UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MICHELLE BARRETO REQUENA

**Otimização da entrega de fármacos para tratamento de câncer de pele por terapia
fotodinâmica**

São Carlos

2019

MICHELLE BARRETO REQUENA

**Otimização da entrega de fármacos para tratamento de câncer de pele por terapia
fotodinâmica**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Física do Instituto de Física de
São Carlos da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador
Bagnato

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Requena, Michelle Barreto

Otimização da entrega de fármacos para tratamento de câncer de pele por terapia fotodinâmica / Michelle Barreto Requena; orientador Vanderlei Salvador Bagnato - versão corrigida -- São Carlos, 2019.

131 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Aplicação intradérmica. 3. Dermógrafo. 4. Microagulhas dissolvíveis. I. Bagnato, Vanderlei Salvador, orient. II. Título.

Dedico este trabalho à minha família e amigos,
cujo apoio e incentivo me motivaram ao longo
dos anos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me guiar e abençoar todo o tempo.

Ao Professor Vanderlei S. Bagnato. Agradeço a orientação durante os quatro anos de execução deste trabalho, e principalmente por me apresentar a Terapia Fotodinâmica há 10 anos. Foi quando me encontrei na ciência e me encantei com as aplicações da física, sempre buscando ajudar as pessoas. Agradeço a todos os ensinamentos, discussões de final de semana e oportunidades que moldaram a pesquisadora me tornei.

Agradeço aos meus pais, João Carlos e Maria Isaura, pelo incentivo aos estudos, apoio as minhas escolhas e carreira. Porque mesmo insatisfeitos com a distância, me encorajavam a continuar e declaravam constatare orgulho. Parte das minhas conquistas foi graças aos sacrifícios que fizeram. A vocês, devo meu amor incondicional.

Sou tão grata ao meu marido Gabriel. Ele faz meus dias leves, me lembra das coisas importantes da vida, me incentiva e sonha comigo. Tenho certeza que me faz mais forte, me inspira e me motiva diariamente. Agradeço seu amor, dedicação e companheirismo.

Ao meu irmão Matheus que me motiva sem nem se esforçar, apenas pelo fato de te orgulhar eu sinto vontade de continuar. Obrigada pelo suporte enquanto eu estive fora estes anos.

Agradeço minha família: avós, tios e primos, sogros e cunhados. Eles me fazem tanta falta, mas sei que de longe vibram tanto por mim, pelo meu trabalho e realizações.

Aos meus amigos de graduação, Sabrina Nicoleti, Carla Signori e Tárcius Ramos. Amigos com quem tive momentos tão especiais e ainda participam muito da minha vida, meu eterno carinho.

Às amigas de Araçatuba, Nathália Tonheiro, Thamires Palomino e Natália Turri. Mesmo nos vendo tão pouco, sei o quanto torcem por mim.

A minha grande amiga Mariana Carreira, que em tão pouco tempo se tornou tão importante pra mim, que é um presente na minha vida, faz meus dias mais divertidos, sempre com sinceridade e alegria.

Ao meu grande amigo José Dirceu Vollet Filho, sempre ao meu lado, sempre me incentivando, ajudando a enxergar as coisas boas e lidar com o que precisei da melhor forma possível. Além disso, obrigada por toda colaboração com meu trabalho, fundamental para o desenvolvimento e finalização.

Agradeço ao Marlon Garcia, que colaborou com o processamento dos dados e tornou-se um amigo que admiro muito.

À Clara Maria Gonçalves que colaborou com os experimentos, uma pessoa que me tranquilizou em diversos momentos e tornou-se uma amiga especial.

Ao amigo Pedro Russignoli, pela dedicação, diversas horas de experimentos, processamento de dados e discussões, o melhor aluno que eu poderia ter.

Um agradecimento especial às amigas Mirian Strignasci, Layla Pires, Hilde Buzzá, Carolina Campos, Cintia Teles e Thereza Cury. Pesquisadoras admiráveis que me ensinaram muito ao longo destes anos e pude compartilhar momentos tão felizes.

Ao professor Sebastião Pratavieira, por todas as contribuições com experimentos e discussões deste trabalho, pela amizade ao longo dos anos.

A Professora Cristina Kurachi, pelas contribuições com o trabalho, incentivo e pela amizade durante todos os anos no grupo.

Às técnicas do laboratório, Natália Inada e Lilian Moriyama, pelo suporte e amizade.

À dermatologista Ana Gabriela Sálvio, pela amizade e aprendizados sobre pesquisa clínica.

À equipe do Ambulatório de Pele do Hospital Amaral Carvalho em Jaú, especialmente as enfermeiras Elisangela, Maira e Talita. Agradeço a colaboração com o estudo e amizade.

Ao professor Ryan Donnelly, que em pouco tempo me ensinou tanto e me inspirou como pesquisadora. Agradeço pela oportunidade, atenção e dedicação.

Aos amigos que fiz em Belfast, especialmente Andi Dian Permana, Patrícia Gonzalez, Carolina Veríssimo e Izanara Pritsch. Não tenho palavras para descrever o quanto vocês preencheram minha vida e fizeram com que tudo fosse tão especial.

Ao Programa Institucional de Doutorado-sanduíche no Exterior (PDSE) pela bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que permitiu que parte do estudo fosse desenvolvida em Belfast, Reino Unido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF), pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

“Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious. And however difficult life may seem there is always something you can do and succeed at”.

Stephen Hawking

RESUMO

REQUENA, M. B., **Otimização dos processos de entrega da droga no tratamento de câncer de pele por terapia fotodinâmica**. 2019. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Em terapia fotodinâmica (TFD), a protoporfirina IX (PpIX) é um fotossensibilizador (FS) endógeno bastante utilizado a partir da aplicação de precursores, como o ácido aminolevulínico (ALA) e aminolevulinato de metila (M-ALA). Tendo em vista que a aplicação intradérmica pode proporcionar a disponibilização destes precursores com maior penetração na pele em relação à sua aplicação tópica convencional, esse estudo avaliou a distribuição da PpIX a partir da entrega de precursores por dermógrafos e microagulhas dissolvíveis. Os estudos em pele sadia de ratos e modelo tumoral em camundongos demonstraram resultados promissores para a aplicação de dermógrafo, apresentando distribuição mais homogênea do FS, e deram embasamento para conduzir um estudo clínico em pacientes. A resposta para tratamento de lesões de carcinoma basocelular nodulares com curetagem prévia e aplicação de dermógrafo teve taxa de cura similar à aplicação tópica, porém, nenhuma lesão recidivou após seis meses de tratamento, enquanto na aplicação tópica 10% dos casos recidivaram. Foram desenvolvidas microagulhas dissolvíveis contendo precursores que apresentaram eficiência em resistência mecânica, permeação e dissolução, mostrando-se viáveis para a aplicação. Microagulhas dissolvíveis contendo 5% de ALA se mostraram mais eficientes na formação do FS em profundidade que a aplicação tópica do creme em mesma concentração nos estudos conduzidos em modelo tumoral de camundongos. A partir deste trabalho, foi possível alcançar mais profundo entendimento acerca dessas técnicas de entrega intradérmica de precursores de FS, as quais podem ser capazes de solucionar problemas práticos relacionados à TFD clínica. Os instrumentos para entrega intradérmica relacionados a este estudo proporcionaram a disponibilização de FS com maior penetração no tecido quando comparados à sua aplicação tópica convencional. A eficácia da entrega do precursor e consequente maior profundidade de produção do FS favorece o uso e pode ampliar a aceitação da TFD como opção terapêutica pela comunidade médica.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Aplicação intradérmica. Dermógrafo. Microagulhas dissolvíveis.

ABSTRACT

REQUENA, M. B., **Optimization of drug delivery for skin cancer treatment of by photodynamic therapy**. 2019. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

In photodynamic therapy (PDT), protoporphyrin IX (PpIX) is an endogenous photosensitizer (PS) widely used, obtained by its precursor's application such as aminolevulinic acid (ALA) and methyl aminolevulinate (MAL). The intradermal application may provide greater penetration of the precursors into the skin compared with the standard topical application. Aiming to improve this penetration, this study evaluated the PpIX distribution obtained by the precursor's delivery using either dermographs or dissolving microneedles. The *in vivo* tests were conducted in normal rat skin and in a model of skin tumor in mice. Both models showed promising results for the dermograph application, presenting a more homogeneous distribution of PS, and provided a basis for a clinical study in patients. The treatment response for nodular basal cell carcinoma lesions using dermograph application associated to previous debulking had a cure rate similar to the topical application; however, no lesion recurrence was observed six months after the treatment, whereas about 10% of the lesions recurred for topical PDT. Dissolving microneedles containing precursors were also developed, presenting desired characteristics of mechanical strength, permeation, and dissolution, which made the *in vivo* application feasible. Dissolving microneedles containing 5% ALA were more efficient to produce PS in-depth than the topical application of the 5% ALA cream in studies conducted in the skin tumor model in mice. Based on this study, a deeper understanding of these intradermal delivery techniques of PS precursors was achieved, which may enable solving practical problems related to clinical PDT. Both instruments for intradermal delivery provided the availability of PS with greater penetration in the tissue when compared to the standard topical application. The efficacy of precursor's delivery and the consequent increase in the depth of PS production favor the PDT use, which can broaden its acceptance as a therapeutic option by the medical community.

Keywords: Photodynamic therapy. Intradermal delivery. Dermograph. Dissolving microneedles.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diagrama de Jablonski simplificado para ilustrar fenômenos relacionados com a interação do FS após excitação pela luz e possíveis reações fotodinâmicas. 33
- Figura 2 - Lâmina histológica de pele humana corada com hematoxilina e eosina (HE). As linhas em preto à direita indicam as localizações do estrato córneo, estrato granular, estrato espinhoso e camada basal. A linha pontilhada em amarelo indica a separação da epiderme e da derme (junção dérmico-epidérmica). 35
- Figura 3 - a) Imagens de fluorescência de campo amplo coletadas 180 minutos após a aplicação de ALA-20% tópico em creme em pele de porco e b) protocolo com aplicação prévia de rolo de microagulhas de 1,5 mm de profundidade seguida da aplicação de ALA-20%. 36
- Figura 4 - Imagens de fluorescência de campo amplo coletadas 180 minutos após a aplicação de ALA-20% em pele de porco a) por creme e após b) após 90 minutos por injeção de pressão livre de agulhas. 36
- Figura 5 - Espectros de absorbância e de emissão de fluorescência normalizada da PpIX. 37
- Figura 6 - Ilustração demonstrando a inserção de pigmentos na derme através de um dermógrafo. 40
- Figura 7 - a) Representação esquemática de cinco tipos diferentes de microagulhas utilizadas para facilitar a administração intradérmica e transdérmica de medicamentos na pele; a) microagulhas sólidas para aumentar a permeação de fármaco através da criação de micro orifícios, b) microagulhas revestidas para rápida dissolução do fármaco, c) microagulhas dissolvíveis para liberação rápida ou controlada da droga incorporada nas microagulhas, d) microagulhas ocas usadas para perfurar a pele e permitir a liberação de um fármaco líquido após infusão ativa ou difusão da formulação através dos orifícios da agulha, e) microagulhas de hidrogel que absorvem fluidos intersticiais do tecido, induzindo a difusão do fármaco localizado em reservatório através das microagulhas inchadas. 41
- Figura 8 - a) Dermógrafos utilizados nos estudos: à esquerda, equipamento denominado de D1 e à direita equipamento denominado D2, b) ponteira e agulha do dermógrafo D1, c) cápsula de nove microagulhas do dermógrafo D2. 46
- Figura 9 - Esquema ilustrando as etapas do processamento das imagens de fluorescência por microscopia confocal dos tumores. a) imagem no canal vermelho, b) imagem com cores falsas do programa para facilitar visualização e c) a letra 'A' a região em que foi quantificada a variação da intensidade de fluorescência no canal vermelho e 'Z' a

