Ana Carolina Junqueira Ferolla

Estudo da pele humana fotoenvelhecida após
tratamento com terapia fotodinâmica associada ao
ácido 5-delta-aminolevulínico tópico: avaliação
imunoistoquímica, do colágeno e do tecido elástico

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

Área de concentração: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Cucé

São Paulo

2007

Dedicatória

A minha família

Aos meus pais Francisco e Maria Aparecida

À minha avó Olga

À minha irmã Leticia

Pela participação em mais uma conquista,

Pela compreensão mais uma vez das horas dedicadas a
medicina e que faltaram no nosso convívio familiar,

Pelo incentivo, pelo apoio e principalmente pelo amor,

Quando eu era pequena sonhava em ser médica; aos treze
anos quis ser dermatologista. O tempo passou e este ano faz 10 anos da
minha formatura. Vocês estiveram em cada passo, cada tombo, mas
principalmente estiveram presentes em todas as vezes que eu me
levantei. Vocês são responsáveis por tornar o meu sonho realidade.

Obrigada pelo carinho, amor e dedicação !

Ao meu marido Giuseppe

Sempre incentivando a minha vida profissional e acreditando em meu trabalho; compreendendo a minha ausência, aproveitando e disputando os momentos fugazes e principalmente multiplicando os nossos momentos de convívio familiar.

Sempre lutando por nossos ideais e transformando nossos caminhos em uma só trilha, facilitando as conquistas, vibrando nas vitórias e me apoiando nas derrotas... esse é o verdadeiro significado da união !

Obrigada pelo carinho, amor e dedicação !

Se eu tivesse que resumir a minha gratidão em uma palavra eu diria para você: SAWABONA !

(SAWABONA é um cumprimento usado no sul da África e quer dizer eu te respeito, eu te valorizo, você é importante para mim).

Ao meu filho Thiago

Os mesmos 300Km continuam a nos separar, agora são quase quatorze anos...

A saudades, a minha ausência e os momentos que passamos no telefone aumentaram...

Mas você continuou meu parceiro! Lembra? Somos cúmplices na vida...e você é o meu maior incentivo...

... por isso tenho a certeza que, por onde eu for, você será meu companheiro, se eu chorar ou sorrir, choraremos e daremos boas gargalhadas juntos e se eu cansar sentaremos a beira de qualquer calçada

... e então você com toda a sua força me dará coragem para continuar o nosso caminho...

... eu olho para a frente na minha vida e vejo a sua imagem projetada no infinito...essa é a minha força de viver!

O número de páginas dessa tese é exatamente a quantidade de quilômetros que nos separam... por isso dedico cada página aqui escrita a cada quilômetro... há! Se eu pudesse escolher as páginas estariam em branco e essa distância não existiria.

Obrigada!

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Cucé, pelos ensinamentos, pelas horas de trabalho e dedicação e acima de tudo por toda a orientação neste trabalho e na minha vida profissional.

A Dra Bhertha Tamura e Dr Bob Chang, pelo carinho, pelos ensinamentos e acima de tudo pela amizade... vocês continuam sendo a mão mais amiga que o destino me enviou. Quando faltou a idéia vocês pensaram, quando faltou material, vocês trabalharam e principalmente quando faltou o estímulo, vocês me estenderam a mão. Esta tese não se tornaria realidade sem a ajuda de vocês!

A Dra Consuelo Junqueira Rodrigues pela atenção, apoio, confiança depositada em meu trabalho e orientação na histopatologia e imunoistoquímica.

A Industria e sua equipe, não somente a empresa, mas especialmente aos meus amigos pelo incentivo, apoio e confiança em todos esses anos de parceria.

Ao Dr Lodovico Chiavarelli, médico cirurgião, foram poucos os momentos e ensinamentos de medicina que pudemos compartilhar, mas ficarão na lembrança.

Sra Maria Grazia Sugaroni e Sra Annunziata Chiavarelli que mesmo longe nunca deixaram de expressar carinho e apoio pelo meu trabalho.

Agradecimentos

Ao Dr Evandro A. Rivitti, pela oportunidade de ingressar no curso de Pós Graduação e pela confiança em meu trabalho.

A Dra Miriam N. Sotto, pelos seus ensinamentos, pelo apoio e orientação que muito contribuíram para realização desta tese.

A Dra Maria Aparecida C. Vilela, pelas valiosas sugestões que muito contribuíram neste estudo, pelos ensinamentos e apoio. Não poderia deixar de expressar a minha admiração e respeito.

A Dra Valeria Aoki, Dr Sérgio Fava e Dra Márcia Nogueira pelas sugestões neste trabalho.

Aos assistentes de Dermatologia da Universidade de Santo Amaro, pela amizade e apoio.

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.

A Profa. Marlene Suano, pela tradução, pela orientação na vida acadêmica e principalmente pela amizade.

A Sra Rose Spina, Sra Luciana Cristina Costa, Sra. Rafaela Wendorff, Sra Roseli Polo e Sra Gina Silvestre pela contribuição e atenção dedicada a este estudo.

A sra Sueli Leite pela sua dedicação e amizade, a minha equipe de funcionárias (Elma, Nilse, Vanessa, Daniela, Silvana e Jaqueline) e a toda

a minha equipe de médicas, pelo apoio e dedicação.

A equipe de funcionárias do consultório da Dra Bherta Tamura, pela atenção dedicada a este trabalho.

A Cabpesq

Aos meus pacientes que tornaram a realização deste trabalho possível.

Normalização adotada

A elaboração desta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. I. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo. Serviço de Biblioteca e Documentação: 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e palavras em Latim

Lista de quadros

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1. Envelhecimento cutâneo.....	8
3.2. Envelhecimento cronológico.....	8
3.2.1. Manifestações clínicas e histopatológicas.....	8
3.3. Fotoenvelhecimento.....	12
3.3.1. Manifestações clínicas.....	12
3.3.2. Alterações histopatológicas epidérmicas.....	14
3.3.3. Alterações histopatológicas dérmicas.....	15
3.4. Remodelação do tecido conjuntivo.....	20
3.5. Sistema imunológico e a pele.....	21
3.5.1. Células apresentadoras de antígeno.....	22
3.5.2. Queratinócitos.....	25
3.5.3. Linfócitos.....	27
3.5.4. Moléculas de adesão.....	32

3.5.5. Citocinas.....	34
3.5.6. Sistema imunológico da pele e a exposição solar.....	37
3.6. Tratamento do fotoenvelhecimento.....	41
3.7. Reestruturação da derme no tratamento do fotoenvelhecimento	44
3.8. Terapia fotodinâmica.....	47
3.8.1. Histórico.....	47
3.8.2. Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica.....	51
3.8.3. Sistema imunológico da pele e a terapia fotodinâmica.....	56
3.8.4. Agentes fotossensibilizantes.....	60
3.8.5. Ácido 5-delta-aminolevulínico.....	65
3.8.5.1. Fatores que interferem na eficácia do ALA na TFD.....	68
3.8.5.2. Efeitos colaterais.....	91
3.8.6. Indicações da terapia fotodinâmica.....	94
3.8.6.1. Dermatológicas oncológicas.....	95
3.8.6.2. Dermatológicas não oncológicas.....	98
3.8.7. Fotoenvelhecimento.....	100
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	106
4.1. Casuística.....	107
4.1.1. Seleção dos pacientes.....	107
4.1.2. Critérios de inclusão.....	107
4.1.3. Critérios de exclusão.....	108
4.1.4. Suspensão da paciente da pesquisa.....	109

4.2.	Métodos.....	109
4.2.1.	Avaliação clínica.....	109
4.2.2.	Controle fotográfico e realização das biópsias.....	110
4.2.3.	Aplicação do ácido 5-delta-aminolevulínico associado à terapia fotodinâmica.....	111
4.2.4.	Acompanhamento da paciente após a aplicação.....	112
4.2.5.	Critérios de avaliação clínica.....	113
4.2.6.	Método de preparo das lâminas.....	113
4.2.7.	Método de coloração de picrosirius para análise quantitativa das fibras colágenas.....	114
4.2.8.	Método de coloração de Weigert-oxona para análise quantitativa das fibras elásticas.....	114
4.2.9.	Técnica imunoistoquímica para anticorpos relacionados a imunologia celular e humoral.....	115
4.2.10.	Avaliação histomorfométrica das fibras colágenas e elásticas e anti-CD1.....	117
4.2.11.	Avaliação da intensidade de reação imunoistoquímica.....	119
4.2.12.	Avaliação da intensidade de reação inflamatória na derme...	120
4.3.	Análise estatística.....	120
5.	RESULTADOS.....	122
5.1.	Avaliação descritiva da amostra.....	123
5.2.	Evolução clínica das pacientes após TFD-ALA.....	124

5.3.	Evolução pós-procedimento e reações adversas.....	135
5.4.	Análise histológica.....	138
5.5.	Análise do colágeno na derme.....	141
5.6.	Análise das fibras elásticas na derme.....	146
5.7.	Análise das reações imunoistoquímicas.....	152
5.7.1.	CD8.....	152
5.7.2.	CD4.....	157
5.7.3.	CD1.....	160
5.7.4.	Interleucina 4 (IL4).....	162
5.7.5.	TNF α	169
5.7.6.	IFN γ	176
5.8.	Infiltrado inflamatório na derme.....	177
6.	DISCUSSÃO.....	179
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	197
8.	CONCLUSÕES.....	199
9.	ANEXOS.....	203
10.	REFERÊNCIAS.....	207

Lista de abreviaturas, símbolos e palavras em latim.

Lista de abreviaturas

a.C.	Antes de Cristo
ALA	Ácido 5-delta-aminolevulínico
ALAd	ALA desidratase
ALAs	Ácido aminolevulínico sintetase
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATA	Acido tricloroacético
ATP	Adenosina trifosfato
BPA-MA	Monoácido A da benzoporfirina
BPD	Benzoporfirina
BSA	Albumina bovina
CBC	Carcinoma basocelular
CD	Cluster de diferenciação
CEC	Carcinoma espinocelular
CF	Calibração e fator
CLA	Antígeno cutâneo do linfócito
CO ₂	Dióxido de carbono
DFO	Desferrioxamina
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNCB	Dinitroclorobenzeno

EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELAM	Molécula de adesão endotelial
EVCAM	Molécula de adesão das células aos vasos
FC	Ferroquelatase
FDA	Federal Drug Administration
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H.E.	Hematoxilina e Eosina
HALA	Hexyl ALA
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HLA-DP	Antígeno leucocitário humano-DP
HLA-DQ	Antígeno leucocitário humano-DQ
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano-DR
HpD	Derivado da hematoporfirina
HPV	Human papilloma virus
HS	Hidrosadenite supurativa
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
kDA	Kilodalton
Laser	Light amplification by the stimulated emission of radiation

LED	Luz de baixa intensidade
LFA	Antígeno 1 de ativação macrofágico
LIP	Luz intensa pulsada
MAL	Metil aminolevulinato
MHC	Antígeno de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinases da matriz
MTHPC	Metatetrahidroxifenilclorina
Npe6	Mono-1 aspartilclorina e 6
P.acnes	Propionibacterium acnes
PGB	Porfobilinogênio
PBGD	Porfobilinogênio deaminase
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PDL	Pulsed dye laser
PEALA	Pentil éster ALA
PpIX	Protoporfirina IX
PUVA	Psoralênico associada ao UVA
QA	Queratose actínica
RF	Radiofrequência
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RUV	Raio ultravioleta
SALT	Skin-associated lymphoid tissue
SMAS	Sistema musculoponeurótico superficial
SnET2	Tin etil etiopurpurina
SnPp	Tin protoporfirina

TAP	Transportadores associados com processamento do antígeno
TCR	Receptores de células T
TFD	Terapia fotodinâmica
TGF	Fator transformador de crescimento
Th	Células T auxiliaadoras/indutoras
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
UVR	Radiação ultravioleta C
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VHS	Virus herpes simples
VLA	Integrinas de ação muito lenta

Lista de símbolos

%	Porcentagem
g/cm	Gramas por centímetro
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
Mg	Miligrama
mg/g	Miligrama por grama
mg/Kg	Miligramas por kilo
mm	Milímetros
mm ²	Milímetros ao quadrado

mW/cm ²	Mililwatts por centímetro quadrado
nm	Nanômetro
W/cm ²	Watts por centímetro quadrado

Em Latim

μm	Micrometro
Apud	Citado por
In vitro	Em laboratório
In vivo	Em tecido vivo
YAG	Ytrium, Alumínio e Granada

Lista de Quadros

Quadro 1 -	Alterações fisiológicas e correlação anatomopatológica na pele envelhecida cronologicamente.....	11
Quadro 2 -	Classificação de Glogau: avaliação do fotodano.....	13
Quadro 3 -	Efeitos da radiação UV <i>in vitro</i>	40
Quadro 4 -	Efeitos da radiação UV <i>in vivo</i>	40
Quadro 5 -	Terapias clínicas e cirúrgicas para redução de sinais cutâneos do fotoenvelhecimento.....	42
Quadro 6 -	Esquema da formação de 1O_2 (espécies reativas de oxigênio) pela reação tipo II.....	52
Quadro 7 -	Efeitos da TFD <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	55
Quadro 8 -	Substâncias fotossensibilizantes: características.....	61
Quadro 9 -	Resumo dos diferentes tipos de veículos tópicos usados na TFD.....	76
Quadro 10 -	Efeitos adversos e complicações da TFD.....	94
Quadro 11 -	Indicação da TFD no tratamento de tumores malignos sólidos.....	95
Quadro 12 -	Comparação entre PDL, LIP e luz azul associados ao ALA no tratamento do fotoenvelhecimento.....	102
Quadro 13 -	Características clínicas do fotoenvelhecimento, segundo consenso de TFD-ALA.....	105

Quadro 14 - Métodos de tratamento do fotoenvelhecimento, segundo a classificação clínica publicada no consenso de TFD-ALA.....	105
--	-----

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Distribuição das pacientes conforme o fotoenvelhecimento facial, a idade e o fototipo.....	124
Tabela 2 -	Resultados clínicos obtidos após o tratamento.....	127
Tabela 3 -	Resultados obtidos em relação à flacidez cutânea.....	128
Tabela 4 -	Presença dos efeitos colaterais durante as três sessões de TFD-ALA.....	137
Tabela 5 -	Valores individuais da fração de área de colágeno (%) na derme das biópsias de pele estudadas.....	143
Tabela 6 -	Estatística descritiva da fração de área de colágeno na derme	144
Tabela 7 -	Valores individuais da fração de área de fibras elásticas na derme das biópsias de pele estudadas.....	149
Tabela 8 -	Estatística descritiva da fração de área de fibras elásticas na derme.....	150
Tabela 9 -	Valores individuais da intensidade de reação para CD8 nas peles estudadas.....	155
Tabela 10 -	Valores individuais da reação imunoistoquímica para anti-CD4 nas biópsias de pele estudadas.....	159
Tabela 11 -	Valores individuais da reação imunoistoquímica para anti-CD1 nas biópsias de pele estudadas.....	162

Tabela 12 -	Valores individuais da reação imunoistoquímica para anti-IL4 nas biópsias de pele estudadas. Avaliação da epiderme.....	165
Tabela 13 -	Valores individuais da reação imunoistoquímica para anti-IL4 nas biópsias de pele estudadas. Avaliação da derme.....	166
Tabela 14 -	Valores individuais da reação imunoistoquímica para TNF α nas biópsias de pele estudadas. Avaliação da epiderme.....	172
Tabela 15 -	Valores individuais da reação imunoistoquímica para TNF nas biópsias de pele estudadas. Avaliação da derme.....	173
Tabela 16 -	Valores individuais da intensidade de infiltrado inflamatório nas biópsias de pele estudadas.....	177

Lista de figuras

Figura 1 -	Ativação do agente fotossensibilizante pela luz.....	53
Figura 2 -	Estrutura do ácido 5-delta-aminolevulínico (ALA).....	65
Figura 3 -	Biossíntese do Heme.....	66
Figura 4 -	Relação entre o comprimento de luz e sua penetração na pele.....	84
Figura 5 -	Fotoenvelhecimento clínico (global) da face	129
Figura 6 -	Evolução pós-procedimento e reações adversas.....	136
Figura 7 -	Corte histológico de biópsia de pele pré-tratamento (caso 2). Observar epiderme retificada e queratinócitos sem alterações. H.E.X160.....	139
Figura 8 -	Corte histológico de biópsia de pele pré-tratamento (caso 11). Observar derme superficial com fibras colágenas desordenadas e pequenas. H.E. X690.....	139
Figura 9 -	Corte histológico de biópsia de pele 24 horas pós- tratamento (caso 1). Observar epiderme com vacuolização na camada basal e dos queratinócitos. Derme superficial com edema. H.E. X690.....	140
Figura 10 -	Corte histológico de biópsia de pele 21 dias pós- tratamento (caso 7). Observar epiderme retificada. Derme superficial mostra fibras colágenas ordenadas com disposição paralela à epiderme. H.E. X340.....	141

Figura 11 -	Corte histológico de pele pré-tratamento (caso 4). A. Fibras colágenas da derme coradas em vermelho pela coloração de picrosirius X340. B. O mesmo campo histológico observado com luz polarizada. Fibras colágenas pequenas e desordenadas. Picrosirius X340.....	142
Figura 12 -	Corte histológico de pele pré-tratamento (caso 7). A. Fibras colágenas da derme coradas em vermelho pela coloração de Picrosirius X340. B. O mesmo campo histológico com marcação das fibras colágenas pelo Sistema Analisador de Imagens. X340.....	142
Figura 13 -	Gráfico de caixas mostrando a fração de área (%) de fibras colágenas na derme de pele pré (antes), 24 horas e pós-tratamento (final).....	145
Figura 14 -	Corte histológico de pele 24 horas pré-tratamento (caso 8). A. Fibras elásticas da derme coradas em negro pela coloração de Weigert-oxona. X340. B. O mesmo campo histológico com marcação das fibras elásticas pelo Sistema Analisador de Imagens. X340....	147
Figura 15 -	Corte histológico de pele 24 horas pós-tratamento (caso 7). A. Fibras elásticas da derme coradas em negro pela coloração de Weigert-oxona. X340. B. Corte histológico de pele 21 dias pós-tratamento (caso 1). Weigert-oxona. X340.....	148
Figura 16 -	Gráfico de barras mostrando a fração de área (%) de fibras elásticas na derme de pele pré (antes), 24 horas e ao final do tratamento.....	152
Figura 17 -	Corte histológico de pele antes do tratamento (caso 1) submetido à reação imunoistoquímica para anti-CD8. Células inflamatórias mononucleares com reação positiva (pigmento marrom) ao redor de vaso. X340.....	153

Figura 18 -	Corte histológico de pele pós-tratamento (caso 7) submetido à reação imunoistoquímica para anti-CD8. Notar ausência de células CD8 positivas na derme. X340.....	154
Figura 19 -	Gráfico de caixas mostrando a intensidade de células CD8+ na derme de pele pré (antes), 24 horas e ao final do tratamento.....	156
Figura 20 -	Corte histológico de pele 24 horas pós-tratamento (caso 2) submetido a imunoistoquímica para anti-CD4. Notas infiltrado inflamatório com células CD4 positivas (marrom) ao redor do folículo piloso. X340.....	157
Figura 21 -	Corte histológico de pele 21 dias pós-tratamento (caso 2) submetido a imunoistoquímica para anti-CD4. Notar infiltrado inflamatório com células CD4 positivas (marrom) ao redor do folículo piloso. X340.....	158
Figura 22 -	Corte histológico de pele 24 horas pós-tratamento (caso 2) submetido a imunoistoquímica para anti-CD1. Células de Langerhans marcadas em marrom na epiderme e folículo piloso. X340.....	160
Figura 23 -	Corte histológico de pele 21 dias pós-tratamento (caso 4) submetido a imunoistoquímica para anti-CD1. Células de Langerhans marcadas em marrom na epiderme e folículo piloso. X340.....	161
Figura 24 -	Corte histológico de pele antes do tratamento (caso 4) submetido à reação imunoistoquímica para anti-IL4. Notar ausência de reação positiva na epiderme e derme. X340.....	163
Figura 25 -	Corte histológico de pele ao final do tratamento (caso 4) submetido à reação imunoistoquímica para anti-IL4. Notar reação positiva (coloração marrom) na epiderme e nas células inflamatórias ao redor de vasos da derme. X340.....	164

Figura 26 -	Gráfico de caixas mostrando a intensidade de IL4 na epiderme de pele pré (antes), 24 horas e ao final do tratamento.....	167
Figura 27 -	Gráfico de caixas mostrando a intensidade de IL4 na derme de pele pré (antes), 24 horas e ao final do tratamento.....	169
Figura 28 -	Corte histológico de pele ao final do tratamento (caso 4) submetido à reação imunoistoquímica para anti-IL4. Notar reação positiva (coloração marrom) na epiderme e nas células inflamatórias ao redor de vasos da derme . X340.....	170
Figura 29 -	Corte histológico de pele ao final do tratamento (caso 4) submetido à reação imunoistoquímica para anti-TNF. Notar reação positiva (coloração marrom) na derme e negativa na epiderme . X340.....	171
Figura 30 -	Gráfico de caixas mostrando a intensidade de TNF na epiderme de pele pré (antes), 24 horas e ao final do tratamento.....	174
Figura 31 -	Gráfico de caixas mostrando a intensidade de TNF α na derme de pele pré (antes), 24 horas e ao final do tratamento.....	175
Figura 32 -	Corte histológico de pele (caso 5). Reação Imunoistoquímica para anti-IFN. 340X. Notar ausência de reação positiva na pele antes (A) e após o tratamento (B).....	176

Resumo

Ferolla ACJ. *Estudo da pele humana fotoenvelhecida após tratamento com terapia fotodinâmica associada ao ácido 5-delta-aminolevulínico tópico: avaliação imunoistoquímica, do colágeno e do tecido elástico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 267p.

A terapia fotodinâmica (TFD) atualmente é considerada uma modalidade terapêutica no fotoenvelhecimento, pois apresenta resposta satisfatória tanto no resultado estético como no tratamento e prevenção das lesões pré-malignas que geralmente acompanham a pele fotoenvelhecida. A destruição seletiva do tecido alvo ocorre através de uma reação química, onde se utiliza um agente fotossensibilizante que é exposto a uma determinada luz com comprimento de onda e na presença de oxigênio produz oxigênio "singlet" que é responsável pela citotoxicidade das células proliferativas e conseqüente morte celular. Foram estudadas 13 pacientes com fotoenvelhecimento clínico que foram submetidas a três sessões de TFD-ALA tópico associado à luz vermelha (630nm) com intervalo quinzenal. Após 21 dias da ultima aplicação 12 pacientes apresentaram melhora do fotoenvelhecimento; principalmente na coloração e textura da pele, clareamento das lesões de melanose solar, regressão da queratose actínica e melhora da flacidez. Houve também aumento do tecido colágeno e fibra elástica nas colorações de picrosírio e Weigert-oxona respectivamente. Em relação a modulação do sistema imune houve diminuição da população de linfócitos CD4 e CD8, aumento da interleucina-4 na epiderme e derme, diminuição da TNF α na epiderme e aumento na derme. A população de células de Langerhans e o INF γ não apresentaram alterações. A TFD-ALA associada à luz vermelha se mostrou eficaz no tratamento do fotoenvelhecimento clínico, no aumento do colágeno e fibras elásticas e na modulação do sistema imunológico.

Descritores: 1. Envelhecimento da pele/ 2. Terapia fotodinâmica/ 3. ácido 5 delta aminolevulínico/ 4. histomorfometria/ 5. colágeno / 6. fibra elástica / 7. imunoistoquímica/ 8. sistema imune.

Summary

Ferolla ACJ. *Study of photo aged human skin after photodynamic therapy treatment with topic 5 delta aminolevulinic acid: immunohistochemical, collagenous and elastic fibre analysis*. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 267p.

PDT is nowadays considered one of the therapies for photo-aging, since it gives a satisfactory response for both, aesthetic result as well as treating and preventing pre-malignous lesions that are a frequent outcome of photo-aged skin. The selective destruction of target tissue occurs through a chemical reaction, by using a photosensitizing agent exposed to a certain light with a wave length which, in the presence of oxygen, produces singlet oxygen responsible for the cytotoxicity of the proliferative cells and consequent cellular death. Thirteen patients with clinical photo-aging have been studied, submitted to three sessions of topical ALA-PDT associated with red light (630nm) at fortnight's intervals. After 21 days of the last treatment, 12 patients showed improved photo-aging, specially regarding skin colour and texture, whitening of the solar melanosis lesions, regression of actinic keratosis and improvement of flaccidity. There also occurred an increase of collagenous and elastic fibre tissue in the picrosirius and Weigert-oxonol methods respectively. Regarding the modulation of the immune system, there was a decrease of the lymphocytes CD4 and CD8 population, an increase of interleukin-4 in the epidermis and in the dermis, decrease of TNF- α in the epidermis and increase in the dermis. The Langerhans cells population and the INF- γ did not present alterations. The ALA-PDT associated to red light was effective for the treatment of clinical photo-aging, for collagenous and elastic fibres increase and in the immune system modulation.

Key words: 1. Skin aging, 2. photodynamic therapy, 3. 5 delta aminolevulinic acid, 4. histomorphometrical, 5. collagenous, 6. elastic fibre, 7. immunohistochemistry, 8. immune system

1. Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma perspectiva no tratamento de tumores e atualmente está sendo empregada no tratamento de doenças inflamatórias como na psoríase, na acne, hiperplasia sebácea, rosácea e mais recentemente no fotoenvelhecimento.¹⁻⁷

A TFD é baseada no acúmulo específico de um agente fotossensibilizante no tecido alvo que posteriormente é ativado pela luz e na presença de oxigênio forma o oxigênio "singlet"; responsável pela injúria da célula alvo.¹

Alguns fatores apresentam forte influência na eficácia da TFD; como escolha do agente fotossensibilizante, parâmetros de irradiação, concentração de oxigênio no meio, seletividade do agente pela célula alvo e alteração da microvascularização.¹

O ácido aminolevulínico (ALA) é considerado uma boa indicação na TFD, pois induz a síntese endógena de PpIX através da biossíntese do heme. A vantagem na sua utilização é a rápida metabolização e possibilidade de uso tópico, o que diminui a reação de fotossensibilidade prolongada.¹

O mecanismo de destruição da célula alvo compreende: direta destruição celular, injúria ao estroma vascular e ativação do sistema imune¹. O papel da TFD é causar uma reação citotóxica no tecido, mas uma resposta pós-TFD, envolvendo reação imune inflamatória; inata e adaptativa, ocorre para auxiliar na erradicação bem sucedida de células residuais remanescentes.⁸ Embora a reação imune seja menos importante que outros

1. Introdução

efeitos no estágio de ablação celular, depois da terapia, seu papel parece ser decisivo no controle de longa duração do efeito da terapia⁹.

A TFD em alta intensidade destrói células imunes importantes; já em baixa intensidade estimula o sistema imune. Por um lado, esse processo ocorre pela ativação de monócitos e macrófagos e produção de mediadores antiinflamatórios; por outro, ocorre pela maciça atração de neutrófilos no lugar da inflamação, havendo um estímulo para a produção de mediadores específicos^{8,9}.

No tratamento dos tumores, os principais fatores que parecem estar envolvidos na indução dessa resposta é a expressão de várias citocinas e outros genes importantes imunologicamente. Entre as citocinas, cuja expressão foi relatada como sendo modulada pela TFD, estão principalmente, a IL6, IL10 e TNF α , além da IL1 β , IL2, fator estimulante de colônia de granulócitos, fator de crescimento epidérmico e a modulação da expressão de vários genes envolvidos em adesão celular e apresentação de antígeno^{8,9}.

No fotoenvelhecimento há diminuição dos fibroblastos; hiperplasia do tecido elástico, com fibras elásticas aumentadas, espessas, enroladas, emaranhadas e fibras colágenas afinadas e achatadas. Há diminuição dos precursores do colágeno tipo I e III e aumento de glicosaminoglicanos que são depositados anormalmente no tecido elastótico em vez de serem depositados entre as fibras colágenas e elásticas¹⁰⁻¹⁵.

O ALA e a luz de 630 nm induzem ao aumento da produção de metaloproteinases da matriz 1 e 3 (MMP1, MMP3) em cultura de fibroblastos

1. Introdução

dérmicos humanos; também ocorre redução da expressão do RNAm do colágeno tipo I e o RNAm do colágeno tipo 3 permanece inalterado quantitativamente¹⁶. Os mecanismos imunomoduladores podem estar envolvidos neste controle, principalmente nas doenças inflamatórias, por meio da produção de citocinas. A epiderme produz IL1, IL6, TGF α e TGF β que possuem ação nos fibroblastos e agem como moduladores da produção de MMP1 e MMP3; sendo assim, a TFD é capaz de modular MMP1 e MMP3 por mecanismos diretos e indiretos. Os queratinócitos são os alvos na TFD (ALA penetra nos tecidos queratinizados e pouco nos mesenquimais), por isso se propoem, que a indução da degradação do colágeno pelas metaloproteinases, seja via queratinócito, pois as citocinas são responsáveis pelos efeitos anti-escleróticos da TFD-ALA *in vivo*^{16,17}.

Este estudo analisou a fração de colágeno, de fibras elásticas e os mecanismos celulares e humorais implicados na TFD-ALA.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

O estudo da pele humana fotoenvelhecida após tratamento com três sessões de Terapia Fotodinâmica associada ao ácido 5-delta-aminolevulínico tópico avaliando:

1) A resposta clínica quanto à melhora do fotoenvelhecimento, antes e 21 dias após a terceira sessão.

2) A imunoistoquímica do sistema imunológico por meio dos marcadores: anti-CD1a, anti-CD4+, anti-CD8+, anti-TNF α , anti-IFN γ e anti-IL4; antes, 24 horas após a primeira sessão e 21 dias após a terceira sessão.

3) A histomorfometria do colágeno e tecido elástico dérmico por meio da coloração de picrosirius e Weigert-oxona antes, 24 horas após a primeira sessão e 21 dias após a terceira sessão para respectivamente quantificar a densidade (fração de área) de fibras colágenas e elásticas.

3. Revisão da Literatura

3.1. Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento cutâneo é uma associação do envelhecimento cronológico ou intrínseco e do fotoenvelhecimento ou envelhecimento extrínseco. O envelhecimento cronológico é determinado geneticamente, enquanto o fotoenvelhecimento é caracterizado por alterações degenerativas causadas pela exposição crônica ao sol. Outros três fatores interagem no envelhecimento: ação da gravidade, linhas de expressão e rugas de dormir^{12,18-21}.

3.2. Envelhecimento cronológico

3.2.1. Manifestações clínicas e histopatológicas

As alterações morfológicas na pele envelhecida cronologicamente, mas não fotoexposta, consistem basicamente em alterações relacionadas à frouxidão, rugas finas e uma variedade de neoplasias benignas. Apresentam-se com grau variável de atrofia evidenciada pelo adelgaçamento e pregueamento da pele; esta perde a elasticidade, a

turgescência e adquire uma coloração amarelada. Os pêlos diminuem e se tornam brancos, as unhas enfraquecem, a pele resseca pela diminuição da secreção sebácea, sudorípara e do conteúdo de água da derme. Ocorre reabsorção óssea do terço inferior da face e alterações das partes moles como crescimento das orelhas e ptose do lóbulo, alongamento nasal e queda da ponta do nariz, alteração do maxilar com conseqüente alteração dos lábios, afinamento e protusão do mento e alteração do tarso na pálpebra inferior. A gravidade provoca a queda da pele principalmente do supercílio e músculos do terço inferior da face com perda do contorno da mandíbula, aparecimento do sulco mento-labial e flacidez cervical. Ocorre atrofia e perda da função muscular dos orbiculares e masseter; o sistema musculoaponeurótico superficial (SMAS) e os músculos da mímica facial (músculos orbicular dos olhos, abaixador do ângulo da boca, zigomático maior e menor e risório) se enfraquecem e tornam-se ptóticos com encovamento infra-orbitário e aprofundamento do sulco nasogeniano. Ocorre atrofia da gordura facial que resulta em concavidade da área temporal, bochechas, afundamento dos lábios e abaulamento das bolsas palpebrais. Movimentos repetidos criam as linhas de expressão, principalmente na fronte, glabella, região periocular e perioral^{20,22-24}.

As alterações histopatológicas estão relacionadas com a atrofia. A epiderme se encontra afinada com diminuição do número e volume das células. O citoplasma celular apresenta vacúolos, o núcleo exhibe alterações na forma e tamanho e há grande quantidade de glicogênio na parte superior

do estrato espinhoso. Na junção dermoepiderme ocorre aplainamento e desaparecimento das papilas causando aumento da fragilidade cutânea devido à diminuição da coesão celular. Os melanócitos dopa-positivo, com exceção nas lesões em áreas fotoexposta diminuem cerca de 10% a cada ano. As células de Langerhans diminuem cerca de 70% durante o início da fase adulta até o início da terceira idade. Na derme, o número de fibroblastos está reduzido alterando a capacidade de biossíntese do colágeno e síntese diminuída de RNAm para o colágeno tipo I. Há aumento da atividade proteolítica da metaloproteinase da matriz 1 (MMP1), da collagenase intersticial, e da degradação do colágeno com conseqüente alteração da cicatrização. A fibra elástica torna-se irregular, granulosa, pois as fibras oxitalânicas, que consistem em microfibrilas, fragmentam-se e desaparecem. A microcirculação diminui em decorrência da regressão e desorganização dos pequenos vasos, as paredes vasculares se tornam mais finas principalmente nas vênulas pós-capilar, ocorre diminuição do material da membrana basal na parede e das células-véu que envolvem os vasos finos. Os mastócitos estão diminuídos e conseqüentemente, as reações de hipersensibilidade^{10,11,14,18,19,21,22,25}.

Associada às alterações histopatológicas ocorrem alterações fisiológicas na pele envelhecida cronologicamente (Quadro 1)¹². A taxa de renovação celular epidérmica decresce em 50% e a taxa de crescimento dos fâneros em 30-50% entre a terceira e sétima década de vida. Ocorre redução da função de barreira do estrato córneo com aumento da

permeabilidade como consequência de alterações no leito vascular e na matriz extracelular; isso torna a pele envelhecida predisposta a alergias de contato. A resposta vascular está diminuída, assim como a capacidade de regulação térmica decorrente da redução de vasodilatação e vasoconstrição das arteríolas dérmicas, em parte pela redução da secreção das glândulas écrinas ou pela perda do tecido subcutâneo. A diminuição da secreção sebácea com consequente ressecamento da pele ocorre devido a menor produção de andrógenos²⁴.

Quadro 1 – Alterações fisiológicas e correlação anatomopatológica na pele envelhecida cronologicamente¹²

Alteração funcional	Correlação anatomopatológica	Consequências clínicas
Turnover epidérmico	Diminuição dos queratinócitos e proliferação	Cicatrização lenta
Função de barreira	Diminuição da vascularização	Risco para dermatite de contato e alteração da resposta ao tratamento tópico
Percepção sensorial	Diminuição	Aumento do risco de pressão, injúria pelo calor ou química
Produção de vitamina D		Aumento do risco de fraturas e osteomalacia
Imunovigilância	Diminuição das células de Langerhans e linfócitos T	Alteração da reação de hipersensibilidade
Resposta inflamatória	Diminuição dos mastócitos Diminuição da área do plexo vascular superficial	Cicatrização prolongada e diminuição da resolução de infecções
Termoregulação	Diminuição glândulas sudoríparas, vascularização e do tecido subcutâneo	Aumento risco de hipotermia
Mecanismo de proteção	Diminuição tecido subcutâneo, junção dermoepidérmica achatada	Formação de bolhas e tendência à necrose nas proeminências ósseas

Estudos *in vitro* demonstram que a idade cronológica da pele é fortemente refletida na cultura de células. Culturas de fibroblastos e queratinócitos apresentam menor capacidade proliferativa, conforme aumenta a idade do doador¹². Culturas celulares de fibroblastos envelhecidos proliferam em uma velocidade menor que fibroblastos fetais; o mesmo ocorre em culturas de fibroblastos dérmicos de pacientes com desordens relacionadas à idade como: progéria, síndrome de Werner e diabetes, que apresentam uma meia vida diminuída quando comparadas com controles normais.

3.3. Fotoenvelhecimento

3.3.1. Manifestações clínicas

O fotoenvelhecimento ou dermatoheliose ocorre pela exposição crônica aos raios UVB e UVA. Clinicamente se caracteriza por aspereza, irregularidade da superfície cutânea, despigmentação mosqueada provocada pela estimulação dos melanócitos pelos raios ultravioletas (RUV), telangiectasias que surgem pelo alargamento de pequenos vasos, rugas finas ou rírides actínicas devido ao enfraquecimento dos tecidos de suporte,

perda da elasticidade, coloração amarelo-citrina da pele pela diminuição dos vasos sangüíneos e aparecimento de lesões pré-malignas e malignas^{10-12,18,-23,25-27}.

O fotoenvelhecimento pode ser clinicamente classificado de maneiras diversas, dependendo do autor^{28,29}. Glogau²⁸ em sua classificação, considera o tipo de ruga, idade e presença de sinais clínicos (Quadro 2).

Quadro 2 – Classificação de Glogau: avaliação do fotodano²⁸

Tipo 1 (leve)	<p>Ausência de rugas</p> <p>20-30 anos</p> <p>Poucas alterações pigmentares</p> <p>Ausência de lesões queratósicas</p>
Tipo 2 (moderado)	<p>Rugas dinâmicas</p> <p>30-40 anos</p> <p>Lentigos senis iniciais</p> <p>Queratoses palpáveis (não visíveis)</p>
Tipo 3 (avançado)	<p>Rugas estáticas</p> <p>Acima de 50 anos</p> <p>Melanoses e telangiectasias</p> <p>Queratoses visíveis</p>
Tipo 4 (severo)	<p>Somente rugas</p> <p>Acima de 60 anos</p> <p>Coloração amarelo-acinzentada</p> <p>Pode ter lesões malignas</p> <p>Pela actínica</p>

A queratose actínica (QA) e o câncer de pele possuem relação importante com a exposição solar e com o fotoenvelhecimento²⁵. As lesões de queratose actínica podem regredir em 20% dos casos espontaneamente ou evoluírem para carcinoma espinocelular (CEC) em um ano em uma porcentagem variável na literatura, de 6,1 a 10,2%³⁰; de 12 a 13%³¹; de 0,025 a 16%³²; e de 0,025 a 10%³³. Mas é certo que 60% dos CECs surgem de uma lesão diagnosticada como queratose actínica e 44% dos carcinomas espinocelulares metastáticos estão associados com lesões de queratose actínica contíguas^{33,34}.

3.3.2. Alterações histopatológicas epidérmicas

A avaliação anatomopatológica da epiderme mostra na camada córnea, áreas irregulares de hiperqueratose. Inicialmente ocorre uma acantose como resultado da estimulação crônica. Essa acantose é acompanhada de atipias focais, perda da polaridade celular, displasias, melanócitos hiperplásicos irregularmente distribuídos ao longo da membrana basal com dispersão localizada de melanina entre os queratinócitos e áreas de despigmentação. Na fase tardia, ocorre uma atrofia com hipogranulose que é responsável pelo afinamento irregular da epiderme. A junção dermoepidérmica se encontra retificada. Os queratinócitos na pele

fotoenvelhecida apresentam um tempo de vida diminuído em relação à pele protegida; talvez como mecanismo de proteção para evitar a carcinogênese^{10-12,19,20,35}.

3.3.3. Alterações histopatológicas dérmicas

O tecido conjuntivo da derme consiste em fibras colágenas e elásticas dentro da substância fundamental; todos são formados pelos fibroblastos¹¹.

O colágeno é uma glicoproteína estrutural, com peso molecular 290 kDa, composto pelos aminoácidos glicina (33,5%), prolina (12%) e hidroxiprolina (10%) formando três cadeias polipeptídicas enroladas entre si configurando uma estrutura de tripla hélice^{11,36}. É formado por fibrilas e microfibrilas que originam as fibras com diâmetro variável e presentes sob a forma de uma rede delicadamente trançada ou de feixes espessos encontrados na camada papilar da derme. São birrefringentes, pois são constituídas por moléculas alongadas e paralelas, desse modo, quando examinadas ao microscópio de polarização aparecem brilhantes contra um fundo escuro³⁷. As unidades pilossebáceas, glândulas écrinas, apócrinas e vasos sanguíneos estão rodeados por uma malha delgada de fibras colágenas^{11,36}.

A derme reticular apresenta fibras colágenas, entrelaçadas, unidas em feixes espessos paralelos à superfície da pele. Eles se estendem em várias direções horizontalmente¹¹.

As fibras reticulares representam um tipo especial de fibra colágena delgada, com 0,2-1 μm de diâmetro. Apresentam argirofilia em contraste com as fibras colágenas e isso provavelmente está relacionado com o fato dessas corresponderem à distribuição de colágeno tipo III ao invés de colágeno tipo I. São as primeiras fibras formadas durante a vida embrionária e estão presentes em várias condições patológicas com atividade fibroblástica aumentada, como na sarcoidose, granuloma da tuberculose, dermatofibroma, fibrossarcoma e feridas em processo de cura¹¹. A proporção de colágeno tipo I para tipo III no adulto é 6:1³⁶.

Na pele normal, apesar do colágeno ser continuamente substituído; a sua formação não é precedida por uma fase argirófila, em vez disso, todo o colágeno neoformado consiste em fibras grandes. Entretanto, há poucas áreas nas quais as fibras colágenas pequenas, sob a forma de fibra reticular, estão presentes sem se transformar em fibras grandes não argirófilas; isso ocorre na zona da membrana basal, próxima da epiderme e seus apêndices, em torno dos vasos sanguíneos e como uma cápsula em torno de cada célula adiposa. A argirofilia das fibras reticulares pode ser explicada pela quantidade de substância fundamental em torno das fibras e sobre as mesmas, sendo presente nessas e ausentes nas fibras colágenas¹¹.

Junqueira (1978) apud Junqueira³⁸ descreveu o método de picrossirius como específico para detecção de colágeno em cortes de tecido em vertebrados, esta coloração aumenta a birrefringência do colágeno e fibras reticulares significativamente^{38,39}.

As fibras elásticas estão presentes em quantidade menor na pele. Na derme papilar estão presentes como feixes de microfibrilas (fibras oxitalânicas) ou como elastina com ligações cruzadas em pequena quantidade (fibras elaunínicas). Na derme reticular estão orientadas horizontalmente na rede, com extensões verticais para a derme papilar na forma de fibras oxitalânicas⁴⁰.

Na microscopia eletrônica as fibras elásticas apresentam, como maior constituinte, a elastina que aparece como estrutura ramificada, amorfa, formando camadas contínuas no tecido conjuntivo. A unidade básica da elastina é a tropoelastina que é um polipeptídeo linear, com cerca de 800 aminoácidos, massa molecular de 72 kDa e rico em valina, prolina, glicina e alanina, além de uma pequena quantidade de hidroxiprolina. A elastina é circundada por estruturas microfibrilares distintas formadas por proteínas de alto e baixo peso molecular, como as fibrilinas, proteínas de ligação latente, fator transformador de crescimento β (TGF β) e fibulinas⁴⁰.

Glicosaminoglicanos são um tipo de proteoglicano, componente da matriz extracelular. São moléculas de polissacarídeos que se ligam à água formando um polímero hidratado preenchedor do espaço entre as fibras de colágeno e elastina e auxiliam na sustentação do tecido cutâneo⁴¹.

No fotoenvelhecimento há diminuição dos fibroblastos; hiperplasia do tecido elástico, com fibras elásticas aumentadas, espessas, enroladas, emaranhadas e fibras colágenas afinadas e achatadas. As fibrilas colágenas estão diminuídas em número e quando presentes mostram uma densidade diminuída, bem como o contraste na estriação transversal e filamentos separados em suas extremidades¹⁰. Há diminuição dos precursores do colágeno tipo I e III^{10,11}. Os vasos sanguíneos na derme elastótica são tortuosos ou dilatados, com espessamento das paredes das vênulas pós-capilares causado pela deposição concêntrica de material membrana “basal-like”. As células-véu estão envolvidas no depósito deste material devido ao aumento de seu tamanho e número. Os glicosaminoglicanos estão aumentados e são depositados anormalmente no tecido elastótico em vez de serem depositados entre as fibras colágenas e elásticas^{10,12-15}.

Nos pacientes com elastose solar clínica, a coloração de hematoxilina-eosina (H.E.) revela, abaixo da epiderme, uma larga faixa de material eosinofílico chamada zona Grenz. Abaixo desta zona existe a degeneração basofílica do colágeno. Nesta área os feixes de colágeno eosinofílico foram substituídos por um material granuloso, organizado em massas amorfas basofílicas, que se coram como tecido elástico nas colorações específicas e são, portanto, designadas como material elastótico.

O material elastótico é resultado da ação direta dos RUV na matriz extracelular ou ação direta nos fibroblastos dérmicos que produzem elastina anormal¹¹⁻¹³. Os fibroblastos mostram características de uma célula que

sintetiza ativamente, pois possuem um retículo endoplasmático rugoso com material amorfo ou granuloso fino que é excretado no espaço extracelular; assim, o material elastótico é formado como resultado de uma função alterada dos fibroblastos, que não são mais capazes de produzir fibras elásticas e colágenas normais. Portanto, esse material não é um produto da degeneração das fibras elásticas preexistentes¹⁰.

O material elastótico se assemelha ao tecido elástico pelas seguintes características:

- composição dos aminoácidos, pois essa assemelha-se mais ao tecido elástico do que ao colágeno. O tecido elástico possui quantidade menor de hidroxiprolina;
- possui a mesma autofluorescência brilhante que o tecido elástico;
- tanto o material elastótico quanto o tecido elástico são digeridos pela enzima elastase.

Por outro lado, difere em alguns aspectos das fibras elásticas na pele idosa não exposta. O número e tamanho das fibras elastóticas estão aumentados em relação ao número e tamanho das fibras encontradas na pele normal ou idosa. Na microscopia eletrônica observa-se que o material elastótico preservou sua antigenicidade para a elastina, mas não para as microfibrilas¹⁰.

3.4. Remodelação do tecido conjuntivo

A manutenção da arquitetura do tecido normal da pele humana requer a deposição, agrupamento e “turnover” das macromoléculas da matriz extracelular; incluindo colágeno, elastina, glicosaminoglicanos e glicoproteínas. A capacidade das células residentes em remodelar a matriz extracelular é essencial no processo de cicatrização; essa remodelação envolve vários passos como degradação da matriz preexistente, rearranjo do citoesqueleto, translocação celular e deposição de novos componentes. A etapa inicial desse processo depende da degradação das macromoléculas da matriz extracelular que ocorre por meio da liberação de enzimas da família das MMPs, incluindo: as collagenases intersticiais, as gelatinases, as estromelisinases, matrilisinas, metaloelastases e as MMPs membranares⁴². O fotoenvelhecimento apresenta uma atividade aumentada da MMP1, pois a RUV estimula a formação de MMPs com conseqüente aumento da degradação do colágeno¹⁵.

A collagenase intersticial é o membro da família mais bem caracterizado e responsável pela degradação do colágeno tipo I, II e III. É induzido pela IL1, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento derivado da plaqueta, TNF α e é reprimido pelos glicocorticóides, TGF β , ácido retinóico e gene do adenovirus⁴².

No processo de cicatrização os queratinócitos em migração sobre a ferida expressam RNAm para colagenase intersticial quando em contato com a derme; estromelisininas são expressas em feridas crônicas, a estromelisina-2 é expressa pelos queratinócitos em migração enquanto a estromelisina-1 pelos queratinócitos em proliferação⁴².

A resposta imune envolve a liberação de MMPs. Os macrófagos liberam grande quantidade de colagenase intersticial, estromelisina-1, matrilitinas, metaloelastases e gelatinase-B contribuindo para a remodelação do tecido conjuntivo. As células T secretam baixos níveis de gelatinases e isso contribui para sua migração por meio do tecido conjuntivo. As MMPs durante a resposta inflamatória são capazes de clivar a TNF α de seu precursor ligado a membrana⁴².

A fase de remodelamento é o passo final no processo de cicatrização; onde a matriz extracelular é reorganizada, ocorre estimulação dos fibroblastos por meio do TGF β com produção de glicosaminoglicanos e síntese de colágeno⁴¹.

3.5. Sistema imunológico e a pele

A epiderme faz parte do sistema imunológico, pois é uma barreira de proteção e contém células que regulam a resposta imune. Esta resposta

envolve mecanismos de defesa específicos contra estímulos endógenos ou exógenos, mecanismos homeostáticos e de vigilância imunológica⁴³⁻⁴⁵.

A exposição epidérmica a qualquer substância penetrante ativa o sistema local, incluindo a percepção e a apresentação de antígeno e resulta na migração de células imunocompetentes para dentro da derme, a fim de assegurar o reconhecimento do antígeno ou a eliminação do patógeno⁴³.

A resposta imunitária envolve dois sistemas: os mecanismos celulares influenciados por linfócitos T, o SALT (Skin-Associated Lymphoid Tissue) e os mecanismos humorais, que dependem dos linfócitos B^{44,46}. O SALT é formado por um sistema integrado de tecidos linfóides associados à pele onde as células de Langerhans interagem com queratinócitos vizinhos que secretam uma variedade de citocinas imuno-reguladoras, linfócitos T circulantes e nódulos linfáticos^{47,48}.

3.5.1. Células apresentadoras de antígeno

As células dotadas da capacidade de apresentação de antígeno são as células dedríticas, cuja função é internalizar e apresentar antígenos. Capturam os antígenos nos locais de infecção e são ativadas como parte da resposta imune inata, o que induz sua migração para os tecidos linfóides locais e sua maturação em células altamente efetivas em apresentar

antígenos às células T recirculantes. São representadas pelos macrófagos, linfócito B e células de Langerhans^{44,49}.

As células de Langerhans vigiam a pele em busca de patógenos antigênicos e iniciam a resposta imune assegurando a integridade e homeostasia do órgão mais periférico do organismo. São células dendríticas imaturas típicas, fagocíticas ativas, derivadas da medula óssea e circulam entre o tecido hematopoiético e a pele. Possuem receptores de superfície para imunoglobulina (fração Fc-IgG) e complemento (C3b) facilitando o reconhecimento, fagocitose e destruição de substâncias antigênicas^{44,47,48,50-52}. Na microscopia eletrônica se apresentam como grânulos citoplasmáticos, arredondados denominados “grânulos de Birbeck” e bastões com estriações centrais com formato semelhante a uma “raquete de tênis”^{31,47,49,50,53}.

Essas células são confinadas ao epitélio escamoso estratificado onde possuem localização supra basal, concentração de 460 a 1000/mm² e representam 3 a 8% das células da epiderme^{43,47,52}. Ocasionalmente apresentam ocorrência extraepitelial como derme, linfáticos dérmicos, parede da aorta e timo³¹.

As células de Langerhans se ligam ao antígeno, migram da epiderme para a derme em direção aos vasos linfáticos; isto ocorre em um período de 24 horas a três dias⁵⁴, e então migram para os linfonodos regionais (região parafolicular do córtex) onde são chamadas de células dendríticas. Nos órgãos linfóides não são mais capazes de captar antígenos, mas expressam altos níveis de moléculas de histocompatibilidade classe I e II permitindo a

apresentação de peptídeos de proteínas de patógenos infectantes e ativação da célula T. Expressam moléculas de adesão que permitem sua interação com a célula T antígeno-específica. Diferenciam-se em células apresentadoras de antígeno potentes durante esta migração garantindo a ativação de linfócitos T em repouso dentro dos linfonodos e não na pele onde o antígeno penetrou primariamente^{44,49,55-63}. As citocinas epidérmicas iniciam e regulam a migração e maturação das células de Langerhans, particularmente a IL1 β e TNF α ⁶⁴.

O marcador imunoistoquímico específico para as células de Langerhans é o CD1a, que é uma glicoproteína da superfície da célula de 49.000 D, associada à uma unidade de microglobulina menor (12.000) β 2^{52,65}. Devido a sua estrutura semelhante às moléculas MHC de classe I em sua organização subunitária e associação com a microglobulina B2 há trabalhos que relatam que o CD1 faz parte da família de antígenos MHC classe I⁵², mas esse marcador se comporta como uma molécula MHC de classe II, pois não é retido no retículo endoplasmático pela associação com o complexo TAP, mas direcionada às vesículas endocíticas, onde se liga aos peptídeos⁶⁶.

A interação das células de Langerhans com o antígeno e células T resulta na indução de uma molécula de superfície celular conhecida como “antígeno cutâneo do linfócito” (CLA) nas células T. O CLA é uma glicoproteína de 200 kDa que define um subgrupo de células T de memória que retornam para a pele; este facilita a entrada dos linfócitos T na pele

através da mediação da ligação e do rolamento das células T sobre as células endoteliais vasculares devido a ligação com a selectina-E; uma molécula de adesão celular. As quimiocinas liberadas pelas células endoteliais ativam as células T a expressarem outras moléculas de adesão como a LFA1 (associada à função do leucócito 1), que fazem a ligação com o endotélio e a VLA4 (de ativação muito tardia) que fazem a ligação com as moléculas de adesão da célula vascular. A interação permite a transmigração das células T para pele e sua participação no processo inflamatório³¹.

As células de Langerhans também interagem com queratinócitos vizinhos, que secretam citocinas imuno-reguladoras e esses passam a ter uma função importante no sistema imunológico, destacando-se a função “sentinela”^{31,47}.

3.5.2. Queratinócitos

Possuem funções estruturais e participam de processos inflamatórios e imunológicos, pois produzem citocinas, neuropeptídeos e eicosanóides. A secreção de citocinas pode ter ação nas células vizinhas; padrão parácrino, alterar seu próprio estado funcional; padrão autócrino e apresentar ação em sítios distantes; padrão endócrino³¹.

Queratinócitos de pele normal produzem IL1, IL7 e TGF β . Mediante certos estímulos como hipóxia, trauma, radiação não ionizante e haptenos, há aumento da produção de IL1, IL6 e TNF α , com início do processo inflamatório; IL1, IL10, GM-CSF e TNF α com modulação do fenótipo e função das células de Langerhans e IL15 com ativação de linfócitos e desvio da resposta linfocítica na direção Th1 (IL12) ou Th2 (IL10)³¹.

Os queratinócitos liberam também células produtoras de eicosanóides, conjunto de mediadores de lipídeos, que regulam reações inflamatórias e imunes, como o produto da ciclooxigenase PGE₂ e o quimioatraente LTB₄ de neutrófilos³¹.

O IFN γ induz a expressão de HLA-DR na superfície do queratinócito e este passa a ser um imunócito (APC), ou seja, apresenta uma nova capacidade funcional, como uma célula acessória efetiva para linfócitos T autólogos em repouso frente a superantígenos^{31,67}.

O queratinócito ainda pode ter o papel de célula alvo para linfócitos T citotóxicos na remoção de vírus ou células pré-malignas ou malignas, pois expressa produtos do MHC classe I³¹.

Moléculas de radical livre, em geral as espécies reativas de oxigênio, que contribuem para o dano e envelhecimento da pele provocado pelo sol, são um outro grupo de modificadores de resposta biológica que se originam dos queratinócitos³¹.

3.5.3. Linfócitos

Os linfócitos do sistema imune adaptativo desenvolvem-se para reconhecer, com grande especificidade, uma imensa variedade de antígenos diferentes^{31,49}. Os linfócitos não são proeminentes na pele humana normal. Na epiderme correspondem de 2 a 3% de todas as células CD3+ e residem na camada basal e suprabasal; na derme são comumente detectados ao redor dos vasos sangüíneos e folículos pilossebáceos e o seu aumento no processo inflamatório ocorre mais pelo influxo que pela proliferação local^{31,56}.

A distinção entre os tipos de linfócitos é realizada por meio de anticorpos monoclonais que reagem com moléculas da superfície dos linfócitos, ou seja, antígenos de diferenciação leucocitária permitindo dessa maneira sua caracterização fenotípica. Os anticorpos monoclonais que reconhecem um mesmo antígeno de diferenciação são agrupados em conjuntos (cluster) de diferenciação (CD). Na sua diferenciação a partir da célula primitiva, os linfócitos vão sofrendo modificações nas moléculas da sua superfície e desta maneira são caracterizados fenotipicamente⁴⁴.

Os linfócitos T e B reconhecem o antígeno por meio de receptores específicos em suas membranas associados com o antígeno de histocompatibilidade I e II⁴⁴.

As moléculas de reconhecimento de antígeno das células B são as imunoglobulinas (Ig). Essas são proteínas produzidas pelas células B com

uma variedade de especificidade antigênica. A secreção de anticorpos, os quais se ligam a patógenos ou a seus produtos tóxicos no espaço extracelular, é a principal função efetora das células B na imunidade adaptativa³¹.

A imunidade humoral na pele não é totalmente conhecida, há presença de IgA nas secreções da pele provavelmente produzidas por células B ativadas nos linfonodos e que retornam para a pele através da circulação. A pele também é um local importante para a hipersensibilidade imediata mediada por IgE liberados por mediadores dos mastócitos dérmicos⁵⁶.

As células T maturam no timo onde são selecionadas para sobreviverem e migrarem para periferia ou sofrerem morte celular programada. São responsáveis pela imunidade celular. Reconhecem antígenos estranhos, liberam citocinas que ativam as células “natural killer” e citocinas que permitem o crescimento, diferenciação e ativação das células B^{44,49}.

As moléculas de reconhecimento de antígenos das células T existem somente como proteínas ligadas à membrana e sua única função é sinalizar para a ativação de células T. Esses “receptores de células T” (TCR) são um conjunto de proteínas de superfície celular conhecido como CD3; que é uma molécula de 20 kDa, semelhantes às imunoglobulinas e diferentes dos “receptores de células B”, pois não se ligam, mas reconhecem os antígenos diretamente^{44,68,69}.

As duas principais classes de células T possuem função efetora distinta e são diferenciadas pela expressão de proteínas celulares de superfície – CD4 e CD8. Estes dois tipos de células T reconhecem diferentes classes de moléculas de histocompatibilidade: Classe I e Classe II⁶⁹.

O CD4 é uma molécula dos linfócitos T “helper” ou auxiliares/indutores ativada pelas células apresentadoras de antígeno que expressem na sua superfície os antígenos de histocompatibilidade classe II (MHC II). O CD8 é uma molécula dos linfócitos T “supressores” ou citotóxicos ativada por células apresentadoras de antígeno que expressem na sua superfície os antígenos de histocompatibilidade classe I (MHC I)^{44,66,68,69,70,71}.

O antígeno de histocompatibilidade (MHC) é poligênico, polimórfico e no homem está localizado no cromossomo 6, se estende cerca de 4×10^6 pares de base e contém mais de 200 genes. Sua principal função é ligar fragmentos peptídicos derivados de agentes patogênicos por degradação no interior das células, apresentando tais fragmentos na superfície celular, onde o complexo é reconhecido pelo linfócito T. A classe I é codificada por três genes de cadeia α : HLA-A, HLA-B, HLA-C e a classe II por três pares de cadeias α e β : HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ. Estes genes são chamados de Sistema de Antígeno Leucocitário Humano (HLA), pois foram descobertos mediante diferenças entre leucócitos de diferentes indivíduos⁶⁶. HLA são glicoproteínas de membranas altamente polimórfas⁷⁰. Os antígenos que se ligam ao HLA-DR são proteínas que foram quebradas em pequenos

peptídeos nas vesículas das células apresentadoras de antígeno e estas vesículas se unem a organelas derivadas do retículo endoplasmático que contem as moléculas classe II^{66,70}.

Moléculas MHC de classe I estão presentes em todas as células nucleadas, portanto as células anucleadas expressam pouca molécula MHC classe I. Ligam peptídeos derivados das proteínas residentes no citosol para a superfície celular, onde o complexo “peptídeo MHC” é reconhecido pelas células T-CD8. Essas proteínas podem incluir aquelas geradas por qualquer patógeno intracelular, tais como vírus ou parasita. O mecanismo proteolítico do complexo proteossoma degrada essas moléculas em fragmentos de peptídeos curtos para serem levados para o lúmen do retículo endoplasmático pelo transportador TAP “transportadores associados com processamento do antígeno”, um heterodímero ligado a adenosina trifosfato (ATP). Os genes TAP1 e TAP2 mapeiam dentro do MHC e são induzidos por interferon. Dentro do retículo endoplasmático peptídeos de resíduos de aminoácidos se ligam às moléculas da classe I recém sintetizadas e formam complexos estáveis que viajam em direção à superfície das células para apresentação aos linfócitos T citotóxicos^{66,70}.

Em comparação, a principal função das células T CD4 que reconhecem moléculas do MHC de classe II é ativar outras células efetoras do sistema imunológico. As células “T virgem”, que são as células maduras que não encontraram seu antígeno específico, para participarem da resposta imune adaptativa devem primeiramente encontrá-lo e então são induzidas a

proliferarem e a se diferenciarem em células capazes de remover este antígeno. Essas são as células T efetoras armadas^{66,70}. As moléculas MHC de classe II apresentam os peptídeos provenientes do sistema vesicular para a superfície onde são reconhecidos pelas células T CD4 auxiliares e que se manifestam apenas através de APC especializadas. Quando as células T-CD4 reconhecem peptídeos ligados a moléculas MHC de classe II nas células B, elas são estimuladas à produção de anticorpos e quando reconhecem peptídeos ligados a moléculas MHC de classe II nos macrófagos ativam essas células para a destruição dos patógenos em suas vesículas⁶⁶.

As células T “helper” (Th) ou auxiliadoras/indutoras podem se dividir em três grupos, de acordo com o padrão de citocinas produzidas^{67,72}. Os linfócitos Th0 em repouso são ativados pela ocupação do “receptor de célula T” ou por estimulação da célula apresentadora de antígeno (APC) na presença de IL12 (interleucina), que é produzida pelas células de Langerhans e por células dendríticas dérmicas. As células T com perfil Th0 são consideradas precursoras potenciais de Th1 e Th2, e produzem padrão de citocinas diversas, pois implicam em diferentes funções imunológicas^{67,72}.

Os antígenos que se diferenciam no interior de macrófagos ou células dendríticas estimulam a produção de células Th1 que são produtoras IL2, IL3, IL12, IFN γ , TNF α e TNF β , GM-CSF. Essas citocinas ativam as propriedades microbicidas dos macrófagos, sua principal função devido a liberação de IFN γ , induzem a produção de anticorpos IgG pelos linfócitos B

que promovem a produção de anticorpos opsonizantes e fixadores de complemento, a citotoxicidade celular dependente de anticorpos e a hipersensibilidade do tipo tardia. As respostas do tipo Th1 são adequadas para defesa contra parasitas intracelulares como vírus, bactérias intracelulares e protozoários^{49,67,72}.

Os antígenos extracelulares estimulam a produção de células Th2. Há produção de IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL10, IL13, TNF α . Os clones Th2 iniciam a resposta humoral ativando células B que são efetivamente indutores da produção de IgM, IgG1 e IgA, e somente eles induzem a produção de IgE e IgG4 (respostas alérgicas e a hipersensibilidade do tipo imediata)^{49,67,73}.

3.5.4. Moléculas de adesão

O recrutamento de leucócitos ocorre como parte da resposta inflamatória e é mediado pelas moléculas de adesão célula-célula que são induzidas na superfície do endotélio dos vasos sanguíneos locais^{49,74}.

Três famílias de receptores de aderência mediam essas interações: a superfamília das imunoglobulinas, as integrinas e as selectinas^{49,74,75}.

As integrinas compreendem uma grande família de proteínas de superfície celular que medeiam a adesão entre células e entre células e matrizes extracelulares na resposta imune. São divididas em subunidades α

e β sendo esta a responsável pela diferenciação. O LFA1 e MAC1 (antígeno 1 de ativação macrofágico) pertencem a subfamília β 2 enquanto a subfamília β 1 compreende receptores que são expressos em células não hematopoiéticas e leucócitos e são chamados de integrinas de ativação muito lenta (VLA1, VLA2, VLA3, VLA4, VLA5)^{49,74}.

As selectinas são glicoproteínas de membrana que ligam grupos específicos de carboidratos. As selectinas E e P são expressas nas células endoteliais, e a selectina L, nos leucócitos e induz a adesão dos leucócitos à parede vascular^{49,74}.

A superfamília das imunoglobulinas, importante na interação dos linfócitos com as células apresentadoras de antígeno, é formada por moléculas de adesão intercelular (ICAM1, ICAM2, ICAM3), antígenos ligados à função leucocitária (LFA2 e LFA3) e a molécula de adesão celular vascular (VCAM1)^{49,74}.

A molécula 1 de aderência intercelular (ICAM1) é uma glicoproteína de superfície celular, com peso molecular de 90 a 114 KDa, presentes nas células não hematopoiéticas e hematopoiéticas e que apresentam um papel importante na concessão de precisa especificidade e diversidade funcional às interações de célula-célula dentro do sistema imune. Foi originalmente definida como favorecedora da agregação de leucócitos homotípicos estimulados com éster de forbol⁷⁶⁻⁷⁸.

ICAM2 é expresso no endotélio e células apresentadoras de antígeno; a ligação com essas células permite que os linfócitos migrem através da

parede vascular. ICAM3 é expresso somente nos leucócitos e é importante na adesão entre células T e células apresentadoras de antígeno⁴⁹.

3.5.5. Citocinas

As citocinas são pequenas proteínas produzidas por uma célula que altera o comportamento ou as propriedades de uma outra célula. Quando produzidas pelos linfócitos T são chamadas de interleucinas (IL); são divididas em primárias e secundárias, sendo as primárias capazes de por si mesmas iniciarem todos os eventos necessários para a infiltração dos leucócitos nos tecidos; somente são primárias a IL1 e o fator de necrose tumoral (TNF α e β)⁴⁹.

A IL1 é produzida pelos linfócitos T, B, macrófagos, monócitos, células de Langerhans, melanócitos, fibroblastos, células endoteliais e musculares e pelos queratinócitos. Induz a proliferação de outras citocinas pelo linfócito T, potencializa a proliferação dos linfócitos B, favorece a quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e linfócitos, produz aumento da síntese dos fatores estimuladores de colônia dos macrófagos e monócitos e induz a síntese de colágeno pelos fibroblastos. Além disso, regula e aumenta a expressão das moléculas de adesão celular ICAM1 (molécula de adesão intercelular), ELAM1 (molécula de adesão de leucócitos ao endotélio) e

EVCAM (molécula de adesão das células aos vasos)^{31,44,49}.

A IL2 (CD25) é um produto de linfócitos T ativados e, sempre figurou de maneira proeminente em modelos de citocinas exigidos para o desenvolvimento, diferenciação e função efetora dos linfócitos T. A IL3 é um produto dos linfócitos T CD4+, causa proliferação, diferenciação e formação de colônias de várias células mielóides a partir da medula óssea. O papel da IL4 (CD124) é como fator de crescimento e diferenciação para as células Th2. Atua sobre os linfócitos T, B, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Inibe a produção das IL1, IL6 e TNF α , além da expressão de ICAM1. A IL5 é sintetizada pelos linfócitos T e mastócitos e atua nos linfócitos B e eosinófilos^{31,44,49}.

A IL6 é produzida pelos linfócitos T e B, monócitos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e hepatócitos. Promove a diferenciação e proliferação das células T e B, proliferação de granulócitos e macrófagos, formação de plaquetas, proliferação de queratinócitos, aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos e possui ação antiviral e antitumoral. A IL7 regula a geração de linfócitos T e B e modifica a função das células efetoras na fase reativa de algumas respostas imunes. IL8 é um potente quimiotático de neutrófilos e também apresenta ação em linfócitos T e basófilos; estes liberam histamina, além disso, estimula a proliferação dos queratinócitos e a via metabólica do ácido araquidônico^{31,44,49}.

A IL10 é imunorreguladora, produzida por linfócito T; Th1 e Th2, células de Langerhans, macrófagos e queratinócitos. Nos linfócitos Th1

diminui as respostas mediadas por células, nos linfócitos B aumenta a produção de anticorpos e nos macrófagos diminui a função de apresentação de antígeno e a produção de $\text{TNF}\alpha$, IL1, IL6, IL8 e GM-CSF. A IL12 é um produto das células apresentadoras de antígeno como as células dendríticas, monócitos e macrófagos e de certos linfócitos B. A IL15 ativa células “natural killer” e estimula a proliferação de linfócitos T ativados^{31,44,49}.

Fator de necrose tumoral (TNF) é dividido em dois subtipos: $\text{TNF}\alpha$ ou caquetina, que desperta dois tipos de reações nas células: efeitos pró-inflamatórios e indução de morte por apoptose e $\text{TNF}\beta$ ou linfotoxina, que é produzido pelos linfócitos T CD4. É um importante mediador de inflamação cutânea e é produzido pelos queratinócitos com exposição ao UV. A injeção intradérmica de $\text{TNF}\alpha$ está associada à migração das células dendríticas para os linfonodos e a injeção sistêmica de anti-TNF inibe a migração das células de Langerhans da epiderme para os linfonodos. Outra fonte cutânea dérmica de $\text{TNF}\alpha$ induzido pelo UV são os fibroblastos. Na pele sua ação inibe a proliferação epidérmica de queratinócitos, melanócitos, diminui o número de células apresentadoras de antígeno, acentua o efeito imunossupressor da radiação UVB, estimula a síntese de colágeno, induz a expressão de moléculas de adesão ICAM1, estimula a produção de GM-CSF, ELAM, PDGF, IL1, IL6 e IL8, $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ ^{31,44,49}.

Interferons podem ser divididos em três grupos, conhecidos como $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$ e $\text{IFN}\gamma$. O $\text{IFN}\alpha$ e $\text{IFN}\beta$ atualmente conhecidos como IFN tipo I, são ácidos estáveis e são principalmente produzidos por leucócitos e

fibroblastos, respectivamente, em resposta a vírus ou ácido ribonucléico duplamente retorcido. O IFN γ é um ácido lábil e sua produção está restrita a célula “natural killer”, linfócitos CD8, um subgrupo de linfócitos CD4, produzindo citocinas do tipo I (células Th1). Apresenta capacidade de modular a resposta imune, propriedades ativadoras dos macrófagos, aumenta a capacidade de apresentação de antígenos de células apresentadoras e induz moléculas de adesão como ICAM1 e VCAM1^{31,44,49}.

3.5.6. Sistema imunológico da pele e a exposição solar

A exposição excessiva da pele humana à luz solar provoca inúmeros danos estruturais e funcionais, sendo um deles a imunossupressão sistêmica e local⁷⁹. O primeiro passo no início da reação fotobiológica é a absorção cutânea da energia da RUV por uma molécula específica chamada cromóforo. Essa energia causa dano fotoquímico ao DNA e proteínas. A epiderme contém vários desses cromóforos, principalmente no espectro UVB. Após a exposição a RUV ocorre liberação de citocinas e mediadores inflamatórios que são importantes no reparo do DNA e que modulam o comportamento de várias células como queratinócitos, células de Langerhans, células endoteliais, fibroblastos e linfócitos³¹.

Os raios ultravioletas, especialmente a radiação UVB (280-315 nm) provocam a isomerização do ácido urocânico, dano ao DNA celular e posteriormente produção de citocinas como IL1, TNF e prostaglandina E2. A atividade das células “natural killer” é inibida, a presença de antígenos é alterada e o microambiente torna-se favorável ao desenvolvimento de resposta celular Th2. A fotoexposição causa influxo de IL10 que produz células macrofágicas e a depleção das células de Langerhans levando a diminuição na capacidade das células apresentadoras de antígeno e conseqüentemente na imunidade CD4 dependente, ou seja, nas reações celulares imunes. A diminuição das células de Langerhans quando comparadas à pele normal contribui para o aumento da susceptibilidade da pele ao câncer^{12,25,31,51,79,80}. Os mastócitos são uma fonte poderosa de TNF α que aumentam sua expressão de integrantes de ligação de matrizes nas células de Langerhans. O ácido urocânico tem a capacidade de degranular os mastócitos e dessa maneira afeta o tráfico e a função das células de Langerhans⁷⁹.

Estudos mostram que quatro exposições diárias de UV reduzem muito o número de células de Langerhans; e que essa pele irradiada, com uma população de células de Langerhans muito diminuída, é incapaz de iniciar uma resposta de hipersensibilidade retardada ao DNCB⁵⁰. Gilchrest et al.⁵⁰ mostram dados que confirmam e quantificam o efeito da irradiação UV sobre as células de Langerhans na pele humana e demonstram que o

envelhecimento cronológico também está associado à redução dessa população celular na epiderme.

O mecanismo mais importante no que diz respeito à depleção das células de Langerhans em seres humanos, é desconhecido. Alguns autores sugerem que a deficiência ou a baixa regulação dos receptores de fatores de crescimento para células de Langerhans são responsáveis pela diminuição destas células; os dois mecanismos mais prováveis implicados neste acontecimento são a apoptose e/ou migração. Trabalhos na literatura demonstram que as células humanas irradiadas sofrem apoptose e trabalhos em células de ratos mostram que a irradiação UVB diminui as células de Langerhans através da produção de oxigênio reativo^{31,80}.

Os queratinócitos são sítio importante do dano induzido pelo UVB, sendo capazes de produzir citocinas com propriedade imunológica ou inflamatória; são elas: IL1, IL3, IL6, IL10, IL12, GM-CSF, TNF α e IFN β . A IL7 é deprimida e o papel da IL15 é controverso. Há liberação também de substância P, peptídeo relacionado com o gene da calcitonina e o óxido nítrico³¹.

A exposição dos queratinócitos ao RUV inibe a capacidade das citocinas em aumentar ICAM1 nas primeiras 24 horas, entretanto depois de 48-96 horas a RUV aumenta os níveis de ICAM1. Estudos na literatura demonstram que um trauma significativo à pele por esfoliação grave ou exposição a altos níveis de UVB, podem induzir a presença de uma grande variedade de citocinas na pele e no aparecimento de células endoteliais de

selectina-E^{31,81}.

A TFD pode diminuir a adesão celular das células alvo, principalmente as células tumorais, por meio da inibição das integrinas, diminuindo desta maneira o potencial metastático das células remanescente⁸².

Em relação aos linfócitos circulantes, é difícil a interpretação devido aos tipos de fonte de radiação. Após exposição curta ao UVR há uma diminuição das células T circulantes, mais pronunciadas nas primeiras 8 a 12 horas e que retorna ao normal em 72 horas. A proporção de células B não se altera (Quadros 3 e 4)³¹.

Quadro 3 – Efeitos da radiação UV *in vitro*

- Altera capacidade de apresentar o antígeno das células apresentadoras de antígeno (células de Langerhans).
- Altera a capacidade dos linfócitos para responder a mitógenos ou antígenos.
- Altera a produção de citocinas.
- Induz liberação fatores imunossupressores.

Quadro 4 - Efeitos da radiação UV *in vivo*

- Indução câncer de pele.
- Alteração função e morfologia das células de Langerhans.
- Supressão da indução da hipersensibilidade de contato.
- Supressão da indução da hipersensibilidade retardada.
- Altera o trânsito das células.
- Alteração dos níveis circulantes de citocinas (IL1, IL6, TNF α).

3.6. Tratamento do fotoenvelhecimento

Muitas são as formas de tratamento da pele fotoenvelhecida, tanto no aspecto estético como na profilaxia do câncer de pele. O fotoenvelhecimento pode ser tratado e/ou prevenido por meio de métodos clínicos ou cirúrgicos como: uso de substâncias químicas como as esfoliações, métodos mecânicos como a dermoabrasão, ou cirúrgicos como a eletrocoagulação, crioterapia ou laserterapia (Quadro 5)^{25,83-88}.

As esfoliações químicas com ácido e a dermoabrasão são eficazes em destruir a pele danificada. As esfoliações superficiais retiram a camada córnea ou toda a epiderme, mas pouco melhoram as rugas; a média, atinge parte da derme papilar melhorando a textura da pele e as linhas superficiais e a profunda atinge a derme reticular com melhora da textura, coloração e rugas profundas^{19,35,89,90}.

A dermoabrasão também atinge a derme reticular principalmente no tratamento das rugas profundas, é uma técnica difícil de ser realizada necessitando treinamento, expõe o médico aos agentes infecciosos desprendidos do sangue e o paciente pode ter contato com as partículas do cristal principalmente nos olhos. Ambos os procedimentos podem evoluir com hiperpigmentação, hipopigmentação, eritema e formação de cicatrizes^{19,35,89,90}.

Quadro 5 – Terapias clínicas e cirúrgicas para redução de sinais cutâneos do fotoenvelhecimento

Clinicas

Meio ambiente

- Eliminar exposição solar
- Eliminar exposição e consumo de cigarros

Agentes tópicos

- Alfa-hidroxiácidos
- Beta-hidroxiácidos
- Estrogênio
- Retinóides
- Proteção solar (químico e físico)
- Vitaminas C e E
- Extrato de chá verde
- Fatores de crescimento (TGF-beta)

Peelings químicos

- Alfa e beta-hidroxiácidos, ácido tricloracético, Jessner, fenol

Agentes injetáveis (inclui preenchimento dos tecidos moles)

- Transplante de gordura autóloga
- Toxina botulínica
- Colágeno
- Ácido hialurônico
- Polimetilmetacrilato (PMMA), hidroxipaatita, Gore-Tex® ou outros implantes permanentes
- *Vein transfer*

Terapia de reposição hormonal

- Estrogênio
- Hormônio do crescimento

Cirúrgico

- Blefaroplastia
- *Lift* de sobrancelhas
- Ritidectomia cervicofacial (*lift*-facial)
- *Resurfacing* com laser de dióxido de carbono ou laser Erbium
- Dermabrasão ou microdermabrasão
- Tratamento a laser das telangiectasias (585-595 nm)
- Tratamento a laser de lesões pigmentadas (Q-switched 694 nm, 755 nm, 1.064 nm)
- Lasers fabricados para estimular a produção de colágeno (585 nm, 1.320 nm, 1.450 nm)
- Luz intensa pulsada (LIP)
- Aparelhos de radiofrequência

O laser ablativo pode ser controlado na profundidade atingida, mas como provoca uma ferida aberta, as complicações também são as mesmas das esfoliações e dermoabrasão. O “resurfacing” a laser nunca é realizado até o nível de uma esfoliação profunda, mas atinge os mesmos resultados devido à remoção do tecido, contração e remodelação do colágeno^{35,90-93}.

O laser não ablativo, como a luz intensa pulsada (LIP), provoca danos térmicos subclínicos e melhora do fotoenvelhecimento, mas pouca melhora das lesões pré-malignas e malignas^{35,90-93}.

Um regime terapêutico para o fotoenvelhecimento com lesões pré-malignas combina vários tipos de técnicas cirúrgicas, laser ablativos, esfoliações químicas ou laser não ablativo; essa combinação é dispendiosa, demorada, paciente dependente e pode cursar com complicações³⁵.

Novos procedimentos com radiofrequência (RF)^{94,95}, luz de baixa intensidade (LED)^{95,96}, laser fracionado e fontes de luz infravermelha têm sido utilizados no tratamento e profilaxia do fotoenvelhecimento^{95,96}.

Atualmente a TFD está sendo utilizada no tratamento do fotoenvelhecimento por meio do uso tópico do ácido 5-delta-aminolevulínico (ALA); técnica chamada de “fotorrejuvenescimento fotodinâmico”, com ótimos resultados estéticos, em um período aceitável, bem tolerada com poucos efeitos colaterais e, sobretudo, com eficácia tanto nos componentes do fotodano como no tratamento das lesões pré-malignas, malignas, e, mais importante, na profilaxia do câncer de pele^{2,35,95}.

3.7. Reestruturação da derme no tratamento do fotoenvelhecimento

A reestruturação da derme no tratamento do fotoenvelhecimento apresenta principalmente a formação de neocolágeno na derme papilar.

A dermoabrasão apresenta inicialmente diminuição da quantidade de elastina, seguida de aumento; mas esta permanece inferior à quantidade inicial. Há também diminuição da quantidade de colágeno tipo I e III seguida de aumento no controle após três meses. As fibras colágenas e elásticas se tornam mais densas e regulares⁹⁷.

Nas esfoliações químicas a remodelação das fibras colágenas é maior quanto maior a profundidade do “peeling”. As fibras de colágeno se tornam mais densas e compactas, com padrão estriado horizontal ocupando a derme superior. Ocorre também aumento do tecido elástico⁹⁸. A comparação entre a aplicação de fenol puro, fórmula de Baker e ATA 60% demonstra que a elastose não prejudica a penetração das substâncias químicas e a espessura da faixa de colágeno é proporcional à espessura da profundidade da necrose alcançada na fase aguda⁹⁸.

A comparação entre dermoabrasão, peeling de ATA 35%, laser de CO₂ e a fórmula de Baker-Gordon nos dias 7, 21 e 42, mostra que o peeling de ATA 35% pode ser comparado clínico e histologicamente com laser (três passadas com 150 J/cm² por pulso ou uma ou duas passadas com 250

J/cm²). A dermabrasão pode ser comparada com laser duas ou três passadas com 250-450 J/cm². O “peeling” de fenol mostra uma recuperação mais lenta que os outros procedimentos.

Na literatura há relatos que técnicas não ablativas são mais seletivas, apresentam pouca injúria epidérmica, ativação fibroblástica da derme papilar e reticular superior com síntese de neocolágeno^{5,92,99}. Nas técnicas ablativas a remodelação do colágeno tem início quando começa a formação do tecido de granulação pelos fibroblastos que também são responsáveis pela produção de elastina e fibronectina^{90,100}.

Em relação às técnicas ablativas, Drnovsek-Olup¹⁰¹ demonstra com o laser a Er:Yag, a desnaturação do colágeno profundo e alterações epidérmicas com total coagulação logo após o procedimento. No sétimo dia há completa regeneração da epiderme e infiltrado de monócitos e macrófagos e no vigésimo primeiro dia é observada proliferação do tecido profundo. Orringer et al.¹⁰² mostram que a produção de procolágeno tipo I e RNA mensageiro do procolágeno tipo III apresenta um pico de 7,5 e 8,9 vezes o nível basal, respectivamente 21 dias após o tratamento com laser de CO₂ e permanecem elevados por seis meses.

O tratamento com LIP resulta em 18% de aumento do colágeno tipo I na derme papilar principalmente após seis meses do tratamento^{93,103}. Prieto et al.¹⁰⁴, não evidencia alteração significativa na epiderme e derme após tratamento da pele fotoenvelhecida com LIP, e por isso não encontra uma formação de colágeno significativa na derme papilar.

O tratamento das ríides actínicas com PDL 585 nm evidencia a formação de colágeno dérmico como mecanismo chave da ação para as técnicas não ablativas no remodelamento dérmico^{93,105,106}, aumento de 84% na produção procolágeno tipo III¹⁰⁷ e aumento na expressão “ácido nucléico mensageiro no colágeno tipo I”, procolágeno tipo I, procolágeno tipo III, sulfato de condroitina e espessamento da zona Grenz.

Muccini et al.¹⁰⁸, em estudo do tratamento da elastose solar com laser de diodo 980 nm, mostra após 21 dias proliferação de neocolágeno e fibras elásticas.

O laser Nd:Yag não ablativo também pode produzir novo colágeno na derme papilar, principalmente em pacientes jovens. A epiderme se torna mais compacta, há formação de colágeno e diminuição da elastose solar na derme^{103,106,109,110}. Dang et al.¹¹¹, em estudo na pele de rato com Q switched 1064 nm Nd:Yag laser e 1320 nm Nd:Yag não ablativo, demonstra que o primeiro é mais efetivo que o segundo e que reações foto-mecânicas podem causar maior síntese de colágeno tipo III enquanto o efeito fototérmico maior formação de colágeno tipo I.

Mendez et al.¹¹² mostram que a terapia com LED pode ter um efeito biomodulador positivo na reparação cutânea, pois reduz a reação inflamatória e aumenta o depósito de colágeno com aumento da proliferação dos miofibroblastos em feridas cutâneas em ratos. O aumento da produção e a organização do colágeno são demonstrados pelo autor por meio da coloração de picrosírius¹¹².

Zelickson et al.⁹⁴ demonstram o aumento na expressão do RNA mensageiro do colágeno tipo I após tratamento com radiofrequência na pele de abdômen humano; tratamento não ablativo no rejuvenescimento da pele.

3.8. Terapia fotodinâmica

3.8.1. Histórico

A luz é indicada no tratamento de doenças desde a antiguidade¹¹³. Usada pelos humanos por 3000 anos, era conhecida no Egito, Índia e China. Na Grécia, Herodotes, a chamou de “helioterapia” e a recomendava para a restauração da saúde¹¹⁴.

A fotoquimioterapia é descrita no sagrado livro indiano “Atharava-veda” (1400 a.C.) com o uso da planta *Psoralea corylifolia* usada no tratamento do vitiligo. Seu avanço ocorreu em 1974 com a PUVA (psoralênico associado à UVA) no tratamento da psoríase¹¹⁴.

A origem da TFD é no século XX, mais precisamente no ano 1897, por um estudante de medicina alemão chamado Oscar Raab. Orientado pelo Professor Herman von Tappeiner apud Daniell e Hill¹¹⁵, estuda o processo através do qual a droga quinina é eficaz contra a malária e percebe que

outros agentes, como a acridina, são letais para o paramécio na presença de luz¹¹³⁻¹¹⁷.

Em Munique, Albert Jesionek (1903) e Georges Dreyer (1904) em Copenhagen apud Daniell e Hill¹¹⁵, observam o efeito da eosina em solução tópica a 5% em pacientes portadores de tumores cutâneos, lupus, pitíriase versicolor, psoríase, molusco contagioso e sífilis^{115,117-119}.

von Tappeiner e Jodlbauer (1904) apud Daniell e Hill¹¹⁵, relatam que a presença de oxigênio é essencial para reação de fotossensibilização¹¹⁵. Posteriormente, von Tappeiner (1907) apud Daniell e Hill¹¹⁵; denomina essa reação de “reação fotodinâmica”; uma reação tecidual, oxigênio dependente, seguida de fotossensibilização e irradiação com luz¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Paralelamente aos estudos de von Tappeiner (1841) apud Moan¹¹⁴ remove o ferro do sangue através do tratamento com ácido sulfúrico. O espectro de absorção desta “substância vermelha”, que posteriormente foi identificada como hematoporfirina, bem como sua fluorescência, é descrito por Thudichum (1867) apud Moan¹¹⁴.

As reações de fotossensibilidade causadas pela hematoporfirina são percebidas em 1908, por Hausmann, apud Daniell e Hill¹¹⁵; mas a sua sensibilização é reportada em 1911 após a administração em ratos e exposição ao sol^{114,115}. Em 1913; Meyer-Betz apud Daniell e Hill¹¹⁵ é o primeiro autor a demonstrar os efeitos de sua fotossensibilização *in vivo*^{114,115}.

Em 1942, Frenchman Policard apud Daniell e Hill¹¹⁵ observa, através da fluorescência com a luz de Wood, a seletividade da localização da porfirina no tumor. No mesmo ano, Auler e Banzer apud Daniell e Hill¹¹⁵, observam os níveis mais altos da ação fotodinâmica da hematoporfirina dentro do tumor quando comparado ao tecido adjacente^{114,115}.

Na década de 1960, é sintetizado um derivado da hematoporfirina chamado “derivado da hematoporfirina” ou HpD; uma mistura de porfirinas derivadas do sangue. A partir desta data, vários são os trabalhos usados no mapeamento e melhor localização dos tumores¹²⁰.

Lipson et al.¹²⁰ reportam o primeiro tratamento com HpD em câncer de mama recorrente com recidiva da lesão¹¹⁵, mas a efetiva destruição das células tumorais é reportada por Diamond (1972) apud Daniell e Hill¹¹⁵ usando células de glioma sensibilizadas pela hematoporfirina implantadas no subcutâneo em ratos e seguida de irradiação com lâmpada¹¹⁵.

O primeiro estudo clínico com HpD é realizado por Thomas Dougherty, em 1978¹²¹, em 25 pacientes com resposta completa e parcial das lesões malignas cutâneas e subcutâneas^{115,117-119}. Este autor purifica o HpD retirando seus monômeros e o resultado é um novo derivado o “Porfimer sódico”; com isso outros estudos são realizados nas décadas de 1970-1980 para tratamento de tumores de bexiga, pulmão, esôfago, estômago, pele, cabeça e pescoço e do aparelho ginecológico^{114,115,121}

As primeiras drogas introduzidas para TFD após as porfirinas são as “phtalocianinas”, que eram relevantes para o uso clínico pela forte absorção no espectro da banda vermelha (630 nm)¹¹⁴.

Bernbaum e Bonnett (1986) apud Moan¹¹⁴ introduzem a Metatetrahidroxifenilclorina (mTHPC), substância extremamente eficiente *in vivo*.

Devido aos efeitos colaterais sistêmicos como fotossensibilidade prolongada, outros métodos de tratamento para a mesma doença e pouca literatura, o interesse na TFD na dermatologia permanece diminuído até que novas drogas fotossensibilizantes tópicas e sistêmicas são desenvolvidas para uso clínico^{114,117,122-129}.

A TDF com uma substância tópica, o ácido 5-delta-aminolevulínico, um precursor de um metabólico de um fotossensibilizante endógeno, é proposto por Kennedy et al.¹²³; dando início ao desenvolvimento da TFD na dermatologia. É aprovada pelo FDA em 1999, nos Estados Unidos, com ácido 5-delta-aminolevulinico tópico a 20% em solução hidroalcoólica e luz azul a 417 nm para queratoses actínicas não hipertróficas^{117,119,130,131}. Enquanto na Europa, a aprovação é com o uso do metil aminolevulinato (MAL), derivado éster do ALA associado à luz vermelha (630 nm) no tratamento do carcinoma basocelular (CBC) e queratose actínica¹¹⁷. O MAL também é aprovado nos Estados Unidos no tratamento da queratose actínica com luz vermelha^{119,132}.

Atualmente a TFD tem sido utilizada na dermatologia no tratamento de doenças oncológicas como CBC¹²⁰, espinocelular e queratose actínica¹³³, e não oncológicas como acne, hiperplasia sebácea^{93,134,135}, psoríase¹³⁶, e recentemente no fotoenvelhecimento^{2,137}.

3.8.2. Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica

A TDF é um mecanismo baseado na citotoxicidade das células proliferativas, onde uma reação química, ativada pela energia da luz, é usada para seletivamente destruir o tecido^{35,117,130}.

Para este mecanismo, utiliza-se um agente fotossensibilizante, o qual se acumula nas células, e posteriormente é exposto a uma luz com comprimento de onda que coincida com o espectro de absorção deste agente utilizado. Esta ativação pela luz ocorre na presença de oxigênio e faz com que o agente fotossensibilizante passe de um estado de repouso para um estado de ativação denominado “singlet”. Sendo assim, a reação fotoquímica resultante, leva a morte celular através da produção do oxigênio “singlet”^{115,117,126,131,139-145}.

Este estado de excitação, “singlet”, possui uma meia vida curta (cerca de 10^{-6} segundos) e nesta etapa, as moléculas podem retornar ao estado de repouso liberando energia na forma de fluorescência ou progredir para um

estado de meia vida longa chamado "triplet", responsável por espécies fotoativas na geração de produtos citotóxicos. O estado "triplet" possui uma energia menor que o "singlet". As moléculas no estado "triplet" sofrem dois tipos de reação. Na reação, tipo I, as moléculas interagem com substratos biológicos para formar radicais livres como os radicais superóxido, hidroxila e peróxido; reação esta comum no tratamento que envolve o 8-metoxipsoraleno e UVA e não necessita de oxigênio. A reação típica da TFD é a reação tipo II (Quadro 6) onde as moléculas transferem sua energia para o oxigênio intracelular formando oxigênio "singlet" altamente reativo e responsável pela morte celular. Os dois tipos de reação podem ocorrer simultaneamente (Figura 1)^{131,142,146,147}.

Quadro 6. - Esquema da formação de $^1\text{O}_2$ (espécies reativas de oxigênio) pela reação tipo II¹⁴⁸.

Figura 1 - Ativação do agente fotossensibilizante pela luz¹³¹

A substância fotossensibilizante se localiza nas células alvo e células normais, mas é removida menos rapidamente das células alvos, assim, a destruição ocorre com o mínimo dano da pele normal adjacente¹⁴⁹. Esse acúmulo de ALA nas lesões pode ser comprovado por meio da observação de fluorescência vermelha com lâmpada de Wood em quarto escuro; o que também serve como diagnóstico e marcação de margem para cirurgia¹⁵⁰.

Essa diferença na taxa de remoção é devida à seletividade da substância pelo tumor que ocorre em função dos seguintes fatores^{114,117,131,151,152}:

- as células tumorais apresentam fibras colágenas imaturas que apresentam grande capacidade de ligação às porfirinas;
- a rede linfática é pouco desenvolvida;

- há aumento dos vasos sangüíneos e da permeabilidade destes vasos;
- aumento da expressão dos receptores de lipoproteínas de baixa intensidade no tumor aumentando a ligação dessas com as porfirinas;
- presença de macrófagos;
- menor pH intracelular o que diminui a solubilidade da substância.

A ação do oxigênio “singlet”, na célula alvo, provoca falhas na integridade da membrana com alterações na permeabilidade e função de transporte entre o meio intra e extracelular. Dependendo da localização subcelular da fotossensibilização, diferentes organelas como mitocôndrias ou lisossomos são danificados, resultando na morte celular. Após a morte celular, há liberação de mediadores inflamatórios como histamina ou metabólitos do ácido araquidônico, aumentando os efeitos deletérios. Após 2-3 dias da administração da droga ocorre necrose, que é restrita ao tecido doente, com resolução em aproximadamente 14 dias^{117,153,154}. Há estudos que relatam que o primeiro dano provocado pela ativação fotodinâmica é mitocondrial e que a morte celular é em função da fototoxicidade da mitocôndria^{126,141,142}. Estudos demonstram que a injúria induzida pelo ALA e pelo “porfimer sódico” é primariamente restrita à mitocôndria, enquanto que a citotoxicidade do derivado da hematoporfirina (HpD) é mediada pela injúria causada ao sistema lisossomal^{152,155}. O efeito de citotoxicidade mediado pela formação do oxigênio “singlet”, leva à morte celular pela indução de apoptose ou necrose^{156,157} e sem indução de risco mutagênico¹⁵⁸.

Quando a injúria é mitocondrial normalmente a morte celular se dá por meio da apoptose, e esta, quando relacionada a mitocôndria, é fortemente influenciada pela família de proteínas bcl-2. Por outro lado, a morte celular influenciada pelo sistema lisossomal ou outras organelas citoplasmáticas, ocorre por necrose¹⁵².

Os efeitos biológicos que ocorrem na célula podem ser divididos: em primários (celulares) e secundários (vasculares) (Quadro 7). Os efeitos vasculares incluem alterações de perfusão, vasoconstrição, adesão de leucócitos e formação de trombos. Estão relacionados com agregação plaquetária e liberação de tromboxano¹⁵⁹.

Quadro 7 - Efeitos da TFD *in vitro* e *in vivo*¹⁵⁴

Citotoxicidade primária (efeitos celulares <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)
Dano de organelas celulares
Dano da membrana
Edema celular
Citotoxicidade secundária (efeitos vasculares <i>in vivo</i>)
Vasoconstrição das arteríolas (no tecido normal)
Acúmulo de leucócitos (no tecido normal)
Edema perivascular (no tecido normal e tumoral)
Trombose (no tecido tumoral)

Dessa forma, a destruição celular na TFD resulta de três processos: da morte celular obtida diretamente pela produção de oxigênio “singlet”, do dano na vascularização e da ativação do sistema imune^{8,35,152,160}.

3.8.3. Sistema imunológico da pele e a terapia fotodinâmica

Apesar da TFD ser planejada para causar uma reação citotóxica no tecido, uma resposta pós-TFD envolvendo reação imune inflamatória; inata e adaptativa, é prevista para auxiliar na erradicação bem sucedida de células residuais remanescentes.⁸

Os principais fatores que parecem estar envolvidos na indução desta resposta são a expressão de várias citocinas e outros genes importantes imunologicamente. Entre as citocinas cuja expressão foi relatada como sendo modulada pela TFD estão, principalmente, a IL6, IL10 e TNF α , além da IL1 β , IL2, fator estimulante de colônia de granulócitos, fator de crescimento epidérmico e a modulação da expressão de vários genes envolvidos em adesão celular e apresentação de antígeno^{8,9}. Wong et al., em 2003⁸, em estudo com células tumorais e normais, após a TFD, estimula as células com IL6 ou fator de crescimento epidérmico e verifica que essas perdem sua resposta a citocinas ou ao fator de crescimento; a recuperação da resposta ocorre 48 a 72 horas e é acompanhada pela retomada da proliferação celular.

Outro importante fator que contribui para a indução da resposta imune é o dano pró-inflamatório gerado na membrana celular e a vascularização de tumores tratados e tecidos normais. As lesões foto-oxidativas liberam vários

mediadores inflamatórios potentes, provocam uma reação inflamatória importante e uma rápida e massiva invasão de células inflamatórias ativadas, incluindo neutrófilos, granulócitos, mastócitos, monócitos e macrófagos da circulação ao local tratado^{8,9}. A natureza, a taxa e a extensão da morte celular induzida pela TFD parecem ter um papel crucial na geração da resposta imune efetiva. Grande quantidade de fragmento celular é gerada no local do tumor dentro de um intervalo de tempo muito curto e a natureza particular desse material facilita a apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas recrutadas para o local em resposta a sinais inflamatórios assegurando o reconhecimento de epítomos específicos por linfócitos T e sua ativação subsequente⁹.

O dano inicial foto-oxidativo alavanca uma variedade de respostas que levam indiretamente à destruição celular. Conseqüentemente, somando-se à destruição direta das células e às ocorrências secundárias, incluindo isquemia (subseqüente a dano vascular), dano isquemia-reperfusão, essa ativação local de células inflamatórias e linfócitos T célula-específica podem contribuir para a erradicação de lesões tratadas pela TFD. Embora a reação imune possa ser menos importante que outros efeitos no estágio de ablação celular, depois da terapia, seu papel parece ser decisivo no controle de longa duração do efeito da terapia⁹.

Ortel et al.¹⁶¹, mostram que a diferenciação celular pode levar a um aumento de sensibilidade a TFD dependente do ALA. Tipos de células de câncer com graus diferentes de diferenciação exibiam diferentes padrões de

síntese de ALA; portanto, tumores diferenciados são os melhores alvos na TFD ALA-dependente.

A PpIX pode se acumular em linfócitos ativados após administração do ALA. Um dos possíveis mecanismos do acúmulo nos linfócitos é o fato de a atividade da divisão celular usar ferro intracelular para síntese do citocromo e do DNA. Dessa maneira não inativa a PpIX, o precursor fotoativo do heme, pela incorporação do ferro. Isso sugere que TFD-ALA possa ter um papel no tratamento de doenças que requerem a eliminação seletiva de linfócitos ativados e talvez tenha ação como um imunomodulador¹⁶². Hryhorenko et al.¹⁶³, em estudo da resposta imune pelo ALA na TFD, através da citometria de fluxo e análise *in vitro*, mostram que os linfócitos apenas acumulam PpIX quando estão ativados, por outro lado, os macrófagos e células dendríticas acumulam PpIX sem a ativação *in vitro*. Grebenova et al.¹⁶⁴, em 1998, mostram que a população de linfócitos diminui em até 75% quando são comparadas áreas tumorais tratadas e não tratadas.

Abdel-Hady et al.¹⁶⁵, comparam a pele da vulva normal com regiões tumorais, encontrando nessas aumento do infiltrado de CD4 e macrófagos, mas não de células de Langerhans ou CD8. Após TDF há um aumento significativo da população de CD8 nas áreas que responderam ao tratamento em relação às que não responderam. Verifica também que todos os casos que não responderam a TFD apresentavam a perda do HLA classe I.

Gad (2001) apud Bissonnette¹⁶⁶, observa apoptose das células T malignas *in vitro*. Bissonnette et al.¹⁶⁶, observam no tratamento da psoríase, com TFD-ALA sistêmico e irradiação com luz azul, a apoptose dos linfócitos T. Essa apoptose, apenas é verificada, com uma dose de 10 mg/kg e irradiação de 20 J/cm², na dosagem de 15 mg/kg e 10 J/cm² não ocorre a apoptose. Outra correlação verificada nesse estudo é que os pacientes tratados com a dosagem de 10 mg/kg e irradiação de 20 J/cm², apresentam mais eritema. Isso porque a luz azul apresenta pouca penetração e 10 J/cm² não é suficiente para induzir uma reação eritematosa.

Bartosilk et al.¹⁶⁷ mostram que após TFD-ALA, a maioria das células de Langerhans, não apresenta alterações e, quando apresenta, torna-se apoptótica em 3 horas, queratinócitos tornam-se edematosos, mas os desmosomos não apresentam alterações. Os melanócitos conservam-se normais e as alterações epidérmicas recuperam-se após 24 horas. As células inflamatórias se tornam evidentes em 3 a 24 horas.

Yeh et al.¹⁶⁸, estudam as moléculas de adesão selectina E e ICAM1 na degeneração macular da idade tratada ou não com TFD e percebe que o aumento do número de tratamento diminui a expressão do ICAM1.

3.8.4. Agentes fotossensibilizantes

Agentes fotossensibilizantes sistêmicos são divididos em primeira e segunda geração e podem ser classificados em porfirinas e não-porfirinas³⁵.

Um agente fotossensibilizador ideal é:

- minimamente tóxico;
- captado mais rapidamente pelo tecido alvo, ou seja, pelo tecido tumoral quando comparado ao tecido normal;
- removido rapidamente do tecido normal;
- ativado em comprimento de onda de luz que penetrem no tecido-alvo;
- capaz de produzir quantidades grandes de produto citotóxico.

O derivado da hematoporfirina (HpD), o “porfimer sódico” e o tin-protoporfirina (SnPp) são substâncias fotossensibilizantes de primeira geração (Quadro 8) que causam fotossensibilidade prolongada (tempo maior que 6 semanas)^{141,169}.

Quadro 8 –Substâncias fotossensibilizantes: características¹⁵²

Fotossensibilizantes	Nome comercial	Comprimento de luz para TFD	Tempo de exposição	Características
Porfimer sodium	Photofrin	630 nm	24-48 h	frequentemente utilizado, aprovado no tratamento de câncer
BPD-MA, verteporfin	Visudyne	690-692 nm	1-2.5 h	concentração no tumor pode ser atingida em 30 minutos rápido clearance, baixa fotossensibilização cutânea, aprovado para tratamento da degeneração macular da idade
<i>m</i> -THPC, temeporfin	Foscan	652 nm	72-96 h	fotossensibilização cutânea por 1-2 semanas alta toxicidade, requer baixa dosagem
5-ALA	Levulan	635 nm	4-12 h	é convertido em PpIX
Methyl ester ALA	Metvix	635 nm	4-12 h	melhor penetração na pele
Benzyl ester ALA	Benzvix	635 nm	4-12 h	melhor penetração na pele
Hexyl ester ALA	Hexvix	635 nm	4-12 h	melhor penetração na pele
Tin ethyl etiopurpurin, SnTE ₂	Purlytin	660-665 nm	24 h	fotossensibilização por mais de 30 dias
Hypericin	Hypericin	595 nm	24 h	usado na psoríase e câncer de pele
Silicon-based phthalocyanines, Pc4, Pc10, Pc12, Pc18	CGP55847, Photosense	670 nm	3 h	alta penetração, alta seletividade, usado no tratamento do câncer
Chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine, CASPc		670-675 nm	3 h	
Lutetium texaphyrin, motexafin lutetium, lutex	Lutrin, Antrin	720-760 nm	2-4 h	usado na cardiologia
N-Aspartyl-chlorin e6	Npe ₆	660-665 nm	4 h	rápido acúmulo no tumor

➤ *Porfirinas*

O “porfimer sódico” é um agente derivado do HpD que contém éter de dihematoporfirina como seu principal componente ativo; essa droga apresenta seu pico de absorção entre 400-420 nm e picos menores em 510, 514, 580 e 630 nm, sendo este último o mais utilizado. É pouco utilizado na dermatologia pela fotossensibilização prolongada^{35,121,126-128,131,140,141,169,170}. Agentes sensibilizantes de segunda geração (Quadro 8) surgiram para diminuir os efeitos colaterais como o tempo de fotossensibilização^{141,171}.

➤ *Não-porfirinas*

O derivado da Benzoporfirina (BPD) é sintetizado a partir da protoporfirina; formulado em lipossomos o que facilita o seu acúmulo nas células tumorais e seu pico de absorção é de 690 nm e possui uma fotossensibilização cutânea de 3 a 5 dias. Apresenta rápido acúmulo no tumor e meia vida curta. Tem indicação em tumores cutâneos e extracutâneos^{126,171,172}. Um derivado monoácido A da Benzoporfirina (BPA-MA) possui um pico de absorção de 688 nm e é usado principalmente na oftalmologia. Apresenta fotossensibilização por um período pequeno quando comparado a outros fotossensibilizantes sistêmicos^{126,152}.

O Tin Etil Etiopurpurina (SnET2) é uma molécula semelhante à clorofila e possui pico de absorção em 664 nm¹³⁰. É administrado por via endovenosa e apresenta fotossensibilidade por até 30 dias¹³¹.

A Metatetrahidroxifenilclorina (mTHPC) possui pico de absorção 652 nm e é utilizada para propósitos paliativos em tumores de cabeça e pescoço, é extremamente potente e requer doses baixas^{128,152,172}.

A Mono-I aspartilclorina e 6 (Npe6) tem pico de absorção de 664 nm e tem sido utilizada em tumores de pele, mama e trato genito-urinário. Apresenta um clareamento tecidual rápido o que é responsável pela diminuição da fotossensibilidade prolongada^{131,173}.

As ftalocianinas, como a ftalocianina-4, são usadas para o tratamento de câncer de pele e outros tumores sólidos³⁵. O zincoftalocianina (ZnPc) é um fotossensibilizador de segunda geração utilizado na TFD com alta seletividade pela célula tumoral^{174,175}.

O ácido ursodeoxicólico é usado em gastroenterologia e oferece uma eficácia na TFD com menores efeitos colaterais. É um agente que protege a célula dos efeitos apoptóticos contra agentes citotóxicos, mas sensibiliza a mitocôndria ao fotodano e por isso é usado de modo seguro e eficaz na TFD. É preconizado o seu uso antes da irradiação e associado com outras substâncias fotossensíveis, pois desestabiliza a membrana mitocondrial aumentando o potencial de fotossensibilização da mitocôndria. Sua ação não é pelo aumento intracelular de agentes fotossensibilizantes, mas pela sensibilização da mitocôndria ao fotodano¹⁷⁶.

Indocianina verde é um agente fotossensibilizante, com absorção em 700-850 nm, que provoca na microscopia eletrônica vesiculação citoplasmática, dilatação do retículo endoplasmático, do complexo de Golgi,

e condensação da cromatina nuclear (influxo de água para dentro da célula, com vacuolização). Essas alterações sugerem não uma ação fototérmica, mas uma morte celular por uma ação de foto-oxidação. Apresenta uma ação no citoplasma e não na mitocôndria ou lisossomo. Pela absorção próxima da região do infravermelho, a indocianina verde apenas é usada em associação com laser diodo¹⁷⁷.

A acridina laranja é um corante fraco usado com atividade antitumor e atividade tóxica contra bactéria, fungo e protozoário, apresenta propriedades fotossensibilizantes e tem sido utilizada como agente na TFD no tratamento de sarcomas musculares¹⁷⁸.

ATX-S10(Na) (13,17-bis (1-carboxipropionil) carbamoyl-8-etenil-2-hidroxi-3-hidroxiiminoethylidene-2,7,12,18-tetramethylporfirina sódica) é um novo fotossensibilizante hidrofílico, que mostra bom acúmulo no tumor após aplicação intravenosa ou tópica. É rapidamente eliminado na urina (24-48 horas) e possui pico de absorção de 670 nm. É efetivo para psoríase, doença de Bowen, carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular¹⁷⁹.

WST09 (Tookad) é um agente fotossensibilizante novo, testado em células de tumor de cólon de rato. Possui um pico de absorção de 763 nm com a característica de tratar um grande volume de tecido com apenas um sítio de distribuição de luz. Apresenta a vantagem de ter uma fotodegradação rápida¹⁸⁰.

3.8.5. Ácido 5-delta-aminolevulínico

Kennedy et al.¹²³, propuseram um método de TDF com uma substância tóxica, o ALA (Figura 2), um precursor de um metabólito de um fotossensibilizante endógeno, que leva ao acúmulo de PpIX nos tecidos. Essa porfirina integra a biossíntese do heme e é considerada um potente agente fotossensibilizante^{124,126,170,181}. O ácido delta-aminolevulinico (Figura 2) é também chamado de ácido 5-delta-aminolevulínico, ácido 5-amino-4-oxo-pentanóico ou valerato amino γ -keto- δ ¹⁸²

Figura 2 - Estrutura do ácido 5-delta-aminolevulínico (ALA)¹⁸²

O heme é um grupo protéico da hemoglobina envolvido no processo da respiração¹⁸². Sua biossíntese (Figura 3) ocorre em dois subcompartimentos celulares: na mitocôndria e no citosol. A enzima ácido

aminolevulínico sintetase (ALAs), na mitocôndria, forma uma molécula de ALA da associação entre a glicina e a succinil coenzima A. No citosol, duas moléculas de ALA se condensam e formam o porfobilinogênio (PGB), na presença da ALA desidratase (ALAd), e quatro moléculas de PGB se unem originando o uroporfirinogênio III. Na presença do porfobilinogênio deaminase (PBGD), este é convertido em coproporfirinogênio III na presença da uroporfirinogênio descarboxíase e, novamente, no interior da mitocôndria, em protoporfirinogênio IX através da coproporfirinogênio oxidase; este se converte por meio da protoporfirinogênio oxidase em protoporfirina IX (PpIX) e, na presença da enzima ferroquelatase (FC), é adicionado o ferro dando origem ao heme.

Figura 3 – Biossíntese do Heme¹⁸³

Na ausência de ALA exógeno, a concentração de heme livre controla a quantidade de ALA produzida no tecido por meio de um feedback inibitório da ALAs^{124,127,183,184}. Quando o ALA é administrado em excesso, a sua síntese endógena, que é controlada pela enzima ALAs, perde o controle e um rápido acúmulo de PpIX ocorre nas células atingindo uma alta concentração. Essa conversão do ALA para PpIX é mais rápida que a conversão de PpIX para o grupo heme, o qual não tem propriedade de fotossensibilização^{35,147,182,193}.

O metabolismo do ALA exógeno leva a overprodução e acúmulo de PpIX, preferencialmente nas células alvo, com redução da ferroquelatase e um relativo ganho da atividade da PBGD^{182,191}. Assim a alta concentração de PpIX nas células apresenta grande propriedade fotossensibilizadora. Este acúmulo é a base para o uso clínico do ALA na TFD^{35,127,146,147,182-185}. A síntese de porfirina induzida pelo ALA tem relação com o aumento da atividade da PBGD, mas não da FC e ALAd^{186,187}. Hilf et al.¹⁸⁸, em uma tentativa de transferência de células contendo DNA de PBGD consegue aumentar a atividade da enzima, mas nenhum resultado é visto no nível de PpIX

A PpIX, apesar de ser um agente fotossensibilizante potente, é facilmente fotodegradada durante o processo de irradiação com fonte de luz específica. Após a aplicação a concentração de PpIX diminui com a fotoinativação e com a sua conversão em heme que não é fotossensível. Cerca

de 24 horas após administração tópica de ALA, a PpIX é totalmente depurada do organismo^{126-128,130,142,189, 192}.

O efeito porfirinogênico sistêmico com a aplicação tópica é inexistente, pois a aplicação da quantidade de 0,005 a 0,2 g/cm não induz significativo acúmulo de ALA¹⁴². Somente para longos períodos de aplicação e altas concentrações, os seus efeitos sistêmicos devem ser considerados¹⁹³. O aumento insignificante de porfirina no sangue 6 horas após TFD retorna a valores normais em 24 horas, segundo trabalho de Fritsch¹⁴².

Trabalhos demonstram uma ressíntese de PpIX após a fotoirradiação de tumores, e esta propriedade poderia ser utilizada no tratamento do CBC nodular através de doses fracionadas de luz. O mecanismo responsável pelo reaparecimento do PpIX após TFD pode estar relacionado com a difusão do PpIX do tecido normal adjacente para o tecido tumoral¹⁹⁴.

3.8.5.1. Fatores que interferem na eficácia do ALA na TFD

A eficácia do ALA na TFD depende^{122,131,147,153,156,171,195-200}, espessura da pele e tipo de tecido;

- modo de aplicação;
- tempo de exposição prévio;

- concentração do ALA utilizada;
- tipo de veículo utilizado na preparação;
- opções de aumento da distribuição do ALA na pele;
- adição de agentes queladores de ferro;
- estabilidade química do ALA;
- associação com hipertermia;
- concentração de oxigênio no meio;
- irradiância, fluência e fracionamento da dose de luz;
- fontes de luz para terapia fotodinâmica;
- alteração da microvascularização tumoral – oclusão dos vasos tumorais;
- uso de pródrogas – ésteres do ALA.

➤ *Espessura da pele e tipo de tecido*

O ALA é uma molécula hidrofílica, pequena, com 167,6 daltons e que não penetra facilmente na pele íntegra, mas penetra na pele danificada, sendo maior nos tecidos queratinizados anormais; por isso é utilizado como precursor do PpIX, que é uma molécula grande^{126,146,147,181,195,196,201-203}.

Tecidos de origem mesodérmica como músculo, tecido conectivo e cartilagem não acumulam PpIX *in vivo*^{35,146,191}. Martin et al.¹⁴⁶, em estudo da seletividade do ALA tópico no CBC demonstram que esta substância é um excelente fotossensibilizador para dermatoses que envolvem a epiderme e

os anexos, porque o nível de PpIX na derme é muito menor, reduzindo dessa maneira a injúria dérmica e a formação de cicatrizes.

As células tumorais, na pele de rato, apresentam uma fluorescência seis vezes maior que a pele normal, trinta vezes maior que a submucosa normal e sessenta vezes maior que as células musculares normais²⁰⁴

A expectativa da penetração do ALA, na pele, é cerca de três milímetros de profundidade após 3 a 15 horas de sua aplicação, porém funciona nas queratoses actínicas em 60 minutos^{35,147,193}. O carcinoma basocelular superficial apresenta melhor resultado no tratamento com TFD que o nodular; com uma incidência de cura de 100% e 64% respectivamente, demonstrando que a espessura do tumor determina a eficácia do tratamento^{118,123,125,189}. Szeimes et al.¹⁸¹, estudam por meio da técnica de Mohs a distribuição da profundidade da fluorescência do PpIX no CBC sólido, esclerodermiforme e superficial, com ALA 10%, com 4 e 12 horas de exposição. Somente fluorescência da epiderme e anexos é observada após 4 horas. Após 12 horas, CBC sólido e superficial manifestam forte fluorescência, mas no esclerodermiforme foi fraca e irregular.

A falência do tratamento pode ocorrer pela espessura das lesões no caso de lesões hiperqueratóticas e também pela barreira criada pela melanina^{147,152,190}. O ALA penetra na pele com éfelides de maneira irregular e pontilhada³⁵.

A raça também interfere na penetração do ALA. A pele oriental e dos americanos nativos apresentam menor penetração que a pele fina dos europeus^{35,190}.

➤ *Modo de aplicação*

O modo de aplicação do ALA pode ser sistêmico; oral ou intravenoso, tópico ou intratumoral, seguido por um período de exposição de 4 a 72 horas dependendo da farmacocinética do fotossensibilizante, permitindo seu acúmulo no tumor^{203,205}. de Blois et al.²⁰⁶, desenvolvem uma forma de ALA injetável intracutâneo devido a má penetração na pele e esta fórmula resulta em uma solução isotônica, com concentração de 0,1-2% e pH 5,0.

O ALA administrado sistemicamente atinge uma concentração de PpIX em vários tecidos dentro de uma a 6 horas após a administração²⁰⁷. A fluorescência do PpIX atinge a área tumoral antes da pele normal de uma a 3 horas após a ingestão do ALA²²⁴.

van der Veen et al.²²⁵, em estudo em ratos, mostram que a máxima fluorescência após aplicação sistêmica do ALA ocorre em 2 horas no tumor e pele adjacente comprometida, enquanto na pele normal o tempo é de 6 horas. Em contraste com a administração sistêmica, a tópica apresenta uma fluorescência máxima com 6 horas no tumor e pele adjacente comprometida, enquanto na pele normal a fluorescência permanece no mesmo nível após 4 horas da aplicação. Este fato demonstra que na aplicação tópica a fluorescência máxima é quatro vezes maior no tumor que na pele normal e

na administração sistêmica intravenosa, é de 1,8 vezes maior. Isso pode ser consequência de uma pele alterada facilitando a penetração do ALA na queratina anormal. Além disso, a pele com exposição crônica ao sol e queratoses actínicas apresenta maior penetração do ALA. O autor conclui que o ALA tópico apresenta uma seletividade maior para tumores superficiais de pele em comparação ao ALA sistêmico.

Em relação à administração oral e intravenosa, van den Boogert¹⁹¹, em um estudo em ratos, obteve como resultado aumento da creatinina e a uréia inalterada após 4 horas da administração oral do ALA. Na administração intravenosa encontra o mesmo resultado, porém após uma hora. O pico de concentração do ALA é maior na oral que na intravenosa em algumas partes do trato gastrointestinal (estômago, duodeno, jejuno), rim e, em menor concentração, no fígado e plasma, permanecendo similar no esôfago, colo, baço, bexiga, coração, pulmão, músculo, gordura, pele, cérebro e nervos.

O pico de concentração de porfirina é similar nos dois grupos. A quantidade de porfirina é maior no duodeno seguido do jejuno, fígado e rim. O pico ocorre entre 2 a 4 horas na administração oral e uma a 3 horas na intravenosa. Após 12 horas os níveis de porfirina voltam ao normal com exceção do rim. A alta concentração no plasma ocorre com 2 horas na intravenosa e 3 horas na oral e o declínio ocorre em 12 horas. Na urina a porfirina começa a ser detectada com 4 horas e em 24 horas os níveis na urina retornam ao normal. O trabalho sugere que a administração oral e

intravenosa do ALA não alteram a função renal, que a concentração do ALA em alguns tecidos é maior com administração oral que intravenosa. No estômago, duodeno, jejuno este modelo excede 6 horas sugerindo que uma parte do ALA é absorvida no estômago e a maioria no intestino delgado. A menor concentração na aplicação intravenosa do pico do ALA no fígado, plasma e rim provavelmente deve ser pelo retardo na absorção do trato gastrointestinal. Como há ALA após aplicação intravenosa no aspirado duodenal é possível que ocorra uma circulação entero-hepática e o pico de concentração no jejuno é alcançado mais tardiamente que outros tecidos. No rim somente uma pequena parte do ALA é convertida em porfirina, uma grande parte é excretada na urina. No fígado junto com a conversão ao heme, as porfirinas e uma quantidade do ALA são excretadas na bile. O estudo também sugere que as porfirinas não podem ultrapassar a barreira encefálica, mas pequenas quantidades de ALA podem.

Em relação, às características do agente fotossensibilizante, no modo de aplicação, encontra-se na aplicação sistêmica, um efeito citotóxico direto produzido pelo oxigênio “singlet” evidenciado, mas com importância secundária quando comparado com a possível destruição que este agente provoca na microvascularização decorrente da necrose tumoral. Sendo assim, nos casos de necrose tumoral secundária ao dano na microvascularização é menor a participação do efeito citotóxico do oxigênio “singlet”^{119,131,226}. A aplicação tópica dos agentes fotossensibilizantes apresenta maior participação do oxigênio “singlet” na citotoxicidade, mas

menor efeito do dano na microvascularização^{119,131}. Wang et al.²³¹, demonstram em estudo com TFD-ALA tópico, que a perfusão sanguínea, logo após a terapia, está aumentada e não diminuída, como na aplicação sistêmica. Após uma semana a perfusão se mantém aumentada, sugerindo um processo inflamatório local. As células alvo, que neste estudo são células tumorais, desapareceram completamente após a terapia, sugerindo uma eficiente destruição local pela TFD.

➤ *Tempo de exposição prévio*

Outra opção para aumentar a intensidade de fluorescência tópica do ALA é o aumento do tempo de exposição, mas isso pode aumentar a fluorescência no tecido adjacente não comprometido²²⁵. Os estudos mostram uma variabilidade de 3-20 horas no tempo de exposição^{118,123-125,131,146,232-235}. A média nos estudos é 3-8 horas para as lesões superficiais e 8-16 para as profundas^{128,130,146,232}. Kennedy et al.¹²³ relatam que após três horas o tecido alvo já apresenta fluorescência enquanto o normal após 6 horas. Essa observação também é relatada por Neumann et al.²³⁶, em estudo da pele normal em que demonstra que 6 horas de exposição ao ALA é ideal, pois o tecido normal não se encontra alterado. Por outro lado, os estudos de Szeimes et al.¹⁸¹, mostram uma fluorescência somente na epiderme e anexos após 4 horas, já para atingir a derme mais profundamente e o tecido normal o tempo necessário de exposição é 12 horas.

Ackermann et al.¹⁸⁶, comparam ALA em diferentes concentrações e tempo de exposição. Após 1 hora, as três concentrações 1%, 3%, e 10%, apresentam a mesma fluorescência; após 4 horas as concentrações de 3 e 10% não apresentam diferenças, mas há aumento da fluorescência entre 3 e 10% quando se compara o tempo de exposição de 1 e 4 horas; após 8 horas todas as concentrações apresentam aumento na fluorescência. A fluorescência do tecido adjacente não apresenta diferenças entre as concentrações e diferentes tempos de exposição. Após 24 horas nenhuma fluorescência é detectada no tumor ou tecido adjacente em nenhuma concentração.

Wennberg et al.²³⁷, por meio de estudo de microdiálise e perfusão demonstra que a concentração intersticial de ALA no tecido tumoral ocorre após 15 minutos, enquanto na pele normal não é encontrado.

➤ *Concentração do ALA utilizada*

As concentrações variam entre 5 a 20% sendo que os melhores resultados estão relacionados com as concentrações entre 10-20%^{129-131,146,232,233,238,239}.

Kennedy et al.¹²³, em seu primeiro trabalho com ALA, utilizam concentração de 20%. Jeffes et al.²⁴⁰, mostram a comparação entre as concentrações de 10, 20 e 30% de ALA no tratamento de neoplasias epiteliais com resposta em 91% nas lesões na face e 45% nas lesões nas

extremidades. Por outro lado, Larko²⁴¹, em pacientes com esclerodermia utiliza baixas concentrações de ALA (3%) com bom resultado.

➤ *Tipo de veículo utilizado na preparação*

Formulações como água/óleo, óleo/água, proprilenoglicol são testadas sendo a formulação óleo/água muito utilizada^{118,123,131,146} (Quadro 9). Hurlimann et al.²⁴², descrevem uma loção nanocoloidal como altamente efetiva. Pierre et al.¹⁹⁶, descrevem um método de aplicação para o ALA baseado em um sistema lipossomal com uma composição similar ao estrato córneo das células dos mamíferos. Lopez et al.¹⁸³, descreve que a formulação lipossomal não apresenta vantagens em culturas de células de tumor de murino quando se compara ALA e HALA, mas este sistema pode apresentar vantagem quando comparado a solução aquosa.

Quadro 9 – Resumo dos diferentes tipos de veículos tópicos usados na TFD¹⁴⁷

Tipo veículo	Comentários	Referências
Cremes, unguento e gel	mais utilizados	Kennedy et al. ²⁴³ , Peng et al. ²¹⁹ , Morton et al. ²⁴⁴
Cremes, unguento e gel com adjuvantes	adição de substâncias para aumentar a eficácia TFD-ALA	Dijkstra et al. ²⁴⁵ , Soler et al. ²⁴⁶ , Harth et al. ¹⁵⁶ , De Rosa et al. ²⁴⁷
Gel trifásico	aumento da eficácia e estabilidade	Turchiello et al. ²⁴⁸
Gels bioadesivos	ALA para lesões orais e esofágicas	Bourre et al. ²⁴⁹ , Tsai et al. ²⁵⁰
Lipossomas e nanopartículas	aplicado na forma de suspensão aumenta a eficácia e estabilidade do ALA	Hurlimann et al. ²⁴² , Casas et al. ²⁵¹ , Pierre et al. ¹⁹⁶ , Casas et al. ²⁵²
Potencializadores	soluções pré aplicação aumento da eficácia	Hillemanns et al. ²⁵³ , DUSA Pharmaceuticals ²⁵⁴

A formulação contendo DMSO e etanol é o melhor veículo para o ALA. O veículo em creme induz alta concentração de porfirina na pele normal e tumoral e deve ser utilizado quando é necessário aumentar a seletividade¹⁸³.

ALA 20% em creme ou em gel, após 2 horas, produzem similar padrão de fluorescência. A intensidade da fluorescência aumenta com maior tempo de exposição com a formulação em gel, e diminui vagarosamente com o creme. No tecido adjacente ambos produzem fluorescência^{183,186}.

➤ *Opções de aumento da distribuição do ALA na pele*

Iontoforese^{147,196,198,255-257}, US^{196,198}, eletroforese e pulsos elétricos²⁵⁸ têm sido métodos estudados para aumentar a penetração do ALA no tecido. Em todos os casos há maior produção de PpIX. Na aplicação passiva de ALA 20%, após 4 horas de exposição, a fração convertida em PpIX é 3,6%²⁵⁶. Há relatos na literatura de iontoforese para o aumento da absorção dos ésteres do ALA, principalmente MAL e Hexyl-ALA (HALA)¹⁹⁸. Outros métodos como curetagem^{147,237,246}; dermoabrasão, microdermoabrasão¹³⁷, desengorduramento da pele com acetona¹⁴⁷, drogas carreadoras chamadas “dendrimeros”²⁵⁹ e fita adesiva podem ser usados^{147,246}.

➤ *Adição de agentes queladores de ferro*

A diminuição do ferro por meio da adição de agentes queladores acelera o processo de fotossensibilização com maior eficiência e utilizando

menor concentração de ALA^{171,183,260}.

As substâncias podem ser chamadas de “realçadoras de penetração”, como DMSO, ácido oléico, etanol e monolato de glicerol. DMSO é um potente diferenciador de células malignas e aumenta a penetração do ALA no tecido^{147,239}, no entanto, pode danificar o estrato córneo causando uma irritação local¹⁹⁸. A adição de 20% de DMSO em emulsão óleo-água de ALA 10%, aumenta cerca de 2,5 vezes a penetração do ALA na pele.

Outra alternativa é a adição de substâncias chamadas de “quelatores de ferro”. A desferrioxamina (DFO) compete com a ferroquelatase pelo ferro e inibe a formação do heme, aumenta a seletividade da síntese de porfirina induzida pelo ALA nas células tumorais quando comparadas com as normais *in vitro* e, também, pode ser associada para demarcação de margem do tumor previamente à cirurgia^{232,261}. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) pode ter efeito na inibição da atividade da FC^{146,156,183}. A adição de ALA, EDTA e DMSO são mais efetivas que apenas ALA e DMSO ou apenas ALA^{147,239}. Estudos *in vitro* demonstram que a DFO é superior ao EDTA na concentração equivalente na formação de PpIX¹⁴⁷.

Ácido glicólico pode ser uma opção de substância para aumento na penetração do ALA²⁶⁵.

➤ Estabilidade química do ALA

Segundo McCarron et al.¹⁸⁵, a estabilidade do ALA depende do pH, concentração, temperatura e grau de oxigenação da solução. Experimentos

em culturas de células mostram que a produção de PpIX é reduzida quando há ambas as condições, meio ácido ou alcalino¹⁸⁴. Com o aumento do pH, a diminuição da formação de PpIX pode reduzir a viabilidade celular, enquanto que a diminuição abaixo das condições ácidas sugere ser resultado da elevação da substância pH-dependente ou diminuição da atividade enzimática na biossíntese do heme. Uma concentração baixa em um pH fisiológico ou um pH baixo é necessária para a estabilidade da solução^{147,183}. Algumas estratégias para aumentar a estabilidade podem ser usadas como o pH baixo, mas isso pode causar irritação cutânea¹⁸⁵. Alguns autores defendem que a estabilidade química do ALA em solução aquosa varia segundo o pH, mas não tem relação com a presença de EDTA^{262,263}. Por outro lado, estudos referem que o EDTA tem sido utilizado para estabilizar o ALA pelas propriedades quelantes^{147,264}.

➤ *Associação com hipertermia*

Um possível mecanismo pelo qual a hipertermia aumenta a ação do ALA^{156,200,226}, é que o dano causado por esta é potencializado pelo declínio da adenosina trifosfato (ATP); isto é importante porque a mitocôndria é o alvo no tratamento com a TFD-ALA²⁰⁰. O dano mitocondrial pode potencializar a morte celular por meio da hipertermia e esta pode estimular o processo fotoquímico da TFD-ALA.

Estudos mostram um aumento de 40% na associação entre os efeitos vasculares da TFD e a hipertermia, pois esta provoca uma reoxigenação no tecido tumoral logo após a TFD^{122,227}.

A penetração do ALA no estrato córneo na primeira hora não depende da temperatura e sim de sua difusão; na segunda, terceira e quarta horas a aplicação do ALA depende da temperatura. Estudo em ratos demonstra que o ALA penetra na pele na temperatura de 12º C da mesma forma que a 42º C; enquanto o processo de produção de PpIX é temperatura dependente. Na temperatura de 12º não há produção de PpIX e em 42º C a produção é maior que em 37ºC^{199,207}.

➤ *Concentração de oxigênio no meio*

O oxigênio é crucial para iniciação da TFD. Na presença de anóxia tecidual ou baixa concentração de oxigênio (inferior a 2%) o efeito fotodinâmico é praticamente inexistente^{131,153,229,230}. A TFD, em condições normais de oxigênio, causa peroxidação lipídica e diminuição na sobrevivência da célula^{115,230,266}. Esta diminuição não se mostra, segundo Hjelde et al.²³⁰, influenciadas pela presença de hiperóxia.

➤ *Irradiância, fluência e fracionamento da dose de luz*

A irradiância e a fluência devem ser estabelecidas e consideradas na condução da TFD-ALA, pois esta é influenciada pela irradiância e dose de luz^{131,238,267}.

A irradiância é a potência total desenvolvida pelo aparelho dividida pela área de exposição do foco de luz. A fluência ou dose total de energia é definida como a quantidade de energia liberada sobre o tecido, multiplicada pelo tempo de exposição do tumor à luz^{131,238}.

Irradiância (W/cm²) = potência do aparelho/área

Fluência (J/cm²) = irradiância x tempo de exposição

Diferentes irradiâncias e o fracionamento da dose da luz ou a diminuição da intensidade da luz podem aumentar a eficácia da TFD, pois se supõe que essas condições sejam capazes de reoxigenar o tecido irradiado e aumentar a geração de oxigênio “singlet”²⁶⁸. As irradiâncias utilizadas na TFD variam entre 50 e 150 mW/cm². Em irradiâncias muito baixas o tempo de exposição se torna muito longo e em irradiâncias muito altas pode haver adição de efeito térmico no processo de ativação fotodinâmica^{131,152}.

Com baixa irradiância e dose de luz fracionada a distribuição de PpIX, e o suprimento de oxigênio pela vascularização podem se tornar mais homogêneos²⁶⁹. Com a irradiância alta há um aumento do consumo de oxigênio levando a hipóxia e conseqüente redução do efeito da TFD; além da redução da habilidade da vascularização do tumor de manter o seu suprimento de oxigênio²⁶⁸⁻²⁷⁰. Robinson et al.²⁷¹, em 2003, relatam aumento da eficácia da TFD com um esquema de iluminação fracionado, em que uma dose total é fracionada em duas dosagens separadas por um intervalo sem iluminação de 2 horas. O aumento da eficácia foi demonstrado no exame histológico por meio do aumento da necrose em extensão e profundidade.

Em relação à fluência, esta é relacionada com a dose do agente fotossensibilizante. Quando a dose é pequena é necessária alta fluência para um efeito fotodinâmico eficaz. Com doses baixas é necessário prolongar o tempo de exposição^{131,152}. Bissonnette et al.²⁶⁷, em um estudo histológico da localização do fotodano observam que na presença de alta irradiância e baixa fluência as células fotodanificadas são encontradas na camada superior da epiderme, enquanto que baixa irradiância e alta fluência, o dano é maior com necrose de toda epiderme.

A fotodegradação do PpIX depende da irradiância, concentração inicial do sensibilizador e concentração local de oxigênio. Conforme diminui a irradiância a fotodegradação aumenta²⁷⁰.

➤ *Fontes de luz para terapia fotodinâmica*

As porfirinas ou fotossensibilizantes exibem um espectro de absorção grande de 360-405 nm, chamado banda de Soret e outros picos menores entre 500-635 nm^{35,117,154}.

Em relação à fonte de luz para TFD qualquer aparelho capaz de gerar energia luminosa suficiente para produzir uma efetiva fotossensibilização pode ser utilizado, mas os aparelhos de laser são as fontes mais comuns. Tanto laser quanto lâmpada não-coerente de amplo espectro promovem a ativação fotodinâmica, desde que o espectro de emissão seja coincidente com o pico máximo de absorção do agente fotossensibilizante. Em estudos clínicos iniciais lâmpadas incandescentes e projetores de diapositivos foram

utilizados^{2,123,134,144,172,233,272-274}.

São utilizadas na TFD: lâmpadas não-coerente de amplo espectro, que compreendem luz vermelha (570-750 nm), verde (545 nm), azul (417,400-410 nm); fonte de luz com halogênio ou xenônio; LED (light emitting diode), LIP (400-1200 nm) e laser como: pulsed dye laser (PDL) (585 nm e 595 nm), laser de argônio (630 nm) e ND:YAG.^{2,93,190,210,234,238,250,272,274-278}. Em qualquer caso a intensidade da luz não deve exceder 200 mW/cm² para evitar efeitos hipertérmicos não desejáveis¹¹⁹.

O uso da lâmpada não-coerente na TFD é mais barato, estável, fácil de operar e é seguro²⁷⁹. Com o laser, pode-se minimizar o tempo de exposição, selecionar o comprimento de luz e atingir áreas específicas, além de atingir também mais facilmente vasos e pigmento³⁵.

O comprimento de onda mais utilizado é de 630 nm (luz vermelha)^{33,133,152}, pois este atinge a maior profundidade de penetração; cerca de 3mm que é o limite de espessura dos tumores que podem ser tratados pela TFD^{117,154}. Por outro lado a maior absorção do PpIX ocorre com pico de 405 nm (Banda de Soret), que atinge uma profundidade de 1-2 mm da superfície cutânea; dessa maneira, alguns estudos demonstram regressão total das lesões com a luz azul (Figura 4)^{35,280}.

Figura 4 - Relação entre o comprimento de luz e sua penetração na pele³³

Nesse caso, o comprimento de onda depende da profundidade da lesão. Assim, para lesões epidérmicas planas, a luz azul é mais efetiva, pois sua energia é semelhante à Banda de Soret da PpIX; para lesão hiperqueratótica é menos efetiva porque a luz com comprimento de onda curto é intensamente dispersa, ou para lesões pigmentadas pois ocorre um aumento da absorção pela melanina^{35,281}. A luz azul é menos efetiva no tratamento da doença de Bowen; por isso no tratamento de tumores apenas a luz vermelha está indicada pela maior profundidade de penetração e também pela maior oxigenação do tecido^{35,281}. Zelickson et al.⁹⁴ mostram uma regressão total de lesões de queratose actínica com irradiação com patches de luz azul, com 431-515 nm.

A oxigenação do tumor tem um papel especial na penetração da luz no tecido. Quando a concentração de oxigênio diminui, a profundidade de penetração no comprimento de luz de 630 nm também diminui, o que não

ocorre na banda de Soret, pois a penetração de 410 nm não depende da oxigenação do tumor^{35,281}. Para a mesma dose de luz emitida, a equivalência em energia absorvida por comprimento de onda é aproximadamente: 410 nm (10 J/cm²) = 580nm (200 J/cm²) = 630 nm (300 J/cm²)³⁵, embora a fluência indicada na literatura é 10J/cm² com a luz azul, 18-24J/cm² com 580nm e 60-80 J/cm² com 630 nm²⁸².

Dois metabólitos do PpIX são gerados durante a irradiação; são os foto-produtos ou foto-protoporfirina A' e B', que possuem pico de absorção na faixa de 670-700 nm; dessa maneira as lâmpadas não-coerente de amplo espectro, pelo fato de abranger vários picos de absorção, podem aumentar a ativação fotodinâmica, pois a ativação ocorre tanto em 630 nm como na faixa 670-700 nm^{35,130}. Os subprodutos do PpIX apresentam cerca de 3% da intensidade da fluorescência inicial de PpIX²⁰⁸.

A dose de luz é controlada pela escolha da fonte de luz. A comparação entre a irradiação da luz azul com a vermelha, demonstra que ambas, podem produzir uma demarcação entre o tecido normal e o doente, com uma intensidade de fluorescência de PpIX muito baixa no tecido normal²⁰⁹. A luz azul também apresenta uma fotodegradação mais rápida, embora ambas com uma dose de luz fixa e baixa intensidade resultam em maior fotodegradação²⁰⁸.

A luz vermelha, com uma dose de 70 J/cm² se mostra eficiente no tratamento da QA e o aumento dessa dose para 100 ou 140 J/cm² não apresenta aumento na eficácia do tratamento com TFD¹³⁶.

Quando se compara a luz azul com PDL ou LIP, observa-se maior eficiência da luz azul pela maior penetração, sendo esta efetiva mesmo com concentração baixa do fotossensibilizante, em contraste o PDL não alcança a faixa de absorção do PpIX. A LIP quando operada com filtro de corte baixo, como 560 nm, emite luz de 560-1200 nm, com 70% da energia abaixo de 700 nm. Apenas 10-15% da energia da LIP são utilizados na faixa de absorção da PpIX em 580-635 nm, assim, uma dose excessiva de PpIX pode ser necessária para obter uma dose efetiva de TFD. Após o tratamento com LIP-TFD-ALA pode-se fazer uma subsequente iluminação com luz azul por 10 minutos para fotorremover a PpIX remanescente e prevenir subsequente fototoxicidade à luz ambiente³⁵. A associação da limitada profundidade de penetração e a interferência da melanina faz com que a luz azul apresente efeitos puramente fotoquímicos enquanto, LIP e PDL, pela sua penetração mais profunda, produzem não somente efeitos fotoquímicos, mas também efeitos térmicos nos alvos como vasos, pigmentos e menos seletivo no colágeno, por isso a associação da LIP com TFD-ALA também apresenta bons resultados no tratamento do fotoenvelhecimento^{2,35}. PDL também pode ter absorção pela melanina na epiderme que resulta em dano fototérmico epidérmico, isso associado aos efeitos da TFD pode apresentar ação nos queratinócitos, principalmente no tratamento de lesões superficiais como Bowen e QA²¹⁰. Strasswimmer e Grande¹³⁷ compara PDL, LIP, áreas irradiadas com luz azul e não irradiadas. Um segundo controle é realizado com luz e apenas o veículo do ALA. Conclui que as áreas tratadas com ALA

são ativadas e em relação aos tipos de irradiação tanto a LIP quanto PDL apresentam resultado inferior à luz azul.

O LED emite luz vermelha difusa com comprimento de onda de 680nm +- 10nm e uma irradiância de 200±40 mW/cm².²¹¹. As vantagens do LED são: maior penetração e eficiência no fotodegradamento do PpIX na pele de rato, eficiência na inativação de células “in vitro” e menor dor na pele humana¹⁹³.

➤ *Alteração da microvascularização tumoral – oclusão dos vasos tumorais*

A TFD apresenta efeito no suplemento vascular do tumor causando rápida oclusão dos vasos tumorais, privando a célula de nutrientes e oxigênio¹⁷². O dano da microvascularização é rapidamente observado na histologia após a TFD e leva a uma diminuição do fluxo de sangue e conseqüente hipóxia. Rápida e substancial redução na oxigenação pode ocorrer também durante a iluminação pela utilização direta de oxigênio durante a geração fotoquímica de espécies reativas de oxigênio¹⁵⁹.

Nelson¹⁶⁰, em 1987, em estudo com TFD-HpD demonstra que a rápida necrose tumoral não é uma ação direta da morte celular, mas secundária em função da destruição da zona subendotelial da parede do capilar tumoral. Essa é formada por um conjunto de microfibrilas, elastina, colágeno (tipo IV) e glicosaminoglicanos. A destruição dessa estrutura ocorre 2 a 4 horas após a TFD. Wieman et al.²¹², observa alterações na

microcirculação pós TFD, que são pertinentes à necrose do tumor e que, a destruição da vascularização tumoral e hipóxia resultantes são as maiores forças na destruição fotoquímica do tumor. van der Veen¹⁴⁹, em 1994, não encontra relação entre a intensidade da imunofluorescência e a alteração da microcirculação e demonstra a necessidade de mais de uma aplicação para uma interrupção completa da circulação e necrose do tumor, mas sem necrosar o tecido adjacente. Leveckis et al.²¹³, demonstram que TFD-ALA tem efeitos na microcirculação normal, incluindo diâmetro arteriolar e venular e diminuição do fluxo de sangue. Estudos na literatura da associação entre agentes antivasculares com atividade seletiva “tumor-alvo” e TFD mostram resultados terapêuticos superiores quando comparados às técnicas isoladamente^{159,160}. Michels et al.²¹⁴, no estudo do tratamento da neovascularização na degeneração macular da idade demonstram que a TFD não provoca uma oclusão dos vasos de imediato e que após 5 horas da terapia apenas os vasos da periferia estão ocluídos e a total oclusão é verificada após um dia. Depois de uma semana, novos vasos são formados e continuam no mínimo por três meses.

➤ *Uso de pródrogas – ésteres do ALA*

Os derivados ésteres (metil, etil, propil, butil, pentil, hexil e octil - tabela) do ALA são lipofílicos, pois apresentam um aumento no número de carbonos em sua cadeia, e passam a barreira cutânea mais facilmente^{203,215,216}. Os ésteres de cadeia curta (C1-C3) apresentam menor

fluorescência que os de cadeia longa ou o ALA¹⁸³. São derivados farmacologicamente inativos, derivados de uma molécula mãe, e necessitam uma transformação espontânea ou enzimática dentro do corpo, a fim de liberar a droga ativa²¹⁵. Podem ser quantificados por meio da exposição ao reagente de Ehrlich que é um método utilizado para determinar o ALA em pacientes com porfíria²¹⁷.

Trabalhos na literatura com os ésteres do ALA, demonstram uma taxa mais rápida na capacidade de produção de PpIX com baixas concentrações, menor tempo de exposição, uma maior seletividade na formação de porfírina intralesional^{143,147} e uma localização de PpIX mais homogênea^{183,195,203,216,218-220,277,283-286}. Por outro lado, Tunstall et al.²⁰³, em células de carcinoma mamário de ratos, demonstram que os ésteres são menos efetivos que o ALA na indução do acúmulo de PpIX nos trabalhos *in vivo* que *in vitro*.

O metil aminolevulinato (MAL) é um éster do ALA indicado no tratamento da queratose actínica e carcinoma basocelular, sua aplicação é tópica (160 mg/g), três horas antes da TFD, pois apresenta maior penetração na pele seguida da exposição à luz vermelha^{154,286,287}.

Em relação à penetração dos ésteres, trabalhos na pele de rato mostram maior penetração do HALA quando a barreira cutânea está danificada, mas em diferentes tempos de aplicação e diferentes concentrações este apresenta uma difusão mais lenta através do estrato córneo que o ALA^{184,220,222}. O pentil éster ALA (PEALA), na fluorescência *in*

vivo, penetra nas lesões visíveis e na pele com alteração da barreira cutânea, mas não na pele normal e, na fluorescência microscópica, penetra no estrato córneo, mas não nas células displásicas da epiderme^{183,221}. Somente os derivados etil e propil possuem sucesso no aumento da formação do PpIX após aplicação tópica na pele *in vivo*¹⁸⁴.

Em relação à concentração de porfirina, esta é similar com ALA e HALA, mas a escolha do veículo pode alterar esta concentração. A formulação contendo DMSO e etanol é o melhor veículo para o ALA, enquanto que o creme é ideal para HALA. O uso do veículo em creme tanto para HALA como para ALA induz alta concentração de porfirina na pele normal e tumoral e este veículo deve ser utilizado para o ALA quando for necessário aumentar a sua seletividade. Utilizando ALA em solução de etanol com DMSO e HALA em creme, os melhores veículos respectivamente, há uma síntese de porfirina similar na pele; mas no fígado e no sangue, a quantidade produzida pelo HALA, é quatro vezes menor, demonstrando sua seletividade no acúmulo da porfirina²¹⁶.

Em altas concentrações, a regulação da conversão do ALA em porfirina é dirigida pela enzima porfobilinogenase, enquanto a hidrólise dos ésteres do ALA é regulada pelas esterases. O uso dos esterres do ALA é postulado em baixas concentrações em que não há a participação da regulação da síntese de porfirinas²²³.

Em relação ao tempo de exposição, um aumento de 50% de PpIX em um período de 4 a 12 horas é encontrado com o metil, hexil e octil ALA em

relação ao ALA. HALA e o MAL apresentam ótima fluorescência durante períodos de curta aplicação (2 a 4 horas), enquanto que a aplicação tópica do octil ALA por um período menor que 5 horas não apresenta boa fluorescência.

3.8.5.2. Efeitos colaterais

Fotossensibilidade cutânea prolongada é o efeito colateral mais relevante da TFD. O uso tópico de agentes fotossensibilizantes minimiza esse efeito colateral^{35,191,224}.

Os pacientes relatam sensação de formigamento, coceira, dor em fisgada ou queimação, cerca de um minuto após a irradiação com luz. A dor pode ser pela ativação da PpIX que se acumula nas terminações nervosas²⁸⁸. Esses efeitos desaparecem em 24 horas, mas a pele pode ficar eritematosa e edematosa. Podem-se desenvolver erosões superficiais com formação de crosta. É recomendado evitar a exposição à luz por 24 a 48 horas devido a fotossensibilidade tardia que pode ocorrer³⁵.

Trabalhos demonstraram uma reação histamina-like com um eritema se estendendo para fora da área tratada até 10 cm. Isso é relatado mais comumente na pele com efelides³⁵.

No tratamento da acne com TFD pode ocorrer acne reativa, mais comumente na região perioral, causada pela irradiação excessiva pela fonte de luz e é proporcional à severidade do quadro. Pode ocorrer também quadro de seborréia reacional³⁵. A diminuição dos poros na face também é observada pós-tratamento com TFD-ALA¹³⁰. Em uma série de 5 mil pacientes tratados com acne pela TFD, não se observa disfunção hepática quando a administração de ALA é oral com uma dose de 10 mg/kg de peso corpóreo. Cinco pacientes apresentaram herpes labial dois dias após o tratamento. Todos tinham história pregressa de herpes. Entre esses cinco, dois receberam tratamento tópico e três sistêmicos. Verificou-se hiperpigmentação e esfoliação epidérmica, sendo a pigmentação observada por uma semana a dois meses e a esfoliação de 4-10 dias. Com a administração de ALA sistêmico evita-se a hiperpigmentação e esfoliação principalmente no fototipo IV e V³⁵.

A hiperpigmentação após a administração tópica ocorre pela melanogênese, que é uma reação fotodinâmica ao acúmulo de PpIX na epiderme, enquanto que a hiperpigmentação após administração oral é pós inflamatória devido ao edema e eritema. Ocorre também uma diminuição da secreção sebácea que retorna ao normal em 30 dias^{35,117}. A hiperpigmentação é mais comum no fototipo III e IV²⁸⁹. Monfrecola et al.²⁸⁹, devido a esse efeito colateral, sugerem que a TFD pode ser indicada na repigmentação de lesões hipocrômicas.

A escara formada é proporcional à dose da substância e luz utilizadas. O mecanismo de reparo tecidual ocorre com a mínima formação de cicatriz, apesar do dano inicial parecer severo^{13,290}.

Os efeitos colaterais com os esteres do ALA, principalmente o MAL, ocorrem em 5% dos pacientes e são comumente dor e reações adversas locais como fototoxicidade com sensação de queimação que pode durar até 24 horas, edema transitório e eritema por até sete dias^{33,286}.

Agentes antiinflamatórios não hormonais, ventiladores refrescante durante a iluminação, compressas frias após o procedimento podem ser utilizados para diminuir a dor ou desconforto do tratamento. Anestésicos tópicos apresentam um pH alto e o ALA pode se tornar instável; provocam uma vasoconstrição que pode prejudicar a formação de espécies reativas de oxigênio; por isso, o ideal é evitá-los^{35,117,288}. Em um estudo randomizado, duplo-cego e placebo, a aplicação de um gel de tetracaína uma hora antes do procedimento não reduziu a dor durante e após a TFD²⁸⁸. A dor pode ser mais intensa nos fototipos baixos, fluências altas; áreas anatômicas como couro cabeludo e fronte e áreas grandes em extensão. O uso do Mal pode apresentar menor dor que o ALA²⁸⁸.

A TFD degranula mastócitos com liberação de histamina. Pacientes fototipo I podem se beneficiar do uso de antihistaminicos antes da terapia³⁵.

Alterações da acuidade visual e polineuropatia motora associada a lesões cutâneas, mimetizando quadro de porfiria hepática, são complicações citadas na literatura^{291,292}.

Em estudo com ALA sistêmico, Webber et al.²⁹³, realizam monitoramento clínico e laboratorial por 2 meses após a terapia e observa náusea e vômito em 20%, alterações transitórias da função hepática em um quarto dos pacientes e não observa alterações de fotossensibilidade cutânea ou anormalidades neurológicas.

Os principais efeitos colaterais da TFD estão listados abaixo (Quadro 10)³⁵:

Quadro 10 – Efeitos adversos e complicações da TFD

- Administração oral: náuseas e vômitos
- Durante a irradiação: desconforto, queimação e ardência
- Após TFD: eritema, edema, acne reativa, seborréia reacional, hiperpigmentação, pele seca, esfoliação epidérmica (apenas no uso tópico), herpes simples e fotossensibilização prolongada

3.8.6. Indicações da terapia fotodinâmica

A TFD está indicada no tratamento de tumores malignos sólidos com a propriedade de fotossensibilização. Pode ser dividida em indicações gerais (Quadro 11) e dermatológicas, e esta em oncológica e não oncológica.

Quadro 11 - Indicação da TFD no tratamento de tumores malignos sólidos

Carcinomas do trato gastrointestinal ^{29,295}
Esofágicos ^{270,294,296,297}
Pâncreas ²⁹⁸
Bexiga ²⁹⁴)
Cabeça e pescoço ²⁹⁴
Intratorácico e endobronquiais ^{128,169}
Primário e metastático da mama ^{141,159}
Neurológicos ¹⁶⁹
Ginecológicos ^{299,300,301,302}
Pele ^{141,303}
Trato genitourinário ²⁹⁴
Adjuvante no tratamento da sarcomatose ^{178,304}
Câncer cerebral ³⁰⁵
Neovascularização coroidal clássica na degeneração macular da idade ²¹⁴
Sinovite nas doenças artríticas ³⁰⁶
Redução de colônias de <i>Haemophilus parainfluenzae</i> ³⁰⁷ e <i>Escherichia coli</i> ³⁰⁸

3.8.6.1. Dermatológicas oncológicas

As principais indicações oncológicas na dermatologia são a queratose actínica, a doença de Bowen e o carcinoma basocelular superficial. Pode ser indicada, também, no carcinoma espinocelular, na eritroplasia de Queyrat, e em pacientes portadores da síndrome do nevo basocelular³⁰⁹, e na doença de Bowen subungueal^{13,310-313}. Não é recomendada, nos casos de carcinoma espinocelular invasivo e melanoma; com exceção, do melanoma metastático

na doença em progressão^{93,117,125,127,131,144,231,244,273,303,314-321}. É uma boa opção para as neoplasias de pele, não melanoma, que atingem pálpebras e região periocular e, que se ressecadas, podem comprometer a função, é uma boa opção, pois é uma técnica não invasiva³²².

Na literatura, a resposta da TFD-ALA no tratamento do câncer de pele é satisfatória em 85-100% no CBC superficial e 10-64% no carcinoma nodular. Esta pode aumentar para 89% se a curetagem for associada previamente a TFD^{118,123-126,129,131,139,140,146,232,234,235,244,246,278,284,310,323-326}.

Em relação, à recidiva do tumor, Fink-Puches et al.²³³, em 60 meses de estudo retrospectivo com carcinoma basocelular e espinocelular superficiais, observam uma taxa de recidiva superior à da literatura, mas verifica que a profundidade da fibrose encontrada na histopatologia é maior que a invasão inicial do tumor, demonstrando que os pobres resultados em longo prazo, não podem ser explicados pela penetração insuficiente do ALA. Kim et al.¹⁹⁰, afirmam que apesar do bom resultado no tratamento da queratose actínica, o acompanhamento deve ser longo e a confirmação deve ser histopatológica.

A efetividade do MAL é relatada no tratamento da queratose actínica^{287,334}, no tratamento e prevenção de queratoses actínicas em transplantados^{335,336}, no tratamento do carcinoma basocelular nodular com resultados estatisticamente iguais ao da cirurgia, mas cosmeticamente melhores³³⁷, no tratamento da eritroplasia de Queyrat³³⁸ e como opção para carcinoma basocelular de difícil tratamento ou que necessitam grandes

cirurgias³³⁹. Foley et al.³³ demonstram bons resultados com uso do MAL no tratamento dos tumores epiteliais, dando ênfase à simplicidade do procedimento, poucos efeitos colaterais, alta aderência do paciente, múltiplas lesões tratadas ao mesmo tempo e bom resultado cosmético.

Áreas tratadas com ALA ou com MAL, quando comparadas a áreas não tratadas, apresentam um retardo no aparecimento de câncer induzido pelo UVB. O que mostra que a TFD é uma maneira profilática, sem aumentar a morbidade ou mortalidade, na prevenção do câncer induzido pelo UVB^{340,341}.

Nos tumores não epiteliais como sarcoma de kaposi clássico¹⁴¹, doença de Paget da vulva³⁵⁰, lesões em placa de micose fungóide³⁵¹, linfoma de células T³⁵², plasmocitose cutânea benigna³⁵³, linfadenose cutânea benigna³⁵⁴ e no pseudolinfoma cutâneo a TFD-ALA se mostra como opção terapêutica com bons resultados.

A TFD-ALA associada ao LED tem apresentado bons resultados no tratamento de lesões orais principalmente lesões de displasia da mucosa e carcinoma *in situ*^{250,355}, carcinoma verrucoso extenso e de leucoplasia oral^{356,357}.

3.8.6.2. Dermatológicas não oncológicas

As aplicações não oncológicas são baseadas na observação de que os linfócitos podem ser alvos de ativação fotodinâmica em que a TFD tem ação imunomoduladora no tratamento de doenças como psoríase e alopecia areata^{126,143,166,269}.

O ALA é capaz de fotossensibilizar anexos cutâneos como estruturas pilossebáceas e pode ser utilizado para remoção de pelos^{123,358}. Bissonnette et al.³⁵⁹ utilizam ALA nas concentrações 5, 10 e 20% e placebo em pacientes com alopecia areata extensa, 3 horas antes da aplicação de luz vermelha e não encontra crescimento significativo do cabelo. Han et al.³⁵⁸ desenvolvem uma formulação tópica lipossomada de ALA com capacidade de induzir a expressão de PpIX, nos folículos pilossebáceos em ratos, em todas as fases do ciclo do pêlo. A expressão específica somente na glândula sebácea aparece na fase telógena. Forte expressão é vista em toda unidade pilossebácea na anágena com intensa expressão no bulbo e glândula sebácea e uma redução na expressão no bulbo é verificada na fase catágena.

O tratamento da psoríase com ALA apresenta resultado controverso na literatura, a melhora é lenta, o tratamento é doloroso e o tratamento sistêmico pode apresentar melhor resultado, enquanto o tratamento tópico pode ser associado a outros métodos^{136,166,269,360,361-363}.

Verrugas virais^{364,365}, molusco contagioso recalcitrante em paciente com HIV³⁶⁶, epidermodisplasia verruciforme³⁶⁷ e condilomas acuminados³⁶⁸⁻³⁷⁰ refratários aos tratamentos podem ser considerados como passíveis de tratamento com a TFD. Segundo, Veien et al.³⁷¹, a inativação fotodinâmica rompe o DNA viral com a irradiação com luz visível.

A TDF pode ser considerada uma boa alternativa no tratamento da radiodermite crônica³⁷², no queratoacantoma e esclerodermia localizada^{93,126,130,133,143,144,373}, líquen plano hipertrófico do pênis³⁷⁴, leishmaniose cutânea³⁷⁵, na micose interdigital dos pés³⁴², nevo sebáceo³⁴³, sarcoidose cutânea³⁴⁴, onicomicose¹⁴⁷, poroqueratose actínica superficial disseminada³⁴⁵, lesões vasculares hemangiomatosas³⁴⁶, pênfigo benigno familiar recalcitrante³⁴⁷, queratose pilar³⁴⁸, dermatite perioral³⁴⁹ e rinofima³⁷⁶. No líquen escleroso vulvar, a TFD associada ao ALA, apresenta melhora significativa na sintomatologia com mínimo de efeitos colaterais³⁷⁷.

Jayasree et al.³⁷⁸, mostram, em estudos em ratos, a eficácia da TFD na cicatrização de feridas e Chan et al.³⁷⁹, apresentam um estudo usando TFD-laser de argônio na aderência de retalhos na pele de porco.

O tratamento da acne^{3,380-387}, hiperplasia sebácea⁴⁻⁶ e o de rosácea⁷ têm sido algumas das principais indicações da TFD na dermatologia não oncológica. A ação ocorre na glândula sebácea com dano à glândula e ao suprimento microvascular glandular, além da ativação das porfirinas produzidas pelo *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) que resulta na produção

de oxigênio “singlet”, que destrói a membrana da bactéria e altera a função imunológica cutânea^{95,380,388}.

O tratamento da acne vulgar inflamatória de moderada a severa através da TFD apresenta resposta terapêutica benéfica, poucas reações adversas³⁸⁴. Pode ser uma boa opção de tratamento nas áreas corporais extensas³⁸⁹ e indicação nos pacientes que não podem usar retinóides orais³⁹⁰.

Diferentemente, os resultados da TFD na hidrosadenite supurativa (HS) são controversos. Strauss et al.³⁹¹, definem como características para o insucesso do tratamento. Enquanto a TFD apresenta ação na redução do número de bactérias, na produção de sebo e efeitos no epitélio folicular e, por isso, tem uma boa ação na acne vulgar, na HS a produção de sebo é normal, a ação da bactéria é controversa já que a cultura é negativa e a arquitetura do folículo principalmente nos casos crônicos não está mantida. Ao contrário, é grande o número de cicatrizes e fibrose o que dificulta a penetração do ALA.

3.8.7. Fotoenvelhecimento

A TFD tem se tornado uma modalidade com aplicações cosméticas cuja principal indicação é o tratamento do fotoenvelhecimento^{2,134,327}.

A técnica chamada de “fotorejuvenescimento fotodinâmico” é discutida na literatura primeiramente por Ruiz-Rodriguez et al.³⁴⁷ que observa 17 pacientes com queratose actínica e fotoenvelhecimento. O autor usa ALA 20% em emulsão óleo-em-água com oclusão de 4 horas e luz pulsada de 615 nm e observa melhora importante no tratamento das lesões de queratose actínica e coloração da pele.

O uso da luz azul é comum no tratamento da queratose actínica associada ao fotoenvelhecimento e com bons resultados, mas outras fontes de luz podem ser usadas como LIP (400-1200 nm) ou PDL (585-595 nm) e estas aumentam os efeitos cosméticos na TFD-ALA (Quadro 12).^{2,132,282,327,331,392}

Quadro 12 – Comparação entre PDL, LIP e a luz azul associados ao ALA no tratamento do fotoenvelhecimento³²⁷

Referências	Tempo de exposição	Fonte de luz	Número de tratamentos	Resultados	Follow-up (meses)
Gold ³²⁸	1	LIP	3	90 (rugas periorcular); 100 (textura); 90 (hiperpigmentação mosueada); 70 (eritema facial); 83 (QA)	3
Goldman et al. ³²⁹	Short-contact	luz azul	1	90 (QA); 72 (textura); 59 (pigmentação)	--
Avram et al. ³³⁰	1	LIP	1	68 (QA); 55 (telangiectasias); 48 (pigmentação); 25 (textura)	1,3
Bhatia et al. ³³¹	--	LIP	3*, 2**	80 (TFD-ALA-LIP) vs. 50 (LIP) fotoenvelhecimento; 95 vs. 65 (hiperpigmentação); 55 vs. 20 (rugas finas)	1
Gold et al. ¹³³	--	LIP	3*	80 (TFD-ALA-LIP) vs. 50 (LIP) rugas periorculares; 55 vs. 29.5 (textura); 60.3 vs. 37.2 (hiperpigmentação); 84.6 vs. 53.8 (eritema facial); 78 vs. 53.6 (QA)	3
Alster et al. ³³²	1	LIP	2*	1.65*** (TFD-ALA-LIP) vs. 1.28*** (LIP)	6
Dover et al. ³³³ †	0,5-1	LIP	3*, 2**	80 (TFD-ALA-LIP) vs. 45 (LIP) global score; 95 vs. 60 (hiperpigmentação); 80 vs. 80 (linhas finas); 95 vs. 90 (textura); 75 vs. 75 (rugosidade)	1

* meia face, ALA TFD-LIP vs. LIP

** toda face, LIP

*** grau de melhora clínica (1=<25% melhora, 2=25%; 3=51%; 4=76%-100%)

† estudo controlado (meia face), randomizado, prospectivo

QA: queratose actínica; LIP luz intensa pulsada; RF: radiofrequência

Alam³⁹³, Avram³³⁰, Dover³³³ e Alster³³² relatam melhora importante no tratamento do fotoenvelhecimento com associação de ALA e LIP quando comparado ao LIP isoladamente e sem aumento de efeitos colaterais. A melhora do fotoenvelhecimento com a associação do PDL a TFD-ALA é relatada por Alexiades-Armanakas³⁹² e Key²⁸², com melhora da textura, rugas finas e coloração da pele.

Marmur et al.³¹¹ encontram melhora clínica do fotoenvelhecimento e aumento de colágeno tipo I após TFD-ALA associada ao LIP em maior proporção que o LIP isoladamente.

Hall et al.³⁹⁴, sugerem que TFD-ALA pode ser associada à radiofrequência no tratamento do fotoenvelhecimento com efeitos na epiderme e derme.

Lowe et al.³⁹⁵, relatam melhora do fotoenvelhecimento e das rugas finas com ALA 5% associada a LED de 630 nm. O ALA foi aplicado na região periocular com tempo de exposição de 30 minutos.

O uso da luz azul na TFD-ALA apresenta uma melhora de 72% na superfície da pele, 59% na hiperpigmentação mosqueada e também nas rugas finas. A melhora clínica da associação da LIP a TFD-ALA apresenta uma porcentagem de 55-90% nas rugas finas periorbitárias, 25-100% na textura da pele, 48-90% na hiperpigmentação mosqueada e 55-70% no eritema facial^{329,330,347,396}.

Em relação ao tempo de exposição no tratamento do fotoenvelhecimento; Touma e Gilrescht¹³⁵ comparam o tempo de exposição

de uma hora com 14-16 horas e relata melhora das lesões de queratose actínica e do fotoenvelhecimento até 5 meses após a terapia. Hall et al.³⁹⁴, comparam a exposição de 30 minutos, 1, 2 e 3 horas do ALA e aplicação de LIP de 24-30 J/cm² para determinar a mínima e a máxima doses de eritema e crostas e demonstra que quanto maior o tempo e a fluência, maior a incidência dos efeitos colaterais, principalmente na pele de fototipo claro. O tempo de exposição de 1 hora é chamado de “short contact” e é tão eficiente quanto as longas exposições^{134,327}.

Uebelhoer et al., em 2005², fazem uma revisão da literatura e mostra os benefícios da associação do “short contact” do ALA com a TFD e LIP, mostrando uma combinação dos efeitos fototérmicos com os efeitos fotoquímicos levando a melhora do fotoenvelhecimento com poucos efeitos colaterais.

Touma e Gilrescht¹³⁵, demonstram na associação da TFD-ALA com a luz azul, tempo de exposição uma a 3 horas, e o uso de uréia 40% no pré-tratamento em uma hemiface e creme lidocaína 3% ou placebo no momento da irradiação para evitar os efeitos colaterais, uma melhora no fotoenvelhecimento e nas lesões de queratose actínica. Em relação aos efeitos colaterais ocorre apenas moderado desconforto e reações de fototoxicidade por uma semana. Os diferentes tempos de aplicação e o uso da uréia e da lidocaína não apresentam efeitos significantes no resultado.

Nestor et al., em publicação do consenso de TFD-ALA, no tratamento do fotoenvelhecimento demonstram a classificação utilizada do

fotoenvelhecimento e as técnicas de tratamento apropriadas (Quadros 13 e 14). Relata que a TFD-ALA é recomendada no tratamento do fotoenvelhecimento tipo C e que a LIP é mais indicada nos fototipos I-III e a luz azul IV-V, pois causa menor efeito devido à pigmentação. Este consenso ainda recomenda três aplicações com intervalo de 2-4 semanas (Quadro 14).

Quadro 13 – Características clínicas do fotoenvelhecimento, segundo consenso de TFD-ALA³²⁷

Tipo de fotoenvelhecimento	Características	Tipo de tratamento
A	alterações superficiais, incluindo vascular e pigmentar, lentigos, telangiectasias, eritema, rosácea e melasma	I
B	alterações estruturais na derme e epiderme, resultando em rugas, poros abertos, flacidez e pele actínica	II
C	severa elastose associada com QA, câncer de pele, alterações do tipo A e B	III

Quadro 14 - Métodos de tratamento do fotoenvelhecimento, segundo a classificação clínica publicada no consenso de TFD-ALA³²⁷

Tratamento	Tipo de envelhecimento
I (LIP, pode estar associado com outras substâncias*)	tipo A
II (LIP associado com 1064 nm, 1320 nm Nd:YAG laser)	tipo B
III (TFD-ALA associado ou não com LIP ou outra fonte de luz)	tipo C

* metronidazol tópico, acetato de fluocinolona 0.01%, hidroquinona 4%, tretinoína 0,05%

4. Casuística e Métodos

4.1. Casuística

4.1.1. Seleção dos pacientes

Foram estudados, prospectivamente, treze pacientes, do sexo feminino, com idade entre 50 e 78 anos (média 64), atendidas no Ambulatório de Dermatologia da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), no período de fevereiro a setembro de 2006.

Os procedimentos tiveram início após assinatura do termo de consentimento (ANEXO A), o qual possuía explicações sobre as atividades da pesquisa, possíveis efeitos colaterais, fotoproteção e o acompanhamento do doente durante toda a realização dessa pesquisa.

4.1.2. Critérios de inclusão

Foram considerados critérios de inclusão:

- Pacientes do sexo feminino.
- Idade entre 50-78 anos.

- Fototipo I a IV³⁹⁷.
- Presença de fotoenvelhecimento Grau I-IV, segundo a classificação de Glogau²⁸.

4.1.3. Critérios de exclusão

Foram considerados critérios de exclusão:

- Uso recente (um mês) de método abrasivo ou substância queratolítica.
- Doença clínica como diabetes mellitus, hipertensão arterial, doenças neurológicas e psiquiátricas, cardiopatia, discrasia sangünea, hepatopatia, nefropatia, doenças com alterações sistêmicas imunológicas, porfirias e cirurgias recentes.
- Tendência à formação de quelóide e/ou cicatriz hipertrófica.
- Lesões na face compatíveis com doenças dermatológicas em atividade, infectocontagiosas ou que possam originar o fenômeno de Köebner.
- História prévia de infecção por herpes simples.
- Lesões cutâneas de câncer de pele.
- Antecedentes pessoais ou familiares de melanoma.
- Uso de medicações fotossensibilizantes ou imunossupressoras.

4.1.4. Suspensão da paciente da pesquisa

Os critérios de suspensão da paciente da pesquisa foram:

- Resposta exagerada ao tratamento.
- Sensibilidade à substância utilizada.
- Infecções intercorrentes por outros motivos.
- Intolerância ao método usado (dor, ardor, queimação excessiva).
- Tratamento descontínuo (paciente que não comparecer na data marcada ou utilizar outra forma de abrasão da pele).

4.2. Métodos

4.2.1. Avaliação clínica

As pacientes foram submetidas ao exame clínico dermatológico (ANEXO B) e classificadas, segundo Glogau²⁸ em fotoenvelhecimento muito leve (I), leve (II), moderado (III) e importante (IV).

Os itens avaliados foram:

- Rugas superficiais e profundas (principalmente da fronte, região

perioral, periocular e malar).

- Coloração e textura da pele.
- Melanose solar.
- Queratose actínica.
- Flacidez cutânea (principalmente região periocular, mandibular e sulco nasogeniano).

Após a avaliação clínica inicial, foi realizada anamnese para confirmação dos dados de inclusão no protocolo e assinatura do termo de consentimento.

4.2.2. Controle fotográfico e realização das biópsias

As pacientes primeiramente foram fotografadas (máquina digital – Cânon PowerShot A80 – 4.0 megapixels) e então realizada a biópsia na região pré-auricular direita. Esta foi localizada e minuciosamente medida do início ao final do lóbulo da orelha, dividida em 3 partes onde foi realizada cada biópsia. Na primeira região foi realizada a biópsia antes do procedimento, na segunda a biópsia de controle 24 horas após a primeira sessão e na terceira região o controle 21 dias após a terceira sessão.

Após anestesia com lidocaína 2%, foi utilizado em cada biópsia, “punch” descartável número 3 e sutura com fio mononylon 6,0. O fragmento

de biópsia foi colocado em frasco previamente identificado com formol tamponado onde permaneceu no máximo 24 horas até o início das colorações específicas:

- Método de picrosirius³⁸ para fibras colágenas.
- Coloração de Weigert-oxona para as fibras elásticas.
- Imunoistoquímica para avaliação do sistema imunológico da pele.

Os pontos foram retirados sempre após sete dias do procedimento e o intervalo entre as sessões foi de 15 dias.

Após 24 horas da primeira aplicação foi realizada foto de controle e biópsia na 2ª região (as fotos e biópsias foram realizadas sempre com a mesma técnica). Após 21 dias da terceira sessão foi realizada novamente foto e biópsia na 3ª região.

4.2.3. Aplicação do ácido 5-delta-aminolevulínico associado à terapia fotodinâmica

A pele da face foi previamente limpa com álcool e então o ácido 5-delta-aminolevulínico 20% foi aplicado de forma homogênea com o bastão aplicador Levulan® Kerastick™. O Levulan® Kerastick™ contém duas câmaras de vidro, uma contendo ácido 5-delta-aminolevulínico e a outra

álcool e polietilenoglicol; quando quebradas, as substâncias se misturam na ponta do aplicador.

A pele da face com a substância foi ocluída por 2 horas com papel alumínio para evitar fotoativação precoce. Após a retirada da oclusão foi feita sessão de 20 minutos (10 minutos em cada hemiface), com aparelho de terapia fotodinâmica Multi Waves (Leds Light Therapy); Industra, registro na ANVISA 80058580009. O comprimento de onda utilizado foi 630 nm, a intensidade de saída 3100 mw/cm², intensidade óptica de 100 mw/cm², com superfície ativa de 40x80 mm.

4.2.4. Acompanhamento da paciente após a aplicação

As pacientes foram orientadas em relação aos possíveis efeitos colaterais, fotoproteção, uso de produtos químicos sem autorização prévia, retorno nas datas estabelecidas e no caso de descamação, a não retirada da pele.

As pacientes foram avaliadas durante toda a realização desta pesquisa. Nos casos em que persistiram as lesões de queratose actínica, o tratamento foi complementado com crioterapia.

Após o encerramento do estudo as pacientes foram orientadas em como manter um tratamento adequado para o fotoenvelhecimento, fotoproteção adequada e retorno no caso de dúvidas.

4.2.5. Critérios de avaliação clínica

As pacientes foram avaliadas clinicamente antes e após as sessões de terapia fotodinâmica e classificadas em:

- melhora – leve, moderada ou importante;
- piora;
- inalterado.

4.2.6. Método de preparo das lâminas

As biopsias foram fixadas por 24 horas em solução de formalina 10% em Tampão Fosfato 0,1M. A seguir foram desidratadas e embebidas em parafina para estudo histológico e imunoistoquímico. Dos blocos de parafina foram obtidos cortes histológicos de três μ m e espessura, que seguiram técnicas imunoistoquímicas para estudo da expressão da imunoreatividade

da pele e técnicas histoquímicas para estudo dos componentes fibrosos, fibras colágenas e elásticas da derme. Cortes histológicos de três μm de espessura também foram corados pela H.E. para avaliação histopatológica geral das biópsias.

4.2.7. Método de coloração de picrosirius para análise quantitativa das fibras colágenas

Cortes histológicos da pele das pacientes, antes, 24 horas e 21 dias após o tratamento foram submetidos à coloração pelo método de Picrosirius a 0,2% (Sirius Red, Direct Red 80, C. I. 35780, Aldrich, Milwaukee, WI) dissolvido em solução aquosa de ácido pícrico saturado. Esta coloração tem sido largamente utilizada para corar colágeno em cortes histológicos, com intuito de análise quantitativa.

4.2.8. Método de coloração de Weigert-oxona para análise quantitativa das fibras elásticas

Cortes histológicos da pele das pacientes, antes, 24 horas e 21 dias após o tratamento foram submetidos à coloração pelo método da fucsina-

resorcina de Weigert com oxidação prévia pela oxona 1% ($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$, Du Pont Co.) para evidenciação de fibras elásticas maduras, elaunínicas e oxitalânicas

4.2.9. Técnica imunoistoquímica para anticorpos relacionados a imunologia celular e humoral

Cortes histológicos seriados de 3 μm de espessura dos blocos de parafina seguiram para a reação de imunoistoquímica segundo o método do complexo avidina-biotina-peroxidase³⁹⁸.

Os cortes histológicos foram recolhidos em lâminas de vidro, previamente tratadas com 3-aminopropyl-triethoxy-silane (Sigma A-3648 USA), utilizado para garantir melhor adesão do corte à lâmina. As lâminas, contendo os cortes, foram deixadas por 24 horas em estufa a 60°C para iniciar a desparafinação, que foi completada com banho em xilol quente e frio. Em seguida, foram submetidas à hidratação em banhos de etanol em graduação decrescente e finalmente água destilada.

A recuperação antigênica foi obtida em alta temperatura em vapor com solução de citrato pH 6,0 por 50 minutos a 95°C, para os anticorpos CD1, CD4 e CD8. A seguir procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (3% - 10 volumes) com quatro banhos de 5 minutos cada.

As lâminas com os espécimes foram lavadas com água corrente e destilada e com solução salina tamponada com fosfato (PBS-phosphate buffered saline) 0,01M pH 7,4 por 5 minutos.

Antes da incubação com anticorpo primário procedeu-se o bloqueio de proteínas com “Protein Block Serum-Free” (DAKO X909, EUA) e depois bloqueio com de Avidina e Biotina com os Kits DAKO Biotin Bloking por 15 minutos e DAKO Avidin Bloking também por 15 minutos. A seguir procedeu-se à incubação com os anticorpos primários nas seguintes diluições: CD1 1/20, CD4 1/400 e CD8 1/50 (DAKO), que foram diluídos em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (SIGMA A 9647 USA) e ázida sódica (NaN_3) 0,1%. Incubou-se com por 60 minutos a 37°C, à 4°C em câmara úmida. Após a incubação as lâminas com os espécimes eram lavadas em tampão PBS com três trocas de 2 minutos cada.

Os outros anticorpos utilizados foram o IFN γ 1/30 (RD Systems – código MAB285), IL4 1/20 (RD System - código AF-204-NA) e TNF α 1/20 (RD System – código AF-210-NA); a recuperação antigênica dos três anticorpos foi realizada com tripsina (20 mg em 100 ml PBS).

Para o anticorpo secundário biotinilado, a incubação foi realizada com o Kit “LSAB Plus-HRP” (DAKO, USA), lavando-se após em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada.

A revelação foi realizada em solução de substrato cromógeno, DAB (3,3 diaminobenzidine-tetrahydrochloride do kit “LiquidDAB + Substrate Chromogen System” (DAKO). A seguir lavou-se o material em água corrente

e destilada por 3 minutos e contracolorou-se com hematoxilina de Harris por 1 minuto.

As lâminas com os espécimes foram lavadas novamente em água corrente e destilada, imersas duas vezes em água amoniacal (solução aquosa de hidróxido de amônia 0,5%) e lavadas outra vez em água corrente e destilada. Em seguida, foram desidratadas em etanol com graduação crescente e montaram-se novas as lâminas com Entellan (Merk 107961, Germany).

4.2.10. Avaliação histomorfométrica das fibras colágenas e elásticas e anti-CD1

As lâminas, submetidas à histoquímica para fibras colágenas e elásticas e à imunoistoquímica foram analisadas sob microscópio de luz Zeiss com objetiva de 20x e ocular de 10x. A avaliação quantitativa foi realizada com auxílio de Sistema Analisador de Imagem (Kontron Eletronic 300, ZEISS).

A estação de trabalho consiste de microscópio Zeiss trinocular, um vídeo-câmera colorido (SONY CCD - Iris) com placa digitalizadora de imagens, um microcomputador com processador Pentium 133MHz, IBM-PC compatível, operando em ambiente Windows 95®-32 bits. As imagens

obtidas em 10 campos microscópicos foram digitalizadas com auxílio do software, proporcionando a possibilidade de compartilhamento de dados com o processador de textos (Microsoft Word®) e planilha eletrônica (Microsoft Excel®). A utilização deste programa proporcionou a análise, o tratamento, a interpretação e a obtenção de valores de mensuração das estruturas com todas as variáveis e a distribuição automática dos dados.

A transmissão óptica foi quantificada a fim de se processar e analisar a imagem, e para que esta fosse quantificada em suas medidas originais, optou-se por transformar a medida da imagem digitalizada, o Pixel, em medida micrometrada. Para tal utilizamos a calibração de Pixel em micrômetros. A calibração das imagens foi realizada para imagens obtidas em aumentos de 10, 20, 40 e 100 vezes. O fator de calibração (CF) é calculado automaticamente, em pixels, e este fator foi utilizado pelo software para os cálculos correspondentes em micrômetros. As imagens foram analisadas pelo software Kontron 300 (Zeiss) para determinação de área, comprimento e contagem de partículas, contendo ferramenta que permite identificar determinada estrutura, colocá-la em evidência e automatizar sua marcação.

Após aquisição da imagem com objetiva de 20x e ocular de 10x, utilizamos o recurso de “threshold” para marcar as estruturas a serem quantificadas. Em seguida empregamos um procedimento de macro desenvolvido para contagem, mensuração e quantificação da expressão das fibras colágenas e elásticas e anti-CD1 existente em cada imagem

analisada. Esta rotina, semi-automatizada foi realizada em cada campo da lâmina em estudo, sendo 10 campos por lâmina. Os resultados obtidos em cada campo, correspondentes à área percentual de fibras, ou seja, fração de área, foram arquivados em planilha Excel para posterior análise estatística. Em cada campo analisado foi também quantificada a área tecidual analisada. A avaliação imunoistoquímica para anti-CD1 foi realizada por meio da contagem do número de células CD1 positivas em área da epiderme, que foi obtida com auxílio do sistema analisador de imagem Kontron 300.

4.2.11. Avaliação da intensidade de reação imunoistoquímica

As áreas analisadas foram a epiderme e derme. Todas as amostras foram avaliadas sob microscópio de luz Zeiss com objetiva de 20x e ocular de 10x, por dois investigadores independentes. A média de intensidade de reação foi avaliada em todo o espécime, por método semi-quantitativo usando os seguintes escores: 0=ausência de reação; 0,5=reação muito fraca; 1,0= reação discreta; 2,0= reação moderada; 3,0= reação intensa. A documentação fotográfica foi obtida usando microscópio de luz acoplado ao analisador de Imagem Kontron 300 com uma câmera CCD Sony (Tokyo, Japan).

4.2.12. Avaliação da intensidade de reação inflamatória na derme

Cortes histológicos de 3 μm de espessura foram corados pela H.E. e analisados sob microscopia de luz. A intensidade de reação inflamatória na derme foi avaliada através de método semi-quantitativo utilizando os seguintes escores: 0= II ausente; 1,0= II discreto; 2,0= II moderado; 3,0= II intenso, tendo como base o número de células inflamatórias mononucleares presentes ao redor de vasos e anexos cutâneos.

4.3. Análise Estatística

Os dados quantitativos histomorfométricos, relativos à fração de área de fibras colágenas e elásticas e do número de células CD1 positivas e os dados semi-quantitativos da reação inflamatória, células CD4 e CD8 positivas e reação positiva IL4, IFN γ e TNF α foram analisados por meio de Estatística Descritiva: média, desvio padrão, valor mínimo e máximo e mediana.

Para verificar os resultados dos efeitos de um único tratamento, antes e após a terapia fotodinâmica, nos diferentes pacientes, os valores foram

submetidos ao teste de normalidade. Utilizamos o Teste Estatístico Paramétrico de T pareado para analisar a variação de colágeno da derme, em três momentos distintos no mesmo paciente, antes – 24horas-21dias após o tratamento, pois os valores apresentaram distribuição normal. Este teste indicou se o efeito de um único tratamento, terapia fotodinâmica, no mesmo indivíduo foi significativa. Ainda, estando os dados dentro de uma curva normal, utilizamos a Análise de Variância para ver se as médias dos três grupos foram alteradas por um único fator, sendo a hipótese nula não existir diferença na população estudada.

Quando os dados não apresentaram uma distribuição normal, então foi aplicado o Teste Estatístico não paramétrico Simples de Wilcoxon para ver se um único tratamento no mesmo indivíduo foi significativa. De outra maneira, utilizamos também a análise de Variância on Ranks ou Teste de Kruskal-Wallis para comparar a mediana entre os três tempos de observação.

Para avaliar a ocorrência de correlação entre a intensidade da melhora clínica e do ganho de colágeno e fibras elásticas na derme após o tratamento utilizamos o teste de Regressão Linear.

Os Testes Estatísticos foram realizados com auxílio do programa SigmaStat (Jandel Cientific, CA, USA), aceitando como nível de significância $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Avaliação descritiva da amostra

Treze pacientes, com fotoenvelhecimento facial realizaram tratamento com terapia fotodinâmica e ALA tópico. Segundo a classificação de Glogau²⁸, seis pacientes (1, 4, 9, 10, 11 e 12) apresentavam fotoenvelhecimento grau III (46,15%), cinco (2, 3, 5, 6 e 13) grau IV (38,46%) e duas (7 e 8) grau II (15,38%). A idade variou entre 50 e 78 anos (média 64).

Em relação ao fototipo, duas pacientes (2 e 5) apresentavam fototipo I (15,38%), cinco (1, 3, 6, 9 e 12) fototipo II (38,46%), cinco (4, 7, 10, 11 e 13) fototipo III (38,46%) e uma (8) IV (7,69%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das pacientes conforme o fotoenvelhecimento facial, a idade e o fototipo

Paciente	Fotoenvelhecimento	Idade	Fototipo
1	Glogau III	50	II
2	Glogau IV	69	I
3	Glogau IV	65	II
4	Glogau III	52	III
5	Glogau IV	79	I
6	Glogau IV	57	II
7	Glogau II	44	III
8	Glogau II	47	IV
9	Glogau III	58	II
10	Glogau III	57	III
11	Glogau III	64	III
12	Glogau III	64	II
13	Glogau IV	63	III

5.2. Evolução clínica das pacientes após TFD-ALA

Em relação aos itens abaixo avaliados:

- Fotoenvelhecimento clínico (global) da face.
- Rugas superficiais e profundas (principalmente fronte, perioral, periocular e malar).

- Coloração e textura da pele.
- Melanose solar.
- Queratose actínica.
- Flacidez cutânea (principalmente periocular, região mandibular e sulconasogeniano).

Observou-se os seguintes resultados:

➤ *fotoenvelhecimento clínico (global) da face*

Doze pacientes (92,30%) apresentaram melhora do fotoenvelhecimento clínico e apenas uma (7,69%) (10) manteve o quadro inalterado (Figura 5). Dessas doze pacientes, cinco (41,66%) (2, 5, 7, 9 e 12) apresentaram melhora importante, quatro (30,76%) (1, 4, 6 e 13) moderada e três (23,09%) (3, 8 e 11) melhora discreta (Tabelas 2 e 3).

➤ *rugos superficiais e profundas (principalmente da fronte, perioral, periocular e malar)*

Não houve alteração das rugas profundas. As rugas superficiais estavam discretamente melhoradas em cinco pacientes (38,46%) (2, 6, 7, 9 e 12) principalmente na fronte e periocular.

- *flacidez cutânea (principalmente região periocular, mandibular e sulco nasogeniano)*

Doze pacientes (92,30%) apresentaram melhora da flacidez cutânea e uma (7,69%) (10) permaneceu inalterada. Cinco (41,66%) (7, 8, 9, 12 e 13) apresentaram melhora da flacidez principalmente na região da pálpebra inferior, duas pacientes (16,66%) (1 e 8) no sulco nasogeniano e dez (83,33%) (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 e 12) na região mandibular.

- *coloração e textura da pele*

Todas as pacientes (13) apresentavam alteração da coloração e textura da pele. A coloração se mostrava amarelo citrina, opaca, sem brilho e a textura não era uniforme com áreas mais oleosas e áreas mais ressecadas. Doze pacientes (92,30%) apresentaram melhora da coloração e textura da pele e apenas uma (7,69%) (10) permaneceu inalterada. Duas pacientes (15,38%) (7 e 8) apresentavam efélides e tiveram apenas um clareamento parcial das lesões e quatro (30,76%) (6, 10, 11 e 13) apresentavam melasma e não tiveram alteração do quadro..

- *melanose solar*

Doze pacientes (92,30%) (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 e 13) apresentavam melanoses e onze (91,66%) apresentaram clareamento

apenas parcial das lesões, uma (8,33%) paciente manteve o quadro inalterado.

➤ *queratose actínica*

Quatro pacientes (30,76%) (2, 5, 6 e 9) apresentavam lesões com diagnóstico clínico de queratose actínica e apenas uma (25%) paciente (6) manteve lesão residual no dorso do nariz . As demais pacientes (75%) apresentaram regressão total das lesões.

Tabela 2 – Resultados clínicos obtidos após o tratamento

Paciente	Fotoenvelhecimento	Resultado pós TFD-ALA	Coloração textura	Melanose	Queratose	Rugas superficiais	Flacidez
1	Glogau III	moderado	melhora	melhora	-	-	melhora
2	Glogau IV	importante	melhora	melhora	regressão	melhora	melhora
3	Glogau IV	discreto	melhora	melhora	-	-	melhora
4	Glogau III	moderado	melhora	melhora	-	-	melhora
5	Glogau III	importante	melhora	melhora	regressão	-	melhora
6	Glogau IV	moderado	melhora	melhora	Regressão parcial	melhora	melhora
7	Glogau II	importante	melhora	melhora	-	melhora	melhora
8	Glogau II	discreto	melhora	-	-	-	melhora
9	Glogau III	importante	melhora	melhora	regressão	melhora	melhora
10	Glogau IV	inalterado	inalterado	inalterado	-	-	inalterado
11	Glogau IV	discreto	melhora	melhora	-	-	melhora
12	Glogau III	importante	melhora	melhora	-	melhora	melhora
13	Glogau IV	moderado	melhora	melhora	-	-	melhora

Tabela 3 - Resultados obtidos em relação à flacidez cutânea

Paciente	Fotoenvelhecimento	Resultado pós TFD-ALA	Flacidez	Sulco nasogeniano	Região mandibular	Pálpebra inferior
1	Glogau III	moderado	melhora	+	+	-
2	Glogau IV	importante	melhora	-	+	-
3	Glogau IV	discreto	melhora	-	+	-
4	Glogau III	moderado	melhora	-	+	-
5	Glogau III	importante	melhora	-	+	-
6	Glogau IV	moderado	melhora	-	+	-
7	Glogau II	importante	melhora	-	+	+
8	Glogau II	discreto	melhora	+	-	+
9	Glogau III	importante	melhora	-	+	+
10	Glogau IV	inalterado	inalterado	-	-	-
11	Glogau IV	discreto	melhora	-	+	-
12	Glogau III	importante	melhora	-	+	+
13	Glogau IV	moderado	melhora	-	-	+

Na Figura 5 observam-se as fotos dos casos estudados antes e 21 dias após a terceira sessão de TFD-ALA

Caso 1

Caso 2

Caso 3 **Caso 4**

Caso 5 **Caso 6**

Caso 7 **Caso 8**

Caso 9 **Caso 10**

Caso 11 **Caso 12**

Caso 13 **5.3. Evolução pós-procedimento e reações adversas**

A evolução pós-procedimento, neste trabalho, foi com formação de eritema com intensidade leve a importante, edema, principalmente da pálpebra inferior, ardência, prurido discreto e descamação leve a moderada (Figura 6); estas reações foram diversas nas pacientes e diferentes nas três sessões (Tabela 4). Na maioria das pacientes a duração foi cerca de 3 a 5 dias. Esses efeitos duraram no mínimo 2 dias e no máximo 10, sendo a média de 6 dias.

Duas pacientes (2 e 4) apresentaram lesões herpéticas, uma paciente (2) apresentou na primeira sessão e a outra na segunda (4); e apenas uma (7) (Figura 6) relatou fotossensibilidade prolongada 24 horas com exposição à luz natural que ocorreu na terceira aplicação (Tabela 4).

Figura 6 - Evolução pós-procedimento e reações adversas

Tabela 4 - Presença dos efeitos colaterais durante as três sessões de TFD-ALA

Caso	duração	1ª sessão	duração	2ª sessão	duração	3ª sessão
1	5	ardência; eritema; edema; descamação	3-4	eritema; edema; descamação	5	ardência; eritema; edema; descamação
2	4	eritema; descamação; herpes	3	eritema; descamação	-	sem reações
3	4	eritema	4	eritema	4	Eritema
4	4-5	ardência; edema; eritema; descamação	4	ardência; eritema; edema; herpes, descamação	4	ardência; eritema; edema; descamação
5	-	sem reações	3	ardência; prurido; eritema; descamação; edema	3	ardência; prurido; eritema; descamação; edema
6	7	descamação; ardência; edema	7	eritema; ardência	7	eritema
7	5	ardência; eritema; edema; descamação	5	ardência; eritema; edema; descamação	5-7	ardência; eritema; edema; descamação; fotossensibilidade prolongada (24hs)
8	2-3	eritema; descamação; edema; ardência	2	eritema; edema	2	eritema; edema
9	3	ardência; eritema; edema; descamação	3	eritema; descamação; ardência	3	eritema; descamação; ardência; edema
10	1	eritema	1	eritema	1	eritema
11	10	ardência; eritema	2-3	eritema	5	eritema; ardência; descamação
12	4	eritema	4	ardência; eritema; edema; descamação	4	ardência; eritema; edema; descamação
13	5	ardência; eritema; edema; descamação	3	eritema; edema; ardência; descamação	5	eritema; ardência; edema; descamação

5.4. Análise histológica

Os resultados da análise histológica, histomorfometria do colágeno e fibra elástica e imunoistoquímica do sistema imune apenas foram avaliados em 12 pacientes devido a problemas técnicos com a biópsia.

As biópsias de pele das pacientes foram analisadas sob microscópio de luz Zeiss e as características diferenciais foram documentadas por captura de imagem.

A biópsia de pele pré-tratamento apresentou, na maioria dos casos, epiderme com retificação das papilas dérmicas e queratinócitos dentro dos limites da normalidade. A derme superficial mostrou quantidade variável de elastose solar e áreas com grande redução de fibras colágenas (Figura 7). Na derme superficial as fibras colágenas mostraram espessura variável e tamanho reduzido, com distribuição desordenada (Figura 8).

Figura 7 - Corte histológico de biópsia de pele pré-tratamento (caso 2).

Observar epiderme retificada e queratinócitos sem alterações. H.E. X160

Figura 8 - Corte histológico de biópsia de pele pré-tratamento (caso 11).

Observar derme superficial com fibras colágenas desordenadas e pequenas. H.E.X690

As biópsias de pele com 24 horas após o tratamento apresentaram espongiose e edema intracelular variável. Por vezes na camada basal observou-se vacuolização. Na derme superficial observou-se edema entremeando as fibras colágenas (Figura 9).

Figura 9 - Corte histológico de biópsia de pele 24 horas pós-tratamento (caso 1). Observar epiderme com vacuolização na camada basal e dos queratinócitos. Derme superficial com edema. H.E. X690

As biópsias de pele, ao final do tratamento, mostraram epiderme ainda com retificação e queratinócitos dentro dos limites da normalidade. Camada basal preservada. A derme superficial mostrou aumento de fibras colágenas que se mostraram organizadas seguindo orientação paralela à epiderme (Figura 10).

Figura 10 - Corte histológico de biópsia de pele 21 dias pós-tratamento (caso 7). Observar epiderme retificada. Derme superficial mostra fibras colágenas ordenadas com disposição paralela à epiderme. H.E. X340

5.5. Análise do colágeno na derme

O colágeno da derme das biópsias de pele foi avaliado por histomorfometria com auxílio de Sistema Analisador de Imagem. Observamos que a derme das biópsias de pele pré-tratamento apresentou pequena quantidade de colágeno, este se apresentou em fibras desordenadas e pequenas (Figura 11). A Figura 12 mostra a marcação das fibras colágenas na coloração de Picrosirius pelo Sistema Analisador de Imagens.

Figura 11 - Corte histológico de pele pré-tratamento (caso 4). A. Fibras colágenas da derme coradas em vermelho pela coloração de picrosirius X340. B. O mesmo campo histológico observado com luz polarizada. Fibras colágenas pequenas e desordenadas. Picrosirius X340.

Figura 12 - Corte histológico de pele pré-tratamento (caso 7). A. Fibras colágenas da derme coradas em vermelho pela coloração de Picrosirius X340. B. O mesmo campo histológico com marcação das fibras colágenas pelo Sistema Analisador de Imagens. X340.

Foram analisadas as biópsias de pele pré, 24 horas e pós-tratamento. A média de fração de área de colágeno da derme das biópsias de pele pré, 24 horas e pós-tratamento foi respectivamente de $22,8\% \pm 6,22\%$; $18,8\% \pm 4,13\%$; $38,3\% \pm 2,65\%$. A Tabela 5 mostra os valores da fração de área de colágeno dos casos estudados. A Tabela 6 mostra a média, desvio padrão, valores máximo e mínimo e mediana da fração de área de colágeno das biópsias de pele.

Tabela 5 - Valores individuais da fração de área de colágeno (%) na derme das biópsias de pele estudadas

Casos	% Colágeno antes	% Colágeno 24hs	% Colágeno final	Ganho de Colágeno (%)
1	20,57	17,11	37,81	17,23
2	29,47	16,93	44,00	14,52
3	21,83	14,20	3,00	--
4	22,76	18,18	21,13	-1,63
5	12,83	14,65	36,60	23,77
6	16,70	14,31	35,40	18,70
7	24,59	22,52	52,94	28,35
8	19,67	19,12	42,53	22,86
9	15,33	16,74	28,30	12,97
11	32,68	23,17	47,54	14,86
12	27,70	21,53	34,48	6,78
13	29,81	27,63	40,79	10,98

Tabela 6 - Estatística descritiva da fração de área de colágeno na derme

Estatística	%Colágeno antes	% Colágeno 24hs	% Colágeno final
Média	22,8	18,8	38,3
Desvio Padrão	6,22	4,13	2,65
Máximo	32,68	27,63	52,93
Mínimo	12,83	14,20	21,12
Mediana	22,29	17,64	37,80

Para avaliar se os efeitos de um único tratamento com terapia fotodinâmica promoveram alterações no colágeno da derme em um mesmo paciente, comparamos os valores da fração de área de colágeno pré, 24 horas e pós-tratamento pelo Teste T Pareado. Comparando-se a porcentagem de colágeno pré e 24 horas pós-tratamento, verificamos haver diferença significativa, com redução da porcentagem de colágeno 24 horas pós-tratamento ($t = -3,189$ com 11 GL, $p = 0,009$).

Comparando-se a porcentagem de colágeno pré e pós-tratamento, verificamos haver aumento significativo de colágeno pós-tratamento ($t = 6,112$ com 10GL, $p < 0,001$).

Comparando-se a porcentagem de colágeno 24 horas com pós-tratamento, verificamos haver diferença significativa, com aumento de colágeno na derme pós-tratamento ($t = 7,880$ com 10 GL, $p < 0,001$).

Comparando-se os três momentos estudados de um mesmo tratamento, pré, 24horas-pós, por meio do Teste Estatístico não-paramétrico

de Kruskal-Wallis, observamos haver diferença significativa ($H= 19,106$ com 2GL, $p=<0,001$). Para melhor especificar as diferenças aplicamos o método de Dunn, que revelou diferença altamente significativa entre porcentagem de colágeno antes e pós-tratamento, com aumento de colágeno pós-tratamento ($Q=13,061$, $p<0,05$). A Figura 13 mostra os resultados em gráfico de caixas, estando representado pela mediana e os percentis 25% e 75%.

Figura 13 - Gráfico de caixas mostrando a fração de área (%) de fibras colágenas na derme de pele pré (antes), 24 horas e pós-tratamento (final)

Correlacionando-se a melhora clínica avaliada por método semi-quantitativo com o ganho de colágeno pareadamente, por meio de análise de Regressão Linear, não foi observada correlação significativa ($p=0,913$):

$$\text{Melhora/clinica} = 2,218 + (0,00353 * \% \text{melhora/colágeno})$$

$$N = 11.000; R = 0,0375; \text{Rsqr} = 0,00141; \text{Adj Rsqr} = -0,110$$

5.6. Análise das fibras elásticas na derme

A quantificação das fibras elásticas da derme das biópsias de pele foi avaliada por histomorfometria com auxílio de Sistema Analisador de Imagem. A derme das biópsias de pele pré-tratamento mostrou fibras elásticas espessas e curtas, por vezes encurvadas e desordenadas ou dispostas em agrupamentos, não havendo distribuição homogênea entre as fibras colágenas. Com o auxílio do Sistema Analisador de imagens pudemos marcar estas fibras elásticas e desse modo quantificá-las (Figura 14).

Figura 14 - Corte histológico de pele 24 horas pré-tratamento (caso 8). A. Fibras elásticas da derme coradas em negro pela coloração de Weigert-oxona. X340. B. O mesmo campo histológico com marcação das fibras elásticas pelo Sistema Analisador de Imagens. X340.

As biópsias de pele 24 horas pós-tratamento apresentaram redução de fibras elásticas devido ao edema da derme. Ao final do tratamento observamos maior quantidade de fibras elásticas, que se apresentavam mais longas e paralelas às fibras colágenas (Figura 15).

Figura 15 – Corte histológico de pele 24 horas pós-tratamento (caso 7). A. Fibras elásticas da derme coradas em negro pela coloração de Weigert-oxona. X340. B. Corte histológico de pele 21 dias pós-tratamento (caso 1). Weigert-oxona. X340.

A Tabela 7 mostra os valores individuais da fração de área de fibras elásticas dos casos estudados. A Tabela 8 mostra a média, desvio padrão, valores máximo e mínimo e mediana da fração de área de fibras elásticas das biópsias de pele estudadas.

Tabela 7 - Valores individuais da fração de área de fibras elásticas na derme das biópsias de pele estudadas

Casos	% Fibras Elásticas antes	% Fibras Elásticas 24hs	% Fibras Elásticas final	Ganho de FE (%)
1	7,76	7,03	13,66	5,89
2	5,12	2,38	5,23	0,11
3	4,08	5,30	6,34	2,26
4	8,70	4,16	14,58	5,88
5	4,66	7,93	11,63	6,98
6	13,28	9,04	17,10	3,82
7	8,36	3,91	6,67	-1,69
8	6,22	2,78	11,77	5,55
9	5,88	3,59	7,57	1,69
11	9,24	5,70	8,91	-0,33
12	6,98	7,96	14,91	7,93
13	11,89	9,66	17,81	5,92

Tabela 8 - Estatística descritiva da fração de área de fibras elásticas na derme

Estatística	%Fibras Elásticas antes	% Fibras Elásticas 24hs	% Fibras Elásticas pós-tratamento
Média	7,68	5,78	11,34
Desvio Padrão	2,82	2,49	4,35
Máximo	13,28	9,66	17,81
Mínimo	4,08	2,37	5,22
Mediana	7,37	5,50	11,70

Para avaliar os efeitos de um único tratamento com terapia fotodinâmica nas fibras elásticas da derme em um mesmo paciente, comparamos os valores da fração de área de colágeno pré, 24 horas e pós-tratamento pelo Teste T Pareado. A média da fração de área de fibras elásticas da derme das biópsias pré-24horas-pós-tratamento foi respectivamente: $7,68 \pm 2,82$; $5,78 \pm 2,49$ e $11,34 \pm 4,35$.

Comparando-se a porcentagem das fibras elásticas pré e 24horas pós-tratamento, verificamos haver diferença significativa, com redução da porcentagem das fibras elásticas 24 horas pós-tratamento ($t=-2.581$ com 11 GL, $p=0,026$).

Comparando-se a porcentagem de fibras elásticas pré e pós-tratamento pelo teste T pareado verificamos haver diferença significativa, com aumento da porcentagem de fibras elásticas ao final do tratamento ($t=4,001$ com 11GL, $p=0,002$).

Comparando-se os três momentos estudados de um mesmo tratamento, pré, 24horas-pós, através do Teste Estatístico paramétrico de Análise de Variância, observamos haver diferença significativa ($F=8,695$, $p<0,001$). Para melhor especificar as diferenças aplicamos o método de comparação múltipla de Tukey, que revelou diferença altamente significativa entre porcentagem das fibras elásticas antes e pós-tratamento, com aumento de fibras elásticas no pós-tratamento ($Q=3,82$; $p<0,05$). A Figura 16 mostra os resultados em gráfico de barras, estando representado pela média dos valores dos casos estudados.

Correlacionando-se a melhora clínica avaliada por método semi-quantitativo com o ganho de fibras elásticas pareadamente, através de análise de Regressão Linear, não foi observada correlação significativa ($p=0,983$):

$$\text{Melhora/clinica} = 2,160 + (0,00179 * \% \text{melhora/fibras elásticas})$$

$$N = 12.000; R = 0,00681; \text{Rsqr} = 0,0000464; \text{Adj Rsqr} = -0,0999$$

Figura 16 - Gráfico de barras mostrando a fração de área (%) de fibras elásticas na derme de pele pré (antes), 24 horas e ao final do tratamento

5.7. Análise das reações imunoistoquímicas

5.7.1. CD8

A análise dos cortes histológicos submetidos à reação imunoistoquímica para anti-CD8 revelou células inflamatórias

mononucleares CD8 positivas presentes ao redor de vasos e anexos na derme (Figuras 17 e 18). A avaliação morfométrica foi semi-quantitativa e os resultados individuais de cada um dos casos estudados está revelado na Tabela 9.

Figura 17 – Corte histológico de pele antes do tratamento (caso 1) submetido à reação imunoistoquímica para anti-CD8. Células inflamatórias mononucleares com reação positiva (pigmento marrom) ao redor de vaso. X340.

Figura 18 – Corte histológico de pele pós-tratamento (caso 7) submetido à reação imunoistoquímica para anti-CD8. Notar ausência de células CD8 positivas na derme. X340.

Tabela 9 - Valores individuais da intensidade de reação para CD8 nas peles estudadas

Casos	CD8 antes	CD8 24hs	CD8 final
1	1,00	0,50	1,00
2	3,00	-	0,50
3	2,00	3,00	0,50
4	2,00	3,00	-
5	0,50	0,50	0,00
7	2,00	2,00	1,00
8	1,00	2,00	0,00
9	0,00	1,00	-
11	1,00	1,00	0,00
12	2,00	-	0,50
13	2,00	3,00	0,50

Valores semi-quantitativos: 0=ausente; 0,5= ½+; 1,0=+; 2,0=++; 3,0=+++

Comparando-se os três momentos estudados de um mesmo tratamento, pré, 24horas e pós, através do Teste Estatístico não paramétrico de Análise de Variância de Kruskal-Wallis, observamos haver diferença significativa ($H= 10,185$, $p=0,006$). Para melhor especificar as diferenças, aplicamos o método de comparação múltipla de Dunn, que revelou diferença altamente significativa entre intensidade de células CD8 antes e pós-tratamento, com redução de células CD8 no pós-tratamento ($Q=2,68$; $p<0,05$). A Figura 19 mostra os resultados em gráfico de barras, estando

representado pela média dos valores dos casos estudados.

Figura 19 - Gráfico de caixas mostrando a intensidade de células CD8+ na derme de pele pré (antes), 24 horas e ao final do tratamento

5.7.2. CD4

Em relação ao anticorpo CD4, para evidenciar os linfócitos, a análise dos cortes histológicos submetidos à reação imunoistoquímica para anti-CD4 revelou células inflamatórias mononucleares CD4 positivas presentes ao redor de vasos e anexos na derme (Figuras 20 e 21). A avaliação morfométrica foi semi-quantitativa e os resultados individuais de cada um dos casos estudados estão revelados na Tabela 10.

Figura 20 – Corte histológico de pele 24 horas pós-tratamento (caso 2) submetido a imunoistoquímica para anti-CD4. Notas infiltrado inflamatório com células CD4 positivas (marrom) ao redor do folículo piloso. X340.

Figura 21 – Corte histológico de pele 21 dias os-tratamento (caso 2) submetido a imunoistoquímica para anti-CD4. Notar infiltrado inflamatório com células CD4 positivas (marrom), em menor quantidade, ao redor do folículo piloso. X340.

Tabela 10 - Valores individuais da reação imunoistoquímica para anti-CD4 nas biópsias de pele estudadas

Casos	CD4 antes	CD4 24hs	CD4. final
1	1,00	1,00	0,50
2	3,00	3,00	1,00
3	0,50	3,00	-
4	3,00	3,00	1,00
5	0,00	0,50	-
6	0,50	2,00	-
7	3,00	-	1,00
8	1,00	3,00	0,00
9	0,00	0,50	-
11	2,00	2,00	1,00
12	2,00	2,00	-
13	2,00	2,00	-

Valores semi-quantitativos: 0=ausente; 0,5= ½+; 1,0=+; 2,0=++; 3,0=+++

Comparando-se os três momentos estudados de um mesmo tratamento, pré, 24horas- pós para células CD4+ na derme, por meio do Teste Estatístico não paramétrico de Análise de Variância de Kruskal-Wallis, observamos não haver diferença significativa ($H=4,821$, $p= 0,090$).

5.7.3. CD1

Em relação ao anticorpo CD1, para evidenciar as células de Langhans, verificamos que 24 horas após e ao final do tratamento com terapia fotodinâmica as células de Langhans estão presentes na epiderme (Figuras 22 e 23).

Figura 22 – Corte histológico de pele 24 horas pós-tratamento (caso 2) submetido a imunoistoquímica para anti-CD1. Células de Langerhans marcadas em marrom na epiderme e folículo piloso. X340.

Figura 23 – Corte histológico de pele 21 dias pós-tratamento (caso 4) submetido a imunoistoquímica para anto-CD1. Células de Langerhans marcadas em marrom na epiderme e folículo piloso. X340.

A avaliação morfométrica foi quantitativa avaliando o número de células CD1+ por área de epiderme. Os resultados individuais de cada um dos casos estudados estão revelados na Tabela 11. A média e desvio padrão foram: CD1 antes = $0,000458 \pm 0,000151$; CD1 24hs = $0,000429 \pm 0,000255$; CD1final = $0,000934 \pm 0,000810$.

Comparando-se os três momentos estudados de um mesmo tratamento, pré – 24horas- pós para células CD1+ na epiderme, através do Teste Estatístico não paramétrico de Análise de Variância de Kruskal-Wallis, observamos não haver diferença significativa ($H=1,977$, $p=0,372$).

Tabela 11 - Valores individuais da reação imunoistoquímica para anti-CD1 nas biópsias de pele estudadas

Casos	CD1 antes (μm^2)	CD1 24hs (μm^2)	CD1 Final (μm^2)
1	7,27e-4	8,97e-4	2,35e-4
2	5,70e-4		1,36e-4
3	4,31e-4	2,18e-4	
4	3,08e-4	4,72e-4	4,13e-4
5	3,08e-4	2,66e-4	2,41e-4
6	2,72e-4	2,79e-4	
7	4,87e-4	2,52e-4	4,97e-4
8	6,54e-4	3,24e-4	
9	4,51e-4	5,38e-4	3,80e-4
11	5,19e-4	4,54e-4	
12	2,60e-4	8,77e-4	1,86e-4
13	5,14e-4	1,46e-4	3,78e-4

Valores=número de células CD1 por área (μm^2) da epiderme

5.7.4. Interleucina 4 (IL4)

Em relação ao anticorpo IL4, para evidenciar a intensidade de Interleucina 4, verificamos que o tratamento com terapia fotodinâmica torna presente a IL4 na epiderme (Figura 24) e na derme (Figura 25).

Figura 24 – Corte histológico de pele antes do tratamento (caso 4) submetido à reação imunoistoquímica para anti-IL4. Notar ausência de reação positiva na epiderme e derme. X340.

Figura 25 – Corte histológico de pele ao final do tratamento (caso 4) submetido à reação imunoistoquímica para anti-IL4. Notar reação positiva (coloração marrom) na epiderme e nas células inflamatórias ao redor de vasos da derme . X340.

A avaliação morfométrica foi semi-quantitativa avaliando a intensidade da reação imunoistoquímica na epiderme e derme separadamente. Os resultados individuais de cada um dos casos estudados estão revelados na Tabela 12 para a epiderme e Tabela 13 para a derme.

Tabela 12 - Valores individuais da reação imunoistoquímica para anti-IL4 nas biópsias de pele estudadas. Avaliação da epiderme

Casos	IL4 epiderme antes	IL4 epiderme 24hs	IL4 epiderme final
1E	0,00	1,00	
2E	0,00	0,00	
4E	0,00	0,00	1,00
5E	0,00	1,00	1,00
6E	0,00	0,00	1,00
7E	0,00	1,00	2,00
8E	0,00	1,00	
9E	0,00	0,00	2,00
11E	0,00	1,00	
12E	0,00	1,00	2,00
13E	1,00		1,00

Valores semi-quantitativos: 0=ausente; 0,5= ½+; 1,0=+; 2,0=++; 3,0=+++

Tabela 13 - Valores individuais da reação imunoistoquímica para anti-IL4 nas biópsias de pele estudadas. Avaliação da derme

Casos	IL4 derme antes	IL4 derme 24hs	IL4 derme final
1D	0,00	0,00	
2D	0,00	0,00	
4D	0,00	1,00	2,00
5D	0,00	1,00	1,00
6D	0,00	0,00	0,00
7D	0,00	1,00	3,00
8D	0,00	0,00	
9D	0,00	0,00	1,00
11D		0,00	
12D	0,00	1,00	2,00
13D	0,00		1,00

Valores semi-quantitativos: 0=ausente; 0,5= ½+; 1,0=+; 2,0=++; 3,0=+++

Comparando-se a intensidade de IL4 na epiderme nos três momentos estudados de um mesmo tratamento, pré, 24horas-pós, através do Teste Estatístico não paramétrico de Análise de Variância de Kruskal-Wallis, observamos haver diferença significativa ($H=16,090$, $p<0,001$). Para melhor especificar as diferenças, aplicamos o método de comparação múltipla de Dunn, que revelou diferença altamente significativa entre intensidade de IL4

na epiderme antes e pós-tratamento, com aumento de IL4 no pós-tratamento na epiderme ($Q=4,00$; $p<0,05$). A Figura 26 mostra os resultados em gráfico de barras, estando representado pela média dos valores dos casos estudados.

Figura 26 - Gráfico de caixas mostrando a intensidade de IL4 na epiderme de pele pré (antes), 24 horas e ao final do tratamento

Comparando-se a intensidade de IL4 na derme nos três momentos estudados de um mesmo tratamento, pré, 24horas-pós, através do Teste Estatístico não paramétrico de Análise de Variância de Kruskal-Wallis, observamos haver diferença significativa ($H=13,77$, $p=0,001$). Para melhor especificar as diferenças, aplicamos o método de comparação múltipla de Dunn, que revelou diferença altamente significativa entre intensidade de IL4 na derme antes e pós-tratamento, com aumento de IL4 no pós-tratamento ($Q=3,71$; $p<0,05$). A Figura 27 mostra os resultados em gráfico de caixas, estando representado pela média dos valores dos casos estudados

Figura 27 - Gráfico de caixas mostrando a intensidade de IL4 na derme de pele pré (antes), 24 horas e ao final do tratamento

5.7.5. $\text{TNF}\alpha$

Em relação ao anticorpo $\text{TNF}\alpha$, verificamos que o tratamento com terapia fotodinâmica reduz a intensidade de $\text{TNF}\alpha$ na epiderme (Figura 28) e aumenta a intensidade na derme (Figura 29).

Figura 28 – Corte histológico de pele antes do tratamento (caso 4) submetido à reação imunoistoquímica para anti-TNF. Notar reação positiva (coloração marrom) na epiderme e ausência na derme . X340.

Figura 29 – Corte histológico de pele ao final do tratamento (caso 4) submetido à reação imunoistoquímica para anti-TNF. Notar reação positiva (coloração marrom) na derme e negativa na epiderme . X340.

A avaliação morfométrica foi semi-quantitativa avaliando a intensidade da reação imunoistoquímica na epiderme e derme separadamente. Os resultados individuais de cada um dos casos estudados estão revelados na Tabela 14 para a epiderme e Tabela 15 para a derme.

Tabela 14 - Valores individuais da reação imunoistoquímica para TNF α nas biópsias de pele estudadas. Avaliação da epiderme

Casos	TNF epiderme antes	TNF epiderme 24hs	TNF epiderme final
1E	3,00	3,00	0,00
2E	2,00	3,00	
4E	3,00	1,00	0,00
5E	2,00	0,00	0,00
6E	3,00	0,00	0,00
7E	3,00	0,00	0,00
9E	1,00	0,00	0,00
11E	3,00	3,00	
12E		1,00	0,00
13E		0,00	1,00

Valores semi-quantitativos: 0=ausente; 0,5= ½+; 1,0=+; 2,0=++; 3,0=+++

Tabela 15 - Valores individuais da reação imunoistoquímica para TNF nas biópsias de pele estudadas. Avaliação da derme

Casos	TNF derme antes	TNF derme 24hs	TNF derme final
1D	0,00	0,00	0,00
2D	0,00	1,00	
4D	0,00	0,00	1,00
5D	0,00	1,00	1,00
6D	0,00	1,00	1,00
7D	0,00	1,00	2,00
9D	1,00	1,00	2,00
11D	0,00	1,00	
12D		1,00	2,00
13D		1,00	1,00

Valores semi-quantitativos: 0=ausente; 0,5= ½+; 1,0=+; 2,0=++; 3,0=+++

Comparando-se a intensidade de TNF α na epiderme nos três momentos estudados de um mesmo tratamento, pré, 24horas- pós, através do Teste Estatístico não paramétrico de Análise de Variância de Kruskal-Wallis, observamos haver diferença significativa ($H=12,895$, $p=0,002$). Para melhor especificar as diferenças, aplicamos o método de comparação múltipla de Dunn, que revelou diferença altamente significativa entre intensidade de TNF α na epiderme antes e pós-tratamento, com redução no pós-tratamento ($Q=3,57$; $p<0,05$). A Figura 30 mostra os resultados em

gráfico de caixas, estando representado pela média dos valores dos casos estudados.

Figura 30 - Gráfico de caixas mostrando a intensidade de $TNF\alpha$ na epiderme de pele pré (antes), 24 horas e ao final do tratamento

Comparando-se a intensidade de $TNF\alpha$ na epiderme nos três momentos estudados de um mesmo tratamento, pré, 24horas- pós, através do Teste Estatístico não paramétrico de Análise de Variância de Kruskal-

Wallis, observamos haver diferença significativa ($H=11,78$, $p=0,003$). Para melhor especificar as diferenças, aplicamos o método de comparação múltipla de Dunn, que revelou diferença altamente significativa entre intensidade de $TNF\alpha$ na derme antes e pós-tratamento, com aumento de $TNF\alpha$ no pós-tratamento ($Q=3,61$; $p<0,05$). A Figura 31 mostra os resultados em gráfico de caixas, estando representado pela média dos valores dos casos estudados.

Figura 31 - Gráfico de caixas mostrando a intensidade de $TNF\alpha$ na derme de pele pré (antes), 24 horas e ao final do tratamento

5.7.6. IFN γ

Em relação ao anticorpo IFN γ , verificamos não haver reação positiva tanto na derme como na epiderme nos três momentos de tratamento estudados (Figura 32).

Figura 32 - Corte histológico de pele (caso 5). Reação Imunoistoquímica para anti-IFN. X340. Notar ausência de reação positiva na pele antes (A) e após o tratamento (B)

5.8. Infiltrado inflamatório na derme

A análise dos cortes histológicos submetidos à coloração de H.E. revelou células inflamatórias mononucleares presentes ao redor de vasos e anexos na derme. A avaliação morfométrica foi semi-quantitativa e os resultados individuais de cada um dos casos estudados estão revelados na Tabela 16.

Tabela 16 - Valores individuais da intensidade de infiltrado inflamatório nas biópsias de pele estudadas

Casos	Infiltrado Inflamatório	Infiltrado Inflamatório	Infiltrado Inflamatório
	antes	24hs	final
1	1,00	1,00	
2	2,00	2,00	
4	2,00	3,00	1,00
5	0,00	0,00	1,00
6	1,00	1,00	1,00
7	1,00	2,00	1,00
8	1,00	1,00	
9	1,00	1,00	1,00
11	1,00	1,00	
12	1,00	2,00	2,00
13	1,00		1,00

Valores semi-quantitativos: 0=ausente; 0,5= ½+; 1,0=+; 2,0=++; 3,0=+++

Comparando-se a intensidade de infiltrado inflamatório na derme nos três momentos estudados de um mesmo tratamento, pré, 24horas- pós, por meio do Teste Estatístico não paramétrico de Análise de Variância de Kruskal-Wallis, observamos não haver diferença significativa ($H=1,11$, $p=0,572$).

6. Discussão

A TFD atualmente é considerada uma modalidade terapêutica com ótimos resultados no tratamento do fotoenvelhecimento, pois apresenta resposta satisfatória no resultado estético, principalmente na melhora da coloração, textura, rugas e no tratamento e prevenção das lesões pré-malignas que geralmente acompanham a pele fotoenvelhecida.^{2,134}.

Resultados promissores com TFD-ALA no fotoenvelhecimento são descritos na literatura inicialmente por Ruiz-Rodriguez et al.³⁴⁷ no tratamento da queratose actínica. Após esta data, outros autores relatam a eficácia da TFD-ALA no tratamento do fotoenvelhecimento moderado acompanhado de múltiplas queratoses actínicas. Os autores obtêm clareamento das lesões, melhora na textura, pigmentação e telangiectasias, mas mínima alteração nas rugas finas.^{2,6,332,333,393}.

Este estudo apresentou 13 pacientes do sexo feminino, com fototipo de I a IV e grau de envelhecimento segundo Glogau²⁸, II (leve), III (moderado) e IV (importante). Não havia paciente com grau I de fotoenvelhecimento na amostra. Doze pacientes apresentaram melhora clínica principalmente da coloração, textura e flacidez da pele (92,30%) e mais discretamente das rugas superficiais (38,46%). As rugas mais profundas não apresentaram melhora.

A melhora do fotoenvelhecimento nesta amostra foi semelhante aos dados da literatura descritos principalmente por Ruiz-Rodriguez³⁴⁷, Alam³⁹³, Dover³³³ e Alster³³² que demonstram melhora do fotoenvelhecimento em seus trabalhos com a terapia fotodinâmica. Nestor et al.³²⁷ referem um

resultado excelente da TFD-ALA no rejuvenescimento com uma porcentagem, segundo a avaliação dos investigadores, de 92%, e dos pacientes 94%.

A melhora da coloração e textura, obtida neste trabalho (92,30%), superou um pouco os dados obtidos por outros autores; Goldman apud Gold⁶ demonstra melhora de 72% na textura e 62.5% na pigmentação da pele, enquanto Avram e Goldman apud Alam³⁹³, 48% nas anormalidades pigmentares e 25% na textura da pele, mas todos concordam com um resultado inferior nas rugas superficiais. Em relação à flacidez não há dados concretos na literatura, e apesar da melhora moderada ou discreta, essa ocorreu em 92,30% das pacientes sendo 41,66% na pálpebra inferior, 16,66% no sulco nasogeniano e 83,33% na região mandibular com conseqüente melhora do contorno facial. Essa observação se torna importante, pois não foi um dado isolado, não era objetivo do tratamento e comparado com outros tratamentos dificilmente obtemos, com um tratamento não invasivo, um resultado na flacidez da pele, principalmente na pálpebra inferior.

As lesões de melanose solar tiveram um clareamento, mas parcial (91,66%) e o mesmo ocorreu com as efélides presentes em duas (15,38%) pacientes. Melasma também estava presente em quatro (30,76%) pacientes e permaneceu inalterado.

O papel fotoprotetor da melanina resulta da sua capacidade de absorver radiação na região do espectro de UV, luz visível e infravermelha.

Torezan¹³¹, em tese de mestrado apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, relata um caso de fibroepitelioma de Pinkus, uma variante do carcinoma basocelular, que apresentou regressão parcial com TFD-ALA após três sessões e explica este fato pela menor ação da mesma em lesões pigmentadas, uma vez que a melanina compete pela absorção da luz em 630 nm.

A fotoproteção causada pela melanina pode explicar o insucesso do tratamento no clareamento das melanoses, efélides e melasma e também em relação à melhora discreta apresentada por duas pacientes, uma fototipo IV com presença de efélides e a outra apesar de fototipo III com presença de melasma e, também, ao quadro inalterado apresentado por uma paciente com alterações poiquilodérmicas e melasma.

Quatro pacientes (30,76%) apresentavam lesões com diagnóstico clínico de queratose actínica e após 21 dias da terceira sessão, 75% das pacientes apresentavam regressão completa das lesões.

A porcentagem de melhora da queratose actínica, no tratamento do fotoenvelhecimento, descrita na literatura varia entre 75-90%, sendo mais rápida na face e couro cabeludo e mais lenta nas extremidades e no tronco.^{6, 347}. Em 2001, durante um consenso sobre queratose actínica, é discutido que este tipo de lesão é um marcador no fotoenvelhecimento pelo UVB e apresenta alterações no DNA que estão relacionadas com o carcinoma espinocelular, por isso, é estabelecido que estas lesões são um tipo de carcinoma *in situ* e que necessitam de tratamento para a prevenção

do câncer de pele¹³². Desta maneira, um tratamento que vise não apenas a melhora do fotoenvelhecimento global, mas também das queratoses actínicas é importante.

A substância utilizada neste estudo foi o ácido 5 delta-aminolevulínico na concentração de 20% que foi aplicado de forma homogênea (apenas uma camada) com o bastão aplicador Levulan® Kerastick™. Calin et al.⁴⁰⁸ definem que o acúmulo de PpIX depende da concentração do ALA. Utilizamos a concentração de 20% conforme o modelo de Kennedy¹²³, que utiliza esta mesma concentração de ALA em emulsão cremosa óleo/água. Trabalhos na literatura utilizam concentrações de 10 a 30% com bons resultados no tratamento de tumores e 3% na esclerodermia^{240,241,303}.

No tratamento do fotoenvelhecimento a concentração mais utilizada nos trabalhos é 20%^{137,332,347}.

Em relação ao período de exposição à substância, este é variável na literatura. No tratamento de tumores há relatos de 3 a 20 horas, sendo que a maioria dos autores utiliza entre 6 a 12 horas¹³⁰. O protocolo original sugere de 14 a 18 horas o tempo de contato do ALA com a região a ser tratada. O tempo estimado para que o ALA se difunda 2,5-3,0 mm é 3 15 horas³²⁷.

Calin et al.⁴⁰⁸ em estudo com diferentes tempos de exposição mostram uma maior fluorescência após 6 horas quando comparado com 5 e 4 horas, mas depois deste tempo, as bordas de demarcação da área tumoral, se tornam difusas e decresce a fluorescência tumoral. Lang et al.³⁹⁹ relatam produção de PpIX nos tumores epiteliais 2 a 4 horas após a

exposição ao ALA. van der Veen et al.²²⁵, relatam que na aplicação tópica a fluorescência máxima é 4 vezes maior no tumor que na pele normal. Isso pode ser consequência de uma pele alterada facilitando a penetração do ALA na queratina anormal; além disso, a pele com exposição crônica ao sol e queratoses actínicas apresenta maior penetração do ALA. No rejuvenescimento o tempo de exposição varia de 30 minutos a 3 horas, sendo denominado de “short contact” o período correspondente à uma hora de exposição ao ALA.^{6,327,333,393,34}.

O tempo de exposição deste trabalho foi 2 horas, com oclusão com papel alumínio para evitar fotoativação precoce, tempo suficiente para produção de PpIX. A pele fotoenvelhecida permite, segundo van der Veen et al.²²⁵, uma eficiente penetração do ALA com 2 horas de exposição. O mecanismo de oclusão com papel alumínio pode aumentar a temperatura local, aumentando a penetração do ALA.

Em relação ao número de sessões e o intervalo entre elas, também é variável na literatura. Nos tumores o importante é a espessura das lesões, pois se preconiza que lesões até 2 mm respondem melhor ao tratamento³²⁶ e por isso carcinomas basocelulares nodulares, esclerodermiformes ou carcinomas espinocelulares invasivos não são indicações para TFD^{93,117,125,131,154,273,314,317,320}. Lesões superficiais podem se beneficiar apenas com 1 sessão, enquanto lesões nodulares precisam de um maior número¹³¹. Por outro lado tumores maiores de 1 cm podem responder a TFD devido à ativação concomitante do sistema imune local¹⁵². As lesões de

queratose actínica localizadas em região acral apresentam menor resposta com apenas 1 sessão devido a maior espessura do tecido⁴⁰⁰.

Em painel de perguntas e respostas publicado no Australian Journal of Dermatology, 2005, verifica-se que para o carcinoma basocelular, a indicação de apenas 1 sessão, não é recomendada, e que o intervalo entre elas depende do processo inflamatório residual para que o paciente não apresente dor. Este mesmo artigo também sugere que no carcinoma basocelular e nas doenças inflamatórias já é preconizado a boa penetração da luz vermelha e que acredita-se não ser necessário preparações prévias e que o tempo entre as aplicações pode ser 2 a 4 semanas, período para que a inflamação ceda.

No fotoenvelhecimento o intervalo entre as sessões é variado, relata-se um período de 2 a 6 semanas entre as aplicações sendo ideal o intervalo de 2-4 semanas^{327,332,333,393}.

No nosso estudo, foi realizado um número de 3 aplicações com intervalo de 15 dias entre as sessões, concordando com o debate publicado pela revista Australian Journal of Dermatology, 2005 e com o consenso do uso de TFD na dermatologia³²⁷.

Na literatura, as fontes de luz utilizadas no fotoenvelhecimento, são: LED com pico de absorção em 630nm, a LIP, pulsed dye laser (PDL) com 595nm e a luz azul (410nm).^{6,137,193,332,333,347,393}. A indução de hipertermia é relatada na literatura apenas no tratamento de tumores¹³¹.

Foi utilizado um aparelho de terapia fotodinâmica (Multi Waves -Leds

Light Therapy; Industra-Brasil), com luz vermelha e pico de absorção de 630 nm que oferece segundo a literatura, uma melhor penetração no tecido e por isso é o mais utilizado^{133,400}. A profundidade de penetração é menor que 1 mm para 410 nm, 0,5-2 mm para 514 nm e 1-6 mm para 630 nm, com uma média de 3 mm que é o limite de espessura dos tumores que podem ser tratados pela TFD, caso contrário, as lesões mais espessas necessitam de preparo prévio^{117,154,327}.

A maioria dos trabalhos no tratamento do fotoenvelhecimento associam a TFD a luz azul, LIP ou PDL. O único relato de associação com LED de 630 nm é realizado com ALA 5%³⁹⁵; não há relatos do uso de ALA 20% com luz vermelha de 630 nm, talvez pela maior profundidade alcançada por esta.

Os efeitos colaterais mais comuns neste trabalho foram eritema leve a intenso, edema, principalmente da pálpebra inferior, ardência, prurido discreto e descamação leve a moderada. Estes efeitos duraram no mínimo dois dias e no máximo 10, sendo que na maioria das pacientes a duração foi cerca de 3 a 5 dias. Avram e Goldman apud Alam e Dover³⁹³ também relatam um tempo de duração dos efeitos colaterais; eritema e edema, cerca de 3 a 5 dias. A intensidade do eritema, segundo Tosca et al.³²⁵, no tratamento do carcinoma basocelular demonstra que pacientes com maior eritema, apresentam melhor resposta na erradicação do tumor. Key²⁸² na associação da TFD-ALA com PDL, afirma que a ativação do PpIX é proporcional ao eritema formado. Neste trabalho não pudemos fazer uma

correlação entre o eritema formado e a melhora do fotoenvelhecimento, pois esta reação foi muito diversa nas três sessões.

Em relação a fotossensibilidade prolongada apenas uma paciente (7,69%) apresentou este efeito colateral, que ocorria após o procedimento com exposição à luz natural por um período de 24 horas.

Keneddy et al.¹²⁴, descreve uma reação “histamina-like” durante a fotoativação que é descrita como “coçar”, “arder” ou “queimar” minutos após a fotoexposição e pode durar com menor intensidade até 24 horas. O autor descreve as lesões com edema podendo apresentar um leve exsudato. Neste trabalho a maioria das pacientes relatou uma sensação de queimação suportável logo após a exposição e que durou cerca de 24 a 48 horas, mas acompanhada de edema importante; este edema não apresentava uma relação com a queixa clínica de dor ou ardor da paciente. O edema foi mais pronunciado na pálpebra inferior e durou cerca de três dias.

O uso de anestésicos tópicos não é recomendado pela possibilidade de interação com o agente fotossensibilizante, principalmente levando a alteração no pH (o pH alto do anestésico pode inativar o agente fotossensibilizante). Há relato na literatura da diminuição da dor com o uso do MAL ao invés do ALA¹¹⁹.

Na literatura estão descritos os seguintes efeitos colaterais: eritema, edema, descamação, sensação de queimação/ardência, prurido, formação de crostas, fotossensibilidade local, erupção acneiforme, hiperpigmentação pós-inflamatória. O ALA não induz o acúmulo de porfiria sistêmica^{6,303,332,333}.

Infecções bacterianas são incomuns. As infecções virais ocorrem em indivíduos que apresentam suscetibilidade³⁹³. Duas pacientes (15,38%) apresentaram quadro clínico compatível com herpes simples; uma apresentou lesão papulo-vesiculosa, eritematosa, dolorosa na região do mento após três dias do procedimento e a outra, lesões vesiculosas, orais na segunda sessão. Nenhuma paciente fez profilaxia antiviral prévia a terapia.

Não ocorreu alteração em relação a pilificação local nas pacientes, Szeimies et al.¹¹⁹, referem que alopecia definitiva não é observada na maioria dos pacientes tratados.

As contra indicações da TFD são porfirias e reações alérgicas as substâncias fotossensibilizantes¹¹⁹ e que já haviam sido descartadas no momento de inclusão da paciente no estudo e acompanhadas durante a realização do mesmo.

Não foram observadas lesões cicatriciais, hiperpigmentações ou hipopigmentações. Gilson et al.²⁹⁰, estuda a incidência de resposta completa do tumor e a necrose de pele e percebe que o diâmetro da escara formada é proporcional ao diâmetro da área total irradiada; aumentando-se a dose da luz e da substância fotossensibilizante há um aumento da chance de formação de escara e do tempo de cicatrização do tumor. O mecanismo de reparação deste dano da pele é interessante, porque o dano inicial parece severo, mas causa mínimo desconforto e sempre cicatriza sem sequelas. Isto pode explicar o eritema intenso e edema importante apresentado por

algumas pacientes, mas com poucas queixas de ardência e cicatrização sem seqüelas.

Em relação, a fibrose formada após a TFD, Fink-Puches et al.²³³, em estudo retrospectivo com recidivas de carcinoma basocelular e espinocelular superficiais, verifica, que a profundidade da fibrose encontrada na histopatologia do tumor, é maior que a invasão inicial do mesmo, demonstrando que apesar da penetração insuficiente do ALA, a fibrose formada foi significativa.

Na histologia, após 5 a 15 minutos da TFD, ocorre vasodilatação e processo inflamatório agudo com neutrófilos, eosinófilos e mastócitos perivascular, mas o tumor não apresenta alteração^{1,325}. Um a três dias após ocorre degeneração vacuolar da basal com focos de necrose da epiderme, processo inflamatório agudo com neutrófilos perivascular e dispersos e invasão de neutrófilos na epiderme. A vasodilatação e edema na derme são proeminentes. Infiltrado neutrofílico agudo pode ser visto nas glândulas sebáceas e estas podem apresentar degeneração de seus núcleos. Neste período o tumor ainda não apresenta alterações. No terceiro dia, ocorre degeneração hidrópica da camada basal, edema intracelular dos queratinócitos e os núcleos se tornam hipercromáticos. O infiltrado inflamatório começa a apresentar características agudas e subagudas. No quarto dia, a necrose dos queratinócitos começa a resultar em degeneração reticular; tem início a necrose celular tumoral e inicia-se a regeneração das glândulas sebáceas. No sétimo dia ocorre a regeneração da pele que está

completa 4-6 semanas pós TFD-ALA. Colorações específicas mostram reparação da zona subepidérmica com fibras colágenas paralelas a epiderme, diminuindo a massa elastótica pré-existente³²⁵.

A evolução das alterações histológicas neste trabalho foram iguais às relatadas na literatura, onde se observou, em 24 horas, edema e vacuolização da camada basal e após 21 dias completa reestruturação da epiderme e neoformação de colágeno, mas a alteração do infiltrado inflamatório não foi significativa. O processo inflamatório agudo que se forma após a TFD, não foi observado neste trabalho sugerindo que este talvez ocorra com maior frequência no tratamento de tumores, onde o tempo de exposição ao ALA é maior e também na administração sistêmica, sendo a tópica responsável pela destruição através da formação do oxigênio “singlet”.

Nas colorações específicas, picrosirius para o colágeno e Weigert-oxona para o tecido elástico, o edema, juntamente com a desorganização das fibras que ocorreram com o procedimento, podem levar a diminuição da porcentagem (fração/área) de colágeno e fibras elásticas na avaliação após 24 horas, mas as biópsias de pele 21 dias pós-tratamento, mostraram aumento de colágeno na derme superficial e ordenação paralela destas fibras em relação à epiderme e maior quantidade de fibras elásticas que estavam mais longas e paralelas às fibras colágenas. Este aumento, posterior pode ser explicado pelo tempo necessário para o estímulo da reorganização das fibras elásticas e síntese do colágeno.

A liberação de enzimas da família das metaloproteinases matriciais é importante na remodelação da matriz extracelular e essencial no processo de cicatrização⁴². Esta liberação é mediada pela resposta imune. Neste processo, a indução da colagenase intersticial, responsável pela degradação do colágeno tipo I, II e III, ocorre através da IL-1, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento derivado da plaqueta, TNF- α e inibição pelo TGF- β ⁴².

Karrer et al.¹⁶, em estudo experimental, evidencia que o ALA e a luz de 630 nm induzem ao aumento da produção de metaloproteinases da matriz-1 (MMP1) e metaloproteinases da matriz-3 (MMP3) nos fibroblastos dérmicos humanos cultivados com redução da expressão do RNAm do colágeno tipo I. As células humanas normais são comparadas com as células de esclerodermia e não há diferença significativa entre elas. Os fibroblastos de esclerodermia exibem níveis 2 vezes mais baixos de MMP1 e MMP3 quando comparado aos normais. Este estudo demonstra que a TFD-ALA pode diminuir o colágeno tipo 1, enquanto o RNAm do colágeno tipo 3 permanece inalterado quantitativamente; ao mesmo tempo há um aumento do MMP1 e MMP3 o que leva aos efeitos anti-escleróticos. Contudo, estes efeitos são transitórios, e por isso são necessárias várias aplicações; estas dosagens foram feitas 24 a 48 horas após a aplicação; isto pode ajudar a explicar a diminuição do colágeno no nosso trabalho 24 após a TFD. Como a TFD é capaz de modular MMP1 e MMP3 por mecanismos diretos e indiretos e os queratinocitos são os alvos na TFD (ALA penetra nos tecidos

queratinizados e pouco nos mesenquimais), o autor propõem que a indução da degradação do colágeno pelas metaloproteinases é via queratinócito, pois as citocinas são responsáveis pelos efeitos anti-escleróticos da TFD-ALA “in vivo”¹⁷. Marmur et al.³¹¹ em estudo comparativo entre ALA-LIP e LIP, mostra que o primeiro apresenta uma maior porcentagem na síntese de colágeno que o segundo, principalmente no colágeno tipo I.

Ambos, os efeitos biológicos da TFD e da irradiação UVA, são mediados pelo oxigênio “singlet”, mas a terapia com UVA produz um dano ao DNA, enquanto que TFD-ALA apresenta como alvo a mitocôndria sugerindo que o DNA não é o alvo para a citotoxicidade e, por isso, não apresenta potencial carcinogênico¹⁶. Stender et al.³⁶⁴ e Sharfaei³⁴⁰ mostram que TFD-ALA possui um potencial anticarcinogênico através do retardo da fotocarcinogênese em ratos. Esse fato colabora para demonstrar que o uso da TFD no tratamento do fotoenvelhecimento tem resultados não apenas estéticos, mas também na prevenção do câncer de pele.

Na avaliação do sistema imunológico, as biópsias foram realizadas 24 horas após a primeira sessão para traçar a migração das células^{54,58,63}. O processo do reconhecimento e ativação do sistema leva 20 a 30 dias e por isso a biópsia de controle da terceira sessão foi realizada com 21 dias, para verificar se ocorria alguma alteração⁴⁰¹.

Os marcadores imunológicos foram escolhidos com o intuito de se definir um perfil de imunidade celular e humoral neste tratamento.

Neste estudo, duas pacientes (15,38%), apresentaram herpes simples, estas não relataram antecedentes pessoais para a doença. A ativação do vírus herpes simples (VHS) é um efeito colateral comum principalmente nas técnicas ablativas^{327,402,403}. A profilaxia não foi realizada, pois a TFD, não é uma técnica invasiva e que raramente complica com o quadro herpético; segundo Nestor et al.³²⁷ a profilaxia somente é necessária antes da TFD em casos especiais como antecedente positivo ao herpes.

O estudo da morfologia e do comportamento das células de Langerhans após trauma térmico, exposição ao UV e trauma com fitas adesivas, mostra que estas desaparecem em 2 dias e retornam entre 11 e 15 dias^{80,404-406}.

Quanto mais ablativo o procedimento, maior é a eliminação das células, por isso Meski⁴⁰³ encontra diminuição das células de Langerhans mesmo após 30 dias da reepitelização do procedimento (quimiodermoabrasão) e Salgado⁹⁰, no estudo com laser de dióxido de carbono (CO₂) na pele também encontra diminuição das células de Langerhans após 15 dias e normalização após 90 dias. Yamamoto et al.⁴⁰⁷, evidenciam diminuição das células após esfoliação com ácido tricloroacético, glicólico e fenol. Tamura⁶⁷ em estudo com toxina botulinica, que não é um método ablativo, não encontra alterações das células de Langerhans.

Neste trabalho, o número de CD1 não apresentou alterações significantes, embora a maioria das pacientes apresentou uma diminuição, este resultado concorda com os trabalhos citados na literatura, onde a

alteração destas células ocorre conforme o grau de ablação do procedimento.

Meski⁴⁰³ no tratamento das ritides periorais com quimiodermoabrasão, Salgado⁹⁰ com uso do laser de CO₂ na pele não fotoexposta e Tamura⁶⁷ com uso da toxina botulinica na hiperhidrose não encontram alterações significantes na quantidade de linfócitos CD4 e CD8.

Os resultados obtidos com os autores citados acima, não concordam com os dados obtidos neste trabalho, onde a contagem de CD4 e CD8 estavam diminuídas.

A diminuição da contagem de CD8 após 24 horas da primeira sessão não foi significativa, mas se tornou significativa com 21 dias da terceira sessão. Esta redução não é obtida por Abdel-Hadyet al.¹⁶⁵, que encontra um aumento do CD8 nas áreas tratadas que apresentam uma resposta positiva em relação às áreas tratadas com resultado negativo. Por outro lado, Hryhorenko et al.^{162,163} relatam que a PpIX se acumula nos linfócitos ativados e Gad (2001) apud Bissonete¹⁶⁶ relatam que após a TFD ocorre a apoptose destas células. Grebenova et al.¹⁶⁴ relatam diminuição de 75% nos linfócitos após a TFD. A diminuição da contagem das células CD4 neste trabalho não foi significativa.

Esta diminuição da contagem das células CD4 e CD8 sugere uma apoptose dos linfócitos após a TFD, o que também é relatado com os trabalhos de Grebenova¹⁶⁴ e Bissonete¹⁶⁶ mas estes trabalhos se referem ao tratamento de tumores e não do fotoenvelhecimento, sobre o qual não há

relatos de alterações do CD4 e CD8 na literatura. O aumento do CD8 relatado por Abdel-Hady¹⁶⁵, pode estar relacionado ao controle da resposta celular presente na neoplasia intraepitelial cervical e quando o tratamento apresenta uma boa resposta, o tumor perde este controle.

Tamura⁶⁷ não encontra alterações significantes com os marcadores TNF α e IFN γ no tratamento da hiperhidrose axilar com toxina botulinica.

O TNF α é um importante mediador de inflamação cutânea e é expresso em todos os processos inflamatórios da pele. Está presente em dois tipos de reações principalmente, efeitos pró-inflamatórios e indução da morte por apoptose. Os queratinócitos e fibroblastos dérmicos sintetizam grande quantidade de TNF α . Neste trabalho o resultado da expressão de TNF α mostrou diminuição significativa desta citocina na epiderme e aumento também significativo na derme. O aumento dérmico poderia justificar o estímulo dos fibroblastos, o que é evidenciado pelo aumento da fração de colágeno e fibra elástica, mas a sua diminuição na epiderme apenas pode ser justificada pelo aumento da IL4 na epiderme. O aumento da IL4 na derme pode não ter sido suficiente para inibição dos fibroblastos, já que não é a ação desta IL na derme, mas sim na epiderme. A apoptose das células CD4 e CD8 também pode estar relacionada ao aumento do TNF α na derme

A ação da IL4 é no crescimento e diferenciação para as células Th2. Inibe a IL1, IL6 e TNF α , além da expressão do ICAM1. A expressão de IL4 promove o desenvolvimento da resposta Th2 que está relacionada com as

respostas das células B. Neste trabalho houve aumento da IL4 na epiderme e derme, podendo sugerir uma resposta do tipo Th2.

Neste trabalho não houve expressão do IFN γ . A produção do IFN γ está restrita a célula “natural killer”, linfócitos CD8, um subgrupo de linfócitos CD4, produzindo citocinas do tipo I (células Th1). Apresenta capacidade de modular a resposta imune, propriedades ativadoras dos macrófagos, aumenta a capacidade de apresentação de antígenos de células apresentadoras e induz moléculas de adesão como ICAM1 e VCAM1^{31,44,49}. O fato de não ocorrer a expressão do IFN γ pode estar relacionado a diminuição dos linfócitos CD4 e CD8 e aumento da IL4, que determina uma resposta Th2, enquanto o IFN γ , Th1.

7. Considerações finais

Neste estudo ficou evidenciado que a TFD com ALA 20% tópico, é eficaz no tratamento do fotoenvelhecimento global, com melhores resultados na flacidez, textura, coloração da pele e queratose actínica e menor no clareamento da melanose solar e rugas finas. No clareamento das efélides e melasma e na melhora das rugas profundas, o resultado foi inalterado.

Ficou evidenciado também que a TFD-ALA é eficaz na melhora do colágeno e fibra elástica, porém essa melhora não apresenta correlação com a melhora clínica.

Em relação ao sistema imune esta terapia não mostrou uma alteração das células de Langerhans e, por isso, pouca imunossupressão local. A apoptose dos linfócitos CD4 e CD8 foi evidenciada por meio da diminuição da contagem destes, sugerindo que a TFD possa ser uma boa indicação em doenças inflamatórias.

O estudo ainda mostrou uma diminuição do TNF α na epiderme e aumento na derme e aumento da IL4 em ambas, epiderme e derme. O aumento da IL4 sugere uma resposta do tipo humoral neste protocolo, o que também pode ser evidenciado pela ausência do INF γ . O aumento do TNF α na derme pode colaborar no estímulo dos fibroblastos na resposta do colágeno e fibras elásticas.

Outras investigações no tratamento do fotoenvelhecimento com a TFD-ALA serão necessárias na parte imunológica para melhor compreensão da modulação do sistema imune.

8. Conclusões

O estudo da pele humana fotoenvelhecida com três sessões de 20 minutos, com intervalo de 15 dias, de TFD-ALA tópico 20% Levulan® Kerastick™, com aparelho MultiWaves de 630 nm apresentou após o tratamento:

1. Melhora no fotoenvelhecimento global da pele (92,30%), com melhora na coloração, textura e flacidez cutânea (92,30%).
2. As lesões de queratose actínica apresentaram melhora neste protocolo em 75%.
3. O clareamento das lesões hiperpigmentadas como melanose solar (91,66%) e efélides (15,38%) foi parcial, enquanto melasma (30,76%) permaneceu inalterado.
4. A melhora das rugas finas foi discreta (38,46%), enquanto que as rugas profundas não apresentaram alteração.
5. O tratamento se mostrou mais eficiente no fototipo I e II, menos eficiente no fototipo III e pouco eficiente no fototipo IV.
6. Houve aumento significativo da porcentagem de colágeno e de fibras elásticas.
7. Não houve correlação da melhora clínica e do aumento da porcentagem de colágeno ou fibra elástica.
8. Houve desenvolvimento de lesões de herpes simples em duas pacientes (15,38%), sugerindo que a necessidade de profilaxia deve ser realizada nos pacientes com antecedentes para a doença.

9. A presença de fotossensibilidade prolongada ocorreu em uma paciente (7,69%), sugerindo que o uso tópico do ácido 5-delta-aminolevulinico é seguro.
10. Os efeitos colaterais como ardência, descamação, eritema e edema foram presentes, mas por um tempo curto, sugerindo que o método usado foi bem tolerado pelas pacientes.
11. As células de Langerhans não apresentaram alterações sugerindo pouca imunossupressão local pelo procedimento.
12. Houve diminuição significativa na contagem da população de linfócitos CD8 e não significativa na de CD4, sugerindo uma apoptose dos linfócitos.
13. Houve diferenças significantes na expressão do TNF- α , que se mostrou diminuída na epiderme e aumentada na derme. Esse aumento na derme pode estimular o fibroblasto.
14. Houve aumento significativo na expressão da interleucina 4, na epiderme e derme.
15. O IFN γ não apresentou alterações neste protocolo o que pode estar relacionado com a apoptose dos linfócitos.
16. A expressão positiva da IL4 e negativa do IFN γ sugere uma resposta do tipo Th2
17. O número de sessões (3), o intervalo entre elas, 15 dias, o tempo de exposição prévia de 2 horas, a concentração de 20% de ALA e o uso da luz vermelha de 630nm, mostraram-se

8. Conclusões

eficazes, neste protocolo, no tratamento do fotoenvelhecimento clínico, assim como na estimulação da síntese de colágeno, de fibras elásticas e no sistema imune.

9. Anexos

Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido

Estudo da pele humana fotoenvelhecida após tratamento com terapia fotodinâmica associada ao ácido 5-delta-aminolevulínico tópico: avaliação imunoistoquímica, do colágeno e do tecido elástico

Nome:-----RG:-----

Endereço:-----

Tel:----- Data de nascimento:-----

A Terapia Fotodinâmica é um tratamento novo baseado no uso de substâncias fotossensibilizantes que se acumulam nas células alvo e são ativadas por uma fonte luminosa, ou seja, é utilizada uma substância tópica que será exposta a uma luz especial por um determinado momento (no caso 20 minutos) e como consequência a pele ficará sensível. O objetivo desta pesquisa é investigar as alterações imunológicas e a síntese de colágeno e da fibra elastica da pele após o tratamento. Será realizada inicialmente uma biópsia da pele pré-auricular com anestesia tópica e os pontos retirados em 7 dias. As sessões serão marcadas a cada 15 dias (total de três aplicações) e as biópsias de controle serão realizadas 24 horas após a primeira sessão e 21 dias após a terceira. Todas as sessões serão fotografadas. O procedimento é indolor e pode causar vermelhidão, ardor discreto e descamação por 3-5 dias após as aplicações. As pacientes devem retornar nas datas marcadas e serão orientadas a usarem filtro solar e hidratante. As pacientes serão acompanhadas por 2 meses após o final da pesquisa.

Declaro que, após convenientemente esclarecida pela pesquisadora e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do protocolo desta pesquisa.

São Paulo, ----- de -----de-----.

Assinatura da paciente

Anexo B – Protocolo do estudo do tratamento do fotoenvelhecimento facial após terapia fotodinâmica associada ao ácido 5-delta-aminolevulinico

1. Identificação

Nome:

Idade:

Endereço:

Telefone:

Registro:

2. Anamnese

Toma sol regularmente?

Todos os dias:

3X/semana:

2X/semana (fim de semana):

Apenas para se locomover na rua:

Usa filtro solar diariamente?

Sim

Não

Você ou seus familiares possuem problemas de cicatrização?

Sim

Paciente

Familiar

Não

Você já teve herpes nos lábios ou na face?

Sim

Não

Você usa ou usou algum tipo de medicação no ultimo mês?

Sim

qual?

Não

Você tem alguma doença como diabetes, pressão alta, doença cardica, renal, hepática ou outras?

Sim

qual?

Não

Apresenta algum tipo de alergia?

Sim qual?

Não

Você já teve câncer de pele? Algum familiar já teve câncer de pele?

Sim Paciente Familiar

Não

3. Exame dermatológico:

Fototipo:

Inicial: data:

Fotoenvelhecimento (Glogau)

Coloração

Textura

Melanose

Queratose actinica

Flacidez

Outros

24 horas: (após sessão) data:

Efeitos colaterais

21 dias: (após terceira sessão) data:

Resultado final

Fotoenvelhecimento (Glogau)

Coloração

Textura

Melanose

Queratose actinica

Flacidez

Outros

10. Referências

1. Skivka LM, Gorobets OB, Kutsenok VV, Lozinsky MO, Borisevich AN, Fedorchuk AG, et al. 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy of lewis lung carcinoma: a role of tumor infiltration with different cells of immune system. *Exp Oncol*. 2004;26:312-5.
2. Uebelhoer NS, Dover JS. Photodynamic therapy for cosmetic applications. *Dermatol Ther*. 2005;18:242-52.
3. Hong S-B, Lee M-H. Topical aminolevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005;21:322-5.
4. Horio T, Horio O, Miyauchi-Hashimoto H, Ohnuki M, Isei T. Photodynamic therapy os sebaceous hyperplasia with topical 5-aminolaevulinic acid and slide projector. *Br J Dermatol*. 2003;148:1274-6.
5. Alster T, Hirsch R. Single-pass CO₂ laser skin resurfacing of light and dark skin: extended experience with 52 patients. *J Cosmet Laser Ther*. 2003;5:39-42.
6. Gold MH, Goldman MP. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy: where we have been and where we are going. *Dermatol Surg*. 2004;30:1077-84.
7. Nybaek H, Jemec GBE. Photodynamic therapy in the treatment of rosacea. *Dermatology*. 2005;211:135-8.

8. Wong TW, Tracy E, Oseroff AR, Baumann H. Photodynamic therapy mediates immediate loss of cellular responsiveness to cytokines and growth factors. *Cancer Res.* 2003;63:3812-8.
9. Korbélik M, Dougherty GJ Photodynamic Therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *Cancer Res.* 1999;59:1941-6.
10. Lever WF. *Histopatologia da pele* 7^a ed. São Paulo: Editora Manole; 1991. p. 269-70.
11. Lever WF. *Histopatologia da pele* 7^a ed. São Paulo: Editora Manole; 1991. p. 27.
12. Gilchrist BA. Skin aging and photoaging: an overview. *J Am Acad Dermatol.* 1989;21:610-3.
13. Calderone DC, Fenske NA. The clinical spectrum of actinic elastosis. *J Am Acad Dermatol.* 1995;32:1016-24.
14. Fitzpatrick TB. *Dermatology in general medicine.* 5 ed. 2005. pp. 303-304.
15. Draelos ZD. (ed). *Cosmecêuticos.* Tradução Ana Cristina Teixeira Aguiar Cunha et al. Revisão científica e consultoria Mônica M. Azulay. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. pp.129-134. (Série Procedimentos em Dermatologia Cosmética)

16. Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, Landthaler M, Szeimies R-M. Influence of 5-aminolevulinic acid and red light on collagen metabolism of human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2003;120:325-31.
17. Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, Landthaler M, Szeimies R-M. Keratinocyte-derived cytokines after photodynamic therapy and their paracrine induction of matrix metalloproteinases in fibroblasts. *Br J Dermatol.* 2004;151:776-83.
18. 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;99:743-8.
19. Kadunc BV. Acido piruvico: técnica 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.
20. Coleman WP, editor. *Cirurgia Cosmética.* 2a ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 2000. 459p.
21. Lawrence N. New and emerging treatments for photoaging. *Clin Plastic Surg.* 2001;28:235-6.
22. Roenigk HH. Treatment of the aging face. *Dermatol Clin.* 1995;13:245-61.
23. Fusco FJ. The aging face and skin. *Clin Plast Surg.* 2001;28:1.

24. Maio M. Tratado de medicina estética. 1o vol. São Paulo:Editora Roca. 2004. pp. 249-65.
25. Sampaio SAP, Rivitti EA. Dermatologia 1ª ed São Paulo: Artes Medicas; 1998. p.629.
26. 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;56:505-11.
27. Elson ML. Treatment of photoaging- a personal comment and open study of the use of glycolic acid. *J Dermatol Treat.* 1993;4:215-8.
28. Glogau RG. Chemical peeling and aging skin. *J Geriatric Dermatol.* 1994;2:30-5.
29. Hamilton DA. A classification of the aging face and its relationship to remedies. *J Clin Dermatol.* 1998;1998:35.
30. Dodson JM, Despainn J, Hewett JE, Clark DP. Malignant potential of actinic keratoses and the controversy over treatment. A patient-oriented perspective. *Arch Dermatol.* 1991;127:1029-31.
31. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen FK, Goldsmith LA, Katz SI, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.* 4ª ed,. McGraw Hill, 1993a. p. 797-803.
32. Glogau RG. The risk f progression to invasive disease. *J Am Ac Derm.* 2000;42:23-4.

33. Foley P. Clinical efficacy of methyl aminolaevulinate photodynamic therapy in basal cell carcinoma and solar keratosis. *Australas J Dermatol.* 2005;46(Suppl.):S8-S10; discussion S23-5. Review.
34. Joizzo JL. Current and novel treatment options for actinic keratosis. *J Cutan Med Surg.* 2005;8:13-21.
35. Goldman MP. (ed). *Terapia Fotodinâmica*. Tradução Patrícia Mesquita Couto de Azevedo. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. pp.105-118 (Série Procedimentos em Dermatologia Cosmética).
36. Fitzpatrick TB. *Dermatology in general medicine*. 5 ed. 2005. pp. 245-256.
37. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara; 1995. p.63-9.
38. Junqueira LC, Montes GS, Martins JE, Joazeiro PP. Dermal collagen distribution. A histochemical and structural study. *Histochemistry.* 1983;79:397-403.
39. Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr Path Bd.* 1973;150:174-87.
40. Fitzpatrick TB. *Dermatology in general medicine*. 5 ed. 2005. pp. 260-270.

-
41. Draelos ZD. (ed). Cosmecêuticos. Tradução Ana Cristina Teixeira Aguiar Cunha et al. Revisão científica e consultoria Mônica M. Azulay. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. pp.145-151. (Série Procedimentos em Dermatologia Cosmética)
 42. Fitzpatrick TB. Dermatology in general medicine. 5 ed. 2005. pp. 289-298.
 43. Proksch E, Brasch J, Sterry W. Integrity of the permeability barrier regulates epidermal Langerhans cell density. Br J Dermatol. 1996;134:630-8.
 44. Sampaio SAP, Rivitti EA. Dermatologia 1^a ed. São Paulo:Artes Medicas; 1998. p.45-66.
 45. Fitzpatrick TB. Dermatology in general medicine. 5 ed. 2005. pp. 343-465.
 46. Streilen JW. Circuits and signal of the skin associatd linfoid tissues (SALT). J Invest Derm. 1985;85(supp1):105-35.
 47. .Breathnach SM. The Langerhans cell. Br J Dermatol. 1988;119:463-9.
 48. Sprecher E, Becker Y. Role of epidermal Langerhans cells in viral infections. Arch Virol. 1988;103:1-14.
 49. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed Ed.2002. pp.319-361.

50. Gilchrest BA, Murphy GF, Soter NA. Effect of chronologic aging and ultraviolet irradiation on Langerhans cells in human epidermis. *J Invest Dermatol.* 1982;79:85-8.
51. Wolff K, Stingl G. The Langerhans cell. *J Invest Dermatol.* 1983;80(6 suppl.):17S-21S.
52. Bruynzeel-Koomen C, van der Donk EMM, Bruynzeel PLB, Capron M, de Gast GC, Mudde GC. Associated expression of CD1 antigen and Fc receptor for IgE on epidermal Langerhans cells from patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol.* 1988;74:137-42.
53. Birbeck Ms, Breathnach As, Everall Jd. An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol.* 1961;37:51-63.
54. Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pak M, Hankis DF, Morris PJ, Austyn JM. Migration and maturation Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 1990;172:1483-93.
55. Elder JT, Reynolds NJ, Cooper KD, Griffiths CE, Hardas BD, Bleicher PA. CD1 gene in human skin. *J Dermatol Sci.* 1993;6:206-13.
56. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 1994. 435p.
57. Staquet MJ. Adhesion and migration of epidermal dendritic cells. *Pathol Biol.* 1995;43:858-62.

-
58. Lukas M, Stossel H, Hefel L, Imamura S, Fritsch P, Sepp NT, et al. Human cutaneous dendritic cells migrate through dermal lymphatic vessels in a skin organ culture model *J Invest Derm.* 1996;106:1293-9.
 59. Lappin MB, Kimber I, Norval M. The role of dendritic cells in cutaneous immunity. *Arch Dermatol Res.* 1996;288:109-21.
 60. Katou F, Ohtani H, Saaristo A, Nagura H, Motegi K. Immunological activation of dermal Langerhans cells in contact with lymphocytes in a model of human inflamed skin. *Am J Pathol.* 2000;156:519-27.
 61. Stoitzner P, Pfaller K, Stossel H, Romani N. A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J Invest Dermatol.* 2002;118:117-25.
 62. Stoitzner P, Holzmann S, Mclellan AD, Ivarsson L, Stossel H, Kapp M, et al. Visualization and characterization of migratory Langerhans in murine skin and lymph nodes by antibodies against Langerin? CD207. *J Invest Dermatol.* 2003;120:266-74.
 63. Sugiura K, Shamoto M, Sakamoto N, Shinzato M, Osada A, Sugiura M, et al. It is true that, when Langerhans cells migrate from the skin to lymph node, they are transported via lymph vessels *Dermatol.* 2003;206:222-4.
 64. Cumberbatch M, Dearman RJ, Griffiths CEM, Kimber I. Langerhans cell migration. *Clin Exp Dermatol.* 2000;25:413-8.
 65. Krenács L, Tiszaivicz L, Krenács T, Boumsell L. Immunohistochemical detection of CD1a antigen in formalin-fixed and paraffin-embedded

- tissue sections with monoclonal antibody 010. J Pathol. 1993;171:99-104.
66. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença*. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed Ed.2002. pp.177-204.
67. Tamura BM. *Estudo imunohistoquímico da pele após tratamento da hiperhidrose axilar com toxina botulinica*. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2005.
68. Nagy ZA, Lehmann PV, Falcioni F, Muller S, Adorini L. Why peptides? Their possible role in the evolution of MHC-restricted T-cell recognition. *Immunol Today*. 1989;10:132-8.
69. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença*. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed Ed.2002. pp.127-136.
70. Weenink SM, Gautam AM. Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Cell Biol*. 1997;75: 69-81.
71. Sato A, Klein J. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343:702-9.
72. Osmond DG. The ontogeny and organization of the lymphoid system. *J Invest Derm*. 1985;85(supp1):25-95.

-
73. Nickoloff BJ, Nestle FJ. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2004;113:1664-75.
 74. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença.* 5^a ed. Porto Alegre: Artmed Ed.2002. pp.93-100.
 75. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990;346:425-34.
 76. Dougherty GJ, Murdoch S, Hogg N. The function of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1) in the generation of an immune response. *Eur J Immunol.* 1988;18:35-9.
 77. De Panfilis G, Manara GC, Ferrari C, Torresani C. Adhesion molecules on the plasma membrane of epidermal cells. II. The intercellular adhesion molecule-1 is constitutively present on the cell surface of human resting Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 1990;94:317-21.
 78. Lisby S, Ralfkiaer E, Rothlein R, Vejlsgaard GL. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlated to inflammation. *Br J Dermatol.* 1989;120:479-84.
 79. Murphy GF, Katz S, Klingman AM. Topical tretinoin replenishes CD1a-positive epidermal Langerhans cells in chronically photodamaged human skin. *Cutan Pathol.* 1998;25:30-4.

-
80. Kölgen W, Both H, van Weelden H, Guikers KLH, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Knol EF, et al. Epidermal Langerhans cell depletion after artificial ultraviolet B irradiation of human skin in vivo: apoptosis versus migration. *J Invest Dermatol.* 2002;118:812-7.
 81. Munksgaard B. Aumento da presença de genes E-selectina, IL-8 e IL-10 na pele human após trauma mínimo. *Dermatol Exp* 2003;12:777-83.
 82. Uzdensky A, Juzeniene A, Kolpakova E, Hjortland G-O, Juzenas P, Moan J. Photosensitization with protoporphyrin IX inhibits attachment of cancer cells to a substratum. *Biochem Biophys Res Comm.* 2004;322:452-7.
 83. Lawrence N; Cox SE; Cockrell CJ; Freeman RG; Cruz PDJR. A comparison of the efficacy and safety of Jessner's and 35% trichloroacetic acid vs 5% fluorouracil in the treatment of widespread facial actinic keratoses *Arch Dermatol.* 1995;131:176-81.
 84. Adrian RM. Pulsed carbon dioxide and long pulse 10-ms erbium-YAG laser resurfacing: a comparative clinical and histologic study. *J Cutan Laser Ther.* 1999;1:197-202.
 85. Chiarello SE Cryoppeeling (extensive cryosurgery) for treatment of actinic keratoses: an update and comparison *Dermatol Surg.* 2000;26:728-32.
 86. Brody H.J, Monheit GD, Resnik SS, Alt TH. A history of chemical peeling. *Dermatol Surg.* 2000;26:405-9.

-
87. Airan LE, Hruza G. Current lasers in skin resurfacing. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2002;10:87-101.
 88. Papadavid E, Katsambas A. Lasers for facial rejuvenation: a review. *Int J Dermatol.* 2003;42:480-7.
 89. Fulton JE. Dermabrasion chemabrasion, and laserabrasion. *Dermatol Surg.* 1996;22:619-28.
 90. Salgado AGM Estudo imunohistoquimico da pele antes e depois do laser de CO₂ ultrapulsado Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2001
 91. Weiss RA, Weiss MA. Intense pulsed light: newer perspective. *Dermatol Surg.* 1997;23:1221.
 92. Raulin C, Greve B, Grema H. IPL technology: a review. *Lasers Surg Med.* 2003;32:78-87.
 93. Goldberg DJ, editor. Procedures in cosmetic dermatology series: lasers and lights. Volume 2. New York: Elsevier Saunders; 2005. p.39-40.
 94. Zelickson BD, Kist D, Bernstein E, Brown DB, Ksensenko S, Burns J, et al. Histological and ultrastructural evaluation of the effects of a radiofrequency-based nonablative dermal remodeling device. *Arch Dermatol.* 2004;140:204-9.
 95. Chan HHL. Effective and safe use of lasers, light sources, and radiofrequency devices in the clinical management of Asian patients with selected dermatoses. *Lasers Surg Med.* 2005;37:179-85.

96. Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli GM, et al. Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Dermatol Surg.* 2005;31:1199-205.
97. El-Domyati MBM, Attia SK, Saleh FY, Ahmad HM, Uitto JJ. Trichloroacetic acid peeling versus dermabrasion: a histometric, immunohistochemical, and ultrastructural comparison. *Dermatol Surg.* 2004;30:179-88.
98. Stegman S. A comparative histologic study of the effects of three peeling agents and dermabrasion on normal and sundamage skin. *Aesthetic Plastic Surg.* 1982;6:123.
99. Nelson JS, Majaron B, Kelly KM. What is nonablative photorejuvenation of human skin? *Semin Cutan Med Surg.* 2002;21:238-50.
100. Trelles MA, Brychta P, Stanek J, Allones I, Alvarez J, Koegler G, et al. Laser techniques associated with facial aesthetic and reparative surgery. *Facial Plast Surg.* 2005;21:83-98.
101. Drnovsek-Olup B, Beltram M, Pizem J. Repetitive Er:YAG laser irradiation of human skin: a histological evaluation. *Lasers Surg Med.* 2004;35:146-51.
102. Orringer JS, Kang S, Johnson TM, Karimipour DJ, Hamilton T, Hammerberg C, Voorhees JJ, Fisher GJ. Connective tissue remodeling induced by carbon dioxide laser resurfacing of photodamaged human skin *Arch Dermatol.* 2004;140:1326-32.

103. Goldberg DJ. New collagen formation after dermal remodeling with an intense pulsed light source. *J Cutan Laser Ther.* 2000; 2:59-61.
104. Prieto VG, Sadick NS, Lloreta J, Nicholson J, Shea CR. Effects of intense pulsed light on sun-damaged human skin, routine, and ultrastructural analysis. *Lasers Surg Med.* 2002;30:82-5.
105. Moody BR, McCarthy JE, Hruza GJ. Collagen remodeling after 585-nm pulsed dye laser irradiation: an ultrasonographic analysis. *Dermatol Surg.* 2003;29:997-9.
106. Dang Y, Ren Q, Hoecker S, Liu H, Ma J, Zhang J. Biophysical, histological and biochemical changes after non-ablative treatments with the 595 and 1320 nm lasers: a comparative study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2005;21:204-9.(b)
107. Bjerring P, Clement M, Heickendorff L, Lybecker H, Kiernan M. Dermal collagen production following irradiation by dye laser and broadband light source *J Cosmet Laser Ther.* 2002;4:39-43.
108. Muccini JA Jr, O'Donnell FE Jr, Fuller T, Reinisch L Laser treatment of solar elastosis with epithelial preservation. *Lasers Surg Med.* 1998;23:121-7.
109. Schmultz CD, Phelps R, Goldberg DJ. Nonablative facial remodeling: erythema reduction and histologic evidence of new collagen formation using a 300-microsecond 1064-nm Nd:YAG laser. *Arch Dermatol.* 2004;140:1373-6.

110. Freedman BM, Balakrishnan TP, Reedy EA. The lamellar peel: a sequential nonablative and ablative laser treatment for facial skin rejuvenation. *J Cosmet Laser Ther.* 2005;7:191-5.
111. Dang Y, Ren QS, Liu HX, Ma JB, Zhang JS. Comparison of histologic, biochemical, and mechanical properties of murine skin treated with the 1064-nm and 1320-nm Nd:YAG lasers *Exp Dermatol.* 2005;14:876-82.
112. Mendez TM, Pinheiro AL, Pacheco MT, Nascimento PM, Ramalho LM. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds *J Clin Laser Med Surg.* 2004;22:19-25.
113. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001;74:656-9.
114. Moan J, Peng Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res.* 2003;23:3591-600.
115. Daniell MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg.* 1991;61:340-8.
116. Spikes JD. The origin and meaning of the term “photodynamic” (as used in “photodynamic therapy”, for example). *J Photochem Photobiol B.* 1991;9:369-74.
117. Babilas P, Karrer S, Sidoroff A, Landthaler M, Szeimies R-M. Photodynamic therapy in dermatology – an update. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2005;21:142-9.
118. Cairnduff F, Stringer MR, Hudson EJ, Ash DV, Brown SB. Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid for

- superficial primary and secondary skin cancer. *Br J Cancer*. 1994;69:605-8.
119. Szeimies R-M, Morton CA, Sidoroff A, Braathen LR. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Acta Derm Venereal*. 2005;85:483-90.
120. Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Nat Cancer Inst*. 1961;26:1-11.
121. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleamn A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res*. 1978;38:2628-35.
122. Glassberg E, Lewandowski L, Halcin C, Lask G, Uitto J. Hyperthermia potentiates the effects of aluminum phthalocyanine tetrasulfonate-mediated photodynamic toxicity in human malignant and normal cell lines. *Lasers Surg Med*. 1991;11:432-9.
123. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous proroporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B*. 1990;6:143-8.
124. Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous photoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 1992;14:275-92.
125. Wolf P, Rieger E, Kerl H. Topical photodynamic therapy with endogenous porphyrins after application of 5-aminolevulinic acid. *J Am Acad Dermatol*. 1993;28:17-21.

126. Szeimies R-M, Calzavara-Pinton PG, Karrer S, Ortel B, Landthaler M. Topical photodynamic therapy in dermatology. *J Photochem Photobiol B*. 1996;36:213-9.
127. Szeimies R-M, Karrer S, Sauerwald A, Landthaler M. Photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic keratoses: an initial clinical study. *Dermatology*. 1996;192:246-51.
128. Lui H, Bissonnette R. Photodynamic therapy. In: Goldman MP editor. *Cutaneous and cosmetic laser surgery*. 2nd. ed. Saint Louis: Mosby; 1999. p.437-58.
129. Orenstein A, Kostenich G, Roitman L, Tsur H, Katanick D, Kopolovick J, et al. Photodynamic therapy of malignant lesions of the skin mediated by topical application of 5-aminolevulinic acid in combination with DMSO and EDTA. *Lasers Life Sci*. 1996; 7:49-57.
130. Nelson JS, Miccullough JL, Berns MW. Principles and applications of photodynamic therapy in dermatology. In: Arndt KA, Dover JS, Olbright SM. ed. *Lasers in cutaneous and aesthetic surgery*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p.349-82.
131. Torezan LAR Avaliação da eficácia da Terapia Fotodinâmica com ácido 5-delta aminolevulinico (ALA) tópico no carcinoma basocelular. Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2000.

132. Itkin A, Gilchrest BA. Delta-Aminolevulinic acid and blue light photodynamic therapy for treatment of multiple basal cell carcinomas in two patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Surg.* 2004; 30:1054-61. Review.
133. Gold MH, Bradshaw VL, Boring MM, et al. A split-face comparison study of ALA-PDT with intense pulsed light versus intense pulse light alone for photodamage/photorejuvenation. *Dermatol Surg.* 2006
134. Bakos RM, Cestari T, Peukert C, Bakos I, Orlandini T, Berti C, et al. Terapêutica fotodinamica com ácido delta aminolevulinico em neoplasias queratinociticas superficiais. *An Bras Dermatol.* 2003;78:197-207.
135. Touma DJ, Gilchrest BA. Topical photodynamic therapy: a new tool in cosmetic dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2003;22:124-30.
136. Gold MH, Bradshaw VL, Boring MM, Bridges TM, Biron JA, Carter LN. The use of a novel intense pulsed light and heat source and ALA-PDT in the treatment of moderate to severe inflammatory acne vulgaris. *J Drugs Dermatol.* 2004; 3(6 suppl.):S15-9 (b).
137. Radakovic-Fijan S, Blecha-Thalhammer U, Schleyer V, Szeimies RM, Zwingers T, Hönigsmann H, et al. Topical aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy as a treatment option for psoriasis? Results of a randomized, observer-blinded study. *Br J Dermatol.* 2005;152:279-83.

138. Strasswimmer J, Grande DJ. Do pulsed lasers produce an effective photodynamic therapy response? *Lasers Surg Med.* 2006;38:22-5.
139. Hurlimann AF, Panavizzon RG, Burg A. Topical photodynamic treatment of skin tumours and dermatoses. *Dermatology.* 1994;3:327.
140. Wilson BD, Mang TS, Stoll H, Jones C, Cooper M, Dougherty TJ. Photodynamic therapy for the treatment of basal cell carcinoma. *Arch. Dermatol.* 1992;128:1597-601.
141. Calzavara-Pinton PG, Szeimies RM, Ortel B, Zane C. Photodynamic therapy with systemic administration of photosensitizers in *Dermatology.* *J Photochem Photobiol B.* 1996;36:225-31.
142. Fritsch C, Verwohlt B, Bolsen K, Ruzicka T, Goerz G. Influence of topical photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid on porphyrin metabolism. *Arch Dermatol Res.* 1996;288:517-21.
143. Fritsch C, Lang K, Neuse W, Ruzicka T, Lehmann P. Photodynamic diagnosis and therapy in dermatology. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 1998;11:358-73.
144. Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42:389-413.
145. Dysart JS, Patterson MS. Characterization of photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MML cells in vitro. *Phys Med Biol.* 2005;50:2597-616.
146. Martin A, Tope WD, Grevelink JM, Starr JC, Fewkes JL, Flotte TJ, et al. Lack of selectivity of protoporphyrin IX fluorescence of basal cell

- carcinoma after topical application of 5-aminolevulinic acid: implications for photodynamic treatment. *Arch Dermatol Res.* 1995;287:665-74.
147. Donnelly RF, McCarron PA, Woolfson AD. Drug delivery of aminolevulinic acid from topical formulations intended for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2005;81:750-67.
148. Niedre MJ, Yu CS, Patterson MS, Wilson BC. Singlet oxygen luminescence as an in vivo photodynamic therapy dose metric: validation in normal mouse skin with topical aminolevulinic acid. *Br J Cancer.* 2005;92:298-304.
149. van der Veen N, van Leengoed HLLM, Star WM. In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin: increased damage after múltiple irradiations. *Br J Cancer.* 1994;70:867-72.
150. Itoh Y, Ninomiya Y, Henta T, Tajima S, Ishibashi A. Topical delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for Japanese actinic keratoses. *J Dermatol.* 2000; 27:513-8.
151. Lui H, Anderson RR. Photodynamic therapy in dermatology. Shedding a different light on skin disease. *Arch Dermatol.* 1992;128:1631-6.
152. Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, Golab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol.* 2005;52:339-52.

153. Tromberg BJ, Orenstein A, Kimel S, Bakker SJ, Hyatt J, Nelson JS, et al. In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1990;52:375-85.
154. Szeimies R-M, Landthaler M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnosis of skin cancers. *Rec Res Cancer Res.* 2002;160:240-5.
155. Radakovic-Fijan S, Rappersberger K, Tanew A, Honigsmann H, Ortel B. Ultrastructural changes in PAM cells after photodynamic treatment with delta-aminolevulinic acid-induced porphyrins or photosan. *J Invest Dermatol.* 1999;112:264-70.
156. Harth Y, Hirshowitz B, Kaplan B. Modified topical photodynamic therapy of superficial skin tumors, utilizing aminolevulinic acid, penetration enhancers, red light, and hyperthermia. *Dermatol Surg.* 1998;24:723-6.
157. Wild PJ, Krieg RC, Seidi J, Stoehr R, Reher K, Hofman C, et al. RNA expression profiling of normal and tumor cells following photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid-induced proroporphyrin IX in vitro. *Mol Cancer Ter.* 2005;4:516-28.
158. Verwanger T, Schnitzhofer G, Krammer B. Expression kinetics of the (proto) oncogenes *c-myc* and *bcl-2* following photodynamjic treatment of normal and transformed human fibroblasts with 5-aminolevulinic acid-stimulated endogenous protoporphyrin IX. *J Photochm Photobiol B: Biol.* 1998;45:131-5.

159. Ferrario A, von Tiehl KF, Rucker N, Schwarz MA, Gill PS, Gomer CJ. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res.* 2000;60:4066-9.
160. Seshadri M, Spornyak JA, Mazurchuk R, Camacho SH, Oseroff AR, Cheney RT, et al. Tumor vascular response to photodynamic therapy and the antivascular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid: implications for combination therapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11:4241-50.
161. Ortel B, Chen N, Brissette J, Dotto GP, Maytin E, Hasan T. Differentiation-specific increase in ALA-induced protoporphyrin IX accumulation in primary mouse keratinocytes. *Br J Cancer.* 1998;77:1744-51.
162. Hryhorenko EA, Oseroff AR, Morgan J, Rittenhouse-Diakun K. Antigen specific and nonspecific modulation of the immune response by aminolevulinic acid based photodynamic therapy. *Immunopharmacology.* 1998;40:231-40.
163. Hryhorenko EA, Oseroff AR, Morgan J, Rittenhouse-Diakun K. Deletion of alloantigen-activated cells by aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1999;69:560-5.

164. Grebenova D, Cajthamlova H, Bartova J, Marinov J, Klamova H, Fuchs O, et al. Selective destruction of leukaemic cells by photo-activation of 5- aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin-IX. *J Photochem Photobiol B*. 1998;47:74-81.
165. Abdel-Hady E-S, Martin-Hirsch P, Duggan-Keen M, Stern PL, Moore JV, Corbitt G, et al. Immunological and viral factors associated with the response of vulval intraepithelial neoplasia to photodynamic therapy. *Cancer Res*. 2001;61:192-6.
166. Bissonnette R, Tremblay J-F, Juzenas P, Boushira M, Lui H. Systemic photodynamic therapy with aminolevulinic acid induces apoptosis in lesional T lymphocytes of psoriatic plaques. *J Invest Dermatol*. 2002;119:77-83.
167. Bartosik J, Stender IM, Kovayasi T, Agren MS. Ultrastructural alteration of tape-stripped normal human skin after photodynamic therapy. *Eur J Dermatol*. 2004;14:91-5.
168. Yeh DC, Bula DV, Miller JW, Gragoudas ES, Arroyo JG. Expression of leukocyte adhesion molecules in human subfoveal choroidal neovascular membranes treated with and without photodynamic therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:2368-73.
169. Buskard, N.A.; Wilson, B.C. Introduction to the symposium on photodynamic therapy [Editorial]. *Semin. Oncol*. 1994;21(Suppl. 15): 1-3.

170. Charlesworth P, Truscott TG. The use of 5-aminolevulinic acid (ALA) in photodynamic therapy (PDT). *J Photochem Photobiol B.* 1993;18:99-100.
171. Ortel B, Calzavara-Pinton PG, Szeimies R-M, Hasan T. Perspectives in cutaneous photodynamic sensitization. *J Photochem Photobiol B.* 1996;36:209-11.
172. Roberts DJH, Cairnduff F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. *Br J Plast Surg.* 1995 48:360-70.
173. Taber SW, Fingar VH, Coots CT, Wieman TJ. Photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6) for the treatment of cutaneous disease: a phase I clinical study. *Clin Cancer Res.* 1998;4:2741-46.
174. Sibata MN, Tedesco AC, Marchetti JM. Photophysicals and photochemical studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. *Eur J Pharm Sci.* 2004;23:131-8.
175. Iwunze MO, Ekiko BD. Soybean oil as a possible solubilizing and vehicular medium for zinc phthalocyanine in photodynamic therapy. *Cell Mol Biol.* 2004;50:753-8.
176. Kessel D, Caruso JA, Reiners Jr, JJ. Potentiation of photodynamic therapy by Ursodeoxycholic acid. *Cancer Res.* 2000;60:6985-8.

177. Abels C, Fickweiler S, Weiderer P, Bäuml W, Hoftädter F, Landthaler M, et al. Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation. *Arch Dermatol Res.* 2000;292:404-11.
178. Kusuzaki K, Murata H, Matsubara T, Miyazaki S, Okamura A, Seto M, et al. Clinical trial of Photodynamic therapy using acridine orange with/without low dose radiation as new limb salvage modality in musculoskeletal sarcomas. *Anticancer Res.* 2005;25:1225-36.
179. Takahashi H, Nakajima S, Sakata I, Yamamoto-Ishida A, Iizuka H. Photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-S10(NA): comparative effect with 5-aminolevulinic acid on squamous cell carcinoma cell line, SCC15, ultraviolet B-induced skin tumor, and phorbol ester-induced hyperproliferative skin. *Arch Dermatol Res.* 2005;296:496-502.
180. Woodhams JH, MacRobert AJ, Novelli M, Bown SG. Photodynamic therapy with WST09(Tookad): quantitative studies in normal colon and transplanted tumours. *Int J Cancer* 2006;118:477-82.
181. Szeimies R-M, Sassy T, Landthaler M. Penetration potency of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. *Photochem Photobiol.* 1994;59:73-6.
182. Fukuda H, Casas A, Batlle A. Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:272-6.

183. Lopez RF, Lange N, Guy R, Brentley MV. Photodynamic therapy of skin câncer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56:77-94. Review.
184. Gibson SL, Cupriks DJ, Havens JJ, Nguyen ML, Hilf R. A regulatory role for porphobilinogen deaminase (PBGD) in delta-aminolaevulinic acid (delta-ALA)-induced photosensitization? *Br J Cancer.* 1998;77:235-43.
185. McCarron PA, Donnelly RF, Andrews GP, Woolfson AD. Stability of 5-aminolevulinic acid in novel non-aqueous gel and patch-type systems intended for topical application. *J Pharm Sci.* 2005; 94:1756-71.
186. Ackermann G, Abels C, Bäuml W, Langer S, Landthaler M, Lang EW, et al. Simulations on the selectivity of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in vivo. *J Photochem Photobiol B.* 1998;47:121-8.
187. Gibson SL, Havens JJ, Nguyen ML, Hilf R. Delta-aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy inhibits protoporphyrin IX biosynthesis and reduces subsequent treatment efficacy in vitro. *Br J Cancer.* 1999;80:998-1004.
188. Hilf R, Havens JJ, Gibson SL. Effect of δ -aminolevulinic acid on photoporphyrin IX accumulation in tumor cells transfected with plasmids containing porphobilinogen deaminase DNA. *Photochem Photobiol.* 1999;70:334-40.

189. Svanberg K, Andersson T, Killander D, Wang I, Stenram U, Anderson-Engels S, et al. Photodynamic therapy of non-melanoma malignant tumours of the skin using topical delta-amino levulinic acid sensitization and laser irradiation. *Br J Dermatol.* 1994;130:743-51.
190. Kim HS, Yoo JY, Cho KH, Kwon OS, Moon SE. Topical photodynamic therapy using intense pulsed light for treatment of actinic keratosis: clinical and histopathologic evaluation. *Dermatol Surg.* 2005;31:33-7.
191. van den Boogert J, van Hillegersberg R, de Rooij FWM, de Bruin RWF, Edixhoven-Bosdijk A, Houtsmuller AB, et al. 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tissues: pharmacokinetics after oral or intravenous administration. *J Photochem Photobiol B.* 1998;44:29-38.
192. Kelty CJ, Brown NJ, Reed NW, Ackroyd R. The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitiser in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochem Photobiol Sci.* 2002;1:158-68.
193. Juzeniene A, Juzenas P, Iani V, Moan J. Topical application of 5-aminolevulinic acid and its methylester, hexylester and octylester derivatives: considerations for dosimetry in mouse skin model. *Photochem Photobiol.* 2002;76:329-34.
194. Diagaradjane P, Madhuri S, Aruna P, Gupta PK, Ganesan S. In vivo pharmacokinetics of δ -aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX during pre- and post-photodynamic therapy in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-treated skin carcinogenesis in swiss mice: a

- comparison by three-compartment model. *Photochem Photobiol.* 2002;76:81-90.
195. Kloek J, Beijersbergen van Henegouwen GMJ. Prodrugs of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1996;64:994-1000.
196. Pierre MBR, Tedesco AC, Marchetti JM, Bentley MVLB. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and *in vitro* permeation study. *BMC Dermatol.* 2001;1:1471-6.
197. Correia-Garcia S, Casas A, Perotti C, Batlle A, Bermúdez-Moretti MB. Mechanistic studies on delta-aminolevulinic acid uptake and efflux in a mammary adenocarcinoma cell line. *Br J Cancer.* 2003;89:173-7.
198. Lopez RFV, Bentley MVLB, Delgado-Charro MB, Salomon D, van den Bergh H, Lange N, et al. Enhanced delivery of 5-aminolevulinic acid esters by iontophoresis *in vitro*. *Photochem Photobiol.* 2003;77:304-8.
199. van den Akker JTHM, Boot K, Vernon DI, Brown SB, Groenendijk L, van Rhoon GC, et al. Effect of elevating the skin temperature during topical ALA application on *in vitro* ALA penetration through mouse skin and *in vivo* PpIX production in human skin. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:263-7.

200. Yanase S, Nomura J, Matsumura Y, Nagai K, Kinoshita M, Nakanishi H, et al. Enhancement of the effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy by simultaneous hyperthermia. *Int J Oncol.* 2005;27:193-201.
201. Golff BA, Bachor R, Kollas N, Hasan T. Effects of photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid on normal skin of hairless guinea pigs. *J Photochem Photobiol B.* 1992;15:239-51.
202. Casas A, Fukuda H, Di Venosa G, Batlle A. Photosensitization and mechanism of cytotoxicity induced by the use of ALA derivatives in photodynamic therapy. *Br J Cancer.* 2001; 85:279-84.
203. Tunstall RG, Barnett AA, Schofield J, Griffiths J, Vernon DI, Brown SB, et al. Protoporphyrin accumulation induced by 5-aminolaevulinic acid esters in tumour cells growing in vitro and in vivo. *Br J Câncer.* 2002;87:246-50.
204. Bedwell J, MacRobert AJ, Phillips D, Bown SG. Fluorescence distribution and photodynamic effect of ALA-induced PP IX in the DMH rat colonic tumour model. *Br J Cancer.* 1992;65:818-24.
205. Gibson SL, Havens JJ, Foster TH, Hilf R. Time-dependent intracellular accumulation of delta-aminolevulinic acid, induction of porphyrin synthesis and subsequent phototoxicity. *Photochem Photobiol.* 1997; 65:416-21.

206. de Blois AW, Grouls RJ, Ackerman EW, Wijdeven WJ. Development of a stable solution of 5-aminolaevulinic acid for intracutaneous injection in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2002;17:208-15.
207. Juzenas P, Sorensen R, Iani V, Moan J. Uptake of topically applied 5-aminolevulinic acid and production of protoporphyrin IX in normal mouse skin: dependence on skin temperature. *Photochem Photobiol.* 1999;69:478-81.
208. Nadeau V, O'Dwyer M, Hamdan K, Tait I, Padgett M. In vivo measurement of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX photobleaching: a comparison of red and blue light of various intensities. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2004;20:170-4.
209. Wang I, Clemente LP, Pratas RM, Cardoso E, Clemente MP, Montan S, et al. Fluorescence diagnostics and kinetic studies in the head and neck region utilizing low-dose delta-aminolevulinic acid sensitization. *Cancer Lett.* 1999;135:11-9.
210. Britton JER, Goulden V, Stables G, Stringer M, Sheehan-Dare R. Investigation of the use of the pulsed dye laser in the treatment of Bowen's disease using 5-aminolaevulinic acid phototherapy. *Br J Dermatol.* 2005;153:780-4.
211. Lui H, Hobbs L, Tope WD, Lee PK, Elmetts C, Provost N, et al. Photodynamic therapy of multiple nonmelanoma skin cancers with verteporfin and red light-emitting diodes. *Arch Dermatol.* 2004;140:26-32.

212. Wieman TJ, Mang TS, Fingar VH, Hill TG, Reed MWR, Corey TS, et al. Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels. *Surgery*. 1988;104: 512-7.
213. Leveckis J, Brown NJ, Reed MWR. The effect of aminolaevulinic acid-induced, protoporphyrin IX-mediated photodynamic therapy on the cremaster muscle microcirculation in vivo. *Br J Cancer*. 1995;72:1113-9.
214. Michels S, Schmidt-Erfurth U. Sequence of early vascular events after photodynamic therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:2147-54.
215. Kloek J, Akkermans W, Beijersbergen van Henegouwen GMJ. Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into photoporphyrin. *Photochem Photobiol*. 1998;67:150-4.
216. Casas A, Perotti C, Fukuda H, Rogers L, Butler AR, Batlle A. ALA and ALA hexyl ester-induced porphyrin synthesis in chemically induced skin tumors: the role of different vehicles on improving photosensitization. *Br J Cancer*. 2001; 85:1794-800.
217. Di Venosa G, Fukuda H, Perotti C, Batlle A, Casas A. A method for separating ALA from ALA derivatives using ionic exchange extraction. *J Photochem Photobiol B*. 2004;75:157-63.
218. Gerscher S, Connelly JP, Griffiths J, Brown SB, MacRobert AJ, Wong G, et al. Comparison of the pharmacokinetics and phototoxicity of protoporphyrin IX metabolized from 5-aminolevulinic acid and two

- derivatives in human skin in vivo. *Photochem Photobiol.* 2000; 72:569-74.
219. Peng Q, arloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky Ke, et al. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: clinical research and future challenges. *Cancer.* 1997;79:2282-308.
220. van den Akker JTHM, Iani V, Star WM, Sterenborg HJCM, Moan J. Topical application of 5-aminolevulinic acid hexyl ester and 5-aminolevulinic acid to normal nude mouse skin: differences in protoporphyrin IX fluorescence kinetics and the role of the stratum corneum. *Photochem Photobiol.* 2000;72:681-9.
221. van den Akker JTHM, de Bruijn HS, Beyersbergen van Henegouven GMJ, Star W, Sterenborg HJCM. Protoporphyrin IX fluorescence kinetics and localization after topical application of ALA pentyl ester and ALA on hairless mouse skin with UVB-induced early skin cancer. *Photochem Photobiol.* 2000;72:399-406.
222. van den Akker JTHM, Holroyd JA, Vernon DI, Sterenborg HJ, Brown SB. Comparative in vitro percutaneous penetration of 5-aminolevulinic acid and two of its esters through excised hairless mouse skin. *Lasers Surg Med.* 2003;33:173-81.
223. Di Venosa G, Fukuda H, Batlle A, MacRobert A, Casas A. Photodynamic therapy: regulation of porphyrin synthesis and hydrolysis from ALA esters. *J Photochem Photobiol B.* 2006;83:129-36.

- 224. Tope WD, Ross EV, Kollias N, Martin A, Gillies R, Anderson RR. Photoporphyrin IX fluorescence induced in basal cell carcinoma by oral -aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol.* 1998;67:249-55.
- 225. van der Veen N, de Bruijn HS, Berg RJW, Star WM. Kinetics and localisation of PpIX fluorescence after topical and systemic ALA application, observed in skin and skin tumours of UVB-treated mice. *Br J Cancer.* 1996;73:925-30.
- 226. Gomer CJ, Razum NJ. *Photochem Photobiol.* 1984;40:435-9.
- 227. Kimel S, Svaasand LO, Hammer-Wilson M, Gottfried V, Cheng S, Svaasand E, et al. Demonstration of synergistic effects of hyperthermia and photodynamic therapy using the chick chorioallantoic membrane model. *Lasers Surg Med.* 1992;12:432-40.
- 228. Chen Q, Chen H, Shapiro H, Hetzel FW. Sequencing of combined hyperthermia and photodynamic therapy. *Rad Res.* 1996;146:293-7.
- 229. Freitas I, Baronzio GF. New trends in photobiology. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 1991;11:3-30. Invited review.
- 230. Hjelde A, Gederaas OA, Krokan HE, Brubakk AO. Lack of effect of hiperoxia on photodynamic therapy and lipid peroxidation in three different cancer cell lines. *Med Sci Monit.* 2005;11:BR351-6.
- 231. Wang I, Andersson-Engels S, Nilsson GE, Wårdell K, Svanberg K. Superficial blood flow following photodynamic therapy of malignant non-melanoma skin tumors measured by laser Doppler perfusion imaging. *Br J Dermatol.* 1997;136:184-9.

- 232. Fijan S, Hönigsmann H, Ortel B. Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolaevulinic acid and desferrioxamine. *Br J Dermatol.* 1995;133:282-8.
- 233. Fink-Puches R, Soyer HA, Hofer A, Kerl H, Wolf P. Long-term follow-up and histological changes of superficial nonmelanoma skin cancers treated with topical delta-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Arch Dermatol.* 1998;134:821-6.
- 234. Wennberg A-M, Lindholm L-E, Alpsten M, Larkö O. Treatment of superficial basal cell carcinomas using topically applied delta-aminolaevulinic acid and a filtered xenon lamp. *Arch Dermatol Res.* 1996;288:561-4.
- 235. Calzavara-Pinton PG. Repetitive photodynamic therapy with topical delta-aminolaevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumors. *J Photochem Photobiol B.* 1995;29:53-7.
- 236. Neumann NJ, Hanneken S, Ruzicka T, Lehmann P. Phototoxicity of exogenous protoporphyrin IX and delta-aminolevulinic acid in the photo hen's egg test. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2004;20:224-9.
- 237. Wennberg A-M, Larkö O, Lönnroth P, Larson G, Krogstad A-L. Delta-aminolevulinic acid in superficial basal cell carcinomas and normal skin – a microdialysis and perfusion study. *Clin Exp Dermatol.* 2000;25:317-22.

- 238. Spicer MS, Goldberg DJ. Lasers in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 1996;34:1-25.
- 239. Malik Z, Kostenich G, Roitman L, Ehrenberg B, Orenstein A. Topical application of 5-aminolevulinic acid, DMSO and EDTA: protoporphyrin IX accumulation in skin and tumors of mice. *J Photochem Photobiol B.* 1995;28:213-8.
- 240. Jeffes EW, McCullough JL, Weinstein GD, Fergin PE, Nelson JS, Shull TF, et al. Photodynamic therapy of keratosis with topical 5-aminolevulinic acid. *Arch Dermatol* 1997;133:727-32.
- 241. Larko O. Photodynamic therapy *Australasian J Dermatol.* 2005;46:S1-S2.
- 242. Hurlimann AF, Hanggi G, Panizzon RG. Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinomas using topical 5-aminolevulinic acid in naocolloid lotion. *Dermatology.* 1998;197:248-54.
- 243. Kennedy JC, Marcus SL, Pottier RH. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results. *J Clin Laser Med Surg.* 1996;14:289-304.
- 244. Morton CA, Brown SB, Collins S, Ibbotson S, Jenkinson H, Kurwa H, et al. Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br J Dermatol.* 2002;146:552-67.

- 245. Dijkstra AT, Majoie IML, van Dongen JWF, van Weelden H, van Vloten WA. Photodynamic therapy with violet light and topical 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic keratosis, Bowen's disease and basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2001;15:550-4.
- 246. Soler AM, Warloe T, Tausjo J, Berner A. Photodynamic therapy by topical aminolevulinic acid, dimethylsulphoxide and curettage in nodular basal cell carcinoma: a one-year follow-up study. *Acta Derm Venereol*. 1999;79:204-6.
- 247. De Rosa FS, Marchetti JM, Thomazini JA, Tedesco AC, Lopes MV, Bentley B. A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethyl sulfoxide on 5-aminolevulinic acid *in vitro* cutaneous permeation and *in vivo* photoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy. *J Cont Rel* 2000;65:359-66.
- 248. Turchiello RF, Vena FCB, Maillard P, Souza CS, Bentley MVLB, Tedesco AC. Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and m-THPC in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B: Biol*. 2003;70:1-6.
- 249. Bourre L, Thibaut S, Briffaud A, Lajat Y, Patrice T. Potential efficacy of a 5-aminolevulinic acid thermosetting gel formulation for use in photodynamic therapy of lesions of the gastrointestinal tract. *Pharmacol Res*. 2002;45:159-65.

250. Tsai JC, Chiang CP, Chen HM, Huang SB, Wang CW, Lee MI, et al. Photodynamic therapy of oral dysplasia with topical 5-aminolevulinic acid and light-emitting diode array. *Lasers Surg Med*. 2004;34:18-24.
251. Casas A, Fukuda H, Di Venosa G, Del AM, Batlle C. The influence of the vehicle on the synthesis of porphyrins after topical application of 5-aminolevulinic acid, implications in cutaneous photodynamic sensitisation. *Br J Dermatol*. 2000;143:564-72.
252. Casas A, Perotti C, Saccoliti M, Fukuda H, Del AM, Batlle C. ALA and ALA hexyl ester in free and liposomal formulations for the photosensitisation of tumour organ cultures. *Br J Cancer* 2002;86:837-42.
253. Hillemanns P, Untch M, Dannecker C, Baumgartner R, Stepp H, Diebold J, et al. Photodynamic therapy of vulvar intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 2000;85:649-53.
254. DUSA Pharmaceuticals. 2001. Available at: <http://www.dusapharma.com>. Accessed 25 November 2001.
255. Rhodes LE, Tsoukas MM, Anderson RR, Kollias N. Iontophoretic delivery of ALA provides a quantitative model for ALA pharmacokinetics and PpIX phototoxicity in human skin. *J Invest Dermatol*. 1997;108:87-91.
256. Star WM, Aalders MCG, Sac A, Sterenborg JCM. Quantitative model calculation of the time-dependent protoporphyrin IX concentration in

- normal human epidermis after delivery of ALA by passive topical application or iontophoresis. *Photochem Photobiol.* 2002;75:429-32.
257. Boddé HE, Roemelé PEH, Star WM. Quantification of topically delivered 5-aminolevulinic acid by iontophoresis across ex vivo human stratum corneum. *Photochem Photobiol.* 2002;75:418-23.
258. Johnson PG, Hui SW, Oseroff AR. Electrically enhanced percutaneous delivery of delta-aminolevulinic acid using electric pulses and a DC potential. *Photochem Photobiol.* 2002; 75:534-40.
259. Battah AS, O'Neil S, Edwards C, Balaratnam S, Dobbin P, MacRobert AJ. Enhanced porphyrin accumulation using dendritic derivatives of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy: an in vitro study. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:1382-92.
260. Pourzand C, Reelfs O, Kvam E, Tyrrell RM. The iron regulatory protein can determine the effectiveness of 5-aminolevulinic acid in inducing protoporphyrin IX in human primary skin fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1999;112:419-25.
261. Ninomiya Y, Itoh Y, Henta T, Tajima S, Ishibashi A. Photodynamic diagnosis of basal cell carcinoma on the lower eyelid using topical 5-aminolaevulinic acid and desferrioxamine. *Br J Dermatol.* 1999;141:580-1.
262. Elfsson B, Wallin I, Eksborg S, Rudaeus K, Ros AM, Ehrsson H. Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution. *Eur J Pharm Sci.* 1999;7:87-91.

- 263. Bunke A, Zerbe O, Schmid H, Burmeister G, Merkle HP, Gander B. Degradation mechanism and stability of 5-aminolevulinic acid. *J Pharm Sci.* 2000;89:1335-41.
- 264. Gadmar OB, Moan J, Scheie E, Ma L-W, Peng Q. The stability of 5-aminolevulinic acid in solution. *J Photochem Photobiol B.* 2002;67:187-93.
- 265. Ziolkowski P, Osiecka BJ, Oremek G, Siewinski M, Symonowicz K, Salej Y, et al. Enhancement of photodynamic therapy by use of aminolevulinic acid/glycolic acid drug mixture. *J Exp Ther Oncol.* 2004;4:121-9.
- 266. Cappugi P, Campolmi P, Mavilio L, Prignano F, Rossi R. Topical 5-aminolevulinic acid and photodynamic therapy in dermatology: a minireview. *J Chemother.* 2001;13:494-9.
- 267. Bissonnette R, Sharfaei S, Viau G, Liu Y. Irradiance and light dose influence histological localization of photodamage induced by photodynamic therapy with aminolaevulinic acid. *Br J Dermatol.* 2004;151:653-5.
- 268. Babilas P, Schacht V, Liebsch G, Wolfbeis OS, Landthaler M, Szeimies R-M, et al. Effects of light fractionation and different fluence rates on photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid in vivo. *Br J Cancer.* 2003;88:1462-9.
- 269. Robinson DJ, Collins P, Stringer MR, Vernon DI, Stables GI, Brown SB, et al. Improved response of plaque psoriasis after multiple

- treatments with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Acta Derm Venereol.* 1999;79:451-5.
270. van den Boogert J, van Staveren HJ, de Bruin RWF, Eikelaar JHR, Siersema PD, van Hillegersberg R. Photodynamic therapy for esophageal lesions: selectivity depends on wavelength, power, and light dose. *Ann Thorac Surg.* 1999;68:1763-9.
271. Robinson DJ, de Bruijn HS, Star WM, Sterenborg HJCM. Dose and timing of the first light fraction in two-fold illumination schemes for topical ALA-mediated photodynamic therapy of hairless mouse skin. *Photochem Photobiol.* 2003;77:319-3.
272. Karrer S, Bäumlér W, Abels C, Hohenleutner U, Landthaler M, Szeimies R-M. Long-pulse dye laser for photodynamic therapy: investigations in vitro and in vivo. *Lasers Surg Med.* 1999;25:51-9.
273. Fritsch C, Goerrz G, Ruzicka T. Photodynamic therapy in Dermatology. *Arch. Dermatol.* 1998;134:207-14.
274. Kormeili T, Yamauchi PS, Lowe NJ. Topical photodynamic therapy in clinical dermatology. *Br J Dermatol.* 2004;150:1061-9.
275. Lang K, Schulte K-W, Ruzicka T, Fritsch C. Aminolevulinic acid (Levulan) in photodynamic therapy of actinic keratoses. *Skin Therapy Lett.* 2001;6:1-2.

- 276. Varma S, Wilson H, Kurwa HA, Gambles B, Charman C, Pearse AD, et al. Bowen's disease, solar keratoses and superficial basal cell carcinomas treated by photodynamic therapy using a large-field incoherent light source. *Br J Dermatol.* 2001;144:567-74.
- 277. Brown SB. The role of light in the treatment of non-melanoma skin cancer using methyl aminolevulinate. *J Dermatolog Treat.* 2003;14(suppl.3):11-4. Review.
- 278. Clark C, Bryden A, Dawe R, Moseley R, Ferguson J, Ibbotson SH. Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparison of light sources. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003;19:134-41.
- 279. Juzeniene A, Juzenas P, Ma LW, Iani V, Moan J. Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2004;19:139-49.
- 280. Piacquadio DJ, Chen DM, Farber HF, et al. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. *Arch Dermatol.* 2004;40:41-4.
- 281. Nielsen KP, Juzeniene A, Juzenas P, Stammes K, Stamnes JJ, Moan J. Choice of optimal wavelength for PDT: the significance of oxygen depletion. *Photochem Photobiol.* 2005;81:1190-4.

282. Key DJ. Aminolevulinic acid-pulsed dye laser photodynamic therapy for the treatment of photoaging. *Cosm Derm.* 2005;18:31-6.
283. Eleouet S, Rousset N, Carre J, Bourre L, Vonarx V, Lajat Y, et al. In vitro fluorescence, toxicity and phototoxicity induced by delta-aminolevulinic acid (ALA) or ALA-esters. *Photochem Photobiol.* 2000;71:447-54.
284. Soler AM, Warloe T, Berner A, Giercksky KE. A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5-aminolaevulinate-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. *Br J Dermatol.* 2001;145:467-71.
285. De Rosa FS, Tedesco AC, Lopez RF, Pierre MB, Lange N, Marchetti JM, et al. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. *J Control Release.* 2003;89:261-9.
286. Siddiqui MA, Perry CM, Scott LJ. Topical methyl aminolevulinate. *Am J Clin Dermatol.* 2004;5:127-37.
287. Pariser DM, Lowe NJ, Stewart DM, Jarratt MT, Lucky AW, Pariser RJ, et al. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:227-32.
288. Wennberg A-M. Pain, pain relief and other practical issues in photodynamic therapy. *Australas J Dermatol.* 2005;46:S3-4.

-
289. Monfrecola G, Procaccini EM, D'Onofrio D, Roberti G, Liuzzi R, Staibano S, et al. Hyperpigmentation induced by topical 5-aminolaevulinic acid plus visible light. *J Photochem Photobiol B*. 2002;68:147-55.
290. Gilson D, Ash D, Driver I, Feather JW, Brown S. Therapeutic ratio of photodynamic therapy in the treatment of superficial tumors of skin and subcutaneous tissues in man. *Br J Cancer*. 1988; 58:665-7.
291. Mennel S, Callizo J, Meyer CH, Kroll P. Disminución de la agudeza visual tras terapia fotodinámica: estudio mediante tomografía de coherencia óptica y su correlación con la agudeza visual. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2005;80:413-6.
292. Sylantiev C, Schoenfeld N, Mamet R, Groozman GB, Drory VE. Acute neuropathy mimicking porphyria induced by aminolevulinic acid during photodynamic therapy. *Muscle Nerve*. 2005;31:390-3.
293. Webber J, Kessel D, Fromm D. Side effects and photosensitization of human tissues after aminolevulinic acid. *J Surg Res*. 1997;68:31-7.
294. Li JH, Guo ZH, Jin ML, Zhao FY, Cai WM, Gao ML, et al. Photodynamic therapy in the treatment of malignant tumors: an analysis of 540 cases. *J Photochem Photobiol B*. 1990;6:149-55.
295. Patrice T. Challenges for photodynamic therapy in the treatment of gastrointestinal tumours. *J Photochem Photobiol B*. 1991;9:372-4.
296. Kashtan H, Konikoff F, Haddad R, Skornick Y. Photodynamic therapy of cancer of the esophagus using systemic aminolevulinic acid and a

- non laser light source: a phase I/II study. *Gastrointest Endosc.* 1999;49:760-4.
297. Pech O, Gossner L, May A, Rabenstein T, Vieth M, Stolte M, et al. Long-term results of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for superficial Barrett's cancer and high-grade intraepithelial neoplasia. *Gastrointest Endosc.* 2005;62:24-30.
298. Bown SG, Rogowska AZ, Whitelaw DE, Lees WR, Lovat LB, Ripley P, et al. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut.* 2002;50:549-57.
299. Martin-Hirsch PL, Whitehurst C, Buckley CH, Moore JV, Kitchener HC. Photodynamic treatment for lower genital tract intraepithelial neoplasia. *Lancet.* 1998;351:1403.
300. Pahernik SA, Botzlar A, Hillimeanns P, Dellian M, Kirschstein M, Abels C, et al. Pharmacokinetics and selectivity of aminolevulinic acid-induced porphyrin synthesis in patients with cervical intra-epithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 1998;78:310-4.
301. Keefe KA, Tadir Y, Tromberg B, Berns M, Osann K, Hashad R, et al. Photodynamic therapy of high-grade cervical intraepithelial neoplasia with 5-aminolevulinic acid. *Lasers Surg Med.* 2002;31:289-93.
302. Wyss P, Caduff R, Tadir Y, Degen A, Wagnières G, Schwarz V, et al. Photodynamic endometrial ablation: morphological study. *Lasers Surg Med.* 2003;32:305-9.

303. Lang K, Bolsen K, Stahl W, Ruzicka T, Sies H, Lehmann P, et al. The 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin biosynthesis in benign and malignant cells of the skin. *J Photochem Photobiol B*. 2001;65:29-34.
304. Engbrecht BW, Menon C, Kachur AV, Hahn SM, Fraker DL. Photofrin-mediated photodynamic therapy induces vascular occlusion and apoptosis in a human sarcoma xenograft model. *Cancer Res*. 1999;59:4334-42.
305. Bisland SK, Lilge L, Lin A, Rusnov R, Wilson BC. Metronomic photodynamic therapy as a new paradigm for photodynamic therapy: rationale and preclinical evaluation of technical feasibility for treating malignant brain tumors. *Photochem Photobiol*. 2004;80:22-30.
306. Kirdaite G, Lange N, Busso N, van den Bergh H, Kucera P, So A. Photoporphyrin IX photodynamic therapy for synovitis. *Arthritis Rheum*. 2002;46:1371-8.
307. van der Meulen FW, Ibrahim K, Sterenborg HJCM, Alphen LV, Maikoe A, Dankert J. Photodynamic destruction of *Haemophilus parainfluenzae* by endogenously produced porphyrins. *J Photochem Photobiol B*. 1997;40:204-8.
308. Szocs K, Gabor F, Csik G, Fidy J. Delta-Aminolaevulinic acid-induced porphyrin synthesis and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* B. *J Photochem Photobiol B*. 1999; 50:8-17.

- 309. Stables GI, Stringer MR, Robinson DJ, Ash DV. Erythroplasia of Queyrat treated by topical aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 1999;140:514-7.
- 310. Karrer S, Szeimies R-M, Hohenleutner U, Heine A, Landthaler M. Unilateral localized basaliomatosis: treatment with topical photodynamic therapy after application of 5-aminolevulinic acid. *Dermatology.* 1995;190:218-22.
- 311. Marmur ES, Phelps R, Goldberg DJ. Ultrastructural changes seen after ALA-IPL photorejuvenation: a pilot study. *J Cosmet Laser Ther.* 2005;7:21-4.
- 312. Oseroff AR, Shieh S, Frawley NP, Cheney R, Blumenson LE, Pivnick EK, et al. Treatment of diffuse basal cellcarcinomas and basaloid follicular hamartomas in nevoid basal cell carcinoma syndrome by wide-area 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Arch Dermatol.* 2005;141:60-7.
- 313. Usmani N, Stables GI, Telfer NR, Stringer MR. Subungual Bowen's disease treated by topical aminolevulinic acid-protodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53:S273-6.
- 314. Karrer S, Szeimies RM, Hohenleutner U, Landthaler M. Role of lasers and photodynamic therapy in the treatment of cutaneous malignancy. *Am J Clin Dermatol.* 2001;2:229-37.
- 315. Morton CA. Topical photodynamic therapy in dermatology. *S Afr Med J.* 2001;91:634-7.

- 316. Morton CA. The emerging role of 5-ALA-PDT in dermatology: is PDT superior to standard treatments? *J Dermatolog Treat.* 2002;13(suppl.1):S25-9.
- 317. Jeffes EW. Levulan: the first approved topical photosensitizer for the treatment of actinic keratosis. *J Dermatolog Treat.* 2002;13(suppl.1):S19-S23.
- 318. Szeimies R-M, Karrer S, Radakovic-Fijan S, Tanew A, Calzavara-Pinton PG, Zane C, et al. Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol.* 2002;47:258-62.
- 319. Salim A, Leman JA, McColl JH, Chapman R, Morton CA. Randomized comparison of photodynamic therapy with topical 5-fluorouracil in Bowen's disease. *Br J Dermatol.* 2003;148:539-43.
- 320. Epstein E. Evidence-based evaluation of photodynamic therapy of actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:304; author reply 304-6.
- 321. Vereecken P, Laporte M, Awada A, Velu T, Heenen M. Thérapie photodynamique topique en cancérologie cutanée. *Rev Med Brux.* 2004;25:512-20.
- 322. Wang I, Bauer B, Andersson-Engels S, Svanberg S, Svanberg K. Photodynamic therapy utilising topical delta-aminolevulinic acid in non-melanoma skin malignancies of the eyelid and the periocular skin. *Acta Ophtalmol Scand.* 1999;77:182-8.

323. Warloe T, Peng Q, Moan J, Qvist HL, Giercksky KE. Photochemotherapy of multiple basal cell carcinoma with endogenous porphyrins induced by topical application of 5-aminolevulinic acid. In: Spinelli ,dal Fante M, Marchesini R. Editors. Photodynamic Therapy and biomedical lasers. Amsterdam:Elsevier Science B.V.; 1992. p.449-53.
324. Pennington DG, Waner M, Knox A. Photodynamic therapy for multiple skin cancers. *Plast. Reconstr. Surg.* 1988;82:1067-71.
325. Tosca AD, Balas CJ, Stefanidou MP, Katsantonis JC, Georgiou SK, Tzardi MN. Photodynamic treatment of skin malignancies with aminolevulinic acid. Emphasis on anatomical observations and in vivo erythema visual assessment. *Dermatol Surg.* 1996;22:929-34.
326. Morton CA, MacKie RM, Whitehurst C, Moore JV, McColl JH. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: effect of tumor thickness and duration of photosensitizer application on response. *Arch Dermatol.* 1998;134:248-9.
327. Nestor MS, Gold MH, Kauvar ANB, Taub AF, Geronemus RG, Ritvo EC, et al. The use of photodynamic therapy in dermatology: results of a consensus conference. *J Drugs Dermatol.* 2006;5:140-54.
328. Gold MH. Intense pulsed light therapy for photorejuvenation enhanced with 20% aminolevulinic acid photodynamic therapy. *J Lasers Med Surg.* 2003;15(Suppl):47.

- 329. Goldman MP, Atkin D, Kincad S. PDT/ALA in the treatment of actinic damage: real world experience. *J Lasers Med Surg.* 2002;14(Suppl):24.
- 330. Avram DK, Goldman MP. Effectiveness and safety of ALA-IPL in treating actinic keratoses and photodamage. *J Drugs Dermatol.* 2004;3(1 Suppl.):S36-9.
- 331. Bhatia AC, Dover JS. Adjunctive use of topical aminolevulinic acid with intense pulsed light in the treatment of photoaging. Presentation – Controversies and Conversations in Cutaneous Laser Surgery. Mt. Tremblant, Canada. 2004.
- 332. Alster TS, Tanzi EL, Welsh EC. Photorejuvenation of facial skin with topical 20% 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light treatment: a split-face comparison study. *J Drugs Dermatol.* 2005; 4:35-8.
- 333. Dover JS, Bhatia AC, Stewart B, Arndt KA. Topical 5-aminolevulinic acid combined with intense pulsed light in the treatment of photoaging. *Arch Dermatol.* 2005;141:1247-52.
- 334. Tarstedt M, Rosdahl I, Berne B, Svanberg K, Wennberg AM. A randomized multicenter study to compare two treatment regimens of topical methyl aminolevulinate (Metvix)-PDT in actinic keratosis of the face and scalp. *Acta Derm Venereol.* 2005;85:424-8.
- 335. Dragieva G, Prinz BM, Hagner J, Dummer R, Burg G, Binswanger U, et al. A randomized controlled clinical trial of topical photodynamic therapy with methyl aminolaevulinate in the treatment of actinic

-
- keratoses in transplant recipients. *Br J Dermatol.* 2004;151:196-200.
336. Wulf HC, Pavel S, Stender I, Ahb Bakker-wensveen C. Topical photodynamic therapy for prevention of new skin lesions in renal transplant recipients. *Acta Derm Venereol.* 2006;86:25-8.
 337. Rhodes LE, Rie M, Enstrom Y, Groves R, Morken T, Goulden V, et al. Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate vs surgery for nodular basal cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 2004;140:17-23.
 338. Lee MR, Ryman W. Erythroplasia of queyrat treated wih topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy. *Australasian J Dermatol.* 2005;46:196-8.
 339. Vinciullo C, Elliott T, Francis D, Gebauer K, Spelman L, Nguyen R, et al. Photodynamic therapy with topical methyl aminolaevulinate for 'difficult-to-treat' basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2005;152:765-72.
 340. Sharfaei S, Juzenas P, Moan J, Bissonnette R. Weekly topical application of methyl aminolevulinate followed by loght exposure delays the appearance of UV-induced skin tumours in mice. *Arch Dermatol Res.* 2002;294:237-42.
 341. Caty V, Liu Y, Viau G, Bossinnette R. Multiple large surface photodynamic therapy sessions with topical methylaminolaevulinate in PTCH heterozygous mice. *Br J Dermatol.* 2006;154:740-2.
 342. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Capezzera R, Sala R, Zane C. Photodynamic therapy of interdigital mycoses of the feet with topical

-
- application of 5-aminolevulinic acid. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2004;20:144-7.
343. Dierickx CC, Goldenhersh M, Dwyer P, Stratigos A, Mihm M, Anderson RR. Photodynamic therapy for nevus -aminolevulinic acid. *Arch Dermatol*. 1999;135:637-40.
344. Karrer S, Abels C, Wimmershoff MB, Landthaler M, Szeimies R-M. Successful treatment of cutaneous sarcoidosis using topical photodynamic therapy. *Arch Dermatol*. 2002;138:581-4.
345. Nayeemuddin FA, Wong M, Yell J, Rhodes E. Topical photodynamic therapy in disseminated superficial actinic porokeratosis. *Clin Exp Dermatol*. 2002;27:703-6.
346. Evans AV, Robson A, Barlow RJ, Kurwa HA. Treatment of port wine stains with photodynamic therapy, using pulsed dye laser as a light source, compared with pulsed dye laser alone: a pilot study. *Lasers Surg Med*. 2005;36:266-9.
347. Ruiz-Rodriguez R, Alvarez JG, Jaén P, Acevedo A, Córdoba S. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for recalcitrant familial benign pemphigus (Hailey-Hailey disease). *J Am Acad Dermatol*. 2002;47:740-2.
348. Clark SM, Mills CM, Lanigan SW. Treatment of keratosis pilaris atrophicans with the pulsed tunable dye laser. *J Cutan Laser Ther*. 2000;2:151-6.
349. Richey DF, Hopson B. Treatment of perioral dermatitis by

- photodynamic therapy. *J Drugs Dermatol*. 2006;5(suppl.1):
350. Henta T, Itoh Y, Kobayashi M, Ninomiya Y, Ishibashi A. Photodynamic therapy for inoperable vulval Paget's disease using delta-aminolaevulinic acid: successful management of a large skin lesion. *Br J Dermatol*. 1999; 141:347-9.
351. Edström DW, Porwit A, Ros A-M. Photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid for mycosis fungoides: clinical and histological response. *Acta Derm Venereol*. 2001;81:184-8.
352. Leman JA, Dick DC, Morton CA. Topical 5-ALA photodynamic therapy for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Exp Dermatol*. 2002;27:516-8.
353. Tzung TY, Wu KH, Wu JC, Tseng HH. Primary cutaneous plasmacytosis successfully treated with topical photodynamic therapy. *Acta Derm Venereol*. 2005;85:542-3.
354. Takeda H, Kaneko T, Harada KM, Matsuzaki Y, Nakano H, Hanada K. Successful treatment of lymphadenosis benigna cutis with topical photodynamic therapy with delta-aminolevulinic acid. *Dermatology*. 2005;211:264-6.
355. Ortner MA, Zumbusch K, Liebetruhl J, Ebert B, Fleige B, Diete ML, et al. Is topical delta-aminolevulinic acid adequate for photodynamic therapy in Barrett's esophagus? A pilot study. *Endoscopy*. 2002;34:611-6.

- 356. Chen HM, Chen CT, Yang H, Lee MI, Kuo MP, Kuo YS, et al. Successful treatment of an extensive verrucous carcinoma with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *J Oral Pathol Med.* 2005;34:253-6.
- 357. Chen HM, Yu CH, Tu PC, Yeh CY, Tsai T, Chiang CP. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia and oral leukoplakia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 2005;37:114-22.
- 358. Han I, Jun SM, Kim SK, Kim M, Kim JC. Expression pattern and intensity of protoporphyrin IX induced by liposomal 5-aminolevulinic acid in rat pilosebaceous unit throughout hair cycle. *Arch Dermatol Res.* 2005;297:210-7.
- 359. Bissonnette R, Shapiro J, Zeng H, McLean DI, Lui H. Topical photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid does not induce hair regrowth in patients with extensive alopecia areata. *Br J Dermatol.* 2000;143:1032-5.
- 360. Stringer MR, Collins P, Robinson DJ, Stables GI, Sheehan-Dare RA. The accumulation of protoporphyrin IX in plaque psoriasis after topical application of 5-aminolevulinic acid indicates a potential for superficial photodynamic therapy. *J Invest Dermatol.* 1996;107:76-81.
- 361. Collins P, Robinson DJ, Stringer MR, Stables GI, Sheehan-Dare RA. The variable response of plaque psoriasis after a single treatment with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol.*

- 1997;137:743-9.
362. Bissonnette R, Zeng H, McLean DI, Korbélik M, Lui H. Oral aminolevulinic acid induces photoporphyrin IX fluorescence in psoriatic plaques and peripheral blood cells. *Photochem Photobiol.* 2001;74:339-45.
363. Fergin P. Photodynamic therapy of dermatoses other than non-melanoma skin cancer. *Australas J Dermatol.* 2005;46:S27.
364. Stender I-M, Lock-Andersen J, Wulf HC. Recalcitrant hand and foot warts successfully treated with photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid: a pilot study. *Clin Exp Dermatol.* 1999;24:154-9.
365. Stender I-M, Wulf HC. Photodynamic therapy of recalcitrant warts with 5-aminolevulinic acid: a retrospective analysis. *Acta Derm Venereol.* 1999;79:400-1.
366. Gold MH, Boring MM, Bridges TM, Bradshaw VL. The successful use of ALA-PDT in the treatment of recalcitrant molluscum contagiosum. *J Drugs Dermatol.* 2004;3:187-90.
367. Karrer S, Szeimies R-M, Abels C, Wlotzke U, Stolz W, Landthaler M. Epidermodysplasia verruciformis treated using topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 1999;140:935-8.(b)
368. Fehr MK, Chapman CF, Krasieva T, Tromberg BJ, McCullough JL, Berns MW, et al. Selective photosensitizer distribution in vulvar condyloma acuminatum after topical application of 5-aminolevulinic

- acid. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174:951-7.
369. Ross EV, Romero R, Kollias N, Crum C, Anderson RR. Selectivity of protoporphyrin IX fluorescence for condylomata after topical application of 5-aminolaevulinic acid: implications for photodynamic treatment. *Br J Dermatol.* 1997;137:736-42.
370. Wang XL, Wang HW, Wang HS, Xu SZ, Liao KH, Hillemanns P. Topical 5-aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of urethral condylomata acuminata. *Br J Dermatol.* 2004;151:880-5.
371. Veien NK, Wettermark G, Genner J, Brodthagen H. Photodynamic inactivation of verrucae vulgares. *Acta Dermatovener.* 1977;57:441-4.
372. Escudero A, Nagore E, Sevilla A, Sanmartin O, Botella R, Guillen C. Chronic X-ray dermatitis treated by topical 5-aminolaevulinic acid-photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2002;147:394-6.
373. Szeimies R-M, Landthaler M, Karrer S. Non-oncologic indications for ALA-PDT. *J Dermatolog Treat.* 2002;13(suppl 1):S13-8.
374. Kriby B, Whitehurst C, Moore JV, Yates VM. Treatment of lichen planus of the penis with photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 1999;141:765-6.
375. Gardlo K, Horska Z, Enk CD, Rauch L, Megahed M, Ruzicka T, et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:893-6.
376. Amari N, Ando I, Wakigawa M. Photodynamic therapy for thinophyma. *J Dermatol.* 2004;31:771-2.

- 377. Hillemanns P, Untch M, Pröve F, Baumgartner R, Hillemanns M, Korell M. Photodynamic therapy of vulvar lichen sclerosus with 5-aminolevulinic acid. *Obstet Gynecol.* 1999;93:71-4.
- 378. Jayasree RS, Gupta AK, Rathinam K, Mohanan PV, Mohanty M. The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. *J Biomater Appl.* 2001;15:176-86.
- 379. Chan BP, Kochevar IE, Redmond RW. Enhancement of porcine skin graft adherence using a light-activated process. *J Surg Res.* 2002;108:77-84.
- 380. Hongcharu W, Taylor CR, Chang Y, Aghassi D, Suthamjariya K, Anderson RR. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. *J Invest Dermatol.* 2000;115:183-92.
- 381. Itoh Y, Ninomiya Y, Tajima S, Ishibashi A. Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical delta-aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients. *Br J Dermatol.* 2001; 144:575-9.
- 382. Tuchin VV, Genina EA, Bashkatov AN, Simonenko GV, Odoevskaya OD, Altshuler GB. A pilot study of ICG laser therapy of acne vulgaris: photodynamic and photothermolysis treatment. *Lasers Surg Med.* 2003;33:296-310.
- 383. Taub AF. Photodynamic therapy for the treatment of acne: a pilot study. *J Drugs Dermatol.* 2004;3(6 suppl.):S10-4.
- 384. Gold MH, Bradshaw VL, Boring MM, Bridges TM, Biron JA, Lewis TL. Treatment of sebaceous gland hyperplasia by photodynamic therapy

-
- with 5-aminolevulinic acid and a blue light source or intense pulsed light source. *J Drugs Dermatol*. 2004; 3(6 suppl.):S6-9.
385. Melnick S. Case reports: cystic acne improved by photodynamic therapy with short-contact 5-aminolevulinic acid and sequential combination of intense pulsed light and blue light activation. *J Drugs Dermatol*. 2005;...:742-5.
386. Nouri K, Ballard CJ. Laser therapy for acne. *Clin Dermatol*. 2006;24:26-32.
387. Kosaka S, Kawana S, Zouboulis CC, Hasan T, Ortel B. Targeting of sebocytes by aminolevulinic acid-dependent photosensitization. *Photochem Photobiol*. 2006;82:453-7.
388. Pollock B, Turner D, Stringer MR, Bojar RA, Goulden V, Stables GI, et al. Topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris: a study of clinical efficacy and mechanism of action. *Br J Dermatol*. 2004;151:616-22.
389. Kimura M, Itoh Y, Tokuoka Y, kawashima N. Delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for acne on the body. *J Dermatol*. 2004;31:956-60.
390. Santos MA, Belo VG, Santos G. Effectiveness of photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light versus intense pulsed light alone in the treatment of acne vulgaris: comparative study. *Dermatol Surg*. 2005;31:910-5.
391. Strauss RM, Pollock B, Stables GI, Goulden V, Cunliffe WJ.

- Photodynamic therapy using aminolaevulinic acid does not lead to clinical improvement in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol.* 2005;152:803-29.
392. Alexiades-Armenakas MR, Geronemus RG. Laser-mediated photodynamic therapy of actinic keratoses. *Arch Dermatol.* 2003;139:1313-20.
393. Alam M, Dover JS. Treatment of photoaging with topical aminolevulinic acid and light. *Skin Therapy Lett.* 2004;9:7-9.
394. Hall JA, Keller PJ, Keller GS. Dose response of combination photorejuvenation using intense pulsed light-activated photodynamic therapy and radiofrequency energy. *Arch Facial Plast Surg.* 2004;6:374-8.
395. Lowe NJ, Lowe PL. A pilot study to determine the efficacy of ALA-PDT photorejuvenation for the treatment of facial aging. *J Cos Laser Ther.* Dec. 2005.
396. Gold MH. Aminolevulinic acid photodynamic therapy: medical evidence for its expanded use. *Expert Rev Med Devices.* 2006;3:357-71.
397. Fitzpatrick TB The validity and practicability of sunreactive skin types I through VI. *Arch Dermatol.* 1988;124:869-71.
398. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.*

- 1981;29:577-88.
399. Lang K, Lehmann P, Bolsen K, Ruzicka T, Fristsch C. Aminolevulinic acid: pharmacological profile and clinical indication. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001;10:1139-56.
400. Morton CA. Photodynamic Therapy for nonmelanoma skin cancer-and more?. *Arch Dermatol*. 2004;140:116-9.
401. Naumann M, Toyka KV, Mansouri T, Taleghani BM, Ahmadpour J, Reiners K, et al. Depletion of neutralizing antibodies resensitises a secondary non-responder to botulinum A neurotoxin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;65:924-7.
402. Findlay GM, Maccallum FO. Recurrent traumatic herpes. *Lancet*. 1940;1:259.
403. Meski APG. Estudo comparativo da pele pré e pós quimioablação para tratamento de ritides da região perioral: avaliação clínica e imunohistoquímica. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2005.
404. Miyauchi S, Hashimoto K. Epidermal Langerhans cells undergo mitosis during the early recovery phase after ultra-violet B irradiation. *J Invest Dermatol*. 1987;88:703-8.
405. Ghaznawie M, Papadimitriou JM, Heenan PJ. The repopulation of murine Langerhans cells after depletion by mild heat injury. *Br J Dermatol*. 1999;141:206-10.
406. Holzmann S, Koch F, Stroitzner P, Schmuth M, Janke K, Fritsch P, et

- al. Tape stripping leads to emigration of Langerhans cells from the epidermis, their entry into afferent lymphatics in vivo, and allows immigration of progenitors. *J Invest Dermatol.* 2000;114:228.
407. Yamamoto Y, Uede K, Sakai A, Furukawa F. Change of epidermal Langerhans cells in chemical peeled skin. *J Invest Dermatol.* 2003;121:1244.
408. Calin MA, Gruia ML, Herascu N, Coman T The monitoring of the accumulation of protoporphirin IX in Walker tumours by subcutaneous administration of 5-aminolevulinic acid. *J Exp Ther Onc.* 2004;4:247-51.