Yuri Nogueira Chaves

**Avaliação da eficácia da terapia fotodinâmica
no tratamento de queilite actínica**

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Cyro Festa Neto

**São Paulo
2014**

DEDICATÓRIA

À Maria Júlia, minha melhor amiga, parceira, cúmplice, fonte de inspiração, enfim minha mãe, que teve sua existência precocemente interrompida num acidente.

À Daniela, minha esposa, pela dedicação e abdicação sempre em meu favor.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Cyro Festa Neto, pelo acolhimento, incentivo, e principalmente pela inspiração deste verdadeiro ídolo. Obrigado pela orientação neste trabalho.

Ao Dr. Luis A. Torezan, um exemplo de profissional e pessoa, pelos ensinamentos e pela amizade construída ao longo desse trabalho.

À Dra. Silvia Lourenço, pelos ensinamentos e pela ajuda crucial na conclusão deste trabalho.

À Dra. Mirian N. Soto, pela paciência, ajuda e disponibilidade oferecidas sempre.

Às funcionárias Eli, Rosilda e Márcia pela ajuda e paciência.

LISTA DE ABREVIATURAS

5- ALA	ácido 5-delta aminolevulínico
8-MOP	metoxipsoraleno
AP-1	proteína ativadora-1
CBC	carcinoma basocelular
CPNM	câncer de pele não melanoma
CDP	dímero ciclobutano-pirimidina
CEC	carcinoma espinocelular
CGA	campo de grande aumento
COX-2	ciclooxigenase-2
DISC	complexo sinalizador da morte celular
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido dietilaminotetracético
DMSO	dimetilssulfóxido
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
IHQ	imunoistoquímica
LED	diodo que emite luz
LIP	luz intensa pulsada
MAL	metilaminolevulinato
MAPK	proteína-quinase ativadora de mitose
MMP	metaloproteinase da matriz extra-celular
NADH	nicotinamida adenine dinucleotídeo
NF-kB	fator nuclear Kb
Nm	nanômetro
ODC	ornitina decarboxilase
PBG	porfobilinogêneo
PGE-2	prostaglandina E-2
PP	foto-produto pirimidina-pirimidona
PpIX	protoporfirina IX
QA	queilite actínica
ROS	radicais reativos de oxigênio
TFD	terapia fotodinâmica
TNF	fator de necrose tumoral
TRAIL	proteína ligadora indutora de apoptose relacionada ao TNF
UV	ultra-violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Queilite actínica.....	5
2.1.1 Conceito.....	5
2.1.2 Anatomia.....	5
2.1.3 Etiologia.....	5
2.2 Papel da radiação UV na carcinogênese.....	6
2.3 Mecanismos de prevenção celular induzidos pelo UV.....	9
2.4 Terapia fotodinâmica.....	13
2.4.1 Fontes de Luz na terapia fotodinâmica.....	22
2.5 Terapia fotodinâmica na queilite actínica.....	24
2.6 Marcadores moleculares.....	27
3 OBJETIVOS.....	29
4 MÉTODOS.....	31
4.1 Pacientes.....	32
4.2 Protocolo de tratamento.....	32
4.3 Análise clínica.....	33
4.4 Análise histopatológica e imunoistoquímica.....	34
4.5 Análise estatística.....	36
5 RESULTADOS.....	37
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÕES.....	54
8 ANEXOS.....	56
9 REFERÊNCIAS.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de defesa celular contra ação UV.....	10
Figura 2. Ação da radiação UV na pele, mecanismos de defesa e carcinogênese.....	12
Figura 3. Espectro de absorção da protoporfirina IX.....	15
Figura 4. Cadeia de biossíntese do grupo heme.....	17
Figura 5. Pacientes selecionados para biópsia e excluídos no decorrer do estudo.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Publicações com TFD para tratamento de queilite actínica.....	26
Tabela 2. Descrição dos participantes do estudo.....	39
Tabela 3. Resposta clínica após TFD.....	39
Tabela 4. Graus de displasia segundo análise histopatológica antes e após a TFD.....	40
Tabela 5. Resultado da análise imunoistoquímica e antes e após a TFD.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Graus de displasia histopatológica antes e após a TFD.....	40
Gráfico 2. Expressão de survivina antes e após TFD. CGA= campo de grande aumento.....	40
Gráfico 3. Expressão de Ki67 antes e após TFD. CGA= campo de grande aumento.....	41
Gráfico 4. Expressão de p53 antes e após TFD. CGA= campo de grande aumento.....	41

RESUMO

Chaves YN. *Avaliação da eficácia da terapia fotodinâmica no tratamento de queilite actínica* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2014.

INTRODUÇÃO: A queilite actínica é uma neoplasia intra-epitelial do lábio cujas células apresentam alterações semelhantes às aquelas apresentadas pelos carcinomas espinocelulares invasores. O tratamento eficaz dessa moléstia pode evitar sua evolução para carcinoma espinocelular. **OBJETIVO:** Avaliar a eficácia do tratamento da queilite actínica através da clínica, da histopatologia e da imunoistoquímica, usando terapia fotodinâmica com metilaminolevulinato e luz vermelha não coerente. **MÉTODOS:** Vinte e três pacientes com queilite actínica comprovada por exame histopatológico foram submetidos a duas sessões de terapia fotodinâmica com duas semanas de intervalo entre elas. Foram examinados imediatamente após as sessões, quatro, seis e doze semanas após início do tratamento, quando realizavam nova biópsia. Os parâmetros clínicos, histopatológicos e imunoistoquímicos foram avaliados antes e após o tratamento. **RESULTADOS:** Dos 23 pacientes biopsiados, 16 completaram as duas sessões de terapia fotodinâmica e em um paciente o material foi insuficiente para análise imunoistoquímica. Do ponto de vista clínico houve cura completa em 10 pacientes (62,5%), havendo permanência da doença em seis (37,5%). Apesar dessa taxa de cura clínica, não foi observado em nenhum caso cura através da análise histopatológica. Não houve mudança estatisticamente significativa entre os valores de Ki-67, survivina e p53 observados antes e após o tratamento. **CONCLUSÃO:** A terapia fotodinâmica, da maneira realizada nesse estudo, não foi opção terapêutica eficaz para o tratamento das queilites actínicas incluídas nesta amostra.

Descritores: Queilite actínica; Carcinoma espinocelular; Terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

Chaves YN. *Evaluation of the efficacy of photodynamic therapy for the treatment of actinic cheilitis* [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2014.

INTRODUCTION: Actinic cheilitis is a lip intraepithelial neoplasia, whose cells present alterations similar to those presented by invasive squamous cell carcinomas. **OBJECTIVE:** To conduct clinical and laboratory evaluation by histopathology and immunohistochemistry of the efficacy of actinic cheilitis treatment using photodynamic therapy with methyl aminolevulinate and non-coherent red light. **METHODS:** Patients with actinic cheilitis detected by histopathological examination were submitted to two sessions of photodynamic therapy with a two-week interval between them. They were examined immediately after the sessions, four, six and twelve weeks after beginning treatment when a new biopsy was carried out. Clinical histopathological and immunohistochemical parameters were evaluated before and after treatment. **RESULTS:** Of the twenty-three patients who underwent biopsy, sixteen completed two photodynamic therapy sessions and the material of one patient was insufficient for immunohistochemistry. Complete response was achieved in 62,5% (10/16 patients) and 37,5% still remained with clinical evidence of AC. In spite of this, no case of cure by histopathological analysis was found. There was no significant statistical change among the values of Ki-67, survivin and p53 observed before and after treatment. **CONCLUSION:** Photodynamic therapy, as carried out in this trial, was not an efficacious therapeutic option for treating patients with actinic cheilitis included in this sample.

Descriptors: Actinic keilitis; Squamous cell carcinoma; Photodynamic therapy.

1. INTRODUÇÃO

Queilite actínica (QA), foi descrita pela primeira vez por Dubrevilh em 1886 durante o III Congresso Internacional de Dermatologia, como sendo uma lesão pré-maligna. Localizada principalmente no lábio inferior, assemelha-se muito a queratose actínica. Acomete predominantemente homens de pele branca a partir da sexta década de vida. A incidência varia entre os 40 e 80 anos¹, coincidindo com o grupo que apresenta maior risco para desenvolvimento do carcinoma espinocelular (CEC) do lábio.

A luz solar é o principal fator de risco para o desenvolvimento dessas lesões. O lábio é mais susceptível que a pele, pois o epitélio é mais fino, não tem a camada espessa de queratina que a recobre, além de ter menos melanina e menor concentração de glândulas sebáceas e sudoríparas². Outros fatores etiológicos menos relevantes são tabagismo, etilismo^{3,4}, pele clara, higiene bucal precária e traumatismos locais repetidos^{4,5,6}.

Na QA a linha de demarcação nítida do vermelhão do lábio torna-se borrada e a pele logo abaixo perde sua concavidade natural. Com a evolução, áreas de atrofia, leucoplasia, erosão, descamação e úlceras podem surgir. O paciente pode relatar descamação persistente e sensação de secura e queimação no local afetado¹. Na histopatologia, a lesão apresenta epitélio estratificado escamoso atrófico, às vezes com produção de queratina importante. Vários graus de displasia podem ser encontrados⁸. Infiltrado linfocitário inflamatório crônico subjacente ao epitélio displásico geralmente está presente, além de elastose solar e de vasos sanguíneos dilatados na lâmina própria⁷. A intensidade das alterações histopatológicas na QA parece determinar uma associação direta com a severidade da doença e seu potencial de malignização, já que estes achados histopatológicos também são encontrados nos carcinomas espinocelulares invasores do lábio⁹. É importante ressaltar que as alterações histopatológicas não estão distribuídas uniformemente ao longo do lábio, mesmo quando a apresentação clínica é homogênea.

Trata-se de neoplasia intra-epitelial do lábio, podendo evoluir para carcinoma espinocelular (CEC). Ainda não se sabe ao certo a percentagem dessas lesões que desenvolverão CEC. Sabe-se, no entanto que o CEC no lábio

tem quatro vezes mais chances de desenvolver metástases que aquele na pele⁶, portanto um diagnóstico precoce e tratamento efetivo são essenciais.

A terapia padrão da queilite actínica é a vermilionectomia⁸, que consiste em uma intervenção cirúrgica agressiva e que pode deixar seqüela importante com retração do lábio inferior. Crioterapia, ablação com laser de dióxido de carbono, eletrocirurgia, 5-flouracil tópico e ácido tricoloroacético tópico também têm sido usados no tratamento curativo e paliativo. Essas opções, apesar de algumas vezes efetivas, têm vários efeitos adversos indesejáveis^{10,84}.

Terapia fotodinâmica (TFD) consiste na ativação luminosa de um agente fotossensibilizante, que se acumula seletivamente nos tecidos pré-neoplásicos e neoplásicos, para gerar reagentes intermediários de oxigênio. Esses reagentes oxidam irreversivelmente componentes celulares essenciais causando dano tecidual e necrose. As vias celulares e moleculares pelas quais a TFD exerce sua ação permanecem ainda obscuras¹¹.

Apesar de existirem na literatura diversos estudos mostrando a eficácia da TFD no tratamento das queratoses actínicas, o tratamento da queilite actínica com TFD tem sido pouco explorado. Somente poucos estudos fizeram análise histopatológica e não foi encontrado, na literatura aqui revisada, publicação que fizesse análise imunoistoquímica antes e após o tratamento.

O presente estudo pretende avaliar clínica e laboratorialmente, através da histopatologia e imunoistoquímica, os resultados do tratamento da queilite actínica usando terapia fotodinâmica com metil-aminolevulinato (MAL) e luz vermelha não coerente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Queilite actínica

2.1.1 Conceito

A queilite actínica (QA) é uma neoplasia intra-epitelial do lábio cujas células apresentam alterações histopatológicas, moleculares e genéticas semelhantes às apresentadas pelos carcinomas espinocelulares (CEC) invasores, consequente principalmente à exposição solar crônica^{6,85,92}.

2.1.2 Anatomia

O lábio é dividido anatomicamente em três regiões: a pele da área externa, a zona do vermelhão ou semimucosa, e a mucosa. O lábio superior se estende de sua junção com a columela do nariz até o fórnice superior da boca. O lábio inferior se estende do fórnice inferior da boca até a junção com o mento, no sulco mento labial. As comissuras bucais são os ângulos onde a zona superior e inferior do vermelhão se encontram. No vermelhão, as papilas dermais são numerosas, e possuem um rico suprimento de capilares produzindo a coloração vermelha. A zona do vermelhão não contém pêlos ou glândulas sudoríparas e as glândulas sebáceas existem em pequeno número, sendo a membrana mucosa do lábio coberta por um epitélio escamoso estratificado não cornificado¹⁻⁷.

Os lábios ainda são compostos por músculos estriados, que lhes conferem os movimentos, e tecido conjuntivo. Esta disposição anatômica faz com que o vermelhão seja freqüentemente afetado pela radiação solar, especialmente o lábio inferior, por ser geralmente mais protuso¹⁻⁷.

2.1.3 Etiologia

A queilite actínica já foi associada a diversos fatores de risco segundo a literatura, entre eles o tabagismo, a pele clara, o cuidado precário com os dentes,

os traumas locais repetidos e o etilismo^{3,4,5,6}. Sabe-se, no entanto, que entre todos esses fatores a exposição solar crônica é sem dúvida o de maior importância.

2.2 Papel da radiação UV na carcinogênese

O espectro eletromagnético da luz solar pode ser dividido em três tipos de radiação: ultra-violeta (UV), luz visível e luz infra-vermelha. A radiação UV corresponde a cerca de 5% do total da radiação solar e situa-se na faixa entre 100 e 400 nm. Esse espectro é subdividido em três subcategorias: UV-C (100-280 nm), UV-B (280-320 nm) e UV-A (320 a 400 nm). A camada de ozônio absorve com eficiência a radiação UV até 310 nm, ou seja, toda UV-C e cerca de 95% da UV-B¹⁷. Assim, mais de 95% da radiação solar que atinge a Terra é composta por UV-A. Graças ao seu maior comprimento de onda, a radiação UV-A penetra mais profundamente na pele e é capaz de provocar queimaduras e sinais de envelhecimento cutâneo. Já a radiação UV-B é mais potente na indução de queimadura, em relação a UV-A e penetra menos na pele. Sua ação deletéria é, portanto, mais restrita à camada basal da epiderme, induzindo dano direto ao DNA celular^{17,18}. A radiação UV-C é a mais energética delas e oferece o maior potencial de dano biológico a todos os seres vivos, sendo altamente mutagênica e tóxica. Felizmente, é totalmente absorvida pela atmosfera terrestre, sendo que, na estratosfera, a energia da radiação UV-C é utilizada para a formação de ozônio, a partir de oxigênio molecular.

Enquanto UV-B é máximo entre 11 horas e 13 horas, UV-A tende a se manter constante durante todo o dia. A dose de UV é maior em altas altitudes e também em baixas latitudes, aumentando, ainda mais, no verão. Estima-se que ocorra um aumento de 30% na dose de UV recebida pelas pessoas nos dias de feriado, quando comparados aos dias de trabalho normal. Além disso, trabalhadores expostos ao sol recebem cerca de três a cinco vezes mais radiação UV do que profissionais que trabalham em ambientes fechados^{13,17,19}. Os efeitos da radiação UV na pele dependem do comprimento de onda, da taxa de exposição, da raça e das características genéticas da pele¹⁴.

Ambos espectros são capazes de produzir danos ao DNA, seja de uma maneira direta ou indireta. A radiação UV-B é absorvida preferencialmente por cromóforos celulares tais como ácidos nucleicos, aminoácidos aromáticos, NADH, heme, quinonas, flavinas, porfirinas, carotenóides, ácido urocânico e eumelanina^{17,18}. Esses cromóforos absorvem diretamente os fótons UV gerando alterações nas bases do DNA. As bases pirimidínicas adjacentes aos anéis aromáticos são altamente vulneráveis à dimerização, levando à formação de dímeros ciclobutano-pirimidina e foto-produtos pirimidinapirimidona. Na ausência de reparo do DNA, ocorre o acúmulo de transições nas bases C-T, típico da radiação UV-B¹⁸.

O dano celular induzido por UV também pode ocorrer de maneira indireta através da absorção dessa radiação por elementos fotossensibilizantes¹⁷. Quando isso ocorre, as moléculas passam a ficar em um estado de excitação conhecido como *triplet* voltando logo em seguida ao estado de repouso. Essas mudanças implicam em reações intracelulares de transferência da energia e podem ocorrer por duas vias principais chamadas de reações Tipo I e II. Os mecanismos que envolvem ambas reações dependem das características dos fotossensibilizantes. Na reação Tipo I, ocorre transferência direta de um elétron entre o fotossensibilizante excitado e outra molécula, resultando na formação de radicais livres, não dependendo portanto de oxigênio. Na reação Tipo II, ocorre a transferência de energia do fotossensibilizante para oxigênio molecular, acarretando a formação de radicais reativos do oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*). Ocorre portanto a formação de oxigênio *singlet* $^1\text{O}_2$, com grande ação oxidativa e vida média longa, embora o ânion superóxido também seja produzido. Este último sofre dismutação a peróxido de hidrogênio, que na presença de metais catiônicos, acarreta a formação de radicais hidroxila^{17,18, 21}. As interações desses radicais reativos de oxigênio com moléculas intracelulares provocam a resposta biológica final.

Felizmente boa parte da radiação UV-B que chega à pele é absorvida ainda na camada córnea, antes de atingir o DNA das células viáveis. Quando há exposição crônica a UV-B, ocorre o dano ao DNA através da formação de dímeros

ciclobutanopirimidina (CDP) e de foto-produtos pirimidina-pirimidona (PP)¹⁷⁻²¹. Quando o mecanismo de reparo celular é insuficiente ou incorreto, esses danos ao DNA se acumulam e induzem à mutação das células epidérmicas, com posterior formação de clones de células mutadas que, possivelmente, se transformarão em câncer. Esses dímeros são frequentemente observados na mutação do gene TP-53 do CEC. Estudos recentes mostraram que os foto-produtos PP são mais eficientemente reparados pela célula do que os dímeros CDP, o que torna esse último, o principal promotor de mutações induzidas por UV nos mamíferos^{22,23}.

Como já discutido, um dos mecanismos de ação do UV-A é através da geração de ROS. Eles são gerados também normalmente durante o metabolismo celular sendo removidos rapidamente por mecanismos anti-oxidantes enzimáticos e não enzimáticos, resultando num equilíbrio entre pró e anti-oxidação¹⁸. Com a exposição crônica a UV-A existe um desequilíbrio a favor da pró-oxidação, o que leva a uma progressiva deterioração da função e estrutura celular. A oxidação do DNA se dá principalmente nas bases de Guanina, com formação da 8-hidroguanina através da transversão G-T. Além do dano ao DNA nuclear, há também o dano ao DNA mitocondrial^{17,19}. Os mecanismos de reparo na mitocôndria são menos eficazes que no núcleo e, portanto, as mutações se acumulam numa razão ainda maior. Deleções são frequentes e induzem perda da fosforilação oxidativa. ROS também induzem danos nas membranas celulares a partir da peroxidação de ácidos graxos das estruturas fosfolípides da membrana. Peróxidos lipídicos são formados e iniciam uma cadeia de reações que aumentam, ainda mais, o dano oxidativo¹⁸.

ROS também é responsável pela ativação direta dos genes reguladores da produção de enzimas como MAPKs (*Mitogen active protein kinases*), NFK-B (fator nuclear K-B) e AP1 (cascata ativadora da proteína 1)^{18,26}. A ativação destas cascatas enzimáticas contribuem para a liberação de interleucinas e metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) que são responsáveis por mais inflamação, carcinogênese e envelhecimento cutâneos. Exemplos dessas cascatas enzimáticas que podem ser ativadas são: heme-oxigenase, ciclooxigenase, óxido nítrico sintetase, ornitina decarboxilase e citocromo P450.

É sabido que UV-A induz mais inflamação do que UV-B, embora este último também participe na resposta inflamatória cutânea. Esse processo inflamatório inclui uma enorme cascata de eventos que promove infiltrado leucocitário, aumento na produção de prostaglandinas e liberação de várias interleucinas, que por sua vez, aumentam ainda mais a produção de ROS e o processo oxidativo na célula^{24,25}. A inflamação também induz a carcinogênese, uma vez que existe maior expressão de prostaglandina E2 (PGE2) nas lesões de queratoses actínicas e CECs. A PGE2 induz a proliferação celular e inibe apoptose, fato marcante no disparo da carcinogênese cutânea^{17,18,24-26}.

2.3 Mecanismos de prevenção celular induzidos pelo UV

Diante de toda agressão à pele provocada pelo UV, esta também apresenta diversos mecanismos de defesa contra tais agressões (Figura 1). A ativação do gene TP53, a alteração do ciclo celular e a apoptose formam os principais atores dentre esses mecanismos^{12,18,24,25}.

Quando do dano ao DNA induzido por UV, ocorre a transcrição de TP-53¹² e sua fosforilação, feita principalmente através das enzimas MAPKs¹⁸. A ativação do gene TP-53 é responsável pela alteração do ciclo celular. A proteína TP-53 fosforilada é capaz de prolongar a fase G1 do ciclo. Esse fato implica em maior tempo para a célula reparar o dano ao DNA antes da replicação na fase S. Quando o dano ao DNA induzido pela radiação UV é irreparável, as vias de apoptose são ativadas para promover a eliminação das células mutadas. A estrutura de apoptose dos queratinócitos consiste na ativação das vias intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (mediada pela indução dos receptores de morte celular). Tais vias são diretamente reguladas pelas MAPKs e proteína TP-53¹⁸⁻²⁰.

Sabe-se que a exposição ao UV é um dos principais fatores de estimulação das MAPKs e que o dano irreparável ao DNA celular é a principal causa de sua contínua ativação^{18,21}. As MAPKs, além de fosforilar o TP-53 como dito anteriormente, também são indutoras de proteínas pró-apoptóticas Bcl2.

Figura 1. Mecanismos de defesa celular contra ação UV

O TP-53 fosforilado estimula a formação das proteínas receptoras da morte celular TNF R1, CD-95, TRAIL-R1 e TRAIL-R2. A própria radiação UV induz a formação de TNF α , CD95 e TRAIL, chamadas “ligandas”, que são importantes reguladoras da apoptose^{18,29,30}. Nas células mutadas esses reguladores de apoptose são inibidos propiciando sua sobrevivência e crescimento. Ligando-se aos receptores, formam os complexos de sinalização dos indutores da morte celular (DISC- death inducing signaling complex). O resultado final é a ativação da cascata pró-apoptótica das caspases 8 e 10, através da via extrínseca^{18,30,31}.

A via intrínseca ou mitocondrial depende diretamente da ativação do TP-53 que estimula a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bcl2 e inibição das proteínas anti-apoptóticas Bcl2 (complexo Bcl-xl). O equilíbrio entre proteínas pró/anti-apoptóticas controla a liberação de fatores mitocondriais no citoplasma da célula. A mitocôndria, por sua vez, aumenta a síntese e liberação de citocromo C que induz a formação do complexo multi-protéico apoptossomal e posterior ativação da caspase 9, levando à apoptose^{18,29,30}.

Apesar de todos os mecanismos de defesa descritos acima, no CEC observa-se uma desregulação das principais etapas das vias apoptóticas, principalmente TP-53, COX2, MAPKs, complexo Bcl2 e “ligandas” da via extrínseca^{17,18,27,28,30}.

A inativação da TP-53 implica, direta e indiretamente, na inibição das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. O acúmulo dos radicais livres, gerados pela exposição crônica ao UV, estimula a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, uma proteína trans-membrana de 180 kDa) pelos queratinócitos, que por sua vez, estimula ainda mais a cascata das enzimas MAPKs³². A inativação da TP-53 e maior expressão de EGFR aumentam a atividade da COX-2, que por sua vez, aumenta a produção de PGE2. Essa última é a principal prostaglandina produzida após irradiação pela UV, levando à inibição da apoptose e aumento da proliferação dos queratinócitos^{27,28,32}. Todo esse processo de inibição da apoptose e estímulo ao crescimento desregulado das células, leva finalmente a carcinogênese.

Ficam evidentes diante do exposto os mecanismos de agressão da radiação UV na pele assim como os mecanismos de defesa dessa última contra tal agressão (Figura 2).

Figura 2. Ação da radiação UV na pele, mecanismos de defesa e carcinogênese. (adaptado de Svobodova et al.)

No processo de carcinogênese cutânea, várias etapas de defesa estão inativadas ou desreguladas. A maioria dos autores considera que o gene de supressão tumoral TP-53 tem papel primordial em toda cascata de eventos gerados pela radiação UV, sendo a interrupção da apoptose o evento principal da carcinogênese^{18,24,25}. Uma vez que tanto a regulação da apoptose quanto a indução de inibidores do ciclo celular são ativados pela TP-53, a sua mutação contribui tanto para a incontrolada proliferação celular quanto para ausência de apoptose. Porém, ainda não foi demonstrada uma correlação entre o tipo de mutação e a gravidade do tumor, indicando que outros processos moleculares

podem estar envolvidos na agressividade e invasão tumoral^{18,25}. É importante salientar que os padrões de expressões genéticas e inflamações são similares na pele e nos lábios cronicamente expostos à radiação UV e vários estudos já identificaram os fatores relacionados à carcinogênese citados acima também nos lábios, especificamente^{103,104,105}.

2.4 Terapia fotodinâmica

A TFD tem sua origem no início do século XX, em Munique, quando Oscar Raab, um estudante de medicina orientado pelo Professor Herman Von Tappeiner, observou os efeitos decorrentes da fotossensibilização em paramécio³⁶. O interesse do estudo era identificar o processo no qual a droga quinina era eficaz contra a malária, enquanto outros agentes como a acridina (derivado do coaltar) eram tóxicos contra protozoários *in vitro*, porém não, *in vivo*. Raab observou que o paramécio morria entre 60 e 100 minutos após acridina, na concentração de 1:20.000, ter sido adicionada ao meio. Em outro experimento, o paramécio sobrevivia por 800 a 1000 minutos com a mesma concentração de acridina. A única diferença foi a ocorrência de uma grande tempestade, acarretando condições adversas de luminosidade ambiente e, assim, os pesquisadores passaram a indagar se a luz tinha influência nos resultados. A continuação dos estudos confirmou que a acridina e a luz aumentavam a toxicidade ao paramécio, enquanto acridina isolada, luz isolada ou acridina exposta à luz e, posteriormente adicionada ao meio, eram atóxicas³⁶⁻⁴⁰.

Em 1960, foi sintetizado um composto purificado da hematoporfirina chamado HpD. Nas décadas de 1970 e 80, estudos foram realizados com a utilização de um derivado purificado do HpD conhecido com Porfimer sódico, para tratamento de tumores de bexiga, pulmão, esôfago, estômago, pele e aparelho ginecológico⁵⁰⁻⁵³. No início da década de 1990, no Canadá, o Porfimer sódico foi a primeira droga aprovada para uso terapêutico⁴¹.

A fotossensibilidade prolongada com o uso de drogas sistêmicas, os altos índices de cura obtidos com outros métodos mais práticos diminuíram o interesse

deste método na dermatologia. Neste sentido, novas drogas, chamadas de segunda geração, foram desenvolvidas e contribuíram para os recentes avanços da TFD na dermatologia.

Em 1990, Kennedy et al.⁴⁵ revolucionaram a TFD através do uso de uma substância tópica: o ácido 5- delta aminolevulínico (5-ALA). Trata-se de um precursor porfirínico (protoporfirina IX ou PpIX) que é sintetizada no interior das células através da biossíntese do grupo Heme. A PpIX é considerada potente agente fotossensibilizante e facilmente fotoativado⁴⁵.

No fim da década de 1990, uma nova droga derivada do 5-ALA foi sintetizada- o metilaminolevulinato. Trata-se de um composto esterificado do 5-ALA, que por ter propriedade lipofílica, apresenta a vantagem de maior penetração e especificidade no tecido tumoral. O mecanismo de ação parece ser o mesmo para ambas as drogas.

Assim a TFD com droga tópica é capaz de induzir fotossensibilidade apenas localizada e seletiva na área cutânea a ser tratada aumentando muito as possibilidades de sua aplicação na dermatologia^{33,44,45}. Atualmente ela é empregada no tratamento do câncer de pele não-melanocítico (CPNM) e outras doenças inflamatórias e proliferativas não neoplásicas como psoríase, doença de Darier, sarcoidose e necrobiose lipoídica, sendo considerada primeira opção no tratamento de lesões como queratoses actínicas (QA) e outras lesões superficiais extensas como carcinoma basocelular superficial (CBC) e doença de Bowen (DB)
33-35.

TFD consiste na ativação luminosa de um agente fotossensibilizante, que se acumula seletivamente nos tecidos pré-neoplásicos e neoplásicos, para gerar reagentes intermediários de oxigênio. Esses reagentes oxidam irreversivelmente componentes celulares essenciais causando dano tecidual e necrose. As vias celulares e moleculares pelas quais a TFD exerce sua ação permanecem ainda obscuras¹¹.

Dentre os agentes fotossensibilizantes usados na TFD em dermatologia, os principais são o ácido cinco delta aminolevulínico (5-ALA) e seu metil-éster (MAL), ambos pró-drogas derivadas da protoporfirina IX, como já descrito anteriormente.

A PpIX é considerada potente agente fotossensibilizante e facilmente fotoativado, ou seja, a droga é degradada quando exposta à fonte de luz específica. Esses compostos são quimicamente puros e, quando aplicados topicamente, mostram alta eficácia, segurança e seletividade, com menor risco de fotossensibilidade prolongada em relação às drogas mais antigas⁴⁶.

5-ALA é o primeiro intermediário na via de biossíntese do grupo Heme, sendo sintetizado a partir da glicina e succinil - CoA, no interior da mitocôndria (Figura 3). Essa reação é catalisada pela enzima ALA-sintetase. Já no citoplasma da célula, duas moléculas de ALA formam o porfobilinogênio (PBG) e quatro moléculas de PBG formam o uroporfirinogênio III. Este último é convertido em coproporfirinogênio III e, novamente no interior da mitocôndria, em protoporfirinogênio IX, que é convertido em PpIX, pela ação da protoporfirinogênio oxidase⁴⁹.

Figura 3. Cadeia da biossíntese do grupo Heme (PBG = porfobilinogênio; CoA = coenzima A; tx= taxa; cel= células)

A PpIX é o intermediário porfirínico com atividade fotodinâmica e, quando ativado por luz azul, emite fluorescência vermelha intensa. Em contraste, o grupo Heme não fluoresce quando exposto à luz e não possui atividade fotodinâmica^{49,50,53,54}. Enquanto anormalidades metabólicas na via da biossíntese do grupo Heme originam um grupo de doenças denominadas de Porfírias, o acúmulo proposital induzido por ALA ou MAL exógenos é utilizado com finalidade terapêutica na TFD.

A síntese normal de ALA, no interior da célula, é controlada pela enzima ALA sintetase que, por sua vez, é inibida pelo acúmulo de Heme (feedback negativo). Se um excesso de ALA exógeno for aplicado topicamente, ocorrerá rápida passagem através da epiderme anormal e posterior conversão à PpIX no interior da mitocôndria. Uma vez que a conversão da PpIX para Heme é uma reação lenta, as células tendem a acumular grande concentração de PpIX. O acúmulo excessivo de PpIX no interior da mitocôndria induz à sua difusão para o retículo endoplasmático e membrana celular, ambos alvos finais do dano celular induzido pela TFD. Quando MAL é aplicado topicamente, a molécula é rapidamente demetilada a 5-ALA e sofre o mesmo processo de metabolização, conforme exposto acima⁶³.

A PpIX possui vários picos de absorção da luz. O principal é na banda de Soret em 405 nm, correspondente à luz azul. Outros picos menores também têm importância e são chamados de bandas “Q”. São picos que ocorrem em 510, 545, 580, 630, 670 e 700 nm (Figura 4). Embora os picos das bandas Q sejam 10 a 40 x menores que o pico em 405 nm, muitos estudos em TFD são conduzidos usando fonte de luz no espectro da luz vermelha entre 620 e 635 nm. Isso se deve ao fato de que a luz vermelha proporciona maior penetração no tecido, otimizando a TFD.^{46,49}

Figura 4. Espectro de absorção da PpIX

ALA pode ser administrado tópicamente ou sistemicamente, mostrando acúmulo de PpIX em células tumorais de CBC em quaisquer das vias. Estudos em animais e humanos mostraram que a PpIX é eliminada do organismo 24 horas após a administração de ALA exógeno, seja por vias tópica, oral ou endovenosa^{16,46}. Assim, riscos de fotossensibilidade prolongada são considerados ausentes ou desprezíveis com o uso de ALA ou MAL.

Durante a exposição do tumor fotossensibilizado a uma fonte de luz adequada, a PpIX é rapidamente fotoativada, permitindo, assim, alta dose total de energia sem os riscos de reações fototóxicas relevantes para o tecido perilesional⁴⁶.

Alguns fatores interferem com a penetração do ALA na pele: concentração, tipo de veículo utilizado na sua preparação, tempo de aplicação e uso de agentes coadjuvantes que favorecem o acúmulo de PpIX nas células tumorais. Nos estudos clínicos, as concentrações de ALA variam de 5 a 20%^{46,48}. Os melhores resultados terapêuticos foram obtidos com concentrações entre 10 e 20%^{46,47,51-53,62}. Existe divergência nos diversos protocolos sobre qual o melhor veículo a ser

usado no preparo do ALA.

Formulações como emulsão óleo/água, água/óleo, propilenoglicol e loção nanocolóide foram previamente testadas^{46,49}. Hoje, utilizam-se ALA 20% em emulsão água/óleo e solução hidroalcoólica (disponível comercialmente em forma de bastão, sendo o pó do ALA separado da solução, para uso tópico)^{47,48,52,54-56}. Já o MAL somente está disponível em forma de creme contendo óleo de archis, glicerina e água na concentração de 16% (disponível comercialmente em forma de tubo contendo 2 g, pronto para uso tópico)^{15,16,57-59}. Quanto ao fator tempo de aplicação sobre a lesão, também existe grande variação de 60 minutos a 20 horas^{46,47,48,52-56}.

Hoje, os protocolos aprovados para o uso de ALA tópico no tratamento de QAs são de aplicação prolongada entre 14 e 18 horas^{47,48}. No caso do MAL, o tempo de aplicação é de três horas sob oclusão¹⁵.

O uso de agentes coadjuvantes em formulações com ALA pode aumentar, direta ou indiretamente, a formação de PpIX na célula tumoral. A adição de agentes que inibam a ação da enzima ferroquelatase ou aumentem a penetração do ALA no tecido, como ocorre com a desferroxamina, o ácido dietilaminotetracético (EDTA) e dimetilssulfóxido (DMSO) constituem exemplos de aditivos que potencializam a TFD⁵³. Outras técnicas também podem aumentar a concentração de PpIX por aumentar a absorção de ALA, como é o caso da iontoforese.

Em relação ao MAL, trata-se como já exposto, de uma droga lipofílica que foi sintetizada no fim da década de 1990 com o intuito de promover maior penetração no tecido e aumentar a concentração de PpIX nos tumores. Fritsch et al.⁶⁴, em 1998, compararam o acúmulo de porfirinas em QAs e pele normal com ALA e MAL. Em ambos os grupos houve maior concentração de PpIX nas QAs em relação à pele normal adjacente. Porém, MAL foi mais seletivo para a pele lesada em relação ao ALA. Esse dado foi comprovado pela razão de fluorescência entre QA e pele normal (8,7 para MAL e 5,1 para ALA). A seletividade do MAL também se faz evidente em razões ainda maiores quando se compara a fluorescência nos CBCs e na pele normal tratada com MAL⁶⁴. Em 2006, Angell-Petersen et al.⁶¹,

estudaram a formação de porfirinas em QAs e CBCs tratadas com MAL em diferentes regimes de aplicação: as concentrações de MAL testadas foram de 1%, 8% e 16% e o período de aplicação variou de 3 a 28 horas). Nesse estudo, foi observado que a seletividade do MAL (relação tumor/pele normal) era alta nas primeiras horas (10x superior) e decaía com o tempo. Além disso, para as lesões nodulares, a melhor concentração de MAL foi de 16% e a profundidade de fluorescência atingida foi de 2,1 mm após 3 horas de aplicação. Usando tempos de aplicação superiores, observou-se um aumento da intensidade de fluorescência nas camadas mais superficiais das lesões, além de menor seletividade⁶¹. De acordo com os dados de fluorescência, PpIX aumentou durante as treze primeiras horas de aplicação nas QAs e CBCs superficiais. Outros autores já haviam demonstrado aumento de fluorescência após seis horas de aplicação para QAs e quatro horas para CBCs, sugerindo que a TFD com MAL em maior tempo de aplicação poderia ser de maior valor terapêutico^{49,64}. Porém, em um estudo multicêntrico para a avaliação da dose e tempo de aplicação do MAL entre uma e 18 horas em CBCs, nenhuma diferença foi observada na resposta clínica dos grupos submetidos a três horas ou mais de aplicação do MAL. Este dado sugere que a concentração de PpIX, após três horas de aplicação, é suficiente para induzir TFD^{46,49}.

Em relação às concentrações, observou-se que MAL 8% após 18 horas de aplicação e MAL 16% após três horas induziram uma adequada intensidade de fluorescência em lesões mais espessas. Porém, o último regime apresentou a maior profundidade relativa de fluorescência (razão entre a profundidade de fluorescência e profundidade do tumor), que foi de 98%⁶³.

Durante a TFD, o agente fotossensibilizante ligado ao tumor é ativado na presença de luz. Essa ativação leva-o do estado de repouso ao estado de ativação chamado *singlet*, de meia vida curta. Nessa etapa, as moléculas podem retornar ao estado de repouso, emitindo energia na forma de fluorescência por meio da liberação de fótons ou progredir na cadeia de reações químicas, até atingir o estado *triplet* de meia vida mais longa. As moléculas no estado *triplet* podem sofrer dois tipos de reação. Na reação tipo I, as moléculas reagem

diretamente com substratos biológicos para formar radicais livres, como os radicais superóxido, hidroxila e peróxido. Já na reação tipo II, as moléculas transferem sua energia diretamente ao oxigênio intracelular, formando o oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$), altamente reativo, de meia vida curta e responsável pela morte celular. A reação tipo II predomina na TFD, enquanto a reação tipo I, no tratamento que envolve 8-MOP e ultravioleta A (PUVA).

Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente e a razão entre elas é influenciada pelas características do agente fotossensibilizante, dos substratos intracelulares e da concentração de oxigênio no meio. Porém, a presença de $^1\text{O}_2$ parece ser o principal fator para ocorrer a citotoxicidade.

Nas condições de anóxia tecidual ou concentração de oxigênio inferior a 2%, as células tumorais tornam-se resistentes ao efeito citotóxico induzido pela TFD^{46,49,63}.

No caso das drogas de uso tópico, a seletividade pode ser favorecida pela maior permeabilidade anormal do stratum corneum, suprajacente ao tumor. A remoção desse tecido através de agentes queratolíticos, curetagem e microdermabrasão podem aumentar a penetração das drogas tópicas nessas áreas afetadas^{52,54,56}.

Em consequência da ação do $^1\text{O}_2$, a célula tumoral passa a apresentar falhas na integridade da membrana, o que acarreta alterações na permeabilidade e função de transporte entre os meios intra e extracelulares.

Alterações nas membranas do núcleo, mitocôndria, lisossomos e retículo endoplasmático também ocorrem^{63,46,51,57}. Dados utilizando microscopia de fluorescência sugerem que a fototoxicidade mitocondrial é a principal causa da morte celular induzida pela TFD⁶⁰. Apesar da exata localização do efeito citotóxico, a consequência é a perda da integridade celular, havendo a liberação de fatores inflamatórios e ativação da cascata do complemento^{51,60}.

Sabe-se que $^1\text{O}_2$ e outras espécies reativas derivadas do oxigênio reagem com várias biomoléculas: colesterol, triacilglicerol, fosfolípidos e aminoácidos como triptofano, histidina, metionina e bases do ácido nucleico (guanina e guanosina). Os efeitos da TFD induzem inativação de enzimas de membrana,

aumento da permeabilidade das membranas, formação de bolhas intracelulares, interrupção da divisão celular, falência respiratória e lise celular^{16,46}. A indução da apoptose é mais observada com os agentes que se localizam na mitocôndria, através da inibição da produção de ATP, liberação do citocromo C e ativação das caspases^{18,21,46}. Estudos mostram que 5-ALA, HpD e verteporfirin sensibilizam monócitos CD 14+, células dendríticas CD 83+, células de Langerhans, linfócitos CD 25+ e aumentam a produção de IL-6. Histamina, prostaglandinas, fator de ativação plaquetário são ativados por mastócitos e, TNF, por macrófagos, durante a ativação fotodinâmica^{16,46,49}.

Durante a TFD, a seletividade do tratamento depende da área exposta à luz e do acúmulo preferencial do agente fotossensibilizante nas células tumorais em relação ao tecido normal. Embora esse acúmulo preferencial seja pouco compreendido, alguns fatores são apontados como responsáveis. As células tumorais têm uma alteração no metabolismo do heme devido a atividade aumentada da porfobolinogênio deaminase e diminuída da ferroquelatase¹². Isso faz com que as porfirinas acumulem apenas nas células cancerígenas e pré-cancerígenas quando da aplicação de ALA exógeno. A permeabilidade da membrana das células tumorais está alterada. Esse fato pode ser comprovado pela rápida passagem de corantes, como azul de Evans e vermelho do Congo, do interior dos capilares para o estroma do tumor^{46,49}. As fibras colágenas que integram o tumor são imaturas e semelhantes às observadas em tecido embrionário e processo de cicatrização recente. Essas fibras imaturas apresentam grande capacidade de ligação às porfirinas, constituindo um local para retenção e acúmulo do agente fotossensibilizante¹⁶. Outros fatores também colaboram para a maior captação e retenção da droga no interior das células tumorais como: rede linfática pouco desenvolvida, ligação das porfirinas a receptores de superfície de lipoproteínas de baixa densidade das células tumorais, presença de macrófagos e menor pH intracelular⁴⁹.

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

2.4.1 Fontes de luz na TFD

A TFD tópica é muito favorecida em relação a sistêmica devido ao acesso muito mais fácil na irradiação da lesão. Basta que se tenha uma fonte de luz com espectro de emissão que corresponda com o espectro de absorção do agente fotossensibilizante para que o procedimento ocorra adequadamente.

Dois diferentes grupos de fontes de luz podem ser caracterizadas para a TFD: luzes não coerentes (lâmpadas de amplo espectro e lâmpadas de diodo) e luzes coerentes (lasers). A ação destes aparelhos dependem fundamentalmente do espectro de emissão, da irradiância, da distribuição espacial da luz e da potência do aparelho^{15,46,63}.

A emissão das lâmpadas de amplo espectro de alta pressão ou fluorescentes abrangem quase toda a luz visível e início do infravermelho, poupando, quase totalmente, a radiação UV. Lâmpadas halógenas metálicas são amplamente usadas, pois são mais baratas e têm alta irradiância, que mantêm a exposição da luz constante e promove uma TFD não muito longa. Podem ser usadas como fonte de projetores de *slides* (luz branca) ou equipadas com filtros ópticos que promovem a seleção da banda de luz que se deseja. Com a utilização de filtros, pode-se selecionar luz azul, vermelha, infravermelha, ou até uma combinação delas^{16,46}. A lâmpada fluorescente mais usada opera na faixa da luz azul em 407 nm (banda de Soret), sendo suficiente para promover ativação fotodinâmica do 5-ALA.

Os LEDs (do inglês *light emitting diodes*) são aparelhos constituídos por semi condutores sólidos ligados entre si e que geram luz. Fornecem uma fonte de luz confiável e de alta potência em faixas estreitas de bandas de luz (entre 20-50 nm) e podem ser distribuídas em painéis para promover a iluminação de uma superfície ampla e homogênea. Este último item é muito importante pois uma distribuição irregular da luz pode deixar de tratar partes de um tumor superficial mais extenso. São de fácil uso, meia vida longa, baratos e com pouca necessidade de manutenção¹⁶.

A irradiância e a uniformidade da irradiação devem ser constantemente

cheçadas durante a TFD. As irradiâncias usadas em TFD variam de 50 a 150 mW/cm². Sendo a dose total de luz o produto da irradiância vezes o tempo, tem-se que irradiâncias muito baixas o tempo de exposição à fonte de luz pode ser muito longo. Já em irradiâncias muito altas, pode ocorrer efeito térmico aditivo na TFD. Em relação à fluência, ou seja, a dose total de luz utilizada na sessão de TFD, os tumores malignos, lesões mais extensas ou espessas em geral, necessitam de fluências maiores. Durante a irradiação do tumor ocorre um processo conhecido como fotoinativação da droga (do inglês, *photobleaching*), ou seja, à medida em que o tumor é destruído pela ativação fotodinâmica ocorre, paralelamente, inativação do agente pela absorção da luz^{16,46,63}.

Ao contrário das lâmpadas, os lasers fornecem luz em comprimento de onda específico que pode ser bem compatível com o principal espectro de absorção do agente fotossensibilizante, além de um feixe de luz bastante homogêneo. Muitos lasers já foram usados em TFD como laser de argônio, Nd:YAG, vapor de cobre, vapor de ouro e laser de diodo¹⁶. O seu uso permite a realização da TFD mais rápida, pois emitem alta fluência de luz monocromática que corresponde ao pico de absorção do agente. Porém, são aparelhos muito caros, não são portáteis, exigem muita assistência técnica e iluminam apenas pequenas áreas da pele.

As doses de luz estão intimamente relacionadas ao espectro de emissão da fonte e com o pico de absorção do agente. Após a utilização do MAL como agente, preconiza-se o uso de LED de 635 nm (luz vermelha) na dose de 37 J/cm² (Aktilite®, Photocure, Norway).

Quando se avaliam as diversas publicações de TFD com lasers ou fontes de luz não-coerentes (LEDs e lâmpadas halógenas), deve ser ressaltado que as fluências só podem ser comparadas quando consideradas as respectivas irradiâncias dos aparelhos. Por exemplo, lâmpadas halógenas de amplo espectro emitem fótons em comprimentos de onda muito curtos ou muito longos que não são necessários para a ativação do agente fotossensibilizante, resultando fótons desprezados e acarretando superestimação da fluência efetiva quando comparados aos lasers^{16,46}.

2.5 Terapia fotodinâmica na queilite actínica

A terapia fotodinâmica tem se mostrado uma excelente opção para lesões fotoinduzidas, sendo extensamente usada com sucesso para queratoses actínicas não hipertróficas, campo de cancerização, carcinoma basocelular superficial e doença de Bowen.

Até 2008, autoridades regulatórias de 18 países tinham aprovado a TFD como indicação para pelo menos um câncer de pele do tipo não melanoma⁶⁸. Sendo a queilite actínica uma lesão histopatologicamente e etiologicamente semelhante a queratose actínica, é esperada uma resposta semelhante a TFD. Dois estudos randomizados controlados recentes usando MAL-TFD em queratoses actínicas de fina e moderada espessuras, na face e no couro cabeludo, obtiveram 89 -91% de clareamento após duas sessões^{58,86}. Em um destes estudos houve clareamento de 75% das lesões quando era utilizado a crioterapia⁸⁶. Com placebo as respostas foram de 30-38%, respectivamente^{58,86}. No estudo que comparou crioterapia e MAL-TFD, foi observado ainda significativa superioridade do resultado cosmético com este último⁸⁶.

A semelhança da queilite actínica com a queratose actínica, o fato da TFD ser pouco invasiva, gerar pouca inflamação local, ter excelentes resultados cosméticos fazem desta uma terapia muito atrativa também para queilite actínica.

Em 1995, foi publicado primeiro estudo em que TFD foi usado para queilite actínica. Três pacientes foram tratados com ácido 5-aminolevulínico e uma luz não coerente. Houve clareamento completo das lesões e por um período de 12 meses não houve recidiva⁷⁰. Em um estudo maior, com 19 pacientes (11 deles com comprovação por biópsia pre-tratamento), refratária a outros tratamentos, foi usado TFD com *pulsed dye laser* (PDL) (595nm)⁷¹. O agente fotossensibilizante foi o ALA. Houve resposta clínica completa em 68% dos pacientes, que foi mantida após um período médio de acompanhamento de 4,1 meses. Em outro estudo, foram selecionados três pacientes com queilite actínica, que declinavam o tratamento cirúrgico, para serem tratados com TFD usando metil-aminolevulinato e luz vermelha⁸. Um deles já havia se submetido ao tratamento com 5-flouracil

tópico e imiquimod 5% tópico sem sucesso. Em avaliação feita até 13 meses após tratamento, boa melhora clínica e excelente resultado cosmético foram observados. Em 2007 foi publicado um caso no Japão tratado com 5-ALA e *excimer-dye laser* (630nm), com boa melhora clínica e desaparecimento da displasia celular observado na biópsia pós-tratamento⁷². Em 2008, foi publicado estudo em que 10 pacientes com queilite actínica comprovada por biópsia foram tratados com duas sessões de ALA-TFD utilizando luz vermelha incoerente (570-670nm)⁷³. Houve resposta clínica completa após duas sessões em 90% dos pacientes e resposta parcial em 10%, após 3 meses. Os pacientes com resposta clínica completa foram submetidos a uma nova biópsia, constatando-se doença residual em um caso. Levando em consideração a clínica e a histopatologia, 80% dos pacientes obtiveram resposta completa. O estudo com maior tempo de seguimento, selecionou 5 pacientes que haviam rejeitado intervenção cirúrgica e já tinham sido submetidos a outros tratamentos não-invasivos sem sucesso⁷⁵. Esses pacientes tinham queilite actínica comprovada por biópsia e foram tratados com duas sessões de TFD usando metil-aminolevulinato e luz vermelha e em seguida acompanhados por 30 meses. Resposta clínica completa e excelentes resultados cosméticos foram mantidos ao longo dos 30 meses sem sinais de recidiva. Berking et al.⁷⁴ tratou 15 pacientes com queilite actínica com duas sessões de TFD usando metil-aminolevulinato e luz vermelha. Após 3 meses esses pacientes foram reavaliados clinicamente e submetidos a uma nova biópsia para análise histopatológica pós-tratamento. Resposta clínica completa foi observada em 47% (7/15) e parcial em 47% (7/15). Doença residual na histopatologia foi observada em 62% (8/13) dos pacientes. Esse estudo concluiu que a TFD pode ser um método efetivo e não invasivo para tratamento da queilite actínica⁷⁴. Essa conclusão pode ser melhor entendida ao se comparar com o percentual de cura histopatológica observado em métodos terapêuticos consagrados e, inclusive, mais agressivos como o laser de CO₂. Há relato em que, de 20 pacientes com QA tratados com esse método, observou-se melhora histopatológica em apenas 7 (35%)⁸⁴.

Sotirou et al.⁹⁰ tratou 38 pacientes com duas sessões de ALA-TFD usando luz vermelha não coerente e acompanhou esses pacientes por 18 meses, fazendo biópsias pós tratamento para confirmar cura vista na análise histopatológica. Dos 38 pacientes, apenas 22 (57,8%) permaneceram com cura clínica após 18 meses. Desses 22, 5 pacientes tinham evidência de QA na histopatologia. Ou seja, após 18 meses apenas 17 (44,7%) pacientes tiveram cura clínica e visualizadas na análise histopatológica⁹⁰.

Outro estudo em 2012 tratou 19 pacientes com uma sessão de MAL-TFD observou que apesar do bom nível de satisfação dos pacientes com o tratamento 16 pacientes ainda mantinham sinais de QA na análise histopatológica realizada na biópsia após 2 meses do tratamento⁹¹.

Tabela1: Publicações com TFD para tratamento de QA

	Nº/ Idade/ Gênero	Fotosen- sibilizante	Tempo de oclusão	Fonte de luz	Fluência	Nº ses- sões	Resposta	Segui- mento
Stender 1996⁷⁰	3/59- 74/ 2M-1F	5-ALA	3h	Non- coherent light	55 J/cm ²	3	3 RC	6-12m
Alexiades 2004⁷¹	19/42- 86/NR	5-ALA	2 -3 h	PDL 595 nm	7-7.5 J/cm ²	3	13 RC, 2 RP, 1 NR	12 m
Hauschild 2005⁸	3/58- 81/1M; 2F	MAL	3 h	Aktilite 630 nm	10-20 J/cm ²	2	3 RC	13 m
Rossi 2008⁷⁵	5/60- 78/4M; 1F	MAL	3h	Aktilite 630 nm	37J/cm ²	2	5 RC	30 m
Berking et al. 2007⁷⁴	15/36- 88/9M; 6F	MAL	3 h	Aktilite 630 nm	37 J/cm ²	2	7 RC, 7 RP, 1 NR	3 m
Kodama et al. 2007⁷²	1/67/F	5-ALA	2 h	Excimer laser 630 nm	30 J/cm ²	5	1 RP	0 m
Sotiriou et al.2008⁷³	10/60- 71/ 10M	5-ALA	3 h	Waldmann PDT 1200/570- 670 nm	40 J/cm ²	2	9 RC	3 m
Sotirou et al. 2009⁹⁰	38/54- 77/38M	5-ALA	3h	Waldmann PDT 1200/570- 670 nm	40 J/cm ²	2	17 RC/5 RP/16NR	18 m
Castañó 2008¹⁰²	3/56- 70/3M	MAL	3h	Omnilux 630 nm	50-80 J/cm ²	1-3	3 RC	6 m
Ribeiro et al. 2012⁹¹	19/25- 78/10M	MAL	3h	Aktilite 630 nm	37 J/cm ²	1	3 RC/	2 m

-9F

16 NR

Legenda: M= masculino; F= feminino; h= horas; RC= resposta completa; RP= respostas parcial; NR= não houve resposta; m= meses.

2.6 Marcadores moleculares

Um importante marcador do risco da transformação neoplásica investigado em várias lesões é a imunodeteção da proteína p53, produzida pelo gene TP53. Este é um gene supressor de tumor localizado no braço curto do cromossoma 17. Ele codifica uma fosfoproteína de 53-kDa com vida média de 15 minutos, que bloqueia a progressão do ciclo celular para permitir o reparo de DNA danificado e/ou induzir a apoptose. Muitas mutações da região codificante do gene TP53 produzem uma proteína funcionalmente inativa com uma vida média significativamente mais prolongada, podendo ser mais facilmente detectada por métodos de imunoistoquímica⁷⁶. Desta forma, a presença da proteína p53 verificada pela imunodeteção pode ser um indicativo de mutação deste gene, e esta anormalidade representa evento inicial no processo de carcinogênese. A imunodeteção de p53 está aumentada significativamente na QA quando comparada ao lábio normal e à mucosa oral normal. Isto pode ser devido à intensidade do dano causado ao DNA pela exposição solar⁷⁷.

A proteína Ki-67 descrita como complexo de proteínas de 345-395 kDa⁷⁸, aparece expressa em todas as fases do ciclo celular exceto na fase G0, de repouso, sendo considerada um marcador de proliferação celular, processo biológico de vital importância para o organismo. A proliferação celular anormal aparece como fator precursor na origem de tumores malignos⁷⁹. Estudo sobre a expressão da proteína Ki-67 na mucosa bucal normal, displasia epitelial e carcinoma de células escamosas, demonstrou valores do índice de proliferação significativamente diferentes entre os três grupos. Com esse resultado os autores concluíram que a expressão de Ki-67 poderia ser considerada como marcador inicial da progressão de tumores da mucosa bucal⁸⁰.

Apoptose é um processo de morte celular programada fisiológico de extrema importância para o desenvolvimento e manutenção saudável dos tecidos⁸¹. A falta de regulação nos mecanismos de morte celular ocorre no câncer. Duas famílias de genes regulam a apoptose: BCL2 e IAP (proteínas inibidoras de

apoptose). A survivina, recentemente descrita, faz parte da família das IAPs. As IAPs agem como inibidores endógenos das caspases após se ligarem a proteínas liberadas pela mitocôndria, como a SMAC/DIABLO, suprimindo diretamente as caspases 3 e 7⁸³. Além da função inibidora de apoptose, ela também tem importante papel na divisão celular participando da organização dos fusos mitóticos⁸². Acredita-se que a inibição da apoptose induzida pela survivina favoreça o crescimento tumoral, induzindo estímulos pró-oncogênicos e mantendo uma progressão mitótica que favorece o desenvolvimento das células neoplásicas. A survivina é detectada em neoplasias malignas como carcinoma de pulmão, mama, cólon, pâncreas, fígado, útero e ovários e em tecidos fetais, mas encontra-se ausente na maioria dos tecidos adultos diferenciados⁸¹. Níveis elevados dessa proteína correlacionam-se com resistência a quimioterapia e radioterapia dos tumores malignos^{82,83}. A expressão de survivina em lesões de queilite actínica mostra o potencial maligno destas lesões e sua participação no processo de carcinogênese⁸³. Sua expressão foi verificada em 80% dos cânceres de boca e relacionada a um fenótipo mais agressivo da doença⁸³.

3. OBJETIVOS

---

1. Avaliar a melhora dos parâmetros clínicos da queilite actínica após a TFD com Metilaminolevulinato.
2. Avaliar, através da histopatologia, as características do tecido lábial afetado antes e após a TFD.
3. Analisar através da imunoistoquímica a expressão da proteína TP53, Ki67 e survivina na queilite actínica antes e após a TFD.
4. Avaliar a eficiência da TFD no tratamento da QA, através de parâmetros clínicos, histopatológicos e imunoistoquímicos.

4. MÉTODOS

4.1 Pacientes

No período compreendido entre setembro de 2009 e novembro de 2010, foram selecionados 23 pacientes provenientes do ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com quadro clínico de QA. Todos foram submetidos à biópsia de rotina do lábio para confirmação diagnóstica, após serem devidamente esclarecidos dos propósitos e do desenho do estudo, e terem assinado os devidos termos de consentimento. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local (CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-Protocolo 0997/09) e foi conduzido de acordo com a última revisão da Declaração de Helsinki.

Os critérios de inclusão para o estudo foram: a idade maior ou igual a 18 anos, confirmação histopatológica de QA e fototipos de I a IV, segundo a classificação de Fitzpatrick.

Os critérios de exclusão foram:

- história clínica de fotossensibilidade;
- doença infecciosa ativa;
- tratamento prévio para QA nos últimos 6 meses;
- alergia conhecida a algum dos componentes da droga fotossensibilizante (Metvix®, Galderma, França) ou a componentes do anestésico local (Xilocaína 2%);
- gravidez;
- lactação;
- imunossupressão;
- falta de compreensão ou adesão dos pacientes ao protocolo utilizado;
- invasão de células atípicas na derme mostrada através da histopatologia.

4.2 Protocolo de tratamento

Os pacientes selecionados tiveram a região do vermelhão do lábio higienizada com solução alcoólica de clorexidina a 0,5%. Em seguida, foram

submetidos a curetagem superficial da área comprometida, seguida da aplicação de espessa camada do creme de metilaminolevulinato (Metvix®, Galderma, França) sobre essa área, que era então ocluída com um filme plástico e um papel alumínio por um período de três horas, evitando assim exposição a luz. Após esse período, o material usado para ocluir a lesão era retirado, o excesso de creme removido com uma gaze e solução fisiológica a 0,9%. Anestesia local infiltrativa usando de 0,5 a 0,8 ml de lidocaína 2% (Xylestesin®, Cristália) era aplicada na área a ser tratada. Uma gaze enrolada era posicionada entre o lábio inferior e a dentição com o objetivo de aumentar a protusão do lábio e assim, facilitar a exposição à fonte de luz. Esta última tratava-se de um aparelho de LED (Aktilite® - PhotoCure, Oslo - Noruega) que opera na faixa de luz vermelha a $635 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$, com dose total de iluminação de 37 J/cm^2 . O aparelho, que consiste em um painel de 128 lâmpadas de LED de alta potência que operam com irradiância variável entre 50 e 100 mW/cm^2 , era posicionada a cerca de 8 cm da lesão e agia durante cerca de 8 minutos. O mesmo procedimento era repetido em 2 semanas. Todos os pacientes foram orientados para não se expor à luz solar por 48 horas após a sessão de tratamento e a utilizar fotoprotetor labial 3 vezes ao dia por 7 dias.

Os pacientes eram examinados imediatamente após as sessões de TFD, quatro, seis e doze semanas após início do tratamento. Na semana doze realizava-se nova biópsia de controle com *punch* de 3 mm da área mais suspeita, independente desta ter ou não sido o mesmo local da biópsia anterior.

4.3 Análise clínica

Durante a exposição à fonte de luz os pacientes eram solicitados a graduar sua dor numa escala visual que variava de 0 (nenhuma dor) a 10 (dor insuportável) e os efeitos colaterais locais e sistêmicos eram observados durante as sessões de tratamento e nas visitas de seguimento.

A resposta clínica foi avaliada através de fotografias digitais. Ela foi definida como completa (sem sinais clínicos de QA) ou incompleta (permanência de sinais clínicos de QA). Os sinais clínicos analisados foram a perda da nitidez da linha de

demarcação nítida do vermelhão do lábio, a perda da concavidade natural da pele logo abaixo do vermelhão, a presença de áreas de atrofia, leucoplasia, erosão, descamação e úlceras.

4.4 Análise histopatológica e imunoistoquímica

Biopsias foram realizadas antes e 3 meses após o tratamento utilizando um instrumento cilíndrico de *punch* de 3 mm (Miltex®, USA) no local onde as alterações clínicas suspeitas eram mais pronunciadas. O procedimento era realizado em condições estéreis e sob anestesia local com lidocaína 2%, sem vasoconstritor (Xylestesin®, Cristália). O local da biópsia era suturado com fio de monofilamento de nylon 5-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Brasil). As peças foram fixadas em formol 10%, embebidas em parafina, seccionadas (3 μ m de espessura) e coradas em hematoxilina e eosina.

A análise histopatológica considerou as anormalidades citológicas e arquiteturais. Esses critérios incluíram hiperchromatismo nuclear, nucléolos proeminentes, pleomorfismo nuclear, mudança da razão núcleo/citoplasma, mitoses aumentadas e aberrantes, disqueratoses, células multinucleadas e perda da polaridade celular como mudanças citológicas. Alterações arquiteturais incluíram duplicação da camada basal, hiper celularidade e mudanças na maturação epitelial. O espectro de mudanças foi classificado como segue:

1. Epitélio normal: ausência de alterações histopatológicas significativas;
2. QA: alterações epiteliais restritas aos dois terços basais do epitélio. Essa categoria compreende as displasias leve, moderada e grave;
3. Carcinoma *in situ*: todas as camadas foram afetadas;
4. CEC invasivo: presença de neoplasia na derme com áreas desconectadas do epitélio.

As variáveis histopatológicas foram comparadas antes e após o tratamento por um dermatopatologista experiente.

Para a análise imunoistoquímica utilizou-se o método estreptavidina-biotina, com anti-p53, Ki-67 e survivina (DAKO, Carpinteria, CA, EUA). Foram preparadas

lâminas sinalizadas com cortes de 3 μ m. Os cortes passaram por processos de desparafinização em dois banhos de xilol e reidratação em cadeia descendente de álcoois e um banho em hidróxido de amônio 10% em solução de álcool a 95°C foi realizado para remoção do pigmento formólico. As lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada em solução de ácido cítrico com pH 6.0, em banho-maria a 95°C, durante 30 minutos. Então nova lavagem das lâminas em água destilada por 10 minutos. Foi realizado bloqueio da peroxidase endógena tecidual em solução na proporção de 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e álcool metílico. Após lavagem em água destilada por mais 10 minutos, as lâminas receberam mais 3 banhos de 5 minutos com solução tampão TRIS pH 7,4. Os três anticorpos foram encubados manualmente em câmara úmida por 18 horas a 4°C. Para incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário foi usado o sistema KIT LSAB+ (DAKO, Carpinteria, CA, USA). Sendo que o tempo de incubação do anticorpo de ligação foi de 30 minutos com lavagem em 3 banhos de 5 minutos de TRIS pH 7,4, e mais 30 minutos para incubação do complexo terciário, também seguido de lavagem com 3 banhos de 5 minutos de TRIS pH 7,4. As reações foram reveladas com diaminobenzidina (DAKO, Liquid DAB+, K3468) e os cortes contracolorados com hematoxilina de Mayer. Em seguida, os cortes foram submetidos à desidratação em cadeias em concentrações ascendentes de etanol, diafanização em xilol e então as lâminas foram montadas em resina permout.

As alterações imunoistoquímicas foram classificadas de acordo com o número de células alteradas por campo de grande aumento (CGA) da seguinte forma: menos que 5 células por CGA, de 5 a 10 células por CGA ou mais de 10 células por CGA.

4.5 Análise estatística

A comparação entre os resultados antes e depois do tratamento foi realizada pelo teste McNemar para amostras pareadas, sob a hipótese nula que não existem mudanças após o tratamento. Os valores de porcentagens foram calculados a partir do total de casos.

Para as variáveis categóricas foram calculadas as frequências e porcentagens. Para as variáveis numéricas calcularam-se a média, desvio padrão, mediana, e valores mínimo e máximo. O nível de significância considerado foi de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software estatístico SPSS for Windows v.19.

5. RESULTADOS

Dos 23 pacientes biopsiados, dois apresentaram invasão de células atípicas na derme configurando CEC no lábio e foram encaminhados para tratamento cirúrgico. Outros dois pacientes não apresentaram na biópsia sinais histopatológicos de QA e foram portanto retirados do estudo. Entre os demais, três abandonaram o estudo após a primeira sessão do tratamento. Em um dos pacientes o material da biópsia não foi suficiente para análise imunoistoquímica (Figura 5).

Figura 5. Pacientes selecionados para biópsia e excluídos no decorrer do estudo

Dos 16 pacientes que completaram o estudo 10 eram do sexo masculino e seis do feminino. A idade dos participantes variou de 36 a 82 anos, com média de 64,3 (14,19 de desvio padrão). Os fototipos dos participantes, segundo a classificação de Fitzpatrick, variaram de I a III, sendo que três pacientes tinham fototipo I, seis tinham fototipo II e sete tinham fototipo III (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição dos participantes do estudo

Característica		N = 16
Gênero	Masculino, n (%)	10 (62,5)
	Feminino, n (%)	6 (37,5)
Idade (em anos)	Média (desvio padrão)	64,13 (14,19)
	Mediana	64,50
	Mínimo-máximo	36-82
Fototipo	I	3 (18,8)
	II	6 (37,5)
	III	7 (43,8)

Todos os pacientes foram submetidos a anestesia local com lidocaína 2% sem vasoconstrictor (Xylestesin, Cristália) antes da irradiação com a fonte de luz e todos toleraram bem a dor com um escore médio na escala visual de dor de 3,94 na primeira sessão e 4 na segunda sessão, não havendo diferença de dor estatisticamente significativa.

Como esperado, os efeitos adversos mais comuns foram eritema e edema. Um dos pacientes apresentou recidiva de herpes labial após a primeira sessão. Crostas e erosões foram observadas após as sessões, mas tiveram resolução completa em no máximo 2 semanas. Nenhuma infecção bacteriana ou efeito adverso sistêmico foi observado. Também não houve cicatriz ou distúrbio de pigmentação.

Do ponto de vista clínico houve cura completa (ausência de sinais clínicos de queilite actínica) em dez pacientes (62,5%), havendo permanência da doença clínica em seis (37,5%), como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Resposta clínica após TFD

Melhora clínica	Completa, n (%)	10 (62,5)
	Incompleta, n (%)	6 (37,5)

Tabela 4. Graus de displasia segundo análise histopatológica antes e após TFD

<i>Histopatologia</i>	<i>Antes da TFD</i>	<i>Após a TFD</i>
Displasia leve	1 (6,2%)	0
Displasia moderada	13 (81,2%)	10 (62,4%)
Displasia grave	2 (12,4%)	6 (37,4%)

Gráfico 1. Graus de displasia segundo análise histopatológica antes e após a TFD **Gráfico 2. Expressão de survivina antes e após TFD. CGA= campo de grande aumento**

Gráfico 3. Expressão de Ki67 antes e após TFD. CGA= campo de grande aumento **Gráfico 4.** Expressão de p53 antes e após TFD. CGA= campo de grande aumento

Tabela 5. Resultado da análise imunoistoquímica antes e após TFD. CGA= campo de grande aumento

<i>IHQ</i>	<i>Antes da TFD</i>	<i>Após a TFD</i>	<i>p</i>
<i>Ki67</i>			1,00
Até 5 CGA	0	0	
5 - 10 CGA	3	2	
>10 CGA	12	13	
<i>p53</i>			1,00
< 5 CGA	0	0	
5 - 10 CGA	1	2	
>10 CGA	14	13	
<i>Survivina</i>			0,407
< 5 CGA	4	1	
5 - 10 CGA	7	10	
>10 CGA	4	4	

A análise histopatológica não detectou cura em nenhum dos pacientes. Apenas um paciente (6,2%) teve melhora, passando de um quadro de displasia grave para moderada. Não houve mudança no que diz respeito ao grau de displasia em nove pacientes (56,2%). Destes, oito (50%) tinham displasia moderada e um (6,2%), displasia grave. Por outro lado, seis pacientes (37,5%) tiveram piora no grau de displasia: um paciente (6,2%) que tinha displasia leve apresentou displasia moderada após o tratamento e em cinco (31%) pacientes o grau de displasia mudou de moderado para grave. Não foi possível determinar diferenças estatísticas para esta variável.

Em relação à imunoistoquímica não houve mudança estatisticamente significativa entre os valores de expressão de Ki-67, survivina e p53. A comparação entre esses biomarcadores antes e após o tratamento encontra-se na Tabela 5. Antes do tratamento, analisando a marcação do Ki-67, três pacientes tinham de 5 a 10 células por CGA e doze tinham mais de 10 células por CGA. Após o tratamento, dois tinham de 5 a 10 células por CGA e treze tinham mais que 10 células por CGA. Já na marcação com survivina quatro pacientes tinham menos que 5 células por CGA, sete tinham entre 5 e 10 células por CGA e quatro

tinham mais que 10 células por CGA. Após a TFD, apenas um paciente tinha menos que 5 células por CGA, dez tinham entre 5 e 10 células por CGA e quatro tinham mais de 10 células por CGA. Na marcação com o p53, antes do tratamento um paciente tinha entre 5 e 10 células por CGA e quatorze tinham mais que 10 células por CGA. Após o tratamento, dois pacientes tinham entre 5 e 10 células por CGA e treze tinham mais que 10 células por CGA.

6. DISCUSSÃO

QA refere-se a condição na qual o lábio apresenta características clínicas e histopatológicas provocadas pela exposição crônica aos raios UV. Essas mesmas características, encontradas de maneira inicial e superficial na QA, podem ser encontradas no CEC. Sabe-se que essas lesões incipientes podem progredir para um CEC invasivo, e isso não deve ser considerado uma transformação, já que as alterações moleculares e genéticas presentes nos CECs podem já estar presentes nessas lesões incipientes⁸⁵.

Crítérios morfológicos e biológicos para distinguir entre uma QA espessa e um CEC fino ainda não foram bem estabelecidos e isso impossibilita determinar de maneira exata e acurada, onde um termina e o outro começa. Essas lesões começam no epitélio e crescem em direção à lamina própria até formarem tumores propriamente ditos. Não há, no entanto, nenhum limite exato entre uma lesão e outra. A identificação de características clássicas do CEC na derme acontece apenas nos casos mais avançados e sabe-se que é nos estágios iniciais da doença que o tratamento adequado gera melhor prognóstico. É baseado nestes argumentos que preferimos conceituar a QA, não como uma lesão pré-maligna, e sim como uma neoplasia intra-epitelial do lábio cujas células apresentam alterações histopatológicas, moleculares e genéticas, semelhantes àquelas apresentadas pelos CECs invasores, consequentes à exposição solar crônica^{6,85,92}.

Ainda é incerta a percentagem de QAs que desenvolverão CEC. Sabe-se, no entanto que o CEC no lábio é o mais comum entre os tumores da cabeça e pescoço no mundo ocidental e que tem quatro vezes mais chances de desenvolver metástases que aquele na pele^{6,83}. Portanto, um diagnóstico precoce e o tratamento adequado das QAs são essenciais para que se obtenha um bom prognóstico.

A terapia padrão da queilite actínica é a vermilionectomia, que consiste em uma intervenção cirúrgica agressiva e que pode deixar seqüela importante, como a retração do lábio inferior com exposição da dentição inferior^{85,95}. Crioterapia, ablação com laser de dióxido de carbono, eletrocirurgia, 5-flouracil tópico e ácido tricoloroacético tópico também têm sido usados no tratamento curativo e paliativo.

Essas opções, apesar de algumas vezes efetivas, têm vários efeitos adversos e taxas de cura que ainda indesejáveis^{10,84}.

A terapia fotodinâmica tem se mostrado uma excelente opção para lesões fotoinduzidas, sendo extensamente usada com sucesso para queratoses actínicas não hipertróficas, carcinoma basocelular superficial e doença de Bowen.

Até 2008, autoridades regulatórias de 18 países tinham aprovado a TFD como indicação para pelo menos um câncer de pele do tipo não melanoma⁶⁸. Sendo a queilite actínica uma lesão histopatologicamente e etiologicamente semelhante a queratose actínica, é esperada uma resposta semelhante a TFD. Existem, certamente, diferenças nos diversos protocolos em relação ao tipo de droga usada, tempo de incubação, veículo, fonte de luz, dose e irradiância da fonte de luz, preparo ou não das lesões, etc. Cabe ressaltar que, o preparo prévio das lesões, ou seja, uma leve curetagem sem sangramento, suficiente para a remoção das crostas e/ou hiperqueratose e a aplicação correta da droga sobre as mesmas são de extrema importância para o índice de cura. Da mesma forma, chama-se a atenção para o tempo de incubação assim como a dose de luz corretamente aplicadas durante a sessão de TFD. No presente estudo, teve-se o cuidado de preparar corretamente todas as lesões, assim como irradiar toda a superfície cancerizável de maneira bem uniforme, assegurando que todo o vermelhão do lábio fosse tratado igualmente, assegurando que nenhuma área tivesse sido sub-tratada. Esses dados práticos são extensamente aplicados nos manuais e guias de aplicação da TFD em Dermatologia¹⁵. Dois estudos randomizados controlados recentes usando MAL-TFD em queratoses actínicas de fina e moderada espessuras, na face e no couro cabeludo, obtiveram 89-91% de clareamento após duas sessões^{58,86}. Em um destes estudos houve clareamento de 75% das lesões quando era utilizado a crioterapia⁸⁶. Com placebo as respostas foram de 30-38%, respectivamente^{58,86}. No estudo que comparou crioterapia e MAL-TFD, foi observado ainda significativa superioridade do resultado cosmético com este último⁸⁷. Szeimes et al.⁵⁷ compararam crioterapia e MAL-TFD usando luz vermelha (75J/cm²) em outro estudo randomizado. Nesse, houve a inclusão de 193 pacientes com 699 queratoses actínicas (92% na face e couro cabeludo e

93% finas ou moderadamente espessas). A resposta completa após 3 meses foi de 69% para lesões tratadas com MAL-TFD e 75% para crioterapia. Apesar de ambas modalidades terapêuticas mostrarem taxas de resposta muito próximas, com o MAL-TFD houve melhor resultado cosmético e maior taxa de satisfação dos pacientes.

A semelhança da queilite actínica com a queratose actínica, o fato da TFD ser pouco invasiva, gerar pouca inflamação local, ter excelentes resultados cosméticos fazem desta uma terapia muito atrativa também para queilite actínica.

Os primeiros relatos de casos ou pequenas séries usando TFD no tratamento de QA mostravam resultados promissores. Esses estudos preliminares analisavam os resultados apenas do ponto de vista clínico e sem um seguimento a longo prazo^{8,70,71,75}. Análise histopatológica após o tratamento com TFD (sem outras terapias associadas) foi realizada em poucos estudos, mostrando, diferente do que se pensava, resultados de cura observada na análise histopatológica bem inferiores àqueles alcançados no tratamento das queratoses actínicas^{71,74,91,92}. O presente estudo pretende avaliar dos pontos de vista clínico, histopatológico e imunoistoquímico a eficácia da TFD no tratamento da QA.

Apesar de ser um método eficaz, seguro e com excelentes resultados cosméticos a TFD tópica apresenta alguns efeitos adversos como: eritema, edema, prurido, pústulas, hiperpigmentação, ulceração e infecção secundária. No entanto o mais importante deles é sem dúvida alguma a dor^{14,15,33,34,40,41,46,49,93}. No presente estudo, os efeitos adversos mais comuns foram eritema e edema presente em 100% dos pacientes. Um dos pacientes apresentou recidiva de herpes labial após a primeira sessão, com resolução completa em menos de 2 semanas com uso de antiviral por via oral. Crostas e erosões foram observadas no período de recuperação das sessões, mas tiveram resolução completa em no máximo 2 semanas. Nenhuma infecção bacteriana ou efeito adverso sistêmico foi observado. Também não houve cicatriz ou distúrbio de pigmentação. Em relação a dor durante as sessões, os resultados do presente estudo mostraram níveis de dor um pouco menores em relação aos demais estudos^{73,90,91}. Isso, provavelmente se deve ao fato de ter-se usado anestesia local com lidocaína a 2% antes das

sessões em todos os pacientes, já que na experiência dos autores os níveis de dor, sem uso de anestesia local eram importantes. Essa redução na dor durante as sessões corrobora os dados de outros estudos que usaram anestesia infiltrativa no controle da dor^{74,93,94}.

Do ponto de vista clínico o presente estudo analisou os resultados como cura completa, quando havia ausência de sinais clínicos de QA, e ausência de cura, quando permaneciam sinais clínicos de QA. Sendo assim, observou-se cura completa em 10 (62,5%) dos pacientes e permanência de sinais clínicos de QA em 6 pacientes (37,5%) . Em nenhum dos casos houve piora clínica. Em 2009 Sotiriou et al⁷³ publicaram trabalho com 10 pacientes mostrando cura clínica em 9 pacientes após 2 sessões de ALA-TFD e luz vermelha, mostrando uma taxa de resposta clínica completa de 90%. No entanto, esse mesmo grupo de pesquisadores publicaram um ano mais tarde outro trabalho com mesmo tema incluindo um número bem maior de pacientes mostrando resultados bem diferentes. Esse último, publicado em 2009, incluiu 40 pacientes com displasia graus I e II mostrando taxa de cura clínica completa de 68,42% após 3 meses⁹⁰, ou seja, uma taxa de cura clínica compatível com o presente estudo. Esse estudo, diferentemente do presente, usou ALA-TFD ao invés de MAL-TFD e uma fonte de luz vermelha não coerente diferente (Waldmann PDT 1200, Waldmann-Medizin-Technik, Villingen-Schwenningen, Alemanha) que não era do tipo *LED*, além do fato de incluir apenas QAs com graus de displasia I e II. Berking et al.⁷⁴ tratou 15 pacientes com QA com 2 sessões de MAL-TFD usando metilaminolevulinato e luz vermelha (Aktilite® - PhotoCure, Oslo - Noruega). Após 3 meses a resposta clínica completa foi observada em 47% (7/15) e parcial em 47%(7/15)⁷⁴. Essa diferença pode ser explicada pelo tamanho da amostra, menor em relação ao citado anteriormente e/ou pela subjetividade da análise dos resultados na melhora clínica. É importante ressaltar que nesse estudo também não houve distinção entre os graus de displasia incluídos. Um outro estudo incluiu 19 pacientes que receberam de uma a três sessões. Nesse estudo a cura completa foi atingida em 68% dos casos após uma média de 1,8 sessões de tratamento⁷¹, consistente com os resultados aqui apresentados. Diferentemente do presente estudo, este último

usou aminolevulinato (ALA) como fotossensibilizante e *pulsed dye laser* como fonte de luz.

À vista da histopatologia não houve nenhum caso de cura. Em um caso houve diminuição do grau de displasia e em 6 casos houve piora no grau de displasia, mas sem significância estatística. No estudo de Berking et al.⁷⁴, 48% dos pacientes obtiveram cura do ponto de vista histopatológico. Já no estudo de Sotiriou et al.⁹⁰, que incluiu 40 pacientes, 17 dos 38 pacientes que concluíram o estudo após 18 meses (44,7%), tiveram cura na análise histopatológica. Um outro estudo incluiu 19 pacientes com QA comprovada através de exame histopatológico, e tratou-os com uma sessão de MAL-TFD, analisando os resultados através da histopatologia após 2 meses. Nesse estudo a cura vista através da histopatologia foi observada em apenas 3 pacientes (16%)⁹¹. Uma possível explicação para esse resultado discrepante está no fato de que a maioria dos outros estudos incluía apenas graus leve e moderado de displasia e nesse estudo não houve essa distinção^{74,91}. O tamanho relativamente reduzido da amostra aqui incluída também pode ter contribuído com esse resultado discrepante. Outro fator importante que chama a atenção diante desses resultados é o fato que mesmo tendo a maioria dos pacientes cura clínica completa (62,5%), nenhum desses pacientes teve cura observada na análise histopatológica. Este fato também pode ser observado em outros estudos como no de Sotiriou et al.⁹⁰ em que 5 dos 22 pacientes com cura clínica aos 18 meses, apresentavam ainda sinais de QA na histopatologia. No trabalho de Berking et al.⁷⁴, 3 pacientes dos 7 que tinham cura clínica completa após 3 meses, apresentavam sinais de QA na histopatologia. Tal fato é relevante, pois levanta a possibilidade de estar-se, com a TFD, tratando as camadas mais superficiais da epiderme e deixando células alteradas nas camadas mais profundas camufladas, fato que poderia teoricamente atrasar o diagnóstico clínico de um provável CEC. De acordo com os resultados apresentados tanto nesse trabalho, como nos demais sobre esse assunto fica claro que a TFD não tem o mesmo efeito benéfico para queratose actínica como o tem para queratoses actínicas. Isso é visto tanto do ponto de vista clínico como histopatológico.

Os estudos publicados de TFD para tratamento das queratoses actínicas, envolvem ALA e MAL. Todas as evidências mostram que a TFD é altamente eficaz^{15,68,67,57}. A resposta completa das lesões com MAL, após três meses de seguimento é de cerca de 90%, e com ALA de cerca de 89% a 91%, no mesmo período de seguimento^{33,34,47,48,51,52,57,58,86}. Esses resultados estão bem longes dos mostrados aqui no tratamento da QA com TFD. A diluição do fotossensibilizante com a saliva e o formato côncavo do lábio impedindo uma incidência uniforme da luz já foram citados como explicações possíveis para essa diferença de resultados entre QAs e queratoses actínicas⁹². Outro ponto importante é que a correlação clínico-histopatológica na queilite actínica é muito pobre fazendo com que uma biópsia com punch possa facilmente não refletir o grau de displasia mais intenso do lábio³⁴. Assim basear-se em uma biópsia focal do lábio para aferir o grau de displasia como um todo pode não refletir a realidade. Esse é um fato peculiar na queilite actínica e pode ser o responsável pela diferença nos resultados observados nos estudos sobre esse tema⁸⁵. É importante salientar que esse fato também diz respeito às demais modalidades terapêuticas da QA, como laser de CO₂, que baseiam-se em uma biópsia focal para avaliar os resultados do tratamento.

Em relação a imunoistoquímica, o presente estudo avaliou alguns marcadores já relacionados ao risco de transformação neoplásica no lábio: p53, Ki67 e survivina. Um importante marcador do risco da transformação neoplásica investigado em várias lesões é a imunodeteção da proteína p53, produzida pelo gene TP53. A imunodeteção de p53 está aumentada significativamente na QA quando comparada ao lábio normal e à mucosa oral normal. Isto pode ser devido à intensidade do dano causado ao DNA pela exposição solar⁷⁷.

A proteína Ki-67, aparece expressa em todas as fases do ciclo celular exceto na fase G₀, de repouso, sendo considerada um marcador de proliferação celular, processo biológico de vital importância para o organismo⁷⁸. Em estudo sobre a expressão da proteína Ki-67 na mucosa bucal normal, displasia epitelial e carcinoma de células escamosas, os valores do índice de proliferação foram significantes entre os três grupos. Com esse resultado os autores concluíram que

a expressão de Ki-67 poderia ser considerada como marcador inicial da progressão de tumores da mucosa bucal⁸⁰.

A survivina, recentemente descrita, faz parte da família das IAPs. Além da função inibidora de apoptose, ela também tem importante papel na divisão celular participando da organização dos fusos mitóticos⁸². A expressão de survivina em lesões de queilite actínica mostra o potencial maligno destas lesões e sua participação no processo de carcinogênese⁸³. Sua expressão foi verificada em 80% dos cânceres de boca e relacionada a um fenótipo mais agressivo da doença⁸³.

Alguns estudos recentes com campo de cancerização na pele compararam a expressão de p53 e Ki67 antes e após TFD. Nesses estudos houve diminuição da expressão de ambos os marcadores após a TFD^{95,96}. Outro grupo de pesquisadores tratou 26 pacientes com campo de cancerização na face utilizando MAL-TFD e luz vermelha (Aktilite® - PhotoCure, Oslo - Noruega). Houve redução na expressão de p53 em 14 dos 26 pacientes, no entanto, sem significância estatística⁹⁸. Oringer et al.⁹⁹ observou a expressão de p53 e Ki67 nos dias 1, 2, 7, e 30 após TFD em pele com fotodano, mas sem queratoses actínicas. Ele não observou mudança no p53 estatisticamente significativa. Já no Ki67, sendo um marcador de proliferação celular, houve um aumento nos dias 1 e 2 após TFD seguido de queda nos dias 7 e 30⁹⁹. No presente estudo não houve mudança estatisticamente significativa entre antes e depois da TFD em nenhum dos parâmetros imunoistoquímicos estudados. É sabido e já foi descrito que os resultados da TFD para tratamento de queratoses actínicas e campo de cancerização são bem superiores aos da TFD para tratamento de QA, portanto é esperado, de fato, uma diferença nesses dados de imunoistoquímica obtidos de tratamento de campo de cancerização em relação aos nossos dados.

O p53 e o Ki67 são importantes marcadores relacionados à malignidade na QA. No presente estudo chama a atenção a expressão desses marcadores antes do tratamento (mais de 10 células por CGA) na maioria dos pacientes como mostra a Tabela 5. Isso denota um grau de fotodano muito importante, o que pode explicar em parte a resistência desses pacientes ao tratamento, gerando resultados do ponto de vista histopatológico e imunoistoquímico inferiores aos

encontrados em outros estudos. Por outro lado em relação ao p53, sabe-se que pacientes cronicamente expostos à radiação solar apresentam maior expressão da positividade de p53 na epiderme e que a exposição aguda à radiação UV é capaz de induzir maior expressão de p53 selvagem, mesmo que seja transitória²⁴. Assim, é difícil quantificar, com exatidão, a expressão de p53 antes e após o procedimento de nosso estudo, pois embora tenhamos orientado fotoproteção a todos os pacientes, estes poderiam ter sido expostos à radiação UV dias antes da realização das biópsias dificultando, portanto, a interpretação dos resultados. Fica aqui a proposição de utilizar em estudos futuros anticorpos que marquem a p53 mutada, excluindo a marcação da p53 selvagem.

Existem diversos estudos mostrando que a expressão de survivina correlaciona-se com a resistência a TFD^{82,100,101}. Assim a detecção da survivina nos casos do presente estudo vai ao encontro da resistência ao tratamento observada nos mesmos. Alguns estudos mostram que a TFD pode inclusive aumentar a expressão de survivina^{101,82}, fato que não foi observado no presente estudo. Ferrario et al.⁸² mostrou que após realizar TFD com porfirimer sódico em células de câncer de mama de ratos tanto *In vivo* como *In vitro* havia um aumento de survivina.

Uma limitação do presente trabalho é o tamanho da amostra. Um número maior de casos teria dado ao estudo um maior poder estatístico. O fato de termos incluído casos com displasia grave pode ter contribuído para a ausência de cura observada através de análise histopatológica em todos os casos. Isso pode ser comprovado observando-se a concentração elevada dos marcadores associados a malignidade na imunoistoquímica antes da TFD. Além disso, sabe-se que a correlação clínico-histopatológica na queilite actínica é muito pobre e que uma biópsia com punch pode não refletir o grau de displasia mais intenso do lábio⁸⁵. Assim basear-se em uma biópsia focal do lábio para aferir o grau de displasia como um todo pode não refletir a realidade. Esse é um fato peculiar na queilite actínica e pode ser o responsável pela diferença nos resultados observados nos estudos sobre esse tema.

Acredita-se que com a disseminação da microscopia confocal tanto o acompanhamento como avaliação dos métodos terapêuticos usados para QA, terão um grande avanço, já que com esse método pode-se avaliar de maneira global, fidedigna e não invasiva as alterações do lábio antes e após a terapêutica a ser estudada. A utilização da TFD com maior número de sessões ou associação com outros métodos pode maximizar os seus resultados no tratamento da QA e precisa ser melhor estudado.

7. CONCLUSÃO

---

1. A TFD é um método terapêutico seguro para QAs, apresentando neste trabalho índice de cura clínica de 62%.
2. Não houve cura quando analisou-se a histopatologia das lesões em nenhum dos casos de QA incluídos neste estudo, e também não foi possível determinar diferenças estatísticas para esta variável.
3. Não houve alteração estatisticamente significativa nos valores de expressão das proteínas P53, Ki67 e survivina, após TFD, da maneira conduzida neste estudo.
4. Diante dos resultados expostos e discutidos neste estudo, concluí-se que a terapia fotodinâmica não foi opção terapêutica eficaz para o tratamento das QAs incluídas nesta amostra.

8. ANEXOS

Anexo 1. Aplicação do creme fotossensibilizante no lábio inferior com o filme plástico oclusivo

Anexo 2. a) Irradiação com fonte de luz no lábio; b) Aparência do lábio 1 semana após irradiação

A

B

Anexo 3. Paciente antes e após TFD dos pontos de vista: A) clínico; B) histopatológico; C) expressão de Ki67 D) expressão de p53 E) expressão de survivina

9. REFERÊNCIAS

---

1. Main JHP, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *J Can Dent Assoc.* 1994;60:113-6.
2. Kaugars GE, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;88:181-6.
3. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco induced cancer. *Nature.* 2003;3:733-44.
4. Campisi G, Margiotta V. Oral mucosal lesions and risk habits among men in an Italian study population. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(8):22-8.
5. Baker SR. Risk factors in multiple carcinomas of the lip. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1980;88(3):248-51.
6. Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis.* 2004;10(4):212-6.
7. Cataldo E, Doku HC. Solar cheilitis. *J Dermatol Surg Oncol.* 1981;7(12):989-95.
8. Hauschild A, Lischner S, Lange-Asschenfeldt B, Egberts F. Treatment of actinic cheilitis using photodynamic therapy with methylaminolevulinate: report of three cases. *Dermatol Surg.* 2005;31:1344-8.
9. Neto Pimentel DR, Michalany N, Alchorne M, Abreu M, Borra RC, Weckx L. Actinic cheilitis: histopathology and p53. *J Cutan Pathol.* 2006;33(8):539-44.
10. Dufrense R, Curlin M. Actinic cheilitis: a treatment review. *Dermatol Surg.* 1997;23:15-21.
11. Zawacka-Pankau J, Krachulec J, Grulkowski I, Bielawski K, Selivanova G. The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer. *Recent Adv Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;232:487-97.
12. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kmmer JA, Leemans C, Braakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003;63:1727-30.

13. Quaedvlieg PJF, Tirsi E, Thissen MRTM, Krekels GA. Actinic keratosis: how to differentiate the good from the bad ones? *Eur J Dermatol*. 2006;16 (4):335-9.
14. Kohl E, Torezan LAR, Landthaler M, Szeimies R-M. Aesthetic effects of topical photodynamic therapy. *J Eur Acad Dermatol*. 2010;1-9.
15. Braathen L, Szeimies RM, Basset-Seguin N, Bissonnette R, Foley P, Pariser D, Roelands R, Wennberg AM, Morton C. Guidelines on the use of photodynamic therapy for non melanoma skin cancer: an international consensus. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56(1):125-43.
16. Babilas P, Schreml S, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology. State-of-the-art. *Photochem Photobiol Photomed*. 2010;26:118-32.
17. Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration of the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006;150(1):25-38.
18. Rodust PM, Stockfleth E, Ulrich C, Leverkus M, Eberle J. UV - induced squamous cell carcinoma - a role for antiapoptotic signaling pathways. *Br J Dermatol*. 2009;161(Suppl 3):107-15.
19. Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, van der Wall JE, Braakhuis BJM. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol*. 2002;161:1051-60.
20. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Koch WM, Sidransky D. Molecular assessment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Eng J Med*. 1995;332:429-35.
21. Nishigori C. Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci*. 2006;5:208-14.
22. Ischihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T. UV-induced skin damage. *Toxicology*. 2003;189:21-39.
23. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of UV radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;195:298-308.
24. Jonason AS, Subrahmanyam K, Price G, Restifo R, Brash D. Frequent clones

- of P53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93:14025-29.
25. Berg RJW, van Kraken HJ, Rebel HG, de Vries A, van Vloten WA, van Kreijl CF, van der Leun JC, de Gruijl FR. Early p-53 mutations in mouse skin carcinogenesis by UV-B radiation: immunohistochemical detection of mutant p-53 protein clusters of preneoplastic epidermal cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93:274-8.
  26. Roos WP, Kania B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med.* 2006;12:440-50.
  27. Rundhaug JE, Fisher SM. Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV induced skin carcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 2008;84:322-9.
  28. Tripp CS, Blomme EAG, ChinnKS. Epidermal COX-2 induction following UV irradiation: suggested mechanism for the role of COX-2 inhibition in photoprotection. *J Invest Dermatol.* 2003;121:853-61.
  29. Lei K, Davis JR. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl-2 family induces Bax dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:2432-7.
  30. Delehedde M, Cho SH, Sarkiss M. Altered expression of bcl -2 family member proteins in non-melanoma skin cancer. *Cancer.* 1999;85:1514-22.
  31. Peter ME, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 2003;10:26-35.
  32. Rosette C, Karin M. UV light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science.* 1996;274:1194-7.
  33. Szeimies RM, Matheson RT, Davis SA, Bhatia AC, Frambach Y, Klövekorn W, et al. Topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy using red light-emitting diode light for multiple actinic keratoses: a randomized study. *Dermatol Surg.* 2009;35:586-92.
  34. Szeimies RM, Morton CA, Sidoroff A, Braathen LR. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Acta Derm Venereol.* 2005;85:483-90.

35. 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.
36. Daniell MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg*. 1991;61:340-8.
37. Spikes JD. The origin and meaning of the term photodynamic (as used in "photodynamic therapy" for example). *J Photochem Photobio B*. 1991;9:369-74.
38. Raab O. Über die Wirkung fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien. *Z Biol*. 1900;39:524-46.
39. Von Tappeiner H, Jodlbauer A. Ueber die wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) stoffe auf protozoen und enzyme. *Dtsch Arch Klin Med*. 1904;80:427-87.
40. Lui H, Bissonnette R. Photodynamic therapy. In: Goldman MP, Fitzpatrick RE. *Cutaneous laser surgery*. 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1999. p.437-58.
41. Nelson JS, McCullough JL, Berns MW. Principles and applications of photodynamic therapy in dermatology. In: Arndt KA, Dover JS, Olbright SM. *Lasers in cutaneous and aesthetic surgery*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.349-82.
42. Dougherty TJ. Photoirradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res*. 1978;38:2628-35.
43. 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.
44. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B*. 1990;6:143-8.
45. Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX: a clinically useful

- photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 1992;14:275-92.
46. Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 2000;42:389-413.
  47. Piacquadio DJ, Chen DM, Farber HF, Fowler JF Jr, Glazer SD, Goodman JJ. Photodynamic therapy with aminolevulinic topical solution and visible blue light in the treatment of multiples actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. *Arch Dermatol*. 2004;140:41-6.
  48. Nestor MS, Gold MH, Kauvar ANB, Taub AF, Geronemus RG, et al. The use of photodynamic therapy in dermatology: results of a consensus conference. *J Drugs Dermatol*. 2006;5(2):140-54.
  49. Torezan L. Terapia fotodinâmica: princípios de fotoquímica, fotobiologia, agentes fotossensibilizantes e aplicações na oncologia cutânea. In: Osorio N, Torezan L. *Laser em dermatologia*. 2a ed. São Paulo: Roca; 2009. p.171-94.
  50. Charlesworth P, Truscott TG. The use of 5-ALA in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 1993;18:99-100.
  51. Szeimies RM. Photodynamic therapy with topical application of 5-ALA in the treatment of actinic keratosis; a clinical and histological study. *Dermatology*. 1996;192:246-51.
  52. Touma D, Yaar M, Whitehead S, Konnikov N, Gilchrest BA. A trial of short incubation, broad-area photodynamic therapy for facial actinic keratosis and diffuse photodamage. *Arch Dermatol*. 2004;140:33-40.
  53. Fijan S, Honigsman H, Ortel B. Photodynamic therapy of epithelial skin tumors using delta-aminolevulinic acid and desferrioxamine. *Br J Dermatol*. 1995;133:282-8.
  54. Avram D, Goldman MP. Effectiveness and safety of ALA-IPL in treating actinic keratoses and photodamage. *J Drugs Dermatol*. 2004;3(Suppl):36-9.
  55. Alster TS, Tanzi EL, Welsh EC. Photorejuvenation of facial skin with topical 20% 5-ALA and intense pulsed light treatment: a split-face comparison study. *J Drugs Dermatol*. 2005;4:35-8.

56. Gold MH, Bradshaw VL, Boring MM, Bridges TM, Biron JA. Split face comparison of photodynamic therapy with 5- aminolevulinic acid and intense pulsed light versus intense pulsed light alone for photodamage. *Dermatol Surg.* 2006;32(6):795-803.
57. Szeimies RM, Karrer S, Radakovic-Fijan S, Tanew A, Calzavara- Pinton P, Zane C, Sidoroff A, Braathen L. Photodynamic therapy using methyl aminolevelinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol.* 2002;47:258-62.
58. Pariser D, Lowe N, Stewart DM, Jarratt MT, Lucky AW, Pariser RJ, Yamauchi P. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48(2):227-32.
59. Zane C, Capezera R, Sala R, Venturini M, Calzavara-Pinton P. Clinical and echographic analysis of PDT using MAL as sensitizer in the treatment of photodamaged facial skin. *Lasers Surg Med.* 2007;39:203-9.
60. Kessel D, Luo Y. Delayed oxidative photodamage induced by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1996;64:601-4.
61. Angell-Petersen E, Sorensen R, Warloe T, Soler AM, Moan J, Peng Q, Giercksky KE. Porphyrin formation in actinic keratosis and basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *J Invest Dermatol.* 2006;126(2):265-71.
62. Fotinos N, Campo MA, Popowycz F, Gurny R, Lange N. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: characteristics, application and perspectives. *Photochem Photobiol.* 2006;82:994-1015.
63. Peng Q, Soler AM, Warloe T, Nesland JM, Giercksky KE. Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *J Photochem Photobiol B.* 2001;62:140-5.

-
64. Fritsch C, Homey B, Stahl W, Lehmann P, Ruzicka T, Sies H. Preferential relative porphyrin enrichment in solar keratoses upon topical application of delta-aminolevulinic acid methylester. *Photochem Photobiol.* 1998;68:218-21.
  65. Moloney FJ, Collins P. Randomized, double-blind, prospective study to compare topical 5-aminolaevulinic acid methylester with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for extensive scalp actinic keratosis. *Br J Dermatol.* 2007;157:87-91.
  66. Wiegell SR, Wulf HC. Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid versus methyl aminolevulinate. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54:647-51.
  67. Kuijpers DI, Thissen MR, Thissen CA, Neumann MH. Similar effectiveness of methyl aminolevulinate and 5-aminolevulinate in topical photodynamic therapy for nodular basal cell carcinoma. *J Drugs Dermatol.* 2006;5:642-5.
  68. Morton CA, McKenna KE, Rhodes LE; British Association of Dermatologists Therapy Guidelines and Audit Subcommittee and the British Photodermatology Group. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br J Dermatol.* 2008; 159:1245-66.
  69. Clark C, Bryden A, Dawe R, et al. Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparison of light sources. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003;19:134-41.
  70. Stender IM, Wulf HC. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic cheilitis. *Br J Dermatol.* 1996;135:454-6.
  71. Alexiades-Armenakas MR, Geronemus. Laser-mediated photodynamic therapy of actinic cheilitis. *J Drugs Dermatol.* 2004;3:548-51.
  72. Kodama M, Watanabe D, Akita Y, Tamada Y, Matsumoto Y. Photodynamic therapy for the treatment of actinic cheilitis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2007;23:209-10.

-
73. Sotiriou E, Apalla Z, Koussidou-Erremonti T, Ioannides D. Actinic cheilitis treated with one cycle of 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy: report of 10 cases. *Br J Dermatol*. 2008;159:261-2.
  74. Berking C, Herzinger T, Flaig MJ, Brenner M, Borelli C, Degitz K. The efficacy of photodynamic therapy in actinic cheilitis of the lower lip: a prospective study of 15 patients. *Dermatol Surg*. 2007;33:825-30.
  75. Rossi R, Assad GB, Buggiani G, Lotti T. Photodynamic therapy: treatment of choice for actinic cheilitis? *Dermatol Ther*. 2008;21:412-5.
  76. Piccelli HR. *Avaliação clínica, histopatológica e imunohistoquímica de 48 casos de queilite actínica* [dissertação]. Goiânia: Universidade de Católica de Goiás; 2008.
  77. Beissert S, Loser K. Molecular and cellular mechanisms of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol*. 2008;84(1):29-34.
  78. Gerdes J, Schwab U, Lemke H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31:13-20.
  79. Bacchi E, Gown M. Detection of cell proliferation in tissue sections. *Braz J Med Biol Res*. 1993;26:677-87.
  80. Macuskley M, Ogden R, Green M. The association between epithelial proliferation and disease progression in the oral mucosa. *Oral Oncol*. 1999;35:409-14.
  81. Altieri DC. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Prog Cell Cycle Res*. 2003;5:447-52.
  82. Ferrario A, Rucker N, Wong S, Luna M, Gomer C. Survivin, a member of the inhibitor apoptosis family, is induced by photodynamic therapy and is a target for improving treatment response. *Cancer Res*. 2007;67:4989-95.
  83. Schussel J. *Avaliação da expressão imunohistoquímica das proteínas survivina e beta-catenina em queilite actínica e carcinoma epidermóide de*

- lábio* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2007.
84. Oliveira Filho J. *Queilite actínica – avaliação clínica, histopatológica e histoquímica do tratamento com laser de CO2* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1998.
  85. Nico M, Rivitti E, Lourenço S. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. *J Cutan Pathol*. 2007;34:309-14.
  86. Freeman M, Vinciullo C, Francis D, et al. A comparison of photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate (Metvix) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Dermatolog Treat*. 2003;14:99-106.
  87. Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ. P53 protein expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for development of squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 1998;184:360-8.
  88. Liu SC, Klein-Szanto AJP. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral oncol*, 36:145-51, 2000.
  89. Piattelli A, Rubini C, Fiorini M. Prevalence of p53, bcl-2 and Ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in pre-malignant and malignant lesions of oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002;60:532-40.
  90. Sotiriou E, Apalla Z, Chovarda E, Panagiotidou D, Ioannides D Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in actinic cheilitis: an 18-month clinical and histological follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24(8):916-20.
  91. Ribeiro CF1, Souza FH, Jordão JM, Haendchen LC, Mesquita L, Schmitt JV, Faucz LL. Photodynamic therapy in actinic cheilitis: clinical and anatomopathological evaluation of 19 patients. *An Bras Dermatol*. 2012;87(3):418-23.

92. Hurwitz RM, Monger LB. Solar keratosis: an evolving squamous cell carcinoma: benign or malignant? *Dermatol Surg.* 1995;21:184.
93. Chaves YN, Torezan LA, Niwa AB, Sanches Junior JA, Festa Neto C. Pain in photodynamic therapy: mechanism of action and management strategies. *An Bras Dermatol.* 2012;87(4):521-6; quiz 527-9.
94. Borelli C, Herzinger T, Merk K, Berking C, Kunte C, Plewig G, et al. Effect of subcutaneous infiltration anesthesia on pain in photodynamic therapy: a controlled open pilot trial. *Dermatol Surg.* 2007;33:3148.
95. Rossoe EW, Tebcherani AJ, Sittart JA, Pires MC. Actinic cheilitis: aesthetic and functional comparative evaluation of vermilionectomy using the classic and W-plasty techniques. *An Bras Dermatol.* 2011;86(1):65-73.
96. Scola N, Terras S, Georgas D, Othlinghaus N, Matip R, Pantelaki I, Möllenhoff K, Stücker M, Altmeyer P, Kreuter A, Gambichler T. A randomized, half-side comparative study of aminolaevulinate photodynamic therapy vs. CO(2) laser ablation in immunocompetent patients with multiple actinic keratoses. *Br J Dermatol.* 2012;167(6):1366-73.
97. Bagazgoitia L, Cuevas Santos J, Juarranz A, Jaén P. Photodynamic therapy reduces the histological features of actinic damage and the expression of early oncogenic markers. *Br J Dermatol.* 2011;165(1):144-51.
98. Szeimies RM, Torezan L, Niwa A, Valente N, Unger P, Kohl E, Schreml S, Babilas P, Karrer S, Festa-Neto C. Clinical, histopathological and immunohistochemical assessment of human skin field cancerization before and after photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2012;167(1):150.
99. Orringer JS, Hammerberg C, Hamilton T, Johnson TM, Kang S, Sachs DL, Fisher G, Voorhees JJ. Molecular effects of photodynamic therapy for photoaging. *Arch Dermatol.* 2008;144(10):1296-302.
100. Cogno IS, Vittar NB, Lamberti MJ, Rivarola VA. Optimization of photodynamic therapy response by survivin gene knockdown in human metastatic breast cancer T47D cells. *J Photochem Photobiol B.* 2011;104(3):434-43.

-
101. Chu J, Wu S, Xing D. Survivin mediates self-protection through ROS/cdc25c/CDK1 signaling pathway during tumor cell apoptosis induced by high fluence low-power laser irradiation. *Cancer Lett.* 2010;297(2):207-19.
  102. Castaño E, Comuni3n A, Arias D, Mi3ano R, Romero A, Borbujo J. Photodynamic therapy for actinic cheilitis. *Actas Dermosifiliogr.* 2009;100(10):895-8.
  103. Jadotte YT, Schwartz RA. Solar cheilosis: an ominous precursor: part I. Diagnostic insights. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66(2):173-84;
  104. Actinic cheilitis: epithelial expression of COX-2 and its association with mast cell tryptase and PAR-2. *Oral Oncol.* 2009;45:284-90.
  105. Crosthwaite N, Teale D, Franklin C, Foster GA, Stringer BM. p53 protein expression in malignant, pre-malignant and non-malignant lesions of the lip. *J Clin Pathol.* 1996;49:648-53.