direção da profundidade a ser avaliada. As linhas em branco delimitam as 30 áreas avaliadas.	48
Figura 10 - Micrografia com aumento original de 10 vezes de a) 1 microagulha (1 μ), b) 2 agulhas distribuídas linearmente (2-), c) 3 microagulhas (3 μ o) distribuídas de forma circular, d) três agulhas distribuídas de forma circular (3o) e e) 5 agulhas distribuídas de forma circular (5o). A barra de escala no canto superior esquerdo representa 250 μ m.	50
Figura 11 - a) Demonstração do uso de D1 em experimento <i>in vitro</i> em pele suína para avaliação do b) perfil de penetração do corante; a barra de escala no canto inferior direito corresponde a 5 mm.	50
Figura 12 - Esquema representando as sete condições aplicadas no dorso do animal. Sendo que o precursor aplicado a administração do precursor foi feita por meio de creme tópico (C), solução tópica (S), solução intradérmica usando o dermógrafo D1 (D1), solução intradérmica usando D1 seguido de aplicação tópica do creme (D1+C), solução intradérmica usando o dermógrafo D2 (D2), solução intradérmica usando D2 seguida da aplicação tópica do creme (D2+C), e pele normal sem aplicação do precursor (Ctrl).	52
Figura 13 - Imagem ilustrando a) tumor induzido no flanco do animal e b) a medida com paquímetro digital do diâmetro que considera a espessura do tumor (<i>d3</i>).	54
Figura 14 - Esquema exemplificando a posição de indução tumoral intradérmica no flanco direito do animal e resumindo os grupos experimentais executados em réplicas de quatro animais. Sendo o precursor aplicado de forma (a) tópica, (b) intradérmica, (c) controle, sendo o tumor sem aplicação do precursor.	54
Figura 15 - a) Tumor induzido no flanco direito do animal antes da aplicação do precursor, b) creme posicionado no tumor e c) animal mantido sob proteção contra ativação da PpIX pela luz ambiente durante o tempo de incubação.	55
Figura 16 - Resumo dos experimentos conduzidos com o modelo tumoral.	55
Figura 17 - Profundidade de penetração do corante usando D1 com diferentes tipos de agulhas fixadas em 2 mm, com e sem o uso de lubrificante.	56
Figura 18 - Espectros médios de fluorescência para os tempos de 0, 60, 120 e 180 minutos.	57
Figura 19 - Espectros médios de fluorescência normalizados pela intensidade de fluorescência no comprimento de onda de 450 nm.	58
Figura 20 - Intensidade de fluorescência no comprimento de onda de 635 nm após normalização em função do tempo para condições envolvendo aplicação de a) creme e b) solução.	59

Figura 21 - Esquema para ilustrar a curva de formação de PpIX em função do tempo. Sendo C_0 a concentração máxima de FS, τ tempo característico de formação da PpIX para atingir 63% da máxima concentração, α o coeficiente angular da reta que descreve o comportamento da curva para tempo muito menores que τ .	60
Figura 22 - Intensidade de fluorescência no comprimento de onda de 635 nm após normalização em função do tempo para condições envolvendo aplicação de a) creme e b) solução; após subtração do valor da intensidade autofluorescência e ajuste linear.	61
Figura 23 - Valores do coeficiente angular α relacionado ao tempo de formação da PpIX estimado por espectroscopia de fluorescência.	62
Figura 24 - Imagens de fluorescência de campo amplo representativas de antes da aplicação do precursor (controle), após 120 e 180 minutos da aplicação dos protocolos envolvendo solução (S, D1, D2) e associação de com creme (C, D1+C e D2+C).	62
Figura 25 - Intensidade média no canal vermelho em função do tempo associada a fluorescência da PpIX a partir imagens de campo amplo de fluorescência.	63
Figura 26 - Micrografia de fluorescência confocal das biópsias coletadas após 2 horas de incubação para as diferentes condições experimentais. As imagens foram montadas com a sobreposição da imagem de fluorescência no canal vermelho com a imagem de microscopia de transmissão da amostra. A barra de escala no canto direito inferior das imagens corresponde a 1 mm, a letra 'a' indica à posição da epiderme, 'b' a extensão da derme, 'c' a camada adiposa e o símbolo '*' a localização dos folículos pilosos.	64
Figura 27 - Avaliação do médico patologista sobre a incidência do dano em função dos protocolos aplicados.	65
Figura 28 - Imagem de um corte histológico de condição controle em que a epiderme foi selecionada contornada (em vermelho) com ferramenta do programa QuPath e está indicada pela seta vermelha. A letra 'a' indica a extensão da derme papilar e 'b' a derme reticular, o símbolo '▲' indica a localização do estrato córneo, '●' um folículo piloso e '★' uma glândula sebácea. O A barra no canto inferior direito representa a escala de 100 μ m.	66
Figura 29 - Área da epiderme estimada pelos cortes histológicos de cada protocolo a partir de seleção manual da epiderme realizada com o programa QuPath.	66
Figura 30 - Imagens de cortes histológicos para exemplificação dos danos observados após aplicação de TFD, nas quais são representadas a) uma região com crosta e preservação da epiderme, b) uma região em que apenas porções da epiderme foram preservadas e c) uma região	

com dano extremo em que toda epiderme foi destruída. As setas vermelhas indicam regiões com epiderme e o asterisco (“*”) indica regiões de dano tecidual (crosta, edema, inflamação). A barra no canto inferior direito representa a escala de 400 μ m.	67
Figura 31 - Parâmetro η médio estimado para os diferentes protocolos.....	68
Figura 32 - a) Aplicação de creme com dermógrafo D2 no tumor e b) ponteira de irradiação posicionada para a TFD.	69
Figura 33 - Espectros médios da intensidade de fluorescência para aplicação do a) creme e b) creme com dermógrafo, considerando autofluorescência e fluorescência após 1 hora de incubação na região do tumor fotossensibilizado e no tecido sadio sem fotossensibilização.	70
Figura 34 - Espectros médios da intensidade de fluorescência normalizados para aplicação do a) creme e b) creme com dermógrafo, considerando autofluorescência e fluorescência após 1 hora de incubação na região do tumor fotossensibilizado e no tecido sadio sem fotossensibilização.	71
Figura 35 - a) Gráfico tipo <i>boxplot</i> dos valores médio da intensidade de fluorescência normalizada no comprimento de onda de 635 nm referente aos espectros coletados no tumor 1 hora após a aplicação de M-ALA em creme com e sem a aplicação de dermógrafo. b) valor médio e desvio padrão da intensidade de fluorescência normalizada considerando todos os animais.	71
Figura 36 - Imagens de campo amplo de fluorescência coletadas antes da aplicação do precursor (autofluorescência endógena do tumor e pele ao redor), 1 hora após a aplicação do precursor e após a irradiação da TFD; sendo a) aplicação tópica do M-ALA em creme e b) aplicação intradérmica do M-ALA em creme por dermógrafo.	72
Figura 37 - a) Gráfico do tipo <i>boxplot</i> dos valores médio da intensidade no canal vermelho das imagens de fluorescência de campo coletadas no tumor 1 hora após a aplicação de M-ALA em creme com e sem a aplicação de dermógrafo. b) valor médio e desvio padrão da intensidade no canal vermelho das imagens de fluorescência de campo coletadas considerando todos os animais, nas mesmas condições em 1 hora de incubação e autofluorescência.	73
Figura 38 - Imagens representativas da microscopia confocal de fluorescência no canal vermelho com sobreposição da imagem de transmissão para os tumores, sendo a) tumor sem sensibilização (controle); b) tumor após 1 hora da aplicação de creme via tópica de M-ALA na concentração de 20%; c) tumor após 1 hora da aplicação via intradérmica por dermógrafo de M-ALA na concentração de 20% de creme. A barra no canto superior direito corresponde à escala de 1 mm.	74
Figura 39 - Intensidade média no canal vermelho das imagens de microscopia confocal de fluorescência em função da profundidade, para tumores	

- sem sensibilização (controle) e tumores após 1 hora da aplicação de M-ALA em creme na concentração de 20% com aplicação via tópica ou via intradérmica por dermatógrafo. O valor da área para cada aplicação foi calculado pelo programa Origin e está relacionado com a integral dos valores em função da profundidade. 75
- Figura 40 - Intensidade média no canal vermelho das imagens de microscopia confocal de fluorescência em função da profundidade (de 0,5 a 1 mm), para tumores sem sensibilização (controle) e tumores após 1 hora da aplicação de M-ALA em creme na concentração de 20% com aplicação via tópica ou via intradérmica por dermatógrafo. 75
- Figura 41 - Imagens de cortes histológicos de a) tumor controle (sem aplicação de precursor ou irradiação); b) tumor coletado após 72 horas da aplicação de TFD com protocolo de aplicação tópica de creme contendo 20% de M-ALA, e c) tumor coletado após 72 horas da aplicação de TFD com protocolo de aplicação intradérmica do creme contendo 20% de M-ALA por dermatógrafo. A seta azul indica a extensão da pele (epiderme e derme), a seta verde indica a extensão do tumor intradérmico, as setas amarelas indicam regiões com infiltrados inflamatórios e o símbolo asterisco (“*”) indica regiões com crosta e edema. A barra no canto superior direito representa a escala de 250 µm. 76
- Figura 42 - M. S. A., homem, 58 anos, CBC nodular localizado na perna direita, com diâmetro médio de 1,6 cm. Sendo, (a) imagem de luz branca de uma das lesões, seguida pela (b) imagem de autofluorescência da lesão coletada antes da curetagem e as imagens de fluorescência ao longo da incubação e tratamento: (c) após 90 minutos, (d) 180 minutos da aplicação do creme por dermatógrafo, (e) após primeira sessão de TFD, (f) após 90 minutos da reaplicação do creme com dermatógrafo e (g) após segunda sessão de TFD. A seta branca indica a delimitação da lesão (contorno branco na imagem ‘b’ e ‘d’) e o contorno preto (imagem ‘d’) representa a região considerada como borda da lesão. 84
- Figura 43 - Intensidade de fluorescência da PpIX estimada a partir da intensidade média no canal vermelho das imagens de campo amplo de fluorescência na lesão e na borda ao longo das etapas do tratamento. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da média entre as lesões avaliadas. 84
- Figura 44 - Quantidade de lesões em porcentagem em função dos grupos. Sendo as siglas, CP: cabeça e pescoço, T: tronco, MS: membro superior e MI: membro inferior. Sendo, A: aplicação tópica de creme com curetagem prévia, B: aplicação intradérmica de creme por dermatógrafo com curetagem prévia e C: aplicação intradérmica de creme por dermatógrafo sem. curetagem prévia. 86
- Figura 45 - Curvas de porcentagem de sobrevida livre de doença em função tempo de acompanhamento dos pacientes pelo método de Kaplan-Meier. Sendo, A: aplicação tópica de creme com curetagem prévia, B: aplicação intradérmica de creme por dermatógrafo com curetagem

prévia e C: aplicação intradérmica de creme por dermógrafo sem curetagem prévia. Os traços na vertical sobrepostos nas curvas de sobrevida representam a data da última informação de cada lesão.....89

Figura 46 - a) H. D. Z, homem, 52 anos, tratado com o protocolo de aplicação tópica de creme com curetagem prévia (GRUPO A), sendo: a1) CBC nodular de 0,5 cm de diâmetro médio localizado no trapézio esquerdo, a2) aspecto da região após 30 dias a TFD; a3) aspecto da região após oito meses após a TFD. b) L. S. S, mulher, 90 anos, tratada com o protocolo de aplicação intradérmica de creme por dermógrafo com curetagem prévia (GRUPO B) sendo: b1) CBC nodular de 0,6 cm de diâmetro médio localizado na região malar direita, b2) aspecto da região após 30 dias a TFD; b3) aspecto da região após dez meses após a TFD. c) A. H, homem, 80 anos, tratado com o protocolo de aplicação intradérmica de creme por dermógrafo sem curetagem prévia (GRUPO C) sendo: c1) CBC nodular de 0,8 cm de diâmetro médio localizado na região malar direita, c2) aspecto da região após 30 dias a TFD com diagnóstico histopatológico de CBC residual; c3) aspecto da região após realização da cirurgia. O círculo preto nas imagens com índice '2' refere-se à posição na qual a lesão era localizada antes do tratamento e as setas pretas nas imagens com índice '3' apontam a região tratada avaliada após seis meses da TFD.91

Figura 47 - a) Molde de silicone usado para fazer os arranjos de microagulhas e b) micrografia do molde ilustrando os furos e distância entre eles. A barra no canto inferior direito representa a escala de 1 mm.94

Figura 48 - Foto de um arranjo de microagulhas com representação das dimensões de uma microagulha isolada. Sendo x o comprimento no qual as 19 microagulhas estão distribuídas, d a distância entre elas, h a altura e ℓ a largura da base.....94

Figura 49 - Molde de silicone com superfície lisa para formação do filme e filme após secagem e remoção do molde.95

Figura 50 - a) Imagem de um arranjo de microagulhas a ser depositado em um recipiente aberto e b) embalagem de alumínio lacrada para teste de estabilidade.....97

Figura 51 - a) Microagulha aderida na fita adesiva para aplicação e coberta com fita adesiva branca de curativo para fixação no animal, b) posicionamento do equipamento para aquecimento local por 15 minutos à 40°C após aplicação da microagulha.99

Figura 52 - Microagulhas preparadas com Gantrez AN-139 com concentração de a) 20%, b) 10% e c) 5% de M-ALA.....100

Figura 53 - a) Visão microscópica do arranjo de microagulhas e b) micrografia com aumento para visualização do formato piramidal das microagulhas. A barra do canto inferior direito representa escala de 1 mm.....101

Figura 54 - Altura média das microagulhas antes e após compressão por 30 segundos com força de 32 N em função da concentração M-ALA nas formulações contendo 20% de Gantrez S-97 ou 20% de Gantrez AN-139.....	101
Figura 55 - Micrografia dos arranjos de microagulhas de M-ALA após teste de estabilidade a 37 °C e 40% de umidade nas (a,c) embalagens de alumínio lacradas ou (b,d) em recipiente aberto, por (a,b) três e (b,d) quatro semanas.....	102
Figura 56 - Micrografia dos arranjos de microagulhas de ALA após teste de estabilidade a 37 °C e 40% de umidade nas (a,c) embalagens de alumínio lacradas ou (b,d) em recipiente aberto, por (a,b) três e (b,d) quatro semanas.....	103
Figura 57 - a) Filme após corte das bordas e b) imagem microscópica da lateral do filme para estimativa da largura. A barra do canto inferior direito representa escala de 1 mm.	103
Figura 58 - Porcentagem de redução de água após 48 horas de secagem, considerando três lotes com 10 arranjos de microagulhas em cada, para as formulações contendo 5% de ALA e 5% de M-ALA.	104
Figura 59 - a) Arranjo posicionado para coleta de imagem no microscópio para visualização do tamanho das pirâmides., imagem de um dos lados do arranjo b) antes e c) depois da compressão. A barra de escala no canto inferior direito representa escala de 1 mm.....	105
Figura 60 - Altura média das microagulhas antes e após compressão por 30 segundos com força de 32 N com formulação contendo 20% de Gantrez AN-139, 5% de ALA ou M-ALA em 20% de Gantrez AN-139.....	105
Figura 61 - a) Modelo de membrana artificial para avaliação da penetração das microagulhas com oito camadas de Parafilm [®] , exemplo de furos na b) primeira, c) segunda, d) terceira e e) quarta camada. A barra no canto inferior a direita representa escala de 2 mm.	106
Figura 62 - Porcentagem de furos causado pelas microagulhas nas de Parafilm [®] em função da profundidade e quantidade de camadas.....	106
Figura 63 - Teste <i>in vitro</i> em pele de porco neonato para estimar o tempo de dissolução das microagulhas a) após a aplicação manual por 30 segundos e apóio de peças metálicas para manter pressionada e b) após 5 minutos da dissolução.	107
Figura 64 - Micrografias dos arranjos de microagulhas de (a,b,c,d) ALA e (e,f,g,h) M-ALA após o teste de dissolução <i>in vitro</i> em pele de porco neonato.....	108

Figura 65 - Microscopia confocal de fluorescência de um arranjo de microagulhas após 1 hora de dissolução no modelo tumoral animal. A barra no canto inferior a direita representa escala de 1 mm.....	109
Figura 66 - Espectros médios da intensidade de fluorescência para aplicação do a) creme e b) microagulha, considerando autofluorescência e fluorescência após 1 hora de incubação na região do tumor fotossensibilizado e no tecido sadio sem fotossensibilização.	110
Figura 67 - Espectros médios da intensidade de fluorescência normalizados para aplicação do a) creme e b) microagulha, considerando autofluorescência e fluorescência após 1 hora de incubação na região do tumor fotossensibilizado e no tecido sadio sem fotossensibilização.	110
Figura 68 - a) Gráfico do tipo <i>boxplot</i> dos valores médio da intensidade de fluorescência normalizada no comprimento de onda de 635 nm referente aos espectros coletados no tumor 1 hora após a aplicação ALA via creme ou via microagulha. b) gráfico em coluna do valor médio e desvio padrão da intensidade de fluorescência normalizada considerando todos os animais.....	111
Figura 69 - Imagens de campo amplo de fluorescência coletadas antes da aplicação do precursor (autofluorescência endógena do tumor e pele ao redor), 1 hora após a aplicação do precursor e após a irradiação da TFD; sendo a) aplicação tópica do ALA creme, b) aplicação intradérmica do ALA por microagulhas dissolvíveis, c) aplicação intradérmica de microagulhas dissolvíveis sem precursor.....	112
Figura 70 - a) Gráfico do tipo <i>boxplot</i> dos valores médio da intensidade no canal vermelho das imagens de fluorescência de campo coletadas no tumor 1 hora após aplicação ALA via creme ou via microagulha. b) valor médio e desvio padrão da intensidade no canal vermelho das imagens de fluorescência de campo coletadas considerando todos os animais, nas mesmas condições em 1 hora de incubação e autofluorescência.....	112
Figura 71 - Imagens representativas da microscopia confocal de fluorescência no canal vermelho com sobreposição da imagem de transmissão para os tumores, sendo a) tumor após 1 hora da aplicação de creme via tópica de ALA na concentração de 5%; b) tumor após 1 hora da aplicação via intradérmica por microagulhas dissolvíveis contendo ALA na concentração de 5%. A barra no canto superior direito corresponde à escala de 1 mm.	113
Figura 72 - Intensidade média no canal vermelho das imagens de microscopia confocal de fluorescência em função da distância, para tumores sem sensibilização (controle) e tumores após 1 hora da aplicação de ALA na concentração de 5% com aplicação via tópica por creme ou via intradérmica por microagulha dissolúvel. O valor da área para cada aplicação foi calculado pelo programa Origin e está relacionado com a integral dos valores em função da profundidade.....	114

Figura 73 - Imagens de cortes histológicos de a) tumor controle (sem aplicação de precursor ou irradiação); b) tumor coletado após 72 horas da aplicação de TFD com protocolo de aplicação tópica de creme contendo 5% de ALA, e c) tumor coletado após 72 horas da aplicação de TFD com protocolo de aplicação intradérmica por microagulha dissolvível contendo 5% de M-ALA. A seta azul indica a extensão da pele (epiderme e derme), a seta verde indica a extensão do tumor intradérmico, as setas amarelas indicam regiões com infiltrados inflamatórios e o símbolo asterisco (“*”) indica regiões com crosta e edema. A barra no canto superior direito representa a escala de 250 μ m. 115

Figura 74 - Gráfico do tipo *boxplot* dos valores médios da intensidade de fluorescência normalizada no comprimento de onda de 635 nm referente aos espectros coletados no tumor 1 hora após aplicação de M-ALA a 20% em creme via tópica ou intradérmica por dermógrafo e de ALA via creme ou via microagulha. 117

Figura 75 - Imagens representativas da microscopia confocal de fluorescência no canal vermelho com sobreposição da imagem de transmissão para os tumores, sendo a) tumor sem sensibilização (controle); b) tumor após 1 hora da aplicação de creme via tópica de M-ALA na concentração de 20%; c) tumor após 1 hora da aplicação via intradérmica por dermógrafo de M-ALA na concentração de 20% de creme; d) tumor após 1 hora da aplicação de creme via tópica de ALA na concentração de 5%; e) tumor após 1 hora da aplicação via intradérmica por microagulhas dissolvíveis contendo ALA na concentração de 5%. A barra no canto superior direito corresponde à escala de 1 mm. 118

Figura 76 - a) Intensidade média no canal vermelho das imagens de microscopia confocal de fluorescência em função da profundidade, para tumores sem sensibilização (controle), tumores após 1 hora da aplicação de M-ALA na concentração de 20% com aplicação de creme via tópica ou intradérmica por dermógrafo; ALA na concentração de 5% com aplicação via tópica por creme ou via intradérmica por microagulha dissolvível. b) dados da parte ‘a’ com escala reduzida de intensidade média no canal vermelho e profundidade de 0,5 a 1 mm para melhor visualização dos resultados das aplicações neste intervalo. 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da avaliação de 30 dias e após seis meses da TFD para os grupos tratados, considerando as lesões de todos os diâmetros, sendo A: aplicação tópica de creme com curetagem prévia, B: aplicação intradérmica de creme por dermatógrafo com curetagem prévia e C: aplicação intradérmica de creme por dermatógrafo sem curetagem prévia.	87
Tabela 2 - Resultados da avaliação de 30 dias e após seis meses da TFD para os grupos tratados, separando as lesões por diâmetro. Sendo, A: aplicação tópica de creme com curetagem prévia, B: aplicação intradérmica de creme por dermatógrafo com curetagem prévia e C: aplicação intradérmica de creme por dermatógrafo sem curetagem prévia.	88
Tabela 3 - Parâmetros da análise da curva de sobrevida livre de doença em função tempo de acompanhamento dos pacientes pelo método de Kaplan-Meier. Sendo, A: aplicação tópica de creme com curetagem prévia, B: aplicação intradérmica de creme por dermatógrafo com curetagem prévia e C: aplicação intradérmica de creme por dermatógrafo sem curetagem prévia.....	90
Tabela 4 - Parâmetros calculados para os arranjos de microagulhas e formulações contendo ALA e M-ALA na concentração de 5%.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Terapia Fotodinâmica	TFD
Carcinoma basocelular	CBC
Carcinoma espinocelular	CEC
Instituto Nacional do Câncer	INCA
Fotossensibilizador	FS
Intervalo de tempo droga-luz	IDL
Protoporfirina IX	PpIX
Ácido Aminolevulínico	ALA
Aminolevulinato de Metila	M-ALA
Comissão de Ética no Uso de Animais	CEUA
Instituto de Física de São Carlos	IFSC
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	DMEM
Soro fetal bovino	SFT
Hematoxilina e Eosina	HE
Comitê de Ética em Pesquisa	CEP
Diodo emissor de luz	LED
Hospital Amaral Carvalho	HAC
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	TCLE
Programa Institucional de Doutorado-sanduíche no Exterior	PDSE
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	CAPES
Cabeça e pescoço	CP
Tronco	T
Membro superior	MS
Membro inferior	MI
Resposta parcial	RP
Resposta completa	RC

SUMÁRIO

1	MOTIVAÇÃO	31
2	INTRODUÇÃO	33
2.1	Técnicas de monitoramento e estratégias de entrega intradérmica	37
2.1.1	Técnicas para detecção de fluorescência da PpIX	37
2.1.2	Dermógrafo	39
2.1.3	Microagulhas dissolvíveis	40
3	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivos específicos	43
4	DERMÓGRAFO: EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	45
4.1	Material e métodos	45
4.1.1	Dermógrafo	45
4.1.2	Precusores da protoporfirina IX	46
4.1.3	Medidas de fluorescência superficial	46
4.1.4	Medidas de fluorescência em profundidade	47
4.1.5	Terapia fotodinâmica	48
4.1.6	Análise histopatológica	49
4.1.7	Modelo <i>in vitro</i> – pele de porco	50
4.1.8	Modelo animal – pele normal	51
4.1.9	Modelo animal – tumoral	52
4.2	Resultados e discussão	56
4.2.1	Modelo <i>in vitro</i> – pele de porco	56
4.2.2	Modelo animal – pele normal	57
4.2.3	Modelo animal – tumoral	69
4.3	Conclusões do capítulo	76
5	DERMÓGRAFO: ESTUDO CLÍNICO	79
5.1	Material e métodos	79

5.1.1 Seleção de pacientes	79
5.1.2 Dermógrafo	79
5.1.3 Anestesia tópica	80
5.1.4 Precursor de PpIX.....	80
5.1.5 Fluorescência de campo amplo.....	80
5.1.6 Terapia fotodinâmica	81
5.1.7 Estudo piloto.....	81
5.1.8 Estudo clínico	81
5.2 Resultados e discussão.....	83
5.2.1 Estudo piloto.....	83
5.2.2 Estudo clínico	85
5.3 Conclusões do capítulo	91
6 MICROAGULHAS DISSOLVÍVEIS: EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	93
6.1 Material e métodos	93
6.1.1 Formulação	93
6.1.2 Molde e arranjo de microagulhas	94
6.1.3 Quantidade de precursor nas microagulhas	95
6.1.4 Teste de estabilidade.....	97
6.1.5 Teste de compressão.....	97
6.1.6 Teste de inserção e dissolução.....	98
6.1.7 Modelo animal – tumoral	98
6.2 Resultados e discussão.....	100
6.2.1 Caracterização das microagulhas.....	100
6.2.2 Modelo animal – tumoral	109
6.3 Conclusões do capítulo	115
7 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS.....	117
8 CONCLUSÃO.....	121

REFERÊNCIAS 123

1 MOTIVAÇÃO

O câncer de pele não melanoma é o câncer mais frequente no Brasil e corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados no país, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA). Dentre eles, os mais frequentes são o carcinoma basocelular (CBC), responsável por 70% dos diagnósticos, e o carcinoma espinocelular (CEC), representando 25% dos casos. A estimativa de novos casos em 2018 foi de mais de 165 mil pessoas, sendo 85.170 homens e 80.140 mulheres. Considerando apenas o estado de São Paulo, estima-se que o gasto para o tratamento de câncer de pele não melanoma representa um impacto financeiro aos sistemas público e privado de saúde de cerca de R\$ 37 milhões e R\$ 26 milhões ao ano, respectivamente. (1)

Para que seja possível atender de forma efetiva a esta alta demanda por tratamento, é preciso ter uma tecnologia que seja de fácil aplicação, fácil treinamento profissional, não demandar de grandes investimentos em infraestrutura e, principalmente, estar dentro da realidade econômica do país. (2) Neste contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) torna-se uma modalidade terapêutica com grande potencial, pois, além de atender a estes quesitos, possui uma fácil implementação clínica, uma vez que o Brasil dispõe tanto de tecnologia e empresas nacionais para equipamentos de irradiação) (3-4) quanto para a produção de FS (precursores tópicos produzidos pela PDT Pharma LTDA, Cravinhos, SP, Brasil).

A TFD é dada pela reação entre um agente fotossensibilizador (FS) que ao ser excitado por uma fonte de luz interage com o substrato biológico ou oxigênio molecular produzindo espécies reativas capazes de causar morte celular. Essa técnica pode ser aplicada para controle microbiológico de bactérias ou fungos (5–9) ou mesmo no tratamento de alguns tipos lesões neoplásicas e pré-neoplásicas. (10–12)

O Projeto “Terapia Fotodinâmica Brasil” foi voltado ao diagnóstico e tratamento do câncer de pele não melanoma por TFD. Com um investimento e apoio do BNDES e FINEP, envolveu o desenvolvimento de protocolo e a disseminação da técnica para os profissionais da saúde, além da facilitação ao acesso a medicamentos e equipamentos a mais de 70 centros no Brasil e 10 países da América Latina. Os resultados iniciais deste projeto estão divulgados em um artigo e um livro, publicados em 2015, para o tratamento de CBC superficial e nodular por TFD. (2,13) Nos resultados parciais de 27 centros envolvidos com o projeto TFD Brasil, obteve-se, aproximadamente, 86% de resposta completa no tratamento de CBC por TFD com aplicação tópica nos centros considerados experientes, enquanto centros considerados não experientes tiveram taxa de 69,2%. (14) Após seis anos de coleta de dados com esse projeto,

considerado que 1647 lesões foram tratadas, a taxa de resposta completa ao tratamento foi de 80,18%. (15)

O tratamento atualmente empregado para CBC que apresenta o maior índice de sucesso é o procedimento cirúrgico de remoção da lesão, que apresenta um índice de cura de aproximadamente 96%. (16) Entretanto, devido à elevada incidência e reincidência das lesões, é impraticável que o sistema público brasileiro atenda a esta questão de forma eficiente apenas com a aplicação de procedimentos cirúrgicos. O comprometimento anatômico-funcional das estruturas em que algumas lesões incidem e mesmo o resultado estético da cirurgia, dependendo da extensão, profundidade e localização da lesão, também podem ser fatores negativos neste método. Além disso, existem pacientes que não são elegíveis a um procedimento cirúrgico devido à comorbidades pré-existente.

A TFD é uma modalidade terapêutica considerada menos invasiva que a cirurgia, não comprometendo tecidos sadios adjacentes à lesão e que oferece resultado estético satisfatório.

Apesar dos resultados encorajadores e vantagens da técnica, a TFD tópica convencional para câncer de pele não melanoma ainda apresenta algumas limitações que implicam consideravelmente na aceitação médica pela técnica na prática clínica habitual. A partir da experiência adquirida com esse projeto nacional, foi possível analisar as principais barreiras da técnica, que envolvem o tempo de tratamento, considerado elevado, e a resposta limitada que lesões mais espessas têm apresentado.

Neste contexto, a motivação deste trabalho se fundamentou em técnicas que visam melhorar a entrega da medicação a fim de lidar com a melhora para resposta ao tratamento, tendo em vista que a aplicação intradérmica disponibilizar o FS em maior profundidade no tecido em relação à sua aplicação tópica convencional para o tratamento de lesões epiteliais.

2 INTRODUÇÃO

A TFD é uma técnica que envolve a interação entre três compostos, luz, FS e oxigênio molecular. (17) O FS quando presente no tecido está no seu estado singlete de menor energia, chamado estado fundamental (S_0). Quando o FS é excitado por luz de comprimento de onda compatível, sua molécula absorve a energia do fóton e vai para estados excitados de maior energia (S_n). Por conversão interna, a molécula decai para um estado singlete excitado de menor energia (S_1) e, neste estado pode decair para o estado fundamental emitindo fluorescência ou por cruzamento intersistema pode ir para um estado tripleto excitado (T_1). O estado tripleto é um estado metaestável e neste ponto a molécula de fotossensibilizador tem a probabilidade de decair para o estado fundamental emitindo fluorescência ou pode interagir com as moléculas presentes no tecido. A fluorescência da molécula do FS pode ser uma ferramenta utilizada para diagnóstico e monitoramento da TFD. (18)

A reação do tipo I ocorre quando a molécula de FS presente no estado tripleto excitado interage com o substrato biológico (SB) transferindo elétrons ou removendo um átomo de hidrogênio produzindo radicais livres nocivos às células, SB^- e SBH , respectivamente. No caso da reação do tipo II, a molécula de FS presente no estado tripleto excitado interage com o oxigênio molecular (3O_2) e produz oxigênio singlete (1O_2) que é altamente citotóxico. Estes reações ocorrem predominantemente dependendo das características moleculares dos FSs. A morte celular ocorre por necrose ou apoptose, dependendo da localização do FS na célula. (19,20)

Figura 1 - Diagrama de Jablonski simplificado para ilustrar fenômenos relacionados com a interação do FS após excitação pela luz e possíveis reações fotodinâmicas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na aplicação da TFD para câncer, o FS acumula-se preferencialmente nas células neoplásicas. No caso da TFD aplicada no tratamento de lesões de pele, a protoporfirina IX (PpIX) é o FS mais utilizado (21) com reação do tipo II como preferencial. (22) A PpIX é uma molécula endógena gerada na rota biosintética do grupo heme (23) e para que ocorra seu acúmulo celular para TFD costuma-se induzir sua produção a partir da aplicação de precursores, como o ácido aminolevulínico (ALA) e aminolevulinato de metila (M-ALA).

A principal diferença entre o ALA e o M-ALA é que devido à introdução de um grupo metil na molécula de ALA, o M-ALA possui caráter mais lipofílico, o que significa que ele pode ser absorvido mais profundamente nas células da pele. Diversos estudos tentaram comparar a dor e os eventos adversos associados à TFD com ambos precursores, mas a diversidade dos protocolos usados na prática clínica compromete a interpretação dos resultados obtidos nestes estudos como um todo. (24)

Para que haja acúmulo suficiente de PpIX para a realização do tratamento de lesões epiteliais como o CBC, o tempo de incubação do medicamento no protocolo clínico convencional é de aproximadamente 180 minutos após a aplicação tópica do precursor. (25-26) Este tempo é considerado longo levando em consideração a prática clínica e a rotina ambulatorial, e é um fator limitante de aceitação pela comunidade médica.

Além do longo tempo entre a aplicação do precursor e irradiação, a barreira para permeação de precursores através da pele é outra importante limitação da TFD tópica que tem influência direta no sucesso da aplicação. A Figura 2 corresponde a uma lâmina histológica de pele humana.

A pele é um órgão complexo que é estruturado para proteção do corpo e pode ser dividida em três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é um epitélio em renovação contínua, composta principalmente de queratinócitos e contém subcamadas epidérmicas morfológicamente distintas: estrato córneo, estrato granular e estrato espinhoso. O estrato córneo é a camada que recobre a epiderme e é composto por queratinócitos achatados que perderam seus núcleos e organelas citoplasmáticas. A junção dérmico-epidérmica (camada basal) é sintetizada por queratinócitos basais e fibroblastos dérmicos, e funciona como suporte mecânico para a adesão da derme à epiderme. A derme é composta pela derme papilar superior e a derme reticular inferior. O colágeno é o principal constituinte da derme, o que proporciona resistência mecânica à pele. (27)

Figura 2 - Lâmina histológica de pele humana corada com hematoxilina e eosina (HE). As linhas em preto à direita indicam as localizações do estrato córneo, estrato granular, estrato espinhoso e camada basal. A linha pontilhada em amarelo indica a separação da epiderme e da derme (junção dérmico-epidérmica).

Fonte: Adaptada de KHAVKIN. (27)

Técnicas para entrega intradérmica de fármacos, ou seja, disponibilização destas moléculas entre a epiderme e a derme, vem sendo estudadas a fim de melhorar sua entrega em maiores profundidades que aquelas obtidas por aplicação tópica. Dentre elas, têm se mostrado promissoras técnicas baseadas em equipamentos em microescala, que incluem injetores de líquidos e pó, microagulhas e ablação térmica. (28)

O trabalho de Kassuga *et al.* propõe um aperfeiçoamento da TFD ao estimular a penetração intradérmica do M-ALA pela associação de radiofrequência fracionada e ultrassom para o tratamento de queratose actínica. Esta modificação apresentou resultados mais evidentes que os observados com o uso do protocolo clínico tópico convencional, além de ter possibilitado a diminuição do tempo de incubação para cerca de 120 minutos. (29) Há, ainda, relatos na literatura que afirmam que, ao realizar TFD aplicando solução de ALA por meio de um dispositivo de injeção de pressão livre de agulhas para o tratamento de condiloma acuminado, foi possível diminuir o tempo de incubação para 90 minutos, (30) enquanto a aplicação através de um dispositivo similar no tratamento de CBC com solução de ALA mostrou que foram necessários apenas 60 minutos de incubação para ter eficácia no tratamento. (31)

No estudo realizado por Rodrigues *et al.* em modelo de pele de porco, é possível observar a maior homogeneidade na distribuição da PpIX superficial devido à aplicação prévia de um rolo de microagulhas (1,5 mm de profundidade) seguida da aplicação tópica do

precursor (ALA-20%) quando comparada apenas à aplicação tópica (Figura 3). Este resultado ilustra o fato de que, ao romper as barreiras físicas oferecidas pela estruturação das camadas da pele, é possível obter também uma produção mais homogênea da PpIX. (32)

Figura 3 - a) Imagens de fluorescência de campo amplo coletadas 180 minutos após a aplicação de ALA-20% tópico em creme em pele de porco e b) protocolo com aplicação prévia de rolo de microagulhas de 1,5 mm de profundidade seguida da aplicação de ALA-20%.

Fonte: Adaptada de RODRIGUES. (32)

A mesma constatação referente à homogeneidade pode ser observada na Figura 4, com a aplicação de ALA-20% em solução através de uma injeção de pressão livre de agulhas. Além da homogeneidade, essa aplicação pela injeção reduziu o tempo de incubação de 180 minutos da aplicação tópica por creme para apenas 90 minutos. (33)

Figura 4 - Imagens de fluorescência de campo amplo coletadas 180 minutos após a aplicação de ALA-20% em pele de porco a) por creme e após b) após 90 minutos por injeção de pressão livre de agulhas.

Fonte: REQUENA. (33)

Rodrigues *et al.* também verificou que, a partir do mesmo sistema de injeção livre de agulhas, foi possível constatar que a produção de PpIX, além de ser mais uniforme que a aplicação tópica, foi também mais rápida. (34) Estes resultados corroboram com a constatação de que diferentes dispositivos que facilitam a permeação dos precursores e, nestes casos, a transposição mecânica das barreiras da pele, também tem demonstrado efetividade para diminuição do tempo de incubação.

Este trabalho visa, portanto, o aperfeiçoamento do protocolo utilizado para TFD com diferentes dispositivos, uma vez que ao disponibilizar o precursor em maiores profundidades que a aplicação tópica, será possível promover maior formação de FS em camadas mais profundas, tornando a TFD uma opção viável para o tratamento de lesões epiteliais de maior volume e/ou profundidade.

2.1 Técnicas de monitoramento e estratégias de entrega intradérmica

Colocada a motivação e problemática do trabalho, será feita uma breve revisão sobre as técnicas a serem utilizadas como ferramenta do presente estudo, tanto para o monitoramento de fotossensibilizadores quanto para a entrega intradérmica de fármacos ao longo do estudo.

2.1.1 Técnicas para detecção de fluorescência da PpIX

Dentre as possibilidades de emissão de luz por moléculas biológicas, a fluorescência decorre de transições entre estados eletrônicos de mesma multiplicidade de *spin*, ou seja, transições permitidas pelas regras de seleção da mecânica quântica. A fluorescência depende dos níveis de energia disponíveis nos átomos e moléculas, bem como de suas combinações, e por isso moléculas e materiais apresentam fluorescência característica que funciona como uma espécie de assinatura espectral, permitindo identificá-las.

A PpIX, bem como muitas outras moléculas biológicas fotossensíveis, além de ser utilizada em TFD, apresenta absorção e emissão de fluorescência na região do visível e infravermelho próximo (Figura 5), e por isso é passível de detecção por fluorescência.

Figura 5 - Espectros de absorvância e de emissão de fluorescência normalizada da PpIX.

Fonte: Elaborada pela autora.

Devido a este potencial terapêutico e diagnóstico, existem técnicas bem estabelecidas para o monitoramento da fluorescência molécula de PpIX *in vivo*. (35) Alguns fatores do tecido devem ser considerados nas medidas de fluorescência, como o coeficiente de atenuação da luz no tecido, presença de fluoróforos endógenos (responsáveis pela autofluorescência tecidual), absorção, espalhamento e reflexão da luz. (36) Estes parâmetros interferem diretamente na penetração da luz que fará excitação da PpIX e consequentemente na detecção da fluorescência da molécula quando localizada em camadas mais profundas.

Comprimentos de onda na região do azul (entre 400 e 450 nm) são eficientes na excitação da molécula da PpIX e promovem emissão de fluorescência na região do vermelho (aproximadamente 630 nm). Porém, devido à presença de fluoróforos no tecido biológico que também absorvem luz nesta região do espectro e ao alto índice de espalhamento de luz de tecidos biológicos nessa região do espectro, esta excitação permite baixa penetração da luz de excitação no tecido e, portanto, uma detecção apenas da fluorescência mais superficial. (37)

A luz de fontes com emissão entre 620 e 640 nm, por sua vez, embora possua menor eficiência de excitação da PpIX, tem a emissão de fluorescência na região do infravermelho próximo, e é capaz de penetrar em (ou emergir de) camadas mais profundas do tecido biológico. (38-39) O uso de excitação em comprimentos de onda na região do infravermelho próximo por excitação simples não gera fluorescência, mas se utilizados em altas intensidades por meio de técnicas de excitação por dois fótons, também podem ser uma ferramenta para excitação em camadas mais profundas do tecido, gerando fluorescência no visível. (40)

Para obter fluorescência a partir da superfície da pele ou de um tumor, duas principais técnicas de fluorescência podem ser aplicadas: espectroscopia de fluorescência ou imagem de campo amplo de fluorescência. (41)

Na espectroscopia de fluorescência, a excitação deve ser gerada por fonte de luz de alta resolução espectral, como lasers, e são usualmente conduzidas por fibras ópticas. Nela, a fibra de excitação deve ser colocada em contato direto com a superfície, e comumente a excitação e coleta são pontuais (aproximadamente 50 - 1000 μm de diâmetro por ponto de coleta) (42) o que interfere na representação espacial da medida. Estas medidas são mais sensíveis que as técnicas de campo amplo, porém imprecisões técnicas como variações de pressão da fibra no tecido (que afetam a relação absorção óptica do sangue e compressão de vasos sanguíneos no local) (43) e acoplamento da luz no tecido podem induzir distorções no espectro e variações nos resultados.

Para imagens de campo amplo de fluorescência, a principal vantagem está relacionada com a informação espacial, pois é possível conjugar informação de superfícies maiores num

único registro. Porém, deve-se considerar que nesta técnica a fluorescência coletada apresenta um sinal difuso, em que a informação que forma cada pixel da imagem vem da luz que percorreu caminhos variáveis e atravessou volumes diferentes dentro do tecido. Isto faz com que a técnica de imagem de fluorescência retorne mapas espaciais de emissão de fluorescência da PpIX que podem ser influenciados tanto pela variação na quantidade de PpIX quanto por variações nas propriedades ópticas do tecido. (35)

Estudos clínicos com aplicação precursores de PpIX para auxílio na delimitação de tumores durante procedimentos cirúrgicos utilizando microscopia confocal de fluorescência vem sendo realizados. (44-45) A microscopia confocal é uma técnica que permite focalizar a excitação em regiões muito pequenas da amostra, gerando sinal de fluorescência de alta resolução espacial e detecção em planos focais bem determinados. (46) Essa metodologia é simples, precisa e permite a avaliação da PpIX em profundidade quando é possível retirada de amostra do tecido biológico. Está é uma técnica muito rápida, pois depende basicamente da amostra ser cortada após congelamento em nitrogênio líquido em vez do preparo de amostras histológicas que passam por longos processos de desidratação, fixação em parafina e coloração com marcadores específicos. (47)

2.1.2 *Dermógrafo*

A micropigmentação é uma técnica que permite a disponibilização de corantes na pele através de microfuros provocados por agulhas metálicas. Essa técnica é realizada por um equipamento semelhante às máquinas para tatuar, chamado dermógrafo, mas que apresenta um manuseio mais simples e que permite o acoplamento de um menor número de agulhas. (48) No caso da aplicação de substância por dermógrafo, a penetração das agulhas pode variar de 0,1 mm a 2 mm e, portanto atingir a derme (49), como ilustrado na Figura 6.

Dentre as aplicações cirúrgicas e estéticas que utilizam esses dispositivos de inserção de agulhas para disponibilizar corantes, inclui-se preenchimento de espaços no couro cabelo causados por alopecia areata, a reconstrução estética de aréolas, mamilos e sobrancelhas, a marcação endoscópica de tumores do cólon, a modificação estética de formações de queiloide e a pigmentação de tecidos afetados por vitiligo. (50) Para a disponibilização de fármacos, há trabalhos clínicos citando aplicações para a remoção de tatuagens, tratamento de verrugas vulgares (50-51) e infusão de sulfato de bleomicina em lesões queiloideanas (49), obtendo-se resultados promissores. Um teste em animais que utiliza dermógrafo para permeação de um

fármaco a base de fosfocolina, visando o tratamento de Leishmaniose cutânea, demonstrou maior eficácia que a aplicação tópica da mesma substância. (52)

Figura 6 - Ilustração demonstrando a inserção de pigmentos na derme através de um dermógrafo.
Fonte: ARBACHE. (49)

Mesmo que o processo seja considerado mais invasivo e doloroso comparado à aplicação tópica, o uso de dermógrafos pode ser uma ferramenta promissora para realizar a entrega de precursores ou FS em TFD dada à possibilidade de mais eficiente administração das substâncias. Apesar do que já foi reportado anteriormente, não há relatos na literatura de trabalhos que explorem esta aplicação para TFD.

2.1.3 *Microagulhas dissolvíveis*

Os arranjos de microagulhas são dispositivos minimamente invasivos, que podem ser inseridos na pele penetrando o estrato córneo. Por suas dimensões reduzidas, entretanto, essas microagulhas não atingem terminações nervosas, não causando dor ou sangramento. As vias mais comuns de administração de medicamentos são oral e injetável. No caso de pacientes idosos acometidos de disfagia ou mesmo fragilidade, estes acessos podem ser limitações que as microagulhas também são capazes superar. (53) Este método de entrega de fármacos também tem maior aceitação por crianças. (54) Todos estes fatores tornam as microagulhas uma importante ferramenta para entrega intradérmica ou transdérmica de drogas. (55)

Há diversos tipos de microagulhas que podem ser utilizadas para facilitar a administração intradérmica e transdérmica de medicamentos na pele. Essa diversidade permitiu que Donnelly et al. realizassem estudos em várias frentes, envolvendo aplicações

para entrega de antibióticos (56-57), vacinas (58-60), fármacos para o tratamento de filariose linfática (61-62), herpes (63), diabetes (64), Alzheimer (65) e reposição de vitaminas. (66)

As microagulhas sólidas podem ser utilizadas para aumentar a permeação de fármaco por meio da criação de micro-orifícios; microagulhas metálicas ou poliméricas podem ser revestidas para rápida dissolução do fármaco na sua superfície; microagulhas dissolvíveis são aplicadas para liberação rápida ou controlada da droga incorporada em sua formulação; microagulhas ocas, por sua vez, podem ser usadas para perfurar a pele e permitir a liberação de um fármaco líquido após infusão ou difusão da formulação através dos orifícios criados; microagulhas de hidrogel são capazes de absorver fluidos intersticiais do tecido e induzir a difusão do fármaco presente num reservatório através das microagulhas inchadas. Estes modelos foram descritos por Larrañeta *et al.*, e estão exemplificados na Figura 7.

Figura 7 - a) Representação esquemática de cinco tipos diferentes de microagulhas utilizadas para facilitar a administração intradérmica e transdérmica de medicamentos na pele; a) microagulhas sólidas para aumentar a permeação de fármaco através da criação de micro orifícios, b) microagulhas revestidas para rápida dissolução do fármaco, c) microagulhas dissolvíveis para liberação rápida ou controlada da droga incorporada nas microagulhas, d) microagulhas ocas usadas para perfurar a pele e permitir a liberação de um fármaco líquido após infusão ativa ou difusão da formulação através dos orifícios da agulha, e) microagulhas de hidrogel que absorvem fluidos intersticiais do tecido, induzindo a difusão do fármaco localizado em reservatório através das microagulhas inchadas.

Fonte: Adaptada de LARRAÑETA. (67)

No caso das microagulhas poliméricas, as microagulhas dissolvíveis são dispositivos nos quais determinadas drogas são incorporadas e que, após aplicação na pele, se dissolvem

liberando as mesmas drogas, de forma que o polímero utilizado na formulação permanece na pele após a remoção do arranjo. As microagulhas de hidrogel, por sua vez, incham quando inseridas na pele e, assim, formam dutos que servem de caminhos contínuos para a entrega de drogas. Neste caso, a entrega tende a ser mais demorada, porém, após a retirada da microagulha, não há deposição de polímero no tecido. (68-69)

O número de trabalhos publicados utilizando microagulhas poliméricas vem crescendo ao longo dos anos (70) e devido ao potencial dessa tecnologia para entrega de fármacos ter sido pouco explorado no Brasil e, principalmente, para aplicações de TFD, parte deste trabalho propôs avaliar também a disponibilização do precursor em maiores profundidades por meio de microagulhas poliméricas, proporcionando a formação de FS em camadas mais profundas e, com isso, tornando a TFD uma opção viável num maior número de casos, bem como ampliando sua efetividade.

3 OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivo entender os aspectos fundamentais da administração intradérmica de precursores de FS por meio de novas tecnologias, a fim de aumentar a profundidade de entrega da medicação, para tornar a TFD uma opção preferencial no tratamento de uma maior gama de lesões de pele.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a produção superficial de PpIX em função do tempo com aplicação intradérmica por diferentes dermógrafos utilizando as técnicas de espectroscopia de fluorescência e imagem de fluorescência de campo amplo em modelo de pele sadia de ratos;
- Avaliar a produção de PpIX em profundidade com aplicação intradérmica de ALA 20% por diferentes dermógrafos utilizando a técnica de microscopia confocal de fluorescência em modelo de pele sadia de ratos;
- Realizar uma análise qualitativa e quantitativa da histologia com relação ao dano tecidual promovido pela TFD com aplicação intradérmica de ALA 20% por meio de diferentes dermógrafos em modelo de pele sadia de ratos;
- Avaliar a produção superficial de PpIX com aplicação intradérmica de M-ALA 20% por meio de dermógrafo através de espectroscopia de fluorescência e imagem de fluorescência de campo amplo em modelo tumoral em camundongos;
- Quantificar a produção de PpIX em profundidade de M-ALA 20% entregue com aplicação intradérmica por dermógrafo através de microscopia confocal de fluorescência em modelo tumoral em camundongos;
- Realizar uma análise qualitativa da histologia com relação ao dano tecidual promovido pela TFD com aplicação intradérmica de M-ALA 20% por dermógrafo em modelo tumoral em camundongos;

- Avaliar a taxa de cura após 30 dias do tratamento de CBC nodular com TFD comparando a aplicação de creme de M-ALA a 20% com entrega intradérmica por dermógrafo e via tópica em teste clínico;
- Avaliar a taxa de recidiva após seis meses do tratamento de CBC nodular com TFD comparando a aplicação de creme de M-ALA a 20% com entrega intradérmica por dermógrafo e via tópica em teste clínico;
- Avaliar a curva de sobrevida livre de doença do tratamento de CBC nodular com TFD para aplicação de creme de M-ALA a 20% com entrega intradérmica por dermógrafo e via tópica em teste clínico;
- Caracterizar microagulhas dissolvíveis contendo precursores de PpIX em termos de concentração de fármaco após secagem, resistência mecânica, capacidade de inserção, dissolução e estabilidade;
- Avaliar a produção superficial de PpIX com aplicação intradérmica por microagulhas dissolvíveis com ALA a 5% através de espectroscopia de fluorescência e imagem de fluorescência de campo amplo em modelo tumoral em camundongos;
- Quantificar a produção de PpIX em profundidade com aplicação intradérmica por microagulhas dissolvíveis com ALA a 5% através de microscopia confocal de fluorescência em modelo tumoral em camundongos;
- Realizar uma análise qualitativa e quantitativa da histologia com aplicação intradérmica por microagulhas dissolvíveis com ALA a 5% em relação dano tecidual promovida pela TFD em modelo tumoral em camundongos.

4 DERMÓGRAFO: EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Nesta sessão, serão apresentadas a metodologia, resultados, discussão e conclusões dos experimentos em modelo de pele sadia em ratos e modelo tumoral em camundongos com a aplicação de dermógrafo. Estes experimentos foram indispensáveis para determinar o adequado manuseio dos equipamentos e análise das condições favoráveis para aplicação no estudo clínico.

4.1 Material e métodos

4.1.1 *Dermógrafo*

Foi utilizado um dermógrafo comercial (Dermomag Pen Júnior, MAG ESTÉTICA[®], São Paulo, Brasil) registrado pela ANVISA (Nº 80815530001). Este equipamento foi denominado como D1, à esquerda na Figura 8a. Para a liberação do líquido na superfície da pele o dispositivo necessita do acoplamento de uma ponteira e agulha. Para este equipamento, há alguns tipos de agulhas que podem ser acopladas, fabricadas com conformações específicas para diferentes aplicações estéticas e comercializadas separadas das ponteiras, ambas já esterilizadas pelo fabricante (Figura 8b). Recomenda-se a inclinação aproximada de 45° do dermógrafo em relação à pele durante o uso.

Também foi utilizado outro dermógrafo comercial de origem nacional (Dermaflox, FLOX, São Paulo, Brasil) com registro na ANVISA (Nº 80700629002), denominado como D2 (equipamento na direita da Figura 8a). Este dispositivo faz uso de cápsulas descartáveis (contendo agulhas e ponteiras) também comercializadas já estéreis pela empresa (Figura 8c). Este equipamento permite que a profundidade de penetração das agulhas da cápsula seja calibrada no próprio dermógrafo, e a aplicação deve ser feita com inclinação de 90° em relação à pele.

Figura 8 - a) Dermógrafos utilizados nos estudos: à esquerda, equipamento denominado de D1 e à direita equipamento denominado D2, b) ponteira e agulha do dermógrafo D1, c) cápsula de nove microagulhas do dermógrafo D2.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2 Precusores da protoporfirina IX

O fotossensibilizador endógeno PpIX teve seu acúmulo estimulado pela aplicação dos seus precursores metabólicos (ALA e M-ALA), tanto por via tópica (grupo controle) quanto por via intradérmica. Os insumos ou cremes foram adquiridos da empresa PDT Pharma LTDA (Cravinhos, SP, Brasil). Para a aplicação por creme (via tópica), os precursores foram incorporados em uma emulsão manipulada para a TFD previamente estabelecida, e segura inclusive para uso no tratamento em pacientes. (13-14,25) A administração do precursor aplicado em solução líquida (via intradérmica e tópica) foi feita em laboratório a partir diluição do pó em soro fisiológico com a adição de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*, substância utilizada na emulsão que facilita o acúmulo celular da PpIX), a fim de comparar a eficiência com o protocolo clínico de aplicação tópica por creme.

Nos experimentos conduzidos com dermógrafo em pele sadia de ratos foi utilizado o ALA na concentração de 20%, enquanto no estudo em modelo tumoral de camundongos e testes clínicos foi aplicado o M-ALA na concentração de 20%.

4.1.3 Medidas de fluorescência superficial

A coleta de espectros de fluorescência da PpIX foi feita nos testes em animais a partir de um sistema montado no Grupo de Óptica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, que consiste de um espectrofotômetro USB2000 (OceanOptics Inc., EUA) acoplado a

um computador e a um laser para excitação de comprimentos de onda em 408 nm. O processamento dos espectros foi feito no programa Origin[®] (OriginLab Corporation, EUA).

Para verificar a homogeneidade de produção superficial da PpIX, tanto nos testes em pele sadia quanto modelo tumoral, foi utilizado um sistema de imagem de campo amplo de fluorescência que provém do acoplamento da manopla para evidênciação de fluorescência de um dispositivo comercial de irradiação (LINCE[®], MM Optics, São Carlos, Brasil) à base de LED (que emitem na região entre 400 e 450 nm), a uma câmera fotográfica para aquisição de imagens. (4) O processamento das imagens de campo amplo de fluorescência foi feito a partir de um algoritmo desenvolvido na plataforma gratuita Python (Python Software Foundation) que considerou a média de intensidade no canal vermelho após decomposição da imagem RGB.

4.1.4 Medidas de fluorescência em profundidade

Foram coletadas biópsias para análise da produção da PpIX, principalmente em profundidade, após a incubação do precursor de PpIX por 1 hora. Estes fragmentos passaram por um processo de congelamento (a fim de minimizar a degradação do FS) utilizando o composto específico para congelamento O.C.T. Tissue-Tek[®] (do inglês *optimal cutting temperature*, Sakura Finetek USA Inc.) e foram mantidos em um freezer a -80 °C para serem cortados na direção longitudinal com 30 µm de espessura em criostato (Leica Biosystems, CM1850, Reino Unido).

Para avaliação da profundidade de produção e distribuição da PpIX nas lâminas, foi utilizado um microscópio confocal de fluorescência (Zeiss - LSM780, Alemanha). As imagens foram obtidas usando um laser de diodo (405 nm) para excitação e o sinal de fluorescência foi coletado em dois canais, um 430-580 nm devido à fluorescência endógena da pele, e outro 630-670 nm para fluorescência da PpIX (representando na cor vermelha). Os parâmetros de intensidade do laser, ganho e o contraste de detecção foram mantidos para aquisição em todos os experimentos.

O processamento dos dados foi feito a partir de um algoritmo desenvolvido na plataforma gratuita Python (Python Software Foundation). A análise foi feita com a informação das imagens de fluorescência do canal vermelho (Figura 9a), a fim de associar os valores de intensidade com a concentração de PpIX em função da profundidade.

Figura 9 - Esquema ilustrando as etapas do processamento das imagens de fluorescência por microscopia confocal dos tumores. a) imagem no canal vermelho, b) imagem com cores falsas do programa para facilitar visualização e c) a letra 'A' a região em que foi quantificada a variação da intensidade de fluorescência no canal vermelho e 'z' a direção da profundidade a ser avaliada. As linhas em branco delimitam as 30 áreas avaliadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 9b mostra uma imagem com aplicação de cores falsas do programa (escala colorimétrica de 0 a 75) para facilitar a visualização e delimitação manual da superfície do tumor e de sua borda inferior. Na Figura 9c, a letra 'A' identifica a seleção (em linhas tracejadas amarelas) da região de interesse demarcada, a fim de evitar efeitos de bordas nos cálculos, e a letra 'z' indica a direção de profundidade de formação do FS. O programa considerou 30 áreas (delimitadas por linhas brancas) ao longo da profundidade do tumor para estimar a intensidade média em cada região.

4.1.5 Terapia fotodinâmica

Nos testes em que foram empregados TFD, foi utilizada a ponteira do sistema comercial de iluminação LINCE[®] (MMOptics, São Carlos, Brasil) composta de LEDs centrados no comprimento de onda 630 ± 10 nm. Os parâmetros de irradiação foram de 40 mW/cm^2 de irradiância e fluência de 30 J/cm^2 . No modelo de pele sadia de ratos foi utilizado com um acessório quadrado que permite a irradiação de $60,8 \text{ cm}^2$ de área. Para o modelo tumoral, foram utilizados os mesmos parâmetros de irradiação, porém, com a ponteira circular de 2 cm de diâmetro do mesmo equipamento. O tempo de incubação para os

experimentos em pele sadia de ratos foi de 2 horas (71), enquanto no modelo tumoral em camundongo foi de 1 hora.

4.1.6 Análise histopatológica

As lâminas histológicas foram feitas a partir de biópsias excisionais de toda a porção danificada, coletadas após a eutanásia do animal, 72 horas após TFD. Os fragmentos foram cortados em fatias e colocados em cassetes, sendo, em seguida, depositados em vasilhames contendo solução de formaldeído tamponado durante 48 horas para a fixação do material. Após este período os cassetes contendo as peças foram submetidos a uma lavagem com água, passaram por processos de desidratação e fixação. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) após fixação em lâminas. As lâminas foram posteriormente escaneadas e digitalizadas num dispositivo escaneador de lâminas histológicas (Panoramic DESCK, 3DHISTECH, Hungria).

A avaliação qualitativa das lâminas histológicas de pele sadia de rato foi realizada às cegas por um médico patologista. Foram apresentadas as imagens escaneadas dos cortes histológicos e o profissional classificou o dano observado em cada amostra como ausente, leve, moderado ou severo, com uma pontuação de 0 a 3, respectivamente. O dano foi classificado como leve quando a amostra, ainda que apresentasse crosta ou sinais de inflamação, mantivesse a maior parte da epiderme íntegra preservada. Os danos considerados severos foram aqueles em que restava pouca ou nenhuma epiderme preservada no corte, com presença ou não de crosta. Assim, o dano era classificado como moderado, quando eram observadas características de dano leve em porções da amostra e, em outras porções, características de dano severo.

A primeira avaliação quantitativa das lâminas histológicas de pele sadia de rato foi realizada a partir de medidas de área de epiderme íntegra estimadas pelo programa gratuito QUPath[®], o valor médio de área íntegra por condição foi feita considerando os resultados dos três animais, medindo sempre dois cortes de cada animal. A segunda avaliação quantitativa foi feita no programa *Pannoramic Viewer* (3DHISTECH, Hungria), o qual permite adquirir valores de distâncias na extensão longitudinal das amostras histológicas para os cálculos propostos no modelo descrito na seção (4.2.2).

Nas lâminas histológicas do modelo tumoral em camundongos, foi feita uma análise qualitativa, considerando as principais características de dano a partir de critérios histológicos, como estrutura tecidual, presença de crostas e infiltrados inflamatórios.

4.1.7 Modelo *in vitro* – pele de porco

O estudo *in vitro* realizado para adequação no manuseio do dermatógrafo D1, que necessita de deslizamento na pele, foi feito utilizando pele suína do dorso do animal obtida em açougue. O equipamento D1 permite acoplar diferentes tipos agulhas e a Figura 10 contém as micrografias de algumas opções do fabricante.

Figura 10 - Micrografia com aumento original de 10 vezes de a) 1 microagulha (1μ), b) 2 agulhas distribuídas linearmente (2-), c) 3 microagulhas ($3\mu\circ$) distribuídas de forma circular, d) três agulhas distribuídas de forma circular ($3\circ$) e e) 5 agulhas distribuídas de forma circular ($5\circ$). A barra de escala no canto superior esquerdo representa $250\mu\text{m}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

As agulhas foram ajustadas manualmente e aferidas com uma lupa para saída máxima de 2 mm para fora da ponteira. Utilizando tinta preta nanquim (Acrilex Ltda, São Paulo) foram feitos três traços com e sem o uso de lubrificante (creme base) com cada tipo de agulha (Figura 11a). Os traços foram feitos com a angulação aproximada de 45° em relação à pele e, em seguida, foram cortados com um bisturi cirúrgico para visualizar a penetração do corante, como ilustrado na Figura 11b.

Figura 11 - a) Demonstração do uso de D1 em experimento *in vitro* em pele suína para avaliação do b) perfil de penetração do corante; a barra de escala no canto inferior direito corresponde a 5 mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foi utilizado o programa ImageJ[®] para estimar a penetração do corante na pele para cada tipo de agulha utilizada, foi feita a média de dez pontos aleatoriamente medidos ao longo das amostras (Figura 17).

4.1.8 Modelo animal – pele normal

Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) sob protocolo nº 05/2016, foram utilizados 15 ratos machos, da linhagem Wistar, pesando cerca de 350 g, provenientes do Biotério Geral do Campus de Ribeirão Preto na Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos durante todo o experimento em um alojamento para animais, em *rack* ventilado (Alesco®) com sistema de climatização controlada, montado no IFSC-USP, no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica. Ficaram alojados com lotação de três animais/gaiola, e assoalho forrado com maravalha, recebendo água filtrada e ração comercial específica para roedores, ambos *ad libitum*.

Seguindo o protocolo descrito por Damy *et al.* a anestesia foi feita por via de administração intramuscular de cloridrato de xilasina (5 mg/kg) associada a cloridrato de quetamina (75 mg/kg) (72). Ao fim dos experimentos, os animais foram eutanasiados por superdosagem anestésica, administrando-se dose de quatro vezes a utilizada para a anestesia inicial.

Nos animais que receberam TFD, a eutanásia e a consequente extração das biópsias, não ocorreram imediatamente após a irradiação, mas após aguardar um período de 72 horas para estabelecimento do dano.

Os grupos experimentais (G1, G2 e G3) estão resumidos na Figura 12. Após a remoção manual dos pelos, os grupos G1 e G2 foram replicados em seis animais, enquanto o grupo G3 foi realizado em três animais, cada grupo contendo sete condições. Deste modo, a administração do precursor foi feita por meio de creme tópico (C), solução tópica (S), solução intradérmica usando o dermógrafo D1 (D1), solução intradérmica usando D1 seguido de aplicação tópica do creme (D1+C), solução intradérmica usando o dermógrafo D2 (D2), solução intradérmica usando D2 seguida da aplicação tópica do creme (D2+C), e pele normal sem aplicação do precursor (Ctrl).

Todas as condições foram replicadas no dorso de cada animal nas posições representadas na Figura 12. Por isso, após o tempo de incubação do precursor, foi verificada a fluorescência superficial da PpIX ao redor de cada condição, com o intuito de garantir que não haveria sobreposição de FS entre as condições.

Figura 12 - Esquema representando as sete condições aplicadas no dorso do animal. Sendo que o precursor aplicado a administração do precursor foi feita por meio de creme tópico (C), solução tópica (S), solução intradérmica usando o dermógrafo D1 (D1), solução intradérmica usando D1 seguido de aplicação tópica do creme (D1+C), solução intradérmica usando o dermógrafo D2 (D2), solução intradérmica usando D2 seguida da aplicação tópica do creme (D2+C), e pele normal sem aplicação do precursor (Ctrl).

Fonte: Elaborada pela autora.

Cada animal foi anestesiado e, antes da aplicação do precursor, foi coletado o espectro da autofluorescência (fluorescência endógena) do tecido epitelial. Após a administração do FS na área delimitada, foi realizada a coleta de cinco espectros em pontos aleatórios dentro de cada região nos intervalos de tempo de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. A luz de excitação da fluorescência também pode ter por consequência a degradação do FS, indesejada antes da fase de irradiação da TFD. Para minimizar essa degradação da PpIX pela luz de excitação, o monitoramento da fluorescência foi feito em intervalos diferentes: em três animais foram coletados espectros de fluorescência apenas em 30, 90 e 150 minutos, enquanto nos outros três foi feita a coleta nos de 60, 120 e 180 minutos.

As imagens de fluorescência de campo amplo foram coletadas com o intuito de observar como é dada a distribuição da produção superficial de PpIX, nos mesmos intervalos de tempo utilizados na investigação por espectroscopia.

4.1.9 Modelo animal – tumoral

Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) sob protocolo nº 13/2016, foram utilizados 48 camundongos

fêmeas, da linhagem balb/c, do tipo nude, com aproximadamente seis semanas e pesando cerca de 15 g, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As condições experimentais foram replicadas em quatro animais.

Os animais do tipo nude não apresentam pelagem (alopecia) e possuem timo deteriorado ou inexistente (atimia) e, portanto, possuem sistema imune deficiente que permite estudos com tumores heterotransplantados (ou seja, transplantados entre espécies diferentes). Por esta característica, esses animais foram escolhidos como modelo para este estudo envolvendo tumores induzidos a partir de células humanas.

Para a utilização dos animais, a anestesia foi feita via administração inalatória de isoflurano (entre 1,5 e 2% em oxigênio, avaliando de acordo com depressão respiratória e cardíaca e ausência de resposta a estímulos).

A indução tumoral xenográfica foi feita a partir de uma linhagem celular de CEC humano (A-431, ATCC® CRL-1555™), por ser um modelo de câncer de pele não melanoma de crescimento rápido e bem estabelecido na literatura, com formação de tumor nodular e não cístico (como acontece em casos de indução de CBC). (73-74) Estes tipos celulares crescem por adesão em meio de cultura DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Thermo Fisher Scientific, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico. As células foram mantidas em densidades de 20×10^6 células, em incubadora a 37 °C sob atmosfera umidificada e a 5% de CO₂. As contagens celulares foram realizadas em câmara de Neubauer após tripsinização das células com tripsina e EDTA. A viabilidade celular para a manutenção da cultura foi determinada pelo método de exclusão pelo corante azul de tripan.

Para a indução do modelo tumoral, a inoculação foi feita uma única vez no flanco direito do animal usando injeção intradérmica de 50 µL de volume de células ressuspendidas em PBS, com concentração de 10^6 células. O volume (V) de cada tumor foi estimado com base no volume de uma esfera, com altura, largura e comprimento medidos com paquímetro para estimativa do raio médio, segundo a equação (1).

$$V = \left(\frac{d_1}{2} \cdot \frac{d_2}{2} \cdot \frac{d_3}{2} \right) \frac{4}{3} \pi \quad (1)$$

Sendo que d_1 e d_2 representam os diâmetros na base do tumor e d_3 o diâmetro considerando a espessura do tumor (medido conforme ilustrado na Figura 13b).

Figura 13 - Imagem ilustrando a) tumor induzido no flanco do animal e b) a medida com paquímetro digital do diâmetro que considera a espessura do tumor (d_3).

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram avaliadas condições em que o precursor era aplicado topicamente, de forma intradérmica e comparados com as características do tumor sem aplicação do precursor (controle), como resumido na Figura 14.

Figura 14 - Esquema exemplificando a posição de indução tumoral intradérmica no flanco direito do animal e resumindo os grupos experimentais executados em réplicas de quatro animais. Sendo o precursor aplicado de forma (a) tópica, (b) intradérmica, (c) controle, sendo o tumor sem aplicação do precursor.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com o intuito de padronizar o volume de creme depositado no tumor, o creme sempre era aplicado com auxílio de uma seringa de insulina sem agulha, com volume aproximado de 30 unidades (UI). A escolha deste volume deu-se pensando em uma quantidade que fosse suficiente para cobrir o tumor. A fim de evitar dispersão do creme não foi feito curativo oclusivo e após a aplicação do precursor, o animal era então mantido sob uma toca iglu

coberta de papel alumínio para proteção contra a ativação da PpIX por luz ambiente. Uma ilustração da aplicação do creme e posicionamento do animal durante o tempo de incubação está na Figura 15. Com o creme na concentração de 20%, a massa aplicada foi de 63,9 mg, contendo, portanto, aproximadamente de 12,78 mg de M-ALA.

Figura 15 - a) Tumor induzido no flanco direito do animal antes da aplicação do precursor, b) creme posicionado no tumor e c) animal mantido sob proteção contra ativação da PpIX pela luz ambiente durante o tempo de incubação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os protocolos que foram aplicados no modelo tumoral foram replicados sempre em quatro animais e estão resumidos na Figura 16.

Figura 16 - Resumo dos experimentos conduzidos com o modelo tumoral.

Fonte: Elaborada pela autora.

No protocolo ‘A’ os animais foram eutanasiados após 1 hora da aplicação do precursor e a biópsia era congelada para avaliação por microscopia confocal de fluorescência. No protocolo ‘B’, três dias após a realização da TFD, o animal foi eutanasiado e a biópsia do

tumor utilizada para avaliação histológica. Em ambos os protocolos foram coletadas imagens de campo amplo de fluorescência e espectros de fluorescência, portanto, quando estas metodologias foram avaliadas, sempre foram consideradas as medidas dos oito animais (protocolos A e B).

4.2 Resultados e discussão

Nesta seção, serão abordados e discutidos os resultados referentes à aplicação dos dermógrafos no modelo animal de pele sadia e tumoral.

4.2.1 Modelo *in vitro* – pele de porco

Antes de conduzir os experimentos com os animais, foi feito um estudo piloto *in vitro* em pele de porco, a fim de adequar o manuseio do dermógrafo D1 e fazer calibrações do equipamento, uma vez que o ajuste das agulhas é feito manualmente. A Figura 17 contém os resultados de profundidade de penetração para cada tipo de agulha do dermógrafo D1, com e sem o uso de lubrificante. Exceto para o caso com cinco agulhas distribuídas circularmente, o uso do lubrificante não favoreceu o aumento da profundidade atingida, podendo ser associado o fato de que, nos casos com menos agulhas, a maior facilidade no deslizamento pode não ter permitido que a agulha atingisse o máximo de penetração antes de ser movida de posição.

Figura 17 - Profundidade de penetração do corante usando D1 com diferentes tipos de agulhas fixadas em 2 mm, com e sem o uso de lubrificante.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir deste experimento, foi possível concluir que para o dermógrafo D1, a combinação mais viável para o estudo em animais, foi o de 1 microagulha (1 μ) sem a necessidade do uso de lubrificante, atingindo a maior profundidade de penetração. Já era esperado que o limite de 2 mm não fosse alcançado, uma vez que a angulação durante a aplicação faz com que a penetração em relação à superfície da pele seja menor. As barras de erro indicam houve pouca variação de profundidade de penetração ao longo do traçado.

4.2.2 Modelo animal – pele normal

Espectros médios de fluorescência característicos de pele normal de ratos estão expressos na Figura 18. Estes espectros referem-se a medidas de um dos animais na região na qual o creme foi aplicado topicamente, com coleta antes da aplicação (0 minuto), 60, 120 e 180 minutos após a aplicação.

Figura 18 - Espectros médios de fluorescência para os tempos de 0, 60, 120 e 180 minutos.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para o tempo de 0 minuto, antes da aplicação do creme, foi possível observar o espectro médio da autofluorescência endógena da pele. Após a aplicação do creme ocorreu o acúmulo da PpIX no tecido que pode ser associado ao pico de emissão de fluorescência característico da molécula centrado em aproximadamente 635 nm (ao ser excitada com laser em 408 nm), como observado nos espectros após incubação do creme por 60, 120 e 180 minutos.

Flutuações na potência do laser de excitação, diferenças no posicionamento da fibra de coleta no tecido e consequente acoplamento da luz durante a medida ou mesmo alterações da pele são alguns dos fatores que podem promover oscilações na intensidade de fluorescência dos espectros. Este efeito pode ser observado nas diferenças de intensidade e formato no pico em aproximadamente 510 nm (característico da pele) que não são proporcionais comparados com a as intensidades no pico característico da PpIX. A fim de minimizar estes efeitos e associar a intensidade de fluorescência do pico em 635 nm com a concentração de PpIX na superfície do tecido, foi feita uma normalização em que cada ponto espectro $I(\lambda)$ foi dividido pelo valor da intensidade de fluorescência no comprimento de onda de 450 nm, $I(\lambda_{450nm})$, conforme a equação (2). Com excitação em 408 nm a emissão de fluorescência na região de 450 nm é reduzida, por isso, este comprimento de onda foi escolhido para normalização. A escolha pela região de 500 nm, na qual ocorre o máximo da banda de emissão da pele, não foi feita porque existem diversas condições da pele que podem provocar modificações na emissão, enquanto a emissão em 450 nm varia minimamente. (75) Os espectros normalizados estão apresentados na Figura 19.

$$Normalização = \frac{I(\lambda)}{I(\lambda_{450nm})} \quad (2)$$

Figura 19 - Espectros médios de fluorescência normalizados pela intensidade de fluorescência no comprimento de onda de 450 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a normalização (Figura 19), os valores de intensidade de fluorescência no pico característico da molécula de PpIX foram utilizados para estimar e comparar a quantidade FS acumulado após a entrega com os diferentes protocolos aplicados. As intensidades de fluorescência média normalizada no comprimento de onda em 635 nm em função do tempo estão expressas na Figura 20.

Figura 20 - Intensidade de fluorescência no comprimento de onda de 635 nm após normalização em função do tempo para condições envolvendo aplicação de a) creme e b) solução.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em teoria, antes da aplicação do precursor (Figura 20), no tempo de 0 minuto, ainda não há presença do FS na pele. Entretanto, com a excitação utilizada, é possível observar uma intensidade de fluorescência (aproximadamente 0,5 unid. arb.) na região de 635 nm no espectro de autofluorescência da Figura 19 que, conseqüentemente, aparece no ponto inicial das curvas da Figura 20. A fim de eliminar essa informação intrínseca da pele no comprimento de onda de interesse para avaliação da produção de PpIX, o valor médio da intensidade de fluorescência para o tempo inicial, $I_{635nm}(t_0)$, foi subtraído do valor de intensidade de fluorescência em todos os tempos de incubação, $I_{635nm}(t)$, conforme a equação (3).

$$I(t) = I_{635nm}(t) - I_{635nm}(t_0) \quad (3)$$

De acordo com trabalhos anteriores, a equação (4), por sua vez, pode ser utilizada para descrever a curva de formação de PpIX em função do tempo. (76,77) Nesta equação, $C(t)$ corresponde à concentração de PpIX em função do tempo, C_0 representa o máximo de

concentração do FS, a constante τ representa o tempo característico de formação da PpIX para alcançar aproximadamente 63% da máxima concentração e t , o tempo de formação. O comportamento descrito pela equação (4) está exemplificado na Figura 21.

$$C(t) = C_0 - C_0 e^{-t/\tau} \quad (4)$$

Para tempos curtos de monitoramento da formação de PpIX, pode ser feita uma aproximação na equação (4) utilizando uma expansão em série de Maclaurin (série de Taylor centrando a expansão em $t = 0$). Além disso, considerando que para todos os protocolos aplicados, em algum momento o mesmo máximo de concentração de PpIX (C_0) será atingido, a equação (5) pode ser utilizada para comparar o tempo de formação dentre os protocolos aplicados.

$$C(t) = \frac{C_0}{\tau} t \quad (5)$$

Figura 21 - Esquema para ilustrar a curva de formação de PpIX em função do tempo. Sendo C_0 a concentração máxima de FS, τ tempo característico de formação da PpIX para atingir 63% da máxima concentração, α o coeficiente angular da reta que descreve o comportamento da curva para tempo muito menores que τ .

Fonte: Elaborada pela autora.

Definindo α como o coeficiente angular da reta que pode ser relacionado com τ conforme a equação (6), quanto maior o valor de α , menor o tempo para alcançar o máximo de concentração de FS e, portanto, maior eficiência do protocolo. Reescrevendo a

equação (5) e fazendo relação com os dados experimentais de intensidade de fluorescência, temos a equação (7), que foi utilizada para os ajustes lineares da Figura 22.

$$\alpha = \frac{C_0}{\tau} \quad (6)$$

$$I(t) = \alpha t \quad (7)$$

Figura 22 - Intensidade de fluorescência no comprimento de onda de 635 nm após normalização em função do tempo para condições envolvendo aplicação de a) creme e b) solução; após subtração do valor da intensidade autofluorescência e ajuste linear.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores obtidos para o parâmetro α estão expressos na Figura 23. De acordo com este resultado é possível afirmar que as condições que envolveram a aplicação do creme (C, D1+C e D2+C) possuem maior eficiência em relação ao tempo de produção de PpIX.

Figura 23 - Valores do coeficiente angular α relacionado ao tempo de formação da PpIX estimado por espectroscopia de fluorescência.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 24 possui imagens de fluorescência de campo amplo representativas das regiões antes aplicações tópicas e intradérmica e também para os tempos de 120 e 180 minutos de incubação.

Figura 24 - Imagens de fluorescência de campo amplo representativas de antes da aplicação do precursor (controle), após 120 e 180 minutos da aplicação dos protocolos envolvendo solução (S, D1, D2) e associação de com creme (C, D1+C e D2+C).

Fonte: Elaborada pela autora.

Com a excitação utilizada de aproximadamente 450 nm e os filtros do equipamento, a autofluorescência do tecido antes da aplicação do precursor (controle) tem predominância de fluorescência na cor verde. A PpIX, nestas condições, possui emissão de fluorescência na região do vermelho. É válido mencionar que a fluorescência saturada de aspecto esbranquiçado percebida nas imagens advém de pelos residuais, que persistem localizados sob a pele mesmo após a realização da remoção dos pelos.

Uma análise qualitativa das imagens de fluorescência permite dizer que a aplicação tópica da solução (S) de ALA teve a produção de PpIX dada de forma mais heterogênea comparada aos outros protocolos. O dano promovido devido ao deslizamento do dermatógrafo D1 é nítido nas imagens (D1 e D1+C) pelos traçados que podem ser claramente observado em tons mais escuros, devido ao sangramento local. Na aplicação tópica do creme (C) observou-se a maior intensidade de fluorescência.

Foi feita uma análise quantitativa da intensidade média dos pixels no canal vermelho de cada uma das imagens de fluorescência com o intuito de associar esse parâmetro à intensidade de fluorescência da PpIX do tecido. A Figura 25 contém resultados desta análise, mostrando os resultados para os tempos de 120 e 180 minutos. De acordo com esta quantificação, é possível afirmar que a aplicação de creme (C) possuiu a maior intensidade média no canal vermelho (como já observado nas imagens) e que não há diferenças significativas entre os protocolos para os tempos apresentados.

Figura 25 - Intensidade média no canal vermelho em função do tempo associada a fluorescência da PpIX a partir imagens de campo amplo de fluorescência.

Fonte: Elaborada pela autora.

Considerando que tanto a análise por espectroscopia quanto por imagem campo amplo de fluorescência refere-se à produção superficial do FS, foi feita a análise da distribuição da PpIX nas camadas da pele por microscopia confocal de fluorescência. Para estes experimentos, a eutanásia e congelamento das biópsias ocorreram após 2 horas de incubação.

A Figura 26 contém as micrografias representativas das lâminas avaliadas. As imagens foram dispostas a partir da sobreposição da imagem de fluorescência do canal vermelho (com

parâmetros fixos de intensidade do laser, ganho e o contraste de detecção) com a imagem feita por microscopia de transmissão (com contraste ajustado para facilitar a visualização da imagem).

Figura 26 - Micrografia de fluorescência confocal das biópsias coletadas após 2 horas de incubação para as diferentes condições experimentais. As imagens foram montadas com a sobreposição da imagem de fluorescência no canal vermelho com a imagem de microscopia de transmissão da amostra. A barra de escala no canto direito inferior das imagens corresponde a 1 mm, a letra 'a' indica à posição da epiderme, 'b' a extensão da derme, 'c' a camada adiposa e o símbolo '*' a localização dos folículos pilosos.

Fonte: Elaborada pela autora.

De modo geral, foi possível observar a intensidade de fluorescência no canal vermelho, que pode ser associada à presença de PpIX, principalmente na epiderme e folículos pilosos. Uma menor intensidade de fluorescência pode ser observada nas condições 'S' e 'D1', as quais tiveram a aplicação de solução via tópica ou com o dermógrafo D1, respectivamente. No caso das aplicações de creme, é particularmente notável que para o creme sozinho ('C') foi possível visualizar com clareza a fluorescência da PpIX na camada superior da pele, enquanto no caso da aplicação de solução por dermógrafo associados com creme foi possível ver mais fluorescência nas camadas inferiores, principalmente na condição 'D1+C' e 'D2+C'. No caso da solução, o aumento na intensidade de fluorescência é sutil para o uso do dermógrafo D1, mas há um grande aumento no sinal de fluorescência do canal vermelho para a solução administrada pelo dermógrafo D2. Ambos os resultados são uma evidência de que o uso dos dermógrafos abriu caminho para que a penetração tanto da solução quanto do creme a partir da superfície se desse de maneira mais eficiente que a observada sem o uso deles, permitindo que a PpIX fosse identificada por meio da fluorescência em camadas inferiores.

Considerando que foi possível observar distribuição do FS na pele após 2 horas de incubação, esse foi o tempo de incubação escolhido em um novo grupo de animais no qual foi aplicada a TFD para verificar o dano estabelecido através de lâminas histológicas. A eutanásia destes animais foi feita 72 horas após a irradiação.

O resultado da análise histológica realizado pelo médico patologista está na Figura 27 e contem a porcentagem em determinada intensidade de dano foi observada nos animais em função do protocolo aplicado. A análise qualitativa mostrou que a maior incidência de dano severo ocorreu para as condições de 'D2' e 'C', correspondendo a aproximadamente 67% dos casos. Sendo que aproximadamente 33% dos danos foram relatados como leve para a condição 'C', enquanto para a condição 'D2+C' esta foi a quantidade de dano moderado observada. Comparando as condições 'D1+C' e 'D2+C', pode-se afirmar que 'D2+C' apresentou maior dano, uma vez que em 33% dos casos foi de dano severo e o restante moderado, enquanto 100% de dano de 'D1+C' foi moderado. A condição 'S' apresentou a maior heterogeneidade, sendo observado dano leve, moderado e severo em mesma proporção.

Figura 27 - Avaliação do médico patologista sobre a incidência do dano em função dos protocolos aplicados.
Fonte: Elaborada pela autora.

Considerando que o dano na pele pode ser mais severo quando a camada basal da pele é atingida e desta forma, a epiderme é comprometida, foi feita uma quantificação da área da epiderme no corte histológico a fim de associar este valor com a intensidade do dano.

Após padronizar o campo de análise das lâminas, quanto maior o valor da área da epiderme estimada, menor o dano causado, uma vez que este valor estaria mais próximo do