau de diferenciação tumoral, além de ajudar a detectar áreas com proliferação atípica que poderiam apresentar uma incidência maior de transformação maligna (GERDES, 1983; ROSE, 1994; BROWN e GATTER, 2002).

O Ki-67 é um marcador da proliferação celular descrito por Gerdes em 1983 na Alemanha Ocidental, em Kiel (por isso a denominação de Ki), quando notou que marcava as células que se reproduziam. Essa produção ocorreu na 67ª placa de cultura, o que explica a denominação 67 (BROWN e GATTER, 1990). Ele marca o núcleo do queratinócito das células da camada basal e suprabasal e identifica uma proteína grande, nuclear, não histona de 345 e 395 Kd presente no nucléolo das células proliferativas, bem como na cromatina condensada nas células mitóticas, e codificada por quase 30 mil pares de base dentro do genoma humano. O gene que codifica o antígeno Ki-67 localiza-se no cromossomo 10 (10q25) (BROWN e GATTER, 1990; ADRIAENSSENS, 1998; BROWN e GATTER, 2002). Esta proteína possui

uma meia vida estimada em 60-90 minutos (ADRIAENSSENS, 1998; ANDERSEN,1998).

O Ki-67 é um anticorpo murino IgG da classe I que age contra uma fração nuclear da doença de Hodgkin derivada da linha celular 1'428 (hibridoma de células de Hodgkin e Reed-Sternberg) (GERDES, 1984; BROWN, 1988; DE MARE, 1990; BROWN e GATTER, 1990; KERSCHMANN, 1994; ANDERSEN, 1998; SKYTTING, 1999; TAMURA, 2001; BROWN e GATTER, 2002).

A relação do Ki-67 com a proliferação celular foi observada quando este marcador foi aplicado em linfonodos. Observou-se que os anticorpos reagiam com células tumorais e com as células dos centros germinativos (células que apresentam alta proliferação celular), sendo negativos em células em repouso como plasmócitos, fibroblastos, linfócitos, células parietais da mucosa gástrica, células renais, hepatócitos, células espermáticas maduras, células do músculo liso, entre outras. Testou-se em outros tecidos com padrão de proliferação conhecido (padrão este marcado com a timidina tritiada, pois essa possui correlação com a proliferação celular) comprovando esta relação (GERDES, 1983,1984; BROWN,1988; BROWN e GATTER,1990).

O Ki-67 também foi positivo em culturas de células estimuladas por fitohemaglutinina (PHA), tornando-se negativo quando estas células eram induzidas à diferenciação e repouso (ROSE, 1994; TAMURA, 2001; BROWN e GATTER, 2002).

No ciclo celular o antígeno Ki-67 é expresso em todas as fases exceto, na fase G0, em que as células apresentam-se Ki-67 negativas (GERDES, 1983, 1984). Quando as células em repouso são transformadas em células proliferativas, por exemplo, linfócitos estimulados com fitohemaglutinina A, o antígeno reconhecido pelo marcador Ki-67 aparece nos núcleos das células em proliferação; por outro lado, o antígeno desaparece quando as células são induzidas a diferenciar-se para células em repouso (GERDES, 1984). Estes achados indicam que este antígeno nuclear é associado com as células proliferativas, contudo, não é certo se o antígeno Ki-67 é expresso nas células proliferativas durante todas as fases do ciclo celular ou se a sua ocorrência é restrita a certas fases do ciclo. Sendo assim, Gerdes (1984) publicou um estudo do Ki-67 nas fases do ciclo e observou que o anticorpo monoclonal é expresso continuamente nas células proliferativas nas fases G1 (GAP1), S (síntese), G2 (GAP2) e M (mitose), mas não na fase G0 (repouso).

A expressão antigênica aumenta com a progressão do ciclo celular iniciando-se durante a metade final da fase S, alcançando o pico na fase G2 e M e desaparecendo rapidamente no final do ciclo (sua concentração diminui rapidamente após a fase mitótica), por isso existe uma forte evidência que a expressão do Ki-67 se concentre com a proliferação celular medida por meio da fração S e G2 (ANDERSEN, 1998; ADRIAENSSENS, 1998; KORABIOWSKA, 2000; DUAN, 2000; TAMURA, 2001).

Culturas de células exibindo RNA/DNA com características de células na fase G0 são constantemente negativas para expressão do Ki-67, pois as células na fase G0 quebram o antígeno e por isso o anticorpo monoclonal Ki-

67 não se expressa nessa fase. Contudo os resultados na fase G1 variam, as células passam pelo evento inicial de mitose desencadeando uma transição de G0 a G1, sendo que primeiramente em G1 antes da mitose o antígeno Ki-67 é negativo, enquanto que G1 após a mitose as células são Ki-67 positivas (GERDES, 1984; ADRIAENSSENS, 1998; PLAAT, 1999; BROWN e GATTER, 2002).

A distribuição do antígeno Ki-67 parece ser ciclo dependente. Um estudo com células pulmonares humanas embriônicas mostrou na fase final do G1 o antígeno presente na região perinuclear, enquanto na fase S o antígeno fica homogêneo no carioplasma e no G2 no carioplasma com um padrão misto, finamente granular e perinuclear. Uma marcação intensa pericromossômica é evidenciada durante a prófase e a metáfase, além da coloração carioplasmática na prófase e coloração citoplasmática na metáfase. A intensidade da coloração diminui rapidamente durante a anáfase e a telófase; tanto na primeira como na telófase inicial o Ki-67 aparece com um padrão granular. Na telófase tardia adquire um padrão pontilhado que é restaurado até o padrão nucleolar típico. O antígeno Ki-67 é localizado durante a interfase no córtex nucleolar e nos componentes fibrilares densos (BROWN e GATTER, 1990; 2002).

Em 1989, Verheijen, publicou suas observações sobre a localização exclusiva do antígeno Ki-67 no núcleo da célula utilizando imunohistoquímica e imunofluorescência, microscopia confocal, imunoeletromicroscopia, análise de proteínas e RNA e tratamento com actinomicina D. Neste mesmo trabalho os autores relatam que mesmo após a remoção do DNA da célula através de

fracionamento *in situ*, usando DNA polimerase1, ainda é possível detectar o Ki-67, sugerindo que este antígeno não depende da presença do DNA. Este achado é contrário aos estudos de Sasaki (1987 apud BROWN e GATTER, 1990), que relata que após o uso da DNA polimerase 1 não se pode detectar o Ki-67.

Mac Callum e Hall (2000) demonstraram que a proteína Ki-67 é detectada somente no núcleo das células proliferativas e que sua localização espacial se difere nas diferentes fases do ciclo celular e definem que na fase inicial de G1 o Ki-67 é encontrado no componente fibrilar denso do nucléolo bem como em outros sítios que se relacionam com regiões teloméricas e centroméricas dos cromossomos; chamou este padrão de tipo I. Quando as células passam de G1 para fase S, o Ki-67 se localiza exclusivamente no nucléolo; este é o tipo II; durante a mitose o Ki-67 se localiza na camada pericromossômica.

Tanto na epiderme em proliferação, como em doenças como a psoríase, a coloração do anticorpo Ki-67 pode ser verificada no núcleo celular na camada basal e parabasal, enquanto que no epitélio escamoso normal essa coloração também pode ser verificada no citoplasma da célula na camada germinativa. Essa observação foi feita por Rijzewijk (1987), que a comprovou por meio do estudo da coloração na margem e na lesão de psoríase e verificou que na área de pele normal a coloração é mais citoplasmática, enquanto na lesão é nuclear. A epiderme normal perde a coloração citoplasmática 25-30 horas em favor da coloração nuclear. Essa coloração citoplasmática da camada germinativa epidérmica na pele normal

pode às vezes dificultar a medida quantitativa das células Ki-67 positivas, levando a uma subestimativa de núcleos positivos Ki-67, já que existe uma proporção de células cíclicas ativas na pele normal (VAN ERP, 1987). Essa coloração citoplasmática havia sido relatada por Gerdes (1983) como uma coloração fraca e distinguível da coloração nuclear, principalmente quando comparado a um epitélio escamoso como o tecido linfóide das tonsilas. Ambas colorações, citoplasmática e nuclear, apenas são verificadas na epiderme, mas não em outro tipo de tecido.

Ando (1990 apud FRANSSON e HAMMAR, 1992) reportou que essa coloração citoplasmática poderia ser evitada pela exclusão de fixação dos cortes congelados, o que não foi confirmado por Fransson e Hammar (1992) que diminuíram essa coloração com adição de H_2O_2 .

Rijzewijk (1992), em estudo com o marcador Ki-67 em doenças com queratinização comprometida e na pele normal, encontrou nesta um valor de 13 ± 2 núcleos positivos/mm, enquanto que Van Erp (1989) achou o resultado de 25 ± 2 núcleos positivos/mm (apud RIJZEWIJK, 1992). Na pele normal queratinócitos Ki-67 positivos constituem 1-3% dos queratinócitos epidérmicos totais (SOINI, 1994).

A verdadeira função da proteína Ki-67 é difícil de ser determinada. Scholzen e Gerdes em 2000 (apud BROWN e GATTER, 2002) acharam que a dificuldade é pela falta de similaridade com outras proteínas. O Ki-67 é aparentemente uma única estrutura quando comparada a outras proteínas de função conhecida. Bridger, Kill e Lichter (1998 apud BROWN e GATTER, 2002) sugeriram um papel na organização do DNA baseado na

localização do Ki-67 para sítios extranucleolares durante a fase inicial de G1. Estudos indicam que a proteína Ki-67 exerça papel primário na manutenção da estrutura do DNA durante a mitose (TAMURA, 2001). Alguns estudos demonstram que o antígeno Ki-67 não é essencial para a proliferação celular, pois este se mostrou negativo em culturas de células em proliferação medida por outros métodos como citometria de fluxo (BROWN e GATTER, 1990).

MacCallum e Hall, em 2000, sugeriram um papel estrutural e arquitetônico para o Ki-67 dentro do nucléolo, baseado na habilidade desta proteína de interagir em um meio complexo com outras proteínas e na ligação com RNA e DNA. Eles também sugeriram baseado em sua localização, uma associação com o processamento tardio ribossomal de RNA. O Ki-67 é um fator essencial na rápida produção de ribossomos durante a divisão celular. Isto é suportado pela observação da expressão da proteína Ki-67 na correlação com a síntese de proteínas; uma função dos ribossomos (BROWN e GATTER, 2002).

O anticorpo original Ki-67 apenas poderia ser usado em tecidos frescos ou congelados e por isso este anticorpo foi substituído por outros que poderiam ser reconhecidos no tecido fixado convencionalmente (SKYTTING, 1999; ROSE, 1994; BROWN e GATTER, 2002). Descreveu-se, então, anticorpos capazes de reagir com tecidos parafinados. O Ki-67 quando usado em pesquisa apresenta problemas relacionados à reatividade cruzada de anticorpos monoclonais aumentados contra a proteína Ki-67 e por isso a utilização de anticorpos recombinantes como o MIB-1 (Molecular

Immunology Borstel; que é um anticorpo monoclonal contra uma parte recombinante do antígeno Ki-67), MIB-5 (um anticorpo monoclonal em ratos) e TEC-3 (recente preparado feito pela imunização de rato com parte recombinante de equivalente murino da proteína Ki-67) (ADRIAENSSENS, 1998; BROWN e GATTER, 2002). O mais comum é o MIB-1 que pode ser usado para distinguir o fator prognóstico do fator predictivo e pode reagir com um epítipo da proteína Ki-67 no tecido fixado na formalina e/ou parafina, mostrando-se bom marcador de tecidos arquivados (Li, 2000; Brown e Gatter, 2002).

A importância do estudo deste marcador esta relacionada ao fator predictivo que atua como indicador de sensibilidade relativa da doença a uma particular terapia e não apenas ao seu fator prognóstico (BROWN e GATTER, 2002).

Estes estudos relacionados ao fator preditivo do Ki-67 são importantes nos tumores de próstata (HARPER, 1998; MATSUSHIMA, 1999; BROWN e GATTER, 2002;) e nos tumores de mama (CHANG, 1999; BROWN e GATTER, 2002).

Alguns estudos mostram nas doenças linfoproliferativas que o Ki-67 possui boa correlação com o grau histológico dos linfomas não Hodgkin e que este marcador pode ser aplicado na diferenciação entre linfoma folicular e hiperplasia folicular reativa (BROWN e GATTER 1990, 2002).

Outros estudos com Ki-67 foram no câncer do cérvix uterino (BROWN, 1988; GENG, 1999; BROWN e GATTER, 2002), nos tumores de

ovário (HARLOZINSKA, 1996), tumores da vulva (HENDRICKS, 1994) e nos tumores da tireóide (OZAKI, 1999; YOSHIDA, 1999).

Na colite ulcerativa o Ki-67 pode ser usado principalmente na diferenciação do epitélio em regeneração após um processo inflamatório de uma verdadeira displasia (BROWN e GATTER, 2002). Andersen (1998) observou grande diferença entre células Ki-67 positivas nas células de alto e baixo grau de displasia e no carcinoma comparado com epitélio regenerativo, isso fez com que o Ki-67 se tornasse um valor adicional no diagnóstico de mucosa regenerativa ou displásica na colite ulcerativa. O autor acredita que os resultados desse estudo confirmariam claramente a importância da alta proliferação na progressão para a malignidade.

O marcador Ki-67 também foi estudado nos tumores gastrointestinais (TAZAWA, em 1999) e tumores do esôfago (ZHANG, 1998; WHITTLES, 1999). A correlação do Ki-67 e tumores do intestino grosso é pequena e contraditória e este fato pode resultar devido à heterogeneidade dos tumores intestinais, principalmente nos tumores coloretais (BROWN e GATTER, 2002).

Nos tumores de partes moles, os sarcomas sinoviais, o Ki-67 pode ser usado para analisar o prognóstico das lesões (SKYTHING, 1999), por outro lado, tumores benignos, como schwannoma ou neurilemomas, podem apresentar uma baixa incidência de células proliferativas por meio do marcador Ki-67 (KINDBLOM, 1998).

No carcinoma hepatocelular, o índice de proliferação pode ser prognóstico significativo e representar estágios iniciais de hepatocarcinogênese (TANNAPFEL em 1999; TINIAKOS, 1999).

Em relação aos tumores do sistema nervoso central existe uma boa correlação entre o grau histológico do tumor e o índice de coloração do marcador Ki-67 (BROWN e GATTER, 1990).

Alguns estudos utilizam o marcador Ki-67 na avaliação do potencial terapêutico das drogas antiproliferativas como nas terapias hormonais e no uso do interferon gama, sendo esta uma boa indicação do uso do Ki-67 em pesquisas científicas (BROWN e GATTER, 1990).

O uso do marcador Ki-67 na dermatologia pode ser observado em algumas doenças, como melanoma maligno; principalmente em uma lesão com características bordelines para malignidade (TRONNIER, 1997; KORABIOWSKA, 2000, LI, 2000; BROWN e GATTER, 2002; LOHMANN, 2002).

Fransson e Hammar (1992) avaliaram o crescimento epidérmico em pele equivalente com investigação imunohistoquímica com anticorpos contra marcadores associados com proliferação nos períodos de crescimento de 3-6 dias e após o término do crescimento em 21 dias. Nos primeiros 3-6 dias a coloração para Ki-67 foi negativa enquanto que após 21 dias de cultura a coloração foi abundante. Noszczyk (2000) demonstrou que a proliferação dos queratinócitos na regeneração epidérmica normal em humanos se inicia no quinto dia após a injúria, pois as células se tornam Ki-67 positivas.

Ryzewijk (1992) realizou estudo imunohistoquímico utilizando o marcador Ki-67 para células ativas do ciclo e Pab601 para células germinativas em distúrbios cutâneos com queratinização comprometida e verificou que a acantose microscópica está relacionada a um aumento da

população germinativa, enquanto que o “*turn over*” epidérmico aumentado está associado ao aumento de células do ciclo celular.

Pierard (1997) em estudo com beta-hidroxiácido, substância derivada do ácido salicílico, comparado a tretinoína, encontrou aumento da proliferação epidérmica avaliada por meio do Ki-67 em ambas as substâncias. Usou o marcador na avaliação das alterações epidérmicas através da proliferação celular e concluiu que ambas as substâncias possuem efeitos na regeneração epidérmica.

Tan (1994) encontrou diminuição do Ki-67 nas lesões de líquen escleroso vulvar quando comparado à pele normal. Scurry (1998) estudou o potencial maligno do líquen escleroso usando marcador de proliferação. Comparou casos de líquen escleroso com ou sem associação com carcinoma espinocelular e encontrou alto número de Ki-67 nas células escamosas hiperplásicas adjacentes ao carcinoma que poderiam indicar pré-malignidade ou reação ao carcinoma. Rolfe (2002) relatou aumento do Ki-67 nos pacientes tratados com corticóide tópico no líquen escleroso vulvar.

Liew (1999) estudou a presença de células hiperproliferativas que normalmente acompanham a injúria epidérmica pela coloração com Ki-67 antes e após laser ruby na remoção de pêlos e não encontrou evidências de células hiperproliferativas após a irradiação.

De Mare, em 1990, demonstrou aumento de Ki-67 nas lesões de psoríase, enquanto em 1999, Castelinjs estudou o fenótipo epidérmico na psoríase recidivante, usando o 17-propionato de clobetasol sob oclusão hidrocolóide. Este observou que durante o tratamento houve diminuição do

Ki-67 abaixo da faixa de normalidade e, durante a recidiva, a expressão do Ki-67 aumentou na margem da lesão, mas este marcador ainda se encontrava abaixo do valor das lesões maduras. Wrone-Smith (1997), em estudo imunohistoquímico da psoríase, atestou que o Ki-67 somente cora células em proliferação, sendo negativo nas células epidérmicas em repouso. Os mesmos achados foram encontrados por Wiszniewski (2000). Hannuksela - Svahn, em 1999, demonstrou diminuição do Ki-67 nas lesões de psoríase após tratamento com PUVA, o que já tinha sido demonstrado por Kuijpers (1997), com o tratamento com corticóide tópico.

Gibbs e Ponec (2000) compararam o marcador Ki-67 na mucosa bucal, palato duro e epiderme humana e mostraram que os dois últimos são epitélios ortoqueratinizados, enquanto que a mucosa bucal é um epitélio não estratificado, diferença regulada por propriedades intrínsecas dos queratinócitos.

Tamura (2001) estudou as células proliferativas da unidade ungueal e da matriz lateral dorsal e ventral das unhas encravadas após cantotomia.

Siddiqui (2002) comparou, em quarenta e dois pacientes com Hanseníase, a resposta imunológica celular local por meio da intradermorreação do PPD na pele anestesiada e na pele com sensibilidade normal, encontrando aumento de Ki-67 no sítio da intradermorreação positiva.

Simonart (2002) avaliou a proliferação dos queratinócitos por meio do marcador Ki-67 no molusco contagioso, uma doença viral.

Ellis (2002) estudou o índice de proliferação através do Ki-67 na doença de Paget da mama e da vulva. Na doença de Paget da vulva o Ki-67 pode ser usado com o marcador prognóstico. Na doença de Paget da mama não foi encontrado correlação entre Ki-67 e o grau histológico do tumor. Hendricks (1994) demonstrou que o Ki-67 tem significância prognóstica no carcinoma espinocelular de vulva.

Lee (2002) mostrou os efeitos da radiação UVB na proliferação e diferenciação dos queratinócitos epidérmicos após 48 horas de radiação e usaram o Ki-67 como marcador.

Na doença de Bowen, comparando o Ki-67 com P53, Szekeres e Giacomoni (1994) não encontraram associação da expressão do P53 com a atividade proliferativa do Ki-67.

O Ki-67 pode ser usado na diferenciação do carcinoma basocelular e tricoepitelioma, o primeiro apresenta grande expressão do Ki-67 e o diagnóstico diferencial com tricoepitelioma é importante na conduta terapêutica (ABDELSAYED, 2000; BROWN e GATTER, 2002). Biesterfeld e Josef (2002) compararam a atividade de proliferação celular através do MIB-1 entre o queratoacantoma e o carcinoma espinocelular e demonstraram maior incidência no espinocelular em comparação ao queratoacantoma. Tilli (2003), em um estudo com Ki-67, demonstrou alta incidência do marcador no carcinoma basocelular (45%) quando comparado a queratose actínica, espinocelular e pele normal, cuja incidência foi de 11%. Em relação ao carcinoma basocelular o Ki-67 encontra-se aumentado quando se compara tumores primários e recidivados até três anos, sendo

que no segundo o marcador se encontra em maior porcentagem (YEREBAKAN, 2003). O aumento do marcador Ki-67 já havia sido verificado em tumores recidivados por Horlock (1998) que também encontrou aumento deste nos tumores basocelulares infiltrativos ou tipo morféia.

O carcinoma basocelular pode apresentar uma regressão parcial ou total conforme o estímulo imune local. Hunt (1994) estudou o infiltrado celular de tumores basocelulares primários demonstrando regressão antiga, ativa ou sem presença de regressão. O marcador Ki-67 foi estudado nestes tumores e o autor concluiu que o aumento das células proliferativas nos tumores com regressão ativa não é significante e sugeriu que os linfócitos parcialmente ativados não estariam na fase do ciclo de proliferação, em compensação, o aumento do marcador foi significante nas lesões antigas denotando que o Ki-67 não diferencia as células proliferativas das células estromais ou tumorais.

Outros marcadores de proliferação celular são relatados na literatura e podem determinar a velocidade da divisão celular.

Baisch e Gerdes (1987, apud BROWN e GATTER, 1990) observaram diferença importante entre a medida da proliferação celular avaliada pelo Ki-67, quando comparada a colchicina e bromodeoxiuridina.

Rose (1994) comparou cinco marcadores de proliferação celular: Ki-67 monoclonal e policlonal, MIB1, PC10 (anticorpo monoclonal que reconhece o antígeno de proliferação celular; o PCNA) e JC1(anticorpo monoclonal que reconhece uma proteína nuclear associada com a proliferação celular), concluindo que os marcadores ideais são o MIB-1 e o Ki-67 policlonal, seguidos do JC1, PC10 e Ki-67 monoclonal. À mesma conclusão chegou

Welzel (1998) em estudo com três marcadores de proliferação celular, PCNA, MIB-1 e KiS1: o MIB-1 é o marcador mais apropriado.

Verheijen (1989) descreveu a similaridade do antígeno Ki-67 com a DNA topoisomerase II na proliferação celular; Kuijpers (1997) demonstrou no tratamento da psoríase com corticóide tópico uma diminuição importante de dois marcadores de proliferação celular bem estabelecidos; Ki-67 e CK16 (citoqueratina 16). Brown e Gatter (1990) relataram outros marcadores de proliferação celular como: anti-PAA, C5F10 e anti-DNA polimerase. Nagasaka (1999) demonstrou a expressão da ciclina D, uma proteína reguladora da fase G1 no ciclo celular, pois promove a progressão da fase G1 para a fase S, no nevo de Spitz e melanoma maligno. Noszczyk (2001) demonstrou a ação do anticorpo monoclonal 4A4 contra o antígeno P63, membro da família do P53, que marca queratinócitos com alto potencial de proliferação e compara este com o marcador Ki-67 na regeneração epidérmica humana.

Gerdes (1984) definiu o anticorpo monoclonal Ki-67 como método simples e rápido na determinação da fração de crescimento da célula humana; o que tem particular interesse em tumores malignos.

Brown (1988 e1990) definiu o anticorpo monoclonal Ki-67 como marcador rápido e eficiente na estimativa da fração de crescimento tumoral.

Skytting (1999) afirmou que a função do Ki-67 é indeterminada, mas que ele é um marcador de proliferação celular bem estabelecido e que o MIB-1 é considerado marcador de proliferação mais sensível que o índice mitótico.

Utilizando-se o Ki-67 os índices mitóticos podem ser mais bem avaliados até quatro vezes em relação a marcadores como a histona, que depende da replicação do H2B, H3 e H4 para uma hibridização não-isotópica *in situ* (NISH) e a bromodeoxiuridina (BrdU) ou a timidina tritiada que atua na fase S da divisão celular (TAMURA, 2001).

Em uma revisão realizada por Brown e Gatter, em 2002, o número de artigos publicados em relação ao Ki-67 nos últimos dez anos aumentou de 338 para 3489, mostrando o valor deste marcador.

Tendo em vista as vantagens demonstradas pelos autores supra citados e dando continuidade ao trabalho pioneiro de esfoliação pelo AP em pele de porco por Kadunc (1998), escolhemos este marcador de proliferação celular para avaliar esta substância imunohistoquimicamente.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é estudar os efeitos do ácido pirúvico 80% associado a uma gota de óleo de cróton por 5mls diluídos em álcool absoluto na pele fotoenvelhecida dos antebraços e dorso das mãos de pacientes do sexo feminino, após quatro sessões quinzenais de esfoliação, avaliando os resultados clínicos, anatomopatológicos e imunohistoquímico da proliferação celular por meio do marcador Ki-67.

CASUÍSTICA

Foi estudado um grupo de 22 pacientes, do sexo feminino, com idade entre 50 e 75 anos (média 62,5) do Ambulatório de Inestética do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no ano 2002. Todos os pacientes apresentavam fototipo I a III (FITZPATRICK, 1988) e sinais clínicos de fotoenvelhecimento nos antebraços e dorso das mãos. Os procedimentos apenas tiveram início após a assinatura do termo de consentimento (anexo), o qual também continha explicações sobre as atividades diárias da pesquisa, possíveis efeitos colaterais e proteção, bem como acompanhamento quinzenal do doente.

Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram:

- a) pacientes do sexo feminino;
- b) idade entre 50-75 anos;

- c) cor branca (fototipo I a III, FITZPATRICK, 1988);
- d) apresentando pele fotoenvelhecida dos antebraços e dorso das mãos;
- e) consentimento assinado após ampla explicação.

Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram:

- a) uso prévio de método abrasivo ou substância queratolítica antes do procedimento;
- b) doenças clínicas como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, doenças neurológicas ou psiquiátricas, cardiopatia, discrasias sangüíneas, hepatopatia ou nefropatia e cirurgias recentes;
- c) paciente com tendência à formação de quelóide ou cicatriz hipertrófica;
- d) gravidez ou lactação;
- e) fotótipo acima de III (FITZPATRICK, 1988).

Suspensão do paciente da pesquisa

Critérios de suspensão do paciente da pesquisa foram:

- a) resposta exagerada pelo produto (ácido pirúvico a 80%), mas que justificasse a retirada do paciente da pesquisa;

- b) sensibilidade por qualquer substância utilizada, seja na esfoliação ou na proteção solar;
- c) infecções intercorrentes por outros motivos;
- d) intolerância ao método usado (ardor, dor, queimação excessiva);
- e) tratamento descontínuo (foram excluídos pacientes que faltaram nas datas marcadas ou usaram outros métodos abrasivos durante o tratamento).

MÉTODO

Avaliação clínica

Os antebraços e dorso das mãos foram fotografados antes do procedimento e realizada biópsia prévia no canto externo do antebraço esquerdo, ao nível da prega cubital com *punch* descartável número 4, após anestesia com lidocaína 2% e suturado com fio mononylon 4.0.

Após sete dias da biópsia foi retirado o ponto e realizado a primeira sessão de esfoliação química com AP 80% adicionado 1 gota de óleo de cróton a cada 5ml em álcool absoluto. A substância utilizada foi preparada de acordo com a farmacopéia brasileira. Segundo Hetter (1999a e b), o ideal é que 1ml de óleo de cróton seja igual a 25 gotas, sendo assim, uma gota equivale a 0,04ml da substância.

Antes de cada sessão de esfoliação os dois antebraços e dorso das mãos foram desengordurados com acetona e gaze. Após este procedimento, o AP a 80% adicionado uma gota de óleo de cróton foi aplicado com gaze nos locais previamente desengordurados em duas camadas, respeitando sempre o sentido de baixo para cima durante a aplicação e sempre com a mesma pressão.

Após quinze minutos da aplicação os locais foram lavados com água corrente abundante.

Os pacientes foram orientados a usarem vaselina no período de descamação e filtro solar.

As esfoliações foram realizadas a cada quinze dias no total de quatro sessões.

Após dois meses da última sessão foi realizada biópsia de controle ao lado da anterior e controle fotográfico. As biópsias, antes e após as esfoliações, foram emersas em formol 10% e encaminhadas ao setor de Dermatopatologia.

Acompanhamento pós-pesquisa

Os pacientes foram acompanhados após as esfoliações químicas e nos casos em que persistiram lesões cutâneas actínicas, o tratamento foi complementado com crioterapia pelo próprio pesquisador.

Critérios de avaliação clínica

Os pacientes foram avaliados clinicamente antes e após as esfoliações e classificados em ausente, leve, moderado e intenso, conforme o grau de melhora (Figura 1). Foram avaliados:

- ❖ fotoenvelhecimento (elastose clínica, rugas superficiais e profundas)
- ❖ clareamento da melanose solar
- ❖ melhora das queratoses actínicas

Figura 1 – Avaliação clínica: A, C e E - avaliação pré às quatro sessões de esfoliação química pelo AP 80%. B, D e F – avaliação pós dois meses a quarta esfoliação pelo AP 80%.

Critérios de avaliação histopatológica

As lâminas foram avaliadas pela coloração hematoxina eosina comparando-se as alterações cutâneas, antes e após o tratamento, classificadas em ausente, leve, moderada e intensa, segundo o grau de melhora (nos itens hiperqueratose, atipia celular e degeneração basofílica do colágeno), e ausente ou presente (nos itens acantose ou atrofia e retificação da epiderme – Figura 2). Foram avaliadas:

- ❖ epiderme
 - hiperqueratose
 - acantose ou atrofia
 - atipia celular
 - retificação da epiderme
- ❖ derme
 - degeneração basofílica do colágeno

Figura 2 – Avaliação histopatológica. Observa-se hiperqueratose discreta, epiderme levemente atrofiada e retificada, leve atipia das células e degeneração basofílica do colágeno importante. A) HE (50x) B) HE (80x).

Critérios de avaliação imunohistoquímica

Marcador Ki-67

O marcador escolhido para este estudo foi a antígeno Ki-67 da Dako. Utilizou-se o método SABC (Biotina e complexo estreptoavidina conjugada com enzima peroxidase) e aplicada a seguinte técnica:

- ❖ os cortes histológicos parafinados foram cortados a três micras, pescados em lâminas preparadas com 3-aminopropil trietoxisilane (APES - Sigma), evitando que as secções descolassem e mantidos em estufa a 60°C durante 24 horas;
- ❖ posteriormente foram desparafinados em três trocas de xilol e hidratados;
- ❖ foi realizada quebra das ligações aldeídicas (desmascaramento dos antígenos), por meio de aquecimento dos preparados histológicos imersos em tampão citrato (solução de ácido cítrico 0,01M, pH 6.0), dois ciclos no forno de microondas com duração de dez minutos cada na potência máxima;
- ❖ os cortes foram lavados em água destilada e com três trocas de PBS (solução tampão salina fosfato);
- ❖ a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 10 V (3 ml de H₂O₂ em 100 ml de PBS) e realizadas três trocas de dez minutos;
- ❖ os cortes foram novamente lavados em água destilada com quatro trocas de PBS;
- ❖ foi adicionado o anticorpo primário diluído em BSA (solução de albumina bovina), Cod. A-8022 (Sigma) 1% em PBS e incubado por uma noite;

- ❖ seguiu-se lavagem em três trocas de PBS;
- ❖ foram secados ao redor dos cortes e acrescentado o anticorpo secundário biotinilado por quarenta minutos a 40°C em câmara úmida;
- ❖ foram lavados em solução PBS, três trocas;
- ❖ secados ao redor dos cortes e acrescentado à streptoavidina conjugada com peroxidase a 40°C por uma hora;
- ❖ lavados em PBS e revelada a reação com tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB) nº 5637 (Sigma) a 0,04% em PBS; filtrados e acrescentados 6 ul de peróxido de hidrogênio a 20 V à solução reveladora e as lâminas foram mergulhadas durante quatro minutos;
- ❖ lavados em água destilada;
- ❖ contracolorados com hematoxilina de Harris por dois minutos ;
- ❖ lavados em água, desidratados e montados em meio permanente (GERDES,1983 ; KREIPE,1993; SUURMEIJER,1999).

As lâminas foram divididas em campos; a epiderme em cada campo foi medida pelo programa de computador “Pró Image” e as células coradas foram contadas manualmente (Figura 3). Foi realizada a média da medida da epiderme e das células; a média das células foi dividida pela média da medida da epiderme, obtendo-se o número médio de células coradas por lâmina. Esse número foi avaliado antes e após as quatro sessões de esfoliações química (Figura 4).

Média das células coradas = média de células coradas por lâmina
Média medida epiderme

Figura 3 – Medida realizada pelo programa de computador pró-imagem (traçado). Detalhe da célula em proliferação corada pelo marcador imunohistoquímico Ki-67 (seta).

Figura 4 – Avaliação imunohistoquímica. A) avaliação pré às quatro sessões de esfoliação química com AP 80% pelo marcador imunohistoquímico Ki-67. B) avaliação pós dois meses a quarta sessão de esfoliação química com AP 80% pelo marcador imunohistoquímico Ki-67.

Método Estatístico

Para análise dos resultados foram aplicados os seguintes testes:

1) Teste de Kappa (LANDIS, 1977)

Este teste estuda as concordâncias das avaliações antes e depois do tratamento para cada tipo de diagnóstico separadamente

2) Teste G de Cohran (SIEGEL, 1988)

Este teste estuda a concomitância de resultados nas quatro consultas efetuadas

3) Teste de Wilcoxon (SIEGEL, 1988)

Para estudar o comportamento da medida obtida pela média do número de células dividida pela média da medida da epiderme antes e após quatro esfoliações pelo AP 80%. Fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade assinalando-se com asterísco os valores significantes.

RESULTADOS

As vinte e duas pacientes deste estudo foram avaliadas clinicamente, mas apenas dezenove puderam ser avaliadas histo e imunohistoquimicamente devido a problemas técnicos na realização das biópsias de controle.

Clínico

Clinicamente as pacientes foram avaliadas em relação ao fotoenvelhecimento, queratose actínica e melanose solar, e classificadas em ausente, leve, moderada e intensa, dependendo do grau de acometimento (Tabela 1). A epidermólise foi avaliada em cada sessão de esfoliação e classificada em presente ou ausente (Tabela 5).

Tabela 1 - Resultado clínico dos pacientes, segundo a intensidade no envelhecimento cutâneo, lesões de queratose actínica e melanose solar antes e após as esfoliações químicas com AP 80%

paciente	fotoenvelhecimento		queratose actínica		melanose solar	
	antes	após	antes	após	antes	após
1	leve	leve	ausente	ausente	leve	leve
2	intenso	intenso	intenso	moderado	intenso	intenso
3	intenso	moderado	intenso	leve	intenso	moderado
4	moderado	leve	ausente	ausente	moderado	moderado
5	intenso	moderado	intenso	moderado	intenso	intenso
6	moderado	leve	intenso	moderado	moderado	moderado
7	leve	leve	ausente	ausente	leve	leve
8	moderado	leve	intenso	leve	moderado	leve
9	leve	leve	ausente	ausente	leve	leve
10	intenso	moderado	intensa	leve	intenso	moderado
11	leve	leve	ausente	ausente	leve	leve
12	moderado	leve	moderado	ausente	moderado	moderado
13	moderado	leve	moderado	leve	moderado	moderado
14	moderado	leve	moderado	leve	moderado	moderado
15	moderado	leve	moderado	leve	moderado	moderado
16	moderado	moderado	moderado	leve	moderado	moderado
17	moderado	leve	moderado	leve	moderado	moderado
18	intenso	leve	intenso	leve	moderado	moderado
19	moderado	leve	moderado	ausente	moderado	leve
20	moderado	leve	moderado	leve	moderado	moderado
21	moderado	leve	moderado	ausente	moderado	moderado
22	intenso	moderado	intenso	leve	intenso	intenso

1) Fotoenvelhecimento

Na avaliação do fotoenvelhecimento na pré-esfoliação doze pacientes (54,54%) apresentaram grau moderado; quatro (18,18%), grau leve; e seis pacientes (27,27%), grau intenso. Após dois meses da última sessão de esfoliação, os casos leves mantiveram o grau de fotoenvelhecimento, dos doze pacientes com grau moderado apenas um (4,54%) não apresentou melhora, enquanto onze pacientes (50%) apresentaram grau leve; e dos seis com grau intenso, um (4,54%) não melhorou, quatro (18,18%) passaram a ser classificados como moderado e um (4,54%) apresentou uma melhora importante sendo classificado como leve (Tabela 2).

No teste de Mc Nemar obtivemos um resultado estatisticamente significativo, 72,7% de pacientes melhorados (abaixo da diagonal), confirmado pelo teste de Kappa.

Tabela 2 - Pacientes segundo o grau de melhora clínica no fotoenvelhecimento antes e após as esfoliações químicas com AP 80%.

Antes	DEPOIS				TOTAL
	AUSENTE	LEVE	MODERADO	INTENSO	
Ausente	0	0	0	0	0
Leve	0	4	0	0	4
Moderado	0	11	1	0	12
Intenso	0	1	4	1	6
Total	0	16	5	1	22

Teste Kappa = (kw) 0,18 $z_{calc} = 0,06(ns)$ $z_{crit} = 1,96$

Teste de Mc Nemar = $X^2_{calc} = 16,00^*$ ($p < 0,001$) $X^2_{crit} = 3,84$

Concordância diagonal = 27,3%

Acima da diagonal (piora) = 0%

Abaixo da diagonal (melhora) = 72,7%

2) Queratose actínica

Das vinte e duas pacientes estudadas, apenas dezessete (77,27%) apresentaram lesões de queratose actínica, destas, nove (52,94%) pacientes apresentaram grau moderado de lesões na pré-esfoliação, sendo que três (17,64%) apresentaram regressão total das lesões e seis (35,29%) passaram a grau leve. As outras oito pacientes (47,05%) apresentaram grau intenso de lesões, destas, cinco (9,41%) passaram a grau leve e três (17,64%) a grau moderado.

O teste Kappa e o teste de Mc Nemar (77,3%) foram estatisticamente significantes (Tabela 3).

Tabela 3 - Pacientes segundo o grau de melhora clínica das queratoses actínicas antes e após as esfoliações químicas com AP 80%

Antes	DEPOIS				TOTAL
	AUSENTE	LEVE	MODERADO	INTENSO	
Ausente	5	0	0	0	5
Leve	0	0	0	0	0
Moderado	3	6	0	0	9
Intenso	0	5	3	0	8
Total	8	11	3	0	22

Teste Kappa = (kw) 0,24 zcalc = 1,49(ns) zcrit = 1,96

Teste de Mc Nemar = X^2 calc = 17,00* ($p < 0,001$) X^2 crit = 3,84

Concordância diagonal = 22,73%

Acima da diagonal (piora) = 0%

Abaixo da diagonal (melhora) = 77,3%

3) Melanose solar

Em relação à melanose solar, quatro pacientes (18,18%) apresentaram lesões leves e continuaram com a mesma classificação na pós-esfoliação. Treze pacientes (59,09%) foram classificadas como moderada e apenas uma (4,54%) melhorou, passando a leve; as outras

mantiveram a mesma classificação. Cinco pacientes (22,72%) apresentaram grau intenso de lesões, sendo que duas (9,09%) passaram a moderado e três (13,63%) continuaram com o mesmo resultado.

O teste Kappa e o teste de Mc Nemar mostraram um resultado significativo na concordância diagonal (86,4%), ou seja, os pacientes mantiveram a mesma classificação (Tabela 4).

Tabela 4 - Pacientes segundo o grau de melhora clínica das lesões de melanose solar antes e após as esfoliações químicas com AP 80%

Antes	DEPOIS				TOTAL
	AUSENTE	LEVE	MODERADO	INTENSO	
Ausente	0	0	0	0	0
Leve	0	4	0	0	4
Moderado	0	1	12	0	13
Intenso	0	0	2	3	5
Total	0	5	14	3	22

Teste Kappa = (kw) 0,78 $z_{calc} = 4,87(ns)$ $z_{crit} = 1,96$

Teste de Mc Nemar = $X^2_{calc} = 3,00^*$ ($p < 0,001$) $X^2_{crit} = 3,84$

Concordância diagonal = 86,4%

Acima da diagonal (piora) = 0%

Abaixo da diagonal (melhora) = 13,6%

4) Epidermólise

Foi avaliada a presença ou não de epidermólise em cada sessão de esfoliação química pelo ácido pirúvico 80% e, dos vinte e dois pacientes, quatro apresentaram epidermólise na primeira sessão, seis na segunda, cinco na terceira e quatro na quarta. Não apresentaram epidermólise doze pacientes (Tabela 5).

Aplicando-se o teste G de Cochran, achou-se um $G = 0,95$, o que significa que a porcentagem de epidermólise presente não foi estatisticamente significativa.

Teste G de Cochran

$G_{\text{calc}} = 0,95$

$G_{\text{crit}} = 7,82$

Tabela 5 - Presença de epidermólise durante as quatro sessões de esfoliação química pelo AP 80%

Paciente	1	2	3	4
1	-	-	-	+
2	+	+	+	+
3	-	+	-	-
4	+	-	-	--
5	+	-	+	-
6	-	+	-	-
7	-	+	+	+
8	-	-	+	-
9	-	+	-	-
10	+	+	+	+
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
Total	4	6	4	4
%	18	27	18	18

5) Efeitos Colaterais

Neste estudo se observou somente dois casos com efeitos indesejáveis:

- 1) dois pacientes (9,09%) com prurido importante;
- 2) um paciente (4,54%) com algumas lesões vesicobolhosas, porém não deixaram cicatrizes residuais.

Histopatológico

Na epiderme foram avaliadas a hiperqueratose, acantose ou atrofia, atipia celular, retificação da epiderme, enquanto na derme foi avaliada a degeneração basofílica do colágeno (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados dos parâmetros histopatológicos antes e após as esfoliações químicas com AP 80%

PACIENTE	EPIDERME								DERME	
	Hiperqueratose		acantose / atrofia		atipia		retificação da epiderme		degeneração basofílica do colágeno	
	antes	Depois	antes	depois	antes	depois	antes	depois	antes	depois
1	L	L	AT	AT	L	L	P	P	I	I
2	I	I	AC	AT	I	L	A	P	I	I
3	I	L	atr	AT	I	L	P	P	I	I
4	L	M	atr	AT	I	L	P	P	I	I
5	I	I	aca	AT	L	L	A	P	I	I
6	M	I	aca	AC	L	L	A	A	I	I
7	M	M	atr	AT	L	L	P	P	I	I
8	L	L	atr	AT	L	L	P	P	I	I
9	L	L	atr	AT	L	L	P	P	L	L
10	M	L	atr	AT	M	L	P	P	M	M
11	L	L	AT	AT	L	L	P	A	M	M
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	M	M	AT	AT	L	L	P	P	I	I
14	L	M	AT	AT	L	L	P	P	I	I
15	L	M	AC	AT	L	L	A	P	I	I
16	M	L	AC	AT	I	L	A	P	I	M
17	L	L	AT	AT	L	L	A	P	M	M
18	L	L	AT	AT	L	L	A	P	M	M
19	M	L	AC	AT	M	L	A	P	M	M
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	I	L	AC	AT	I	M	A	P	I	I
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L = leve

M = moderado

I = intenso

AT = atrofia

AC = acantose

P = presente

A = ausente

Epiderme

1) Hiperqueratose

Ao estudar o grau de hiperqueratose pré e pós as quatro esfoliações com ácido pirúvico 80% observou-se que dez pacientes (52,62%) mantiveram a mesma classificação antes e depois, sendo sete (36,84%) leve, dois (10,52%) moderado e um (5,26%) intenso. Os outros pacientes, três (15,78%) apresentaram hiperqueratose moderada e passaram para leve, um paciente (5,26 %) passou de moderado para intenso, dois (10,52%) de intenso para leve e um (5,26%) de intenso para moderado (Tabela 7).

O teste Kappa e o teste de Mc Nemar mostraram uma porcentagem alta e significativa (52,6%) de pacientes que mantiveram o mesmo resultado antes e após as esfoliações.

Tabela 7 - Avaliação da hiperqueratose antes e após as esfoliações químicas com AP 80%

Antes	DEPOIS				TOTAL
	AUSENTE	LEVE	MODERADO	INTENSO	
Ausente	0	0	0	0	0
Leve	0	7	2	0	9
Moderado	0	3	2	1	6
Intenso	0	2	1	1	4
Total	0	12	5	2	19

Teste Kappa = (kw) 0,26 $z_{calc} = 1,25(ns)$ $z_{crit} = 1,96$

Teste de Mc Nemar = $X^2_{calc} = 1,00^*$ ($p < 0,001$) $X^2_{crit} = 3,84$

Concordância diagonal = 52,6%

Acima da diagonal (piora) = 15,8%

Abaixo da diagonal (melhora) = 31,6%

2) Acantose ou Atrofia

Dos dezenove pacientes, doze (63,15%) apresentavam atrofia pré-esfoliação e mantiveram o mesmo padrão, seis (31,57%) passaram de acantose para atrofia e um (5,26%) manteve acantose antes e após as quatro esfoliações (Tabela 8).

O teste Kappa e o teste de Mc Nemar mostraram uma porcentagem alta e significativa (68,4%) de pacientes que mantiveram o mesmo resultado antes e após as esfoliações

Tabela 8 - Avaliação da presença de acantose ou atrofia antes e após as esfoliações químicas com AP 80%

Antes	DEPOIS		TOTAL
	ATROFIA	ACANTOSE	
Atrofia	12	0	12
Acantose	6	1	7
Total	18	1	19

Teste Kappa = (kw) 0,17 zcalc = 2,17(ns) zcrit = 1,96

Teste de Mc Nemar = X^2 calc = 8,17* (p<0,001) X^2 crit = 3,84

Concordância diagonal = 68,4%

Acima da diagonal (piora) = 0%

Abaixo da diagonal (melhora) = 31,6%

3) Atipia celular

Na atipia celular, doze pacientes mantiveram no pré e pós o mesmo padrão leve de alteração (63,15%), dois (10,52%) passaram de moderado para leve, quatro (21,05%) de intenso para leve e um (5,26%) de intenso para moderado (Tabela 9).

O teste Kappa e o teste de Mc Nemar mostraram uma porcentagem alta e significativa (63,2%) de pacientes que mantiveram o mesmo resultado antes e após as esfoliações.

Tabela 9 - Avaliação da atipia celular antes e após as esfoliações químicas com AP 80%

Antes	DEPOIS				TOTAL
	AUSENTE	LEVE	MODERADO	INTENSO	
Ausente	0	0	0	0	0
Leve	0	12	0	0	12
Moderado	0	2	0	0	2
Intenso	0	4	1	0	5
Total	0	18	1	0	19

Teste Kappa = (kw) 0,10 $z_{calc} = 4,91(ns)$ $z_{crit} = 1,96$

Teste de Mc Nemar = $X^2_{calc} = 7,00^*$ ($p < 0,001$) $X^2_{crit} = 3,84$

Concordância diagonal = 63,2%

Acima da diagonal (piora) = 0%

Abaixo da diagonal (melhora) = 36,8%

4) Retificação da epiderme

Na avaliação deste item oito pacientes (42,10%) apresentaram epiderme não retificada que se tornou retificada na pós-esfoliação, um (5,26%) apresentava epiderme retificada presente e passou para ausente,

um (5,26%) apresentava ausência de retificação antes e depois das esfoliações e nove pacientes (47,36 %) mantiveram a epiderme retificada no pré e pós (Tabela 10).

O teste Kappa e o teste de Mc Nemar mostraram uma porcentagem alta e significativa (52,6%) de pacientes que mantiveram o mesmo resultado antes e após as esfoliações.

Tabela 10 - Avaliação da presença de retificação da epiderme antes e após as esfoliações químicas com AP 80%

Antes	DEPOIS		TOTAL
	AUSENTE	PRESENTE	
Ausente	1	8	9
Presente	1	9	10
Total	2	17	19

Teste Kappa = (kw) 0,1 zcalc = 0,08(ns) zcrit = 1,96

Teste de Mc Nemar = X^2 calc = 4,00* (p<0,001) X^2 crit = 3,84

Concordância diagonal = 52,6%

Acima da diagonal (piora) = 42,1%

Abaixo da diagonal (melhora) = 5,3%

Derme

5) Degeneração Basofílica do Colágeno

Na avaliação da degeneração basofílica do colágeno dezoito pacientes (94,73%) mantiveram o mesmo padrão antes e após, sendo um (5,26%) leve, cinco (27,77%) moderado e doze (63,15%) intenso. Apenas um paciente (5,26%) apresentou alteração de intenso para moderado (Tabela 11).

O teste Kappa e o teste de Mc Nemar mostraram uma porcentagem alta e significativa (94,7%) de pacientes que mantiveram o mesmo resultado antes e após as esfoliações.

Tabela 11 - Avaliação da degeneração basofílica do colágeno antes e após as esfoliações químicas com AP 80%

Antes	DEPOIS				TOTAL
	AUSENTE	LEVE	MODERADO	INTENSO	
Ausente	0	0	0	0	0
Leve	0	1	0	0	1
Moderada	0	0	5	0	5
Intensa	0	0	1	12	13
Total	0	1	6	12	19

Teste Kappa = (kw) 0,91 zcalc = 4,55(ns) zcrit = 1,96

Teste de Mc Nemar = X^2 calc = 1,00* (p<0,001) X^2 crit = 3,84

Concordância diagonal = 94,7%

Acima da diagonal (piora) = 0%

Abaixo da diagonal (melhora) = 5,3%

Imunohistoquímico

Avaliação das células proliferativas por meio do marcador Ki-67

As células proliferativas foram avaliadas antes e após as quatro sessões de esfoliação química pelo ácido pirúvico 80%. Comparou-se o número médio de células por lâmina antes e após as quatro sessões de esfoliação química de cada paciente, obtendo-se oito (42,10%) pacientes com diminuição das células na pós-esfoliação, um paciente (5,26%) com resultado inalterado e dez pacientes (52,63%) com aumento das células (Tabela 12). Apesar da maioria dos pacientes apresentar aumento das células no pós, quando se aplica o método estatístico, o teste de Wilcoxon, este aumento não é estatisticamente significativo.

Média	0,01	0,01
mediana	0,01	0

Teste de Wilcoxon

$Z_{\text{calc}} = 0,24$

$Z_{\text{crit}} = 1,96$

Tabela 12 - Tabela da média do número de células dividido pela média da medida da epiderme antes e após esfoliação pelo ácido pirúvico

Paciente	MÉDIA DO NÚMERO DE CÉLULAS / MÉDIA DA MEDIDA DA EPIDERME	MÉDIA DO NÚMERO DE CÉLULAS / MÉDIA DA MEDIDA DA EPIDERME	
	antes	depois	
1	0,0061	0,0049	diminuição
2	0,0170	0,0061	diminuição
3	0	0,0013	aumento
4	0,0005	0,0037	aumento
5	0	0	inalterado
6	0,0028	0,0024	diminuição
7	0,0053	0,0097	aumento
8	0,0055	0,0104	aumento
9	0,0032	0,0013	diminuição
10	0	0,0090	aumento
11	0,0092	0,0106	aumento
13	0,0109	0,0126	aumento
14	0,0119	0	diminuição
15	0,0003	0,0352	aumento
16	0,0089	0	diminuição
17	0,0098	0,0099	aumento
18	0,0048	0,0031	diminuição
19	0,0003	0,0031	aumento
21	0,0704	0,0100	diminuição

DISCUSSÃO

Poucos são os relatos na literatura do uso do ácido pirúvico nas esfoliações químicas e por isso a importância do estudo dessa substância nesta pesquisa.

No presente estudo com ácido pirúvico, a concentração utilizada foi 80%, uma vez já demonstrada sua segurança por Kadunc (1998), que verificou fraca ação do ácido a 60%, tanto em nível clínico como histológico. A autora demonstrou que o poder de ação do AP aumenta com o aumento da concentração, que a 100% o ácido é extremamente forte e possui alto poder epidermolítico, causando fortes reações, e com isso demonstrou segurança no uso deste ácido nas concentrações de 60, 70 e 80%; contrário aos estudos de Cisneros (1996), que definem o AP 80% como doloroso e com risco para formação de cicatrizes. Outros autores como Griffin (1989 apud KADUNC, 1998), usaram o ácido pirúvico em esfoliações químicas nas concentrações 40,60 e 80%; e Van Scott e Yu (1989) usaram o ácido a 50% (apud KADUNC, 1998). Moy (1996) comparou vários agentes químicos para esfoliação na pele de porco, entre eles ATA, fenol, AG e AP 50 e 100%.

Neste estudo utilizou-se o veículo alcóolico para diluição do AP já que o gel e o veículo aquoso podem diminuir a penetração da substância (KADUNC, 1998).

O preparo prévio da pele foi realizado desengordurando-a com gaze e acetona, que segundo o trabalho de Kadunc (1998), ao contrário do álcool, se mostrou mais eficiente.

No presente estudo associamos uma gota de óleo de cróton a 5ml do ácido para melhor penetração e uniformidade da substância, sem aumentar seu poder epidermolítico.

Kadunc (1998) observou distribuição pouco homogênea da substância com alterações focais com o AP sem aditivos, e com a adição de óleo de cróton a esfoliação apresentou caráter mais uniforme. Cisneros (1996) usou o AP 60% associado ao óleo de cróton e sabão líquido em formulação semelhante à de Baker para o fenol, classificando o AP com potência entre o ATA e o fenol, denominando esta fórmula de “AP modificado”. Stuzin (1998) demonstrou uma melhor penetração com resultado mais profundo da esfoliação com a fórmula de Baker-Gordon, devido à ação vesicante do óleo. Heeter (1999a e b) mostra a importância da associação do óleo de cróton ao fenol na profundidade da esfoliação.

O aumento do atrito ou pressão exercida no momento da esfoliação e o aumento da quantidade do volume da substância resultam em aprofundamento da esfoliação química, sendo assim, estas variáveis devem ser consideradas nas esfoliações com o AP 80% (KADUNC, 1998; SLAVIN, 1998).

Neste estudo a gaze foi molhada com o ácido pirúvico e o excesso, retirado. Não foi realizado atrito no momento da aplicação das duas camadas, uniformizando dessa forma a aplicação do ácido pirúvico nesta pesquisa.

Como os alfa-hidroxiácidos, o ácido pirúvico possui necessidade de ser neutralizado após sua aplicação, o que pode ser feito com adição de bicarbonato de sódio 10% em solução aquosa ou água corrente.

No estudo realizado por Kadunc (1998) foram comparadas áreas neutralizadas e não neutralizadas e observou-se aumento da destruição do tecido na última área, demonstrando que a permanência do ácido por muito tempo aprofunda a necrose. Dessa maneira, o fator tempo de exposição é uma variável importante na esfoliação com o AP. O tempo de exposição avaliado foi cinco, dez e quinze minutos. Neste mesmo estudo foi observado que a exposição por quinze minutos é longa demais. Cisneros (1996) citou o tempo de exposição entre cinco e quinze minutos. Griffin e Van Scott (1991) usaram AP 60% puro ou associado a 5-flu 1% no tratamento de queratoses actínicas com tempo de exposição entre um e seis minutos.

No presente estudo o tempo de exposição foi quinze minutos e em seguida os pacientes lavaram a região com água corrente abundante para neutralizar o ácido. Foi usado o tempo máximo citado na literatura, mas não se observou aprofundamento exagerado da esfoliação.

O ácido pirúvico não possui toxicidade sistêmica devido a sua origem orgânica. Isso faz com que a substância possa ser usada em grandes áreas corpóreas e em qualquer localização do corpo. No presente estudo nenhum efeito sistêmico do ácido foi verificado durante o tratamento das pacientes.

Kadunc (1998) não observou efeitos tóxicos no estudo realizado na pele de porco e as complicações locais com ácido pirúvico não são citadas na literatura (CISNEROS, 1996; GRIFFIN e VAN SCOTT, 1991).

No presente estudo a esfoliação foi realizada nos antebraços e dorso das mãos e, apesar da localização não facial, não houve complicações inestéticas relacionadas a reepitelização local.

As esfoliações não faciais podem apresentar maiores complicações devido ao número e à densidade de anexos cutâneos presentes nestas regiões e responsáveis pela reepitelização cutânea (SWINERHART, 1992; RUBIN, 1995; KADUNC, 1998; SLAVIN, 1998).

No presente estudo apesar da localização não facial, tempo de exposição máximo citado na literatura como seguro para o procedimento e alta concentração, apenas três pacientes apresentaram complicações locais, sendo duas prurido importante e uma formação de bolhas sem cicatriz; contrário ao trabalho de Cisneros (1996), que define o AP 80% como possível substância capaz de formar cicatrizes.

Muitos foram os estudos com os alfafidroxiácidos no fotoenvelhecimento clínico, destacando-se os trabalhos principalmente com ácido glicólico, ácido cítrico e ácido láctico (RIDGE, 1990; ROENIGK, 1995; BRODY, 1996; STILLER, 1996; DITRE, 1996; TSE, 1996; BERNSTEIN, 1997; BERGFELD, 1997; SLAVIN, 1998; DUFFY, 1998; CLARK, 1999; MANALOTO e ALSTER, 1999; LAWRENCE, 2001; FUSCO, 2001). Coleman e Futrell (1994) combinaram ácido glicólico 70% e ATA 35% no tratamento do fotoenvelhecimento acentuado.

O ácido pirúvico foi utilizado no tratamento do fotoenvelhecimento por Griffin (1989 apud KADUNC, 1998) e Cisneros (1996) com boa resposta.

Neste estudo foi usado o ácido pirúvico 80% no tratamento do fotoenvelhecimento dos antebraços e dorso das mãos de 22 pacientes e avaliada, antes e após quatro sessões com intervalo quinzenal, a melhora da elastose clínica, rugas profundas e superficiais obtendo-se uma melhora estatisticamente significativa (72,7%). Resultado que coincide com os relatos da literatura citados acima, que demonstraram melhora do fotoenvelhecimento com o tratamento com alfa-hidroxiácido e alfacetoácido.

Em relação à melanose solar, não há citações na literatura do tratamento com o ácido pirúvico. Neste estudo observa-se que em 86,4% das pacientes não houve alteração das lesões antes e após as esfoliações.

No tratamento das queratoses actínicas, Griffin e Van Scott (1991) usaram o ácido pirúvico 60% isolado ou associado a 1% de 5-fu, seguido da aplicação do 5-fu 5% em creme por cinco, sete dias, com a finalidade de evidenciar as queratoses não detectáveis. Obtiveram cura das queratoses e diminuição da duração e dos efeitos colaterais do 5-fu.

No presente estudo observou-se melhora das lesões estatisticamente significantes em 77,3% das pacientes.

A ação do AHA resulta em diminuição da espessura e compactação da camada córnea, aumento da camada granulosa, normalização do padrão das cristas epiteliais e atipias basais, dispersão da melanina e aumento da espessura de epiderme viável (KADUNC, 1998; SLAVIN, 1998).

No presente estudo em relação à ação epidérmica, hiperqueratose (52,6%), presença de acantose ou atrofia (68,4%), atipia basal (62,3%) e retificação da epiderme (52,6%), avaliadas antes e após as esfoliações, se encontraram inalteradas, resultado contrário ao estudos citados na literatura que demonstram diminuição da camada córnea, aumento da espessura epidérmica e melhora da atipia celular.

A ação dérmica do AP, como outros alfafidroxiácidos, ocorre em concentrações mais altas por meio da epidermólise. Esta leva a um impacto sobre a derme com aumento da síntese de colágeno, melhora das fibras elásticas que se apresentam menos fragmentadas, mais longas e espessas e aumento da substância fundamental pela biossíntese de glicosaminoglicans. Kadunc (1998) observou na pele de porco, na coloração HE, presença de fibras colágenas na derme papilar e, na coloração de picro-sirus com luz polarizada, presença de colágeno tipo III neoformado, diferenciando-o do colágeno tipo I, que é mais antigo e estável. Relata também que, mesmo com o emprego de variáveis menos agressivas (como menor tempo de exposição, concentração, ausência de potencializadores), houve colágeno neoformado na derme papilar, o que concorda Moy (1996), que mostrou que o estímulo dérmico do AG e AP é desproporcional à extensão da agressão epidérmica da fase aguda, contrário ao ATA e fenol, cujo estímulo na derme é proporcional à agressão epidérmica. Neste estudo de Moy (1996) a medição dos níveis de destruição não foi quantitativa mas sim qualitativa, o que, segundo Kadunc (1998) se deve ao fato de AHA e ACA apresentarem epidermólise focal e irregular e não alterações histológicas lineares, em

faixa, que possam ser medidas milimetricamente; denotando desta maneira a absorção pouco homogênea da AP nas camadas mais profundas da derme, não sendo então recomendado para esfoliações químicas profundas.

Essa mesma idéia foi observada por Rubin (1995) que mencionou que as esfoliações com AG não são suficientemente profundas para causar necrose dérmica, mas que existe um efeito estimulatório específico sobre os fibroblastos, causando melhoras histológicas dérmicas com fenômenos inflamatórios menos intensos.

Cisneros (1996), com o uso do AP 60% modificado na pele humana no estudo histopatológico da fase aguda, encontrou destruição e necrose da epiderme, edema da derme papilar e homogeneização da derme reticular. Após quatro semanas observou hiperplasia epidérmica, espessamento da derme reticular, aumento dos fibroblastos e fibras elásticas, além da formação de colágeno novo, angiogênese e maior quantidade de glicosaminoglicans.

Griffin (1989 apud KADUNC, 1998) usou AP 40, 60 ou 80% e encontrou indução rápida de acantólise intraepidérmica e separação dermoepidérmica com colágeno neoformado na derme papilar e, em 1991, quando usou AP 60% no tratamento de queratose actínica encontrou uma faixa de colágeno neoformado espesso e eosinofílico de 0,02 a 0,32 mm de 3-8 semanas após o tratamento.

Das vinte e duas pacientes, quatro apresentaram epidermólise na primeira sessão, seis na segunda, cinco na terceira e quatro na quarta. Não apresentaram epidermólise doze pacientes. A avaliação da epidermólise não

foi estatisticamente significativa quando aplicado o teste G de Cochran ($G = 0,95$). Este resultado difere de Cisneros (1996), que julga o AP 80% muito potente e classifica a 60% modificado com potência entre o ATA e o fenol e contrário também ao estudo de Kadunc (1998) que propõe o uso do AP no tratamento do fotoenvelhecimento devido a sua capacidade de causar epidermólise.

A avaliação da ação dérmica do AP 80% foi feita por meio da degeneração basofílica do colágeno que não apresentou alterações após as quatro sessões de esfoliação química pela substância. Esse resultado é estatisticamente significativo (94,7%) e contrário aos estudos de Moy (1996), que mostraram efeito dérmico positivo e desproporcional ao epidérmico e ao de Kadunc (1998), que demonstrou aumento das fibras colágenas na derme papilar na coloração de picrossirus.

A ação dérmica da substância depende do grau de epidermólise causado no momento da aplicação que também se apresentou não significativo neste trabalho. Fato que colabora para um resultado não satisfatório na melhora da degeneração basofílica do colágeno.

Contrário a Cisneros (1996), este estudo não apresenta hiperplasia epidérmica, espessamento da derme reticular e formação de colágeno novo como citado pelo autor com o uso do AP 60% modificado.

No presente estudo a ação epidérmica e a ação dérmica da substância foram contrárias à maioria dos trabalhos da literatura, que mostra melhora histopatológica, tanto da epiderme quanto da derme. Mas isso talvez possa ser justificado pela penetração pouco homogênea do ácido com

alterações apenas focais e irregulares na histopatologia, fato este que também explica a indicação, segundo Kadunc (1998), do AP nas esfoliações médio-superficiais e contra-indica nas profundas. Podemos observar neste estudo uma ação superficial do ácido com melhora significativa apenas do fotoenvelhecimento clínico e das queratoses actínicas.

Neste estudo o Ki-67 foi escolhido como marcador de proliferação celular, pois se mostrou, segundo a literatura, um método rápido, simples e eficiente não apenas na estimativa da fração de crescimento tumoral como também um marcador de tecido reacional sendo assim bem estabelecido o seu uso na proliferação das células (GERDES, 1984; ROSE, 1994; BROWN, 1988 e 1990; SKYTTING, 1999; TAMURA, 2001; BROWN e GATTER, 2002). Foi usado para avaliação da estimulação e regeneração epidérmica antes e após as quatro sessões de esfoliação química com ácido pirúvico 80%, e mostrou um aumento das células proliferativas após dois meses da última sessão de esfoliação. As células encontraram-se diminuídas em oito pacientes (42,10%), um paciente (5,26%) apresentou resultado inalterado e dez pacientes (52,63%) apresentaram aumento das células proliferativas. Este resultado apesar de estar de acordo com o de Pierard (1997), que encontrou aumento da proliferação epidérmica avaliada por meio do Ki-67, quando comparou a tretinoína e o ácido salicílico, não foi estatisticamente significativo quando aplicado o teste de Wilcoxon (T calculado aproxima-se do normal – $Z = -0,24$). Por outro lado, Liew (1999) estudou a presença de células hiperproliferativas após injúria epidérmica por meio da coloração com Ki-67, antes e após laser ruby na remoção de pêlos,

e também não encontrou evidências de células hiperproliferativas após a irradiação. Dessa maneira demonstra-se que a proliferação celular na regeneração epidérmica após algum tipo de injúria depende do estímulo inicial e da sua potência; principalmente do estímulo epidérmico, devido ao fato do marcador ser indicado para células proliferativas epidérmicas; sendo assim, substâncias com ação dérmica mais importante que a epidérmica ou procedimentos com pouca ação na epiderme realmente podem apresentar-se como fracos estimuladores do marcador.

Wrone-Smith (1997) demonstrou, em estudo realizado em psoríase, que o Ki-67 apenas marca células na fase proliferativa. Fato também demonstrado por Hunt (1994) no estudo do infiltrado inflamatório de carcinomas basocelulares em regressão, em que demonstra aumento não significativo do marcador Ki-67 nos tumores em regressão ativa, principalmente quando comparado a tumores antigos, relatando que este fato se deve aos linfócitos presentes no infiltrado não estarem na fase de proliferação que poderia ser marcada pelo Ki-67. Isso mostra que, nos espécimes antes das esfoliações químicas, esse marcador se encontrava quase sempre negativo, pois as células encontravam-se em repouso. Porém após a esfoliação houve um estímulo da proliferação celular, uma vez que observamos um aumento na maioria dos pacientes estudados, embora não significativo.

Outras considerações precisam ser feitas em relação ao aumento não significativo das células proliferativas após as esfoliações químicas. O Ki-67 pode marcar células normais na epiderme numa porcentagem de 1-3%

(SOINI, 1994), o que também precisa ser considerado na avaliação da proliferação celular.

A fraca estimulação da epiderme também pode ser verificada pela avaliação da camada germinativa. Se o estímulo pelo ácido fosse eficiente, esta camada deveria estar aumentada após as esfoliações, ou seja, a acantose após as esfoliações deveria ser relevante no trabalho, dado que também não foi significativo. Estudo realizado por Rijzewijk (1992) define o Ki-67 como marcador da proliferação celular, por isso estaria relacionado ao “*turn over*” celular, enquanto o aumento das células germinativas estaria relacionado ao marcador Pab601, marcador citoplasmático do *pool* de células germinativas. Por isso, o Ki-67 é indicado apenas para proliferação celular e não avaliação da acantose.

Outros dados podem modificar a avaliação quantitativa do Ki-67 como estado nutricional, heterogeneidade tumoral, tamanho da biópsia e tempo do ciclo celular (BROWN e GATTER, 1990).

A avaliação de áreas centrais de lesões tumorais estaria prejudicada devido à necrose que estas apresentam, além de que, dependendo da área avaliada, alguns tumores podem apresentar regiões heterogêneas. Estes fatores não estão presentes neste estudo.

Um terceiro fator está relacionado ao tamanho da biópsia, fragmentos pequenos de pele prejudicariam a avaliação do marcador. Isso poderia estar relacionado ao presente estudo, mas seria inviável a realização da avaliação de grandes áreas tratadas, que apenas é possível em relação a um tumor ressecado em que poderia existir uma quantidade maior de material a ser

avaliado. Como se trata da avaliação do estado reacional da pele após tratamento do fotoenvelhecimento, aumentar o tamanho ou a quantidade das biópsias, implicaria maiores seqüelas aos pacientes, como intervenções cirúrgicas e cicatrizes.

Em adição a estes fatores que limitam a efetividade do marcador, inclui-se o fato de que o Ki-67 marca células em proliferação, mas não determina o tempo que essas células levam para completar o ciclo. Sendo assim, tumores que possuem poucas células em ciclo, mas com um ciclo curto, poderiam ter alto índice de proliferação, mas com poucas células Ki-67 positivas. Enquanto outro tumor com células que gastam muito tempo para divisão celular poderiam apresentar um número alto de células Ki-67 positivas, mas com índice baixo de proliferação.

Gerdes (1983) e Rijzewijk (1987) observaram que existe uma coloração citoplasmática no epitélio normal que, apesar de perder para a nuclear, pode dificultar a avaliação do número de células proliferativas. Como na preparação das lâminas coradas pelo marcador foi utilizada H_2O_2 , acredita-se que esta coloração citoplasmática não tenha prejudicado a avaliação, concordando assim com Fransson e Hammar (1992), que diminuíram essa coloração com adição da mesma substância.

O aumento não significativo do marcador Ki-67, após as esfoliações, confirma que tanto os AHA como os ACA são substâncias que apresentam estímulo epidérmico desproporcional ao estímulo dérmico e este, por sua vez, se apresenta tardiamente e mais intensamente que o epidérmico. O Ki-67 é um marcador de proliferação epidérmica que confirma, por um pequeno

aumento das células coradas, que o AP possui um estímulo epidérmico fraco e não homogêneo. Isso em concordância com os trabalhos de Moy (1996), que demonstra na avaliação histopatológica a desproporção do estímulo epidérmico e dérmico, e com Kadunc (1998), que afirma que o AP é uma substância de penetração pouco homogênea, com alterações apenas focais e irregulares na histopatologia, por isso a sua indicação nas esfoliações médio-superficiais.

Os resultados discutidos certamente poderão ser melhorados por meio de novas pesquisas, seja modificando os métodos preparatórios da esfoliação, seja alterando a concentração do ácido pirúvico, aumentando o tempo de exposição e ou mesmo fazendo uso de associação com outro método esfoliativo.

CONCLUSÕES

A esfoliação com o ácido pirúvico 80% em álcool absoluto com uma gota de óleo de cróton a cada 5ml após quatro aplicações quinzenais, com tempo de exposição de quinze minutos por sessão revelou:

- 1) Houve melhora acentuada do quadro clínico relacionado ao envelhecimento cutâneo em 72,7% das pacientes.
- 2) As lesões de queratose actínica melhoraram significativamente em 77,3% das pacientes.
- 3) Não houve melhora das lesões de melanose solar em 86,4% das pacientes.
- 4) A presença de epidermólise em cada sessão de esfoliação química realizada por este método não foi estatisticamente significativa.

- 5) Este método foi muito bem tolerado causando pouco ardor e efeitos colaterais, pois somente duas pacientes apresentaram prurido e uma apresentou bolhas.
- 6) O resultado do exame anatomopatológico antes e após as quatro esfoliações:
- em relação à hiperqueratose, 52,6%; presença de acantose ou atrofia, 68,4%; atipia celular, 63,2%; retificação da epiderme, 52,6%; e degeneração basofílica do colágeno, 94,7%. Nenhum destes estatisticamente significativo.
- 7) O estudo imunohistoquímico por meio do marcador de proliferação celular Ki-67, apesar de ter mostrado aumento das células proliferativas em dez pacientes (através da análise estatística pelo teste de Wilcoxon), após as quatro esfoliações não foi significativo.

Finalizando, achamos necessário aprofundar o estudo do ácido pirúvico no tratamento do fotoenvelhecimento, queratose actínica e melanose solar, possibilitando uma uniformidade dos resultados tanto em profundidade como em superfície.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelsayed RA, Guijarro-Rojas M, Ibrahim NA, Sanguenza OP. Immunohistochemical evaluation of basal cell carcinoma and trichepithelioma using Bcl-2, Ki67, PCNA and P53. *J Cutan Pathol*. 2000 Apr;27(4):169-75.

Adriaenssens E, Dumont L, Lottin S, Bolle D, Lepretre A, Delobelle A, Bouali F, Dugimont T, Coll J, Curgy JJ. H19 overexpression in breast adenocarcinoma stromal cells is associated with tumor values and steroid receptor status but independent of p53 and Ki-67 expression. *Am J Pathol*. 1998 Nov;153(5):1597-607.

Albert MR, Ostheimer KG. The evolution of current medical and popular attitudes toward ultraviolet light exposure: part 1. *J Am Acad Dermatol*. 2002 Dec;47(6):930-7.

Al Mahroos M, Yaar M, Phillips TJ, Bhawan J, Gilchrest BA. Effect of sunscreen application on UV-induced thymine dimers. *Arch Dermatol*. 2002 Nov;138(11):1480-5.

Andersen SN, Rognum TO, Bakka A, Clausen OP. Ki-67: a useful marker for the evaluation of dysplasia in ulcerative colitis. *Mol Pathol*. 1998 Dec;51(6):327-32.

Alam M, Omura NE, Dover JS, Arndt KA. Glycolic acid peels compared to microdermabrasion: a right-left controlled trial of efficacy and patient satisfaction. *Dermatol Surg*. 2002 Jun;28(6):475-9.

Bergfeld W, Tung R, Vidimos A, Vellanki L, Remzi B, Stanton-Hicks U. Improving the cosmetic appearance of photoaged skin with glycolic acid. *J Am Acad Dermatol*. 1997 Jun;36(6 Pt 1):1011-3.

Bernstein EF, Underhill CB, Lakkakorpi J, Ditre CM, Uitto J, Yu RJ, Scott EV. Citric acid increases viable epidermal thickness and glycosaminoglycan content of sun-damaged skin. *Dermatol Surg*. 1997 Aug;23(8):689-94.

Biesterfeld S, Josef J. Differential diagnosis of keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the epidermis by MIB-1 immunohistometry. *Anticancer Res.* 2002 Sep-Oct;22(5):3019-23.

Brody H, Coleman WP 3rd, Piacquadio D, Perricone NV, Elson ML, Harris D. Round table discussion of alpha hydroxy acids. *Dermatol Surg.* 1996 May;22(5):475-7.

Brody HJ. Complications of chemical resurfacing. *Dermatol Clin.* 2001 Jul;19(3):427-38, vii-viii.

Brody HJ. Variations and comparisons in medium-depth chemical peeling. *J Dermatol Surg Oncol.* 1989 Sep;15(9):953-63.

Brody HJ, Monheit GD, Resnik SS, Alt TH. A history of chemical peeling. *Dermatol Surg.* 2000 May;26(5):405-9.

Brown DC, Cole D, Gatter KC, Mason DY. Carcinoma of the cervix uteri: an assessment of tumour proliferation using the monoclonal antibody Ki67. *Br J Cancer.* 1988 Feb;57(2):178-81.

Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception. *Histopathology.* 2002 Jan;40(1):2-11.

Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology.* 1990 Dec;17(6):489-503.

Butler PE, Gonzalez S, Randolph MA, Kim J, Kollias N, Yaremchuk MJ. Quantitative and qualitative effects of chemical peeling on photo-aged skin: an experimental study. *Plast Reconstr Surg.* 2001 Jan;107(1):222-8.

Castelijns FA, Gerritsen MJ, van Vlijmen-Willems IM, van Erp PE, van de Kerkhof PC. The epidermal phenotype during initiation of the psoriatic lesion in the symptomless margin of relapsing psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 1999 Jun;40(6 Pt 1):901-9.

Chang J, Powles TJ, Allred DC, Ashley SE, Clark GM, Makris A, Assersohn L, Gregory RK, Osborne CK, Dowsett M. Biologic markers as predictors of clinical outcome from systemic therapy for primary operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999 Oct;17(10):3058-63.

Chiarello SE. Cryopeeling (extensive cryosurgery) for treatment of actinic keratoses: an update and comparison. *Dermatol Surg.* 2000 Aug;26(8):728-32.

Cisneros JL; Marti A; Brisch A; Singla R; Palon J. Correlacion clinico-histologica de los pelings quimicos intermedios vs resurfacing con laser

CO₂ y ND:YAG Q-Switched poliderm Med Cutan Iber Lat Am v24 p 179-85, 1996.

Clark CP 3rd. Alpha hydroxy acids in skin care. Clin Plast Surg. 1996 Jan;23(1):49-56.

Coleman W P et al. Cirurgia Cosmética -Princípios e Técnicas. Livraria e Editora Revinter 2000;7-17.

Coleman WP 3rd, Futrell JM. The glycolic acid trichloroacetic acid peel. J Dermatol Surg Oncol. 1994 Jan;20(1):76-80.

Cook KK, Cook WR Jr. Chemical peel of nonfacial skin using glycolic acid gel augmented with TCA and neutralized based on visual staging. Dermatol Surg. 2000 Nov;26(11):994-9.

Cox S. Rapid development of keratoacanthomas after a body peel. Dermatol Surg. 2003 Feb;29(2):201-3.

Cuce LC, Bertino MC, Scattone L, Birkenhauer MC. Tretinoin peeling. Dermatol Surg. 2001 Jan;27(1):12-4.

de Mare S, de Jong E, Van Erp PE, Van de Kerkhof PC. Markers for proliferation and keratinization in the margin of the active psoriatic lesion. Br J Dermatol. 1990 Apr;122(4):469-75.

Ditre CM, Griffin TD, Murphy GF, Sueki H, Telegan B, Johnson WC, Yu RJ, Van Scott EJ. Effects of alpha-hydroxy acids on photoaged skin: a pilot clinical, histologic, and ultrastructural study. J Am Acad Dermatol. 1996 Feb;34(2 Pt 1):187-95.

Dittmar HC, Weiss JM, Termeer CC, Denfeld RW, Wanner MB, Skov L, Barker JN, Schopf E, Baadsgaard O, Simon JC. In vivo UVA-1 and UVB irradiation differentially perturbs the antigen-presenting function of human epidermal Langerhans cells. J Invest Dermatol. 1999 Mar;112(3):322-5.

Dodson JM, DeSpain J, Hewett JE, Clark DP. Malignant potential of actinic keratoses and the controversy over treatment. A patient-oriented perspective. Arch Dermatol. 1991 Jul;127(7):1029-31.

Duan H, Koga T, Masuda T, Mashino T, Imafuku S, Terao H, Murakami Y, Urabe K, Kiryu H, Furue M. CD1a+, CD3+, CD4+, CD8+, CD68+ and cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive cells in Bowen's disease. Br J Dermatol. 2000 Dec;143(6):1211-6.

Duffy DM. Alpha hydroxy acids/trichloroacetic acids risk/benefit, strategies. A photographic review. Dermatol Surg. 1998 Feb;24(2):181-9; quiz 190-1.

Ellis PE, Fong LF, Rolfe KJ, Crow JC, Reid WM, Davidson T, MacLean AB, Perrett CW. The role of p53 and Ki67 in Paget's disease of the vulva and the breast. *Gynecol Oncol*. 2002 Aug;86(2):150-6.

Elson ML Treatment of photoaging – a personal comment and open study of the use of glycolic acid *Journal of Dermatologic Treatment*, v4, p215-8, 1993.

Fernandez JF Inmunohistoquímica diagnóstica en dermatopatología tumoral maligna *Actas dermosifiliogr* 1997;88:233-251.

Fitzpatrick T.B. *Dermatology in General Medicine* 4.ed, 1993 a 797- 803.

Fitzpatrick T.B. *Dermatology in General Medicine* 4.ed, 1993 b 1639- 46.

Fitzpatrick T B. *Dermatology in General Medicine* 4.ed, 1993 c 1658-1660.

Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988 Jun;124(6):869-71.

Flynn TC, Coleman WP. Topical revitalization of body skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2000 Jul;14(4):280-4.

Fransson J, Hammar H. Epidermal growth in the skin equivalent. *Arch Dermatol Res*. 1992;284(6):343-8.

Fusco FJ. The aging face and skin: common signs and treatment. *Clin Plast Surg*. 2001 Jan;28(1):1-12.

Garmyn M, Yaar M, Boileau N, Backendorf C, Gilchrest BA. Effect of aging and habitual sun exposure on the genetic response of cultured human keratinocytes to solar-simulated irradiation. *J Invest Dermatol*. 1992 Dec;99(6):743-8.

Geng L, Connolly DC, Isacson C, Ronnett BM, Cho KR. Atypical immature metaplasia (AIM) of the cervix: is it related to high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). *Hum Pathol*. 1999 Mar;30(3):345-51.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984 Oct;133(4):1710-5.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983 Jan 15;31(1):13-20.

Gibbs S, Ponc M. Intrinsic regulation of differentiation markers in human epidermis, hard palate and buccal mucosa. *Arch Oral Biol*. 2000 Feb;45(2):149-58.

Glogau RG Chemical peeling and skin. *J Geriatric Dermatol* 1994; 2:30-5.

Griffin TD, Murphy GF, Sueki H, Telegan B, Johnson WC, Ditre CM, Yu RJ, Van Scott EJ. Increased factor XIIIa transglutaminase expression in dermal dendrocytes after treatment with alpha-hydroxy acids: potential physiologic significance. *J Am Acad Dermatol*. 1996 Feb;34(2 Pt 1):196-203.

Griffin TD, Van Scott EJ. Use of pyruvic acid in the treatment of actinic keratoses: a clinical and histopathologic study. *Cutis*. 1991 May;47(5):325-9.

Griffiths CE. Drug treatment of photoaged skin. *Drugs Aging*. 1999 Apr;14(4):289-301.

Hannuksela-Svahn A, Paakko P, Autio P, Reunala T, Karvonen J, Vahakangas K. Expression of p53 protein before and after PUVA treatment in psoriasis. *Acta Derm Venereol*. 1999 May;79(3):195-9.

Harlozinska A, Bar JK, Sedlacek P, Gerber J. Expression of p53 protein and Ki-67 reactivity in ovarian neoplasms. Correlation with histopathology. *Am J Clin Pathol*. 1996 Mar;105(3):334-40. Harper ME, Glynne-Jones E, Goddard L, Mathews P, Nicholson RI.

Harper. Expression of androgen receptor and growth factors in premalignant lesions of the prostate. *J Pathol*. 1998 Oct;186(2):169-77.

Hetter GP. An examination of the phenol-croton oil peel: part IV. Face peel results with different concentrations of phenol and croton oil. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Mar;105(3):1061-83; discussion 1084-7.

Hetter GP. An examination of the phenol-croton oil peel: Part III. The plastic surgeons' role. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Feb;105(2):752-63.

Hendricks JB, Wilkinson EJ, Kubilis P, Drew P, Blaydes SM, Munakata S. Ki-67 expression in vulvar carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 1994 Jul;13(3):205-10.

Horlock N, Wilson GD, Daley FM, Richman PI, Grobbelaar AO, Sanders R, Foy C. Cellular proliferation characteristics do not account for the behaviour of horrifying basal cell carcinoma. A comparison of the growth fraction of horrifying and non horrifying tumours. *Br J Plast Surg*. 1998 Jan;51(1):59-66.

Hunt MJ, Halliday GM, Weedon D, Cooke BE, Barnetson RS. Regression in basal cell carcinoma: an immunohistochemical analysis. *Br J Dermatol*. 1994 Jan;130(1):1-8.

Hurley ME, Guevara IL, Gonzales RM, Pandya AG. Efficacy of glycolic acid peels in the treatment of melasma. *Arch Dermatol*. 2002 Dec;138(12):1578-82.

Javaheri SM, Handa S, Kaur I, Kumar B. Safety and efficacy of glycolic acid facial peel in Indian women with melasma. *Int J Dermatol*. 2001 May;40(5):354-7.

Kadunc B.V. Acido piruvico: tecnica de padronização para uso em esfoliações químicas através de estudo experimental. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 1998.

Kerschmann RL, McCalmont TH, LeBoit PE. p53 oncoprotein expression and proliferation index in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 1994 Feb;130(2):181-6.

Kindblom LG, Meis-Kindblom JM, Havel G, Busch C. Benign epithelioid schwannoma. *Am J Surg Pathol*. 1998 Jun;22(6):762-70.

Kreipe H, Heidebrecht HJ, Hansen S, Rohlk W, Kubbies M, Wacker HH, Tiemann M, Radzun HJ, Parwaresch R. A new proliferation-associated nuclear antigen detectable in paraffin-embedded tissues by the monoclonal antibody Ki-S1. *Am J Pathol*. 1993 Jan;142(1):3-9.

Korabiowska M, Brinck U, Middel P, Brinkmann U, Berger H, Radzun HJ, Ruschenburg I, Droese M. Proliferative activity in the progression of pigmented skin lesions, diagnostic and prognostic significance. *Anticancer Res*. 2000 May-Jun;20(3A):1781-5.

Kuijpers AL, Bergers M, Siegenthaler G, Zeeuwen PL, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J. Skin-derived antileukoprotease (SKALP) and epidermal fatty acid-binding protein (E-FABP): two novel markers of the psoriatic phenotype that respond differentially to topical steroid. *Acta Derm Venereol*. 1997 Jan;77(1):14-9.

Landis, JR e Kock, GG – The measurement of observer agreement for contrasts among multinomial populations *Biometrics*, 33 – 159-174-1977

Lavker RM, Kaidbey K, Leyden JJ. Effects of topical ammonium lactate on cutaneous atrophy from a potent topical corticosteroid. *J Am Acad Dermatol*. 1992 Apr;26(4):535-44.

Lawrence N. New and emerging treatments for photoaging. *Dermatol Clin*. 2000 Jan;18(1):99-112. Review.

Lawrence N, Cox SE, Cockerell CJ, Freeman RG, Cruz PD Jr. A comparison of the efficacy and safety of Jessner's solution and 35% trichloroacetic acid

vs 5% fluorouracil in the treatment of widespread facial actinic keratoses. *Arch Dermatol*. 1995 Feb;131(2):176-81.

Lee JH, An HT, Chung JH, Kim KH, Eun HC, Cho KH. Acute effects of UVB radiation on the proliferation and differentiation of keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2002 Oct;18(5):253-61.

Lever W., Schaumburg-Lever G. *Histopatologia da pele* 7.ed, São Paulo Editora Manole, 1991 p 43- 48.

Liew SH, Grobbelaar AO, Gault DT, Green CJ, Linge C. The effect of ruby laser light on cellular proliferation of epidermal cells. *Ann Plast Surg*. 1999 Nov;43(5):519-22.

Li LX, Crotty KA, McCarthy SW, Palmer AA, Kril JJ. A zonal comparison of MIB1-Ki67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol*. 2000 Dec;22(6):489-95.

Lohmann CM, Iversen K, Jungbluth AA, Berwick M, Busam KJ. Expression of melanocyte differentiation antigens and ki-67 in nodal nevi and comparison of ki-67 expression with metastatic melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2002 Oct;26(10):1351-7.

MacCallum DE, Hall PA. The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J Pathol*. 2000 Apr;190(5):537-44.

Manaloto RM, Alster TS. Periorbital rejuvenation: a review of dermatologic treatments. *Dermatol Surg*. 1999 Jan;25(1):1-9. Review.

Marrero GM, Katz BE. The new fluor-hydroxy pulse peel. A combination of 5-fluorouracil and glycolic acid. *Dermatol Surg*. 1998 Sep;24(9):973-8.

Matsushima H, Goto T, Hosaka Y, Kitamura T, Kawabe K. Correlation between proliferation, apoptosis, and angiogenesis in prostate carcinoma and their relation to androgen ablation. *Cancer*. 1999 Apr 15;85(8):1822-7.

Moloney SJ, Edmonds SH, Giddens LD, Learn DB. The hairless mouse model of photoaging: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles. *Photochem Photobiol*. 1992 Oct;56(4):505-11.

Monheit GD, Chastain MA. Chemical peels. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2001 May;9(2):239-55, viii.

Monheit GD. Consultation for photoaging skin. *Dermatol Clin*. 2001 Jul;19(3):401-3, vii.

Moyal DD, Fourtanier AM. Effects of UVA radiation on an established immune response in humans and sunscreen efficacy. *Exp Dermatol*. 2002;11 Suppl 1:28-32.

Moy LS, Peace S, Moy RL. Comparison of the effect of various chemical peeling agents in a mini-pig model. *Dermatol Surg*. 1996 May;22(5):429-32.

Nagasaka T, Lai R, Medeiros LJ, Brynes RK, McCourty A, Harada T, Saddik M. Cyclin D1 overexpression in Spitz nevi: an immunohistochemical study. *Am J Dermatopathol*. 1999 Apr;21(2):115-20.

Noszczyk BH, Majewski ST. p63 expression during normal cutaneous wound healing in humans. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Oct;108(5):1242-7; discussion 1248-50.

Ozaki O, Ito K, Mimura T, Sugino K, Ito K. Anaplastic transformation of papillary thyroid carcinoma in recurrent disease in regional lymph nodes: a histologic and immunohistochemical study. *J Surg Oncol*. 1999 Jan;70(1):45-8.

Pierard GE, Nikkels-Tassoudji N, Arrese JE, Pierard-Franchimont C, Leveque JL. Dermo-epidermal stimulation elicited by a beta-lipohydroxyacid: a comparison with salicylic acid and all-trans-retinoic acid. *Dermatology*. 1997;194(4):398-401.

Plaat B, Kole A, Mastik M, Hoekstra H, Molenaar W, Vaalburg W. Protein synthesis rate measured with L-[1-11C]tyrosine positron emission tomography correlates with mitotic activity and MIB-1 antibody-detected proliferation in human soft tissue sarcomas. *Eur J Nucl Med*. 1999 Apr;26(4):328-32.

Resnik SS, Resnik BI. Complications of chemical peeling. *Dermatol Clin*. 1995 Apr;13(2):309-12.

Ridge JM, Siegle RJ, Zuckerman J. Use of alpha-hydroxy acids in the therapy for 'photoaged' skin. *J Am Acad Dermatol*. 1990 Nov;23(5 Pt 1):932.

Rijzewijk JJ, Groenendal H, van Erp P, Bauer FW, van Vloten WA. Cell kinetics in skin disorders with disturbed keratinization. *Acta Derm Venereol*. 1992 Aug;72(4):256-8.

Rijzewijk JJ, Groenendal H, Van Erp P, Bauer FW, Van Vloten WA. Two antigenic binding sites for Ki67 related to quiescent and cycling cells in human epidermis. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 69:512-515 1987.

Roenigk HH Jr. Treatment of the aging face. *Dermatol Clin*. 1995 Apr;13(2):245-61.

Rolfe KJ, Crow JC, Reid WM, Benjamin E, MacLean AB, Perrett CW. The effect of topical corticosteroids on Ki67 and p53 expression in vulval lichen sclerosis. *Br J Dermatol*. 2002 Sep;147(3):503-8.

Rose DS, Maddox PH, Brown DC. Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J Clin Pathol*. 1994 Nov;47(11):1010-4.

Rubin, MG Manual of chemical peels – Superficial and medium-depth Philadelphia, Lippincott, 1995.

Sampaio S.A.P., Rivitti E.A Dermatologia 1.ed, São Paulo Artes Médicas, 1998 a p 987- 989.

Sampaio S.A.P., Rivitti E.A Dermatologia 1.ed, São Paulo Artes Médicas, 1998 b p 629- 634.

Sampaio S A P, Rivitti E A .Dermatologia. São Paulo: Artes Médicas 1998 c; 634-635.

Sarkar R, Kaur C, Bhalla M, Kanwar AJ. The combination of glycolic acid peels with a topical regimen in the treatment of melasma in dark-skinned patients: a comparative study. *Dermatol Surg*. 2002 Sep;28(9):828-32; discussion 832.

Simonart T, Fayt I, Noel JC. An immunohistochemical study of abnormal keratinocyte proliferation in molluscum contagiosum. *Br J Dermatol*. 2002 Apr;146(4):609-14.

Slavin JW. Considerations in alpha hydroxy acid peels. *Clin Plast Surg*. 1998 Jan;25(1):45-52. Review.

Tazawa K, Tsukada K, Makuuchi H, Tsutsumi Y. An immunohistochemical and clinicopathological study of gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int*. 1999 Sep;49(9):786-98.

Sarkar R, Kaur C, Bhalla M, Kanwar AJ. The combination of glycolic acid peels with a topical regimen in the treatment of melasma in dark-skinned patients: a comparative study. *Dermatol Surg*. 2002 Sep;28(9):828-32; discussion 832.

Scurry J, Beshay V, Cohen C, Allen D. Ki67 expression in lichen sclerosis of vulva in patients with and without associated squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 1998 May;32(5):399-404.

Siddiqui MR, Moreira AL, Negesse Y, Taye GA, Hanekom WA, Haslett PA, Britton S, Kaplan G. Local nerve damage in leprosy does not lead to an

impaired cellular immune response or decreased wound healing in the skin. *J Infect Dis*. 2002 Jul 15;186(2):260-5. Epub 2002 Jul 03.

Siegel, S e Castellan JR, N.J. Nonparametric statistics second edition. McGraw – Hill. Int. Ed. - N. York - 1988 399 pag.

Simonart T, Fayt I, Noel JC. An immunohistochemical study of abnormal keratinocyte proliferation in molluscum contagiosum. *Br J Dermatol*. 2002 Apr;146(4):609-14.

Skytting BT, Bauer HC, Perfekt R, Nilsson G, Larsson O. Ki-67 is strongly prognostic in synovial sarcoma: analysis based on 86 patients from the Scandinavian Sarcoma group register. *Br J Cancer*. 1999 Aug;80(11):1809-14.

Soini Y, Kamel D, Paakko P, Lehto VP, Oikarinen A, Vahakangas KV. Aberrant accumulation of p53 associates with Ki67 and mitotic count in benign skin lesions. *Br J Dermatol*. 1994 Oct;131(4):514-20.

Stiller MJ, Bartolone J, Stern R, Smith S, Kollias N, Gillies R, Drake LA. Topical 8% glycolic acid and 8% L-lactic acid creams for the treatment of photodamaged skin. A double-blind vehicle-controlled clinical trial. *Arch Dermatol*. 1996 Jun;132(6):631-6.

Stone PA, Lefer LG. Modified phenol chemical face peels: recognizing the role of application technique. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2001 Aug;9(3):351-76.

Stuzin JM. Phenol peeling and the history of phenol peeling. *Clin Plast Surg*. 1998 Jan;25(1):1-19. Review.

Suurmeijer AJ, Boon ME. Pretreatment in a high-pressure microwave processor for MIB-1 immunostaining of cytological smears and paraffin tissue sections to visualize the various phases of the mitotic cycle. *J Histochem Cytochem*. 1999 Aug;47(8):1015-20.

Swinerhart JM. Salicylic acid ointment peeling of the hands and forearms. Effective nonsurgical removal of pigmented lesions and actinic damage. *J Dermatol Surg Oncol*. 1992 Jun;18(6):495-8.

Szekeres G, De Giacomoni P. Ki-67 and p53 expression in cutaneous Bowen's disease: an immunohistochemical study of fixed-embedded tissue sections. *Acta Derm Venereol*. 1994 Mar;74(2):95-7.

Tamura BM. Cantotomia da unha encravada do hálux: estudo imunohistoquímico da matriz retirada. Tese de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 2001.

Tan SH, Derrick E, McKee PH, Hobbs C, Ridley M, Neill S. Altered p53 expression and epidermal cell proliferation is seen in vulval lichen sclerosis. *J Cutan Pathol*. 1994 Aug;21(4):316-23.

Tannapfel A, Geissler F, Kockerling F, Katalinic A, Hauss J, Wittekind C. Apoptosis and proliferation in relation to histopathological variables and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol*. 1999 Mar;187(4):439-45.

Tilli CM, Ramaekers FC, Broers JL, Hutchison CJ, Neumann HA. Lamin expression in normal human skin, actinic keratosis, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2003 Jan;148(1):102-9.

Tiniakos DG, Brunt EM. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 labeling in hepatocellular nodules: a comparative study. *Liver*. 1999 Feb;19(1):58-68.

Tse Y, Ostad A, Lee HS, Levine VJ, Koenig K, Kamino H, Ashinoff R. A clinical and histologic evaluation of two medium-depth peels. Glycolic acid versus Jessner's trichloroacetic acid. *Dermatol Surg*. 1996 Sep;22(9):781-6.

Tronnier M, Rudolph P, Koser T, Raasch B, Brinckmann J. One single erythemagenic UV irradiation is more effective in increasing the proliferative activity of melanocytes in melanocytic naevi compared with fractionally applied high doses. *Br J Dermatol*. 1997 Oct;137(4):534-9.

Tucci MG, Offidani A, Lucarini G, Simonelli L, Amati S, Cellini A, Biagini G, Ricotti G. Advances in the understanding of malignant transformation of keratinocytes: an immunohistochemical study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1998 Mar;10(2):118-24.

Tung RC, Bergfeld WF, Vidimos AT, Remzi BK. Alpha-Hydroxy acid-based cosmetic procedures. Guidelines for patient management. *Am J Clin Dermatol*. 2000 Mar-Apr;1(2):81-8. Review.

Van Erp PEJ, Groenendal H, Bauer FW, Rijzewijk JJ. Growth fraction in epidermal skin disorders determined by the monoclonal antibody Ki67 1987.

Van Scott EJ, Yu RJ. Hyperkeratinization, corneocyte cohesion, and alpha hydroxy acids. *J Am Acad Dermatol*. 1984 Nov;11(5 Pt 1):867-79.

Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AL, van Driel R, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci*. 1989 Jan;92 (Pt 1):123-30.

Vieira EC, Gazzinelli G, Mares-Guia M. *Bioquímica celular* 1979 Editora Atheneu RJ pag 187-191.

Welzel J, Metker C, Wolff HH, Wilhelm KP. SLS-irritated human skin shows no correlation between degree of proliferation and TEWL increase. *Arch Dermatol Res*. 1998 Nov;290(11):615-20.

Whittles CE, Biddlestone LR, Burton A, Barr H, Jankowski JA, Warner PJ, Shepherd NA. Apoptotic and proliferative activity in the neoplastic progression of Barrett's oesophagus: a comparative study. *J Pathol*. 1999 Apr;187(5):535-40.

Wrone-Smith T, Mitra RS, Thompson CB, Jasty R, Castle VP, Nickoloff BJ. Keratinocytes derived from psoriatic plaques are resistant to apoptosis compared with normal skin. *Am J Pathol*. 1997 Nov;151(5):1321-9.

Wisniewski L, Limat A, Saurat JH, Meda P, Salomon D. Differential expression of connexins during stratification of human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2000 Aug;115(2):278-85.

Yerebakan O, Ciftcioglu MA, Akkaya BK, Yilmaz E. Prognostic value of Ki-67, CD31 and epidermal growth factor receptor expression in basal cell carcinoma. *J Dermatol*. 2003 Jan;30(1):33-41.

Yoshida A, Nakamura Y, Imada T, Asaga T, Shimizu A, Harada M. Apoptosis and proliferative activity in thyroid tumors. *Surg Today*. 1999;29(3):204-8.

Zhang XD, Coventry BJ, Jamieson GG, Gill PG. The utility of the proliferative index in pretreatment biopsy specimens of esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*. 1998 Oct;11(4):215-20.

Apêndice

Termo de consentimento do paciente

Eu, _____,
idade _____, brasileiro (a), estado civil, _____,
residente a _____ na
cidade de _____, estado
de _____,
portador do RG _____, declaro por
meio desta estar ciente e concordar com o estudo
proposto pela Dra Ana Carolina Junqueira Ferolla,
estando esclarecido dos riscos, benefícios e
possíveis complicações

Data: __/__/

Assinatura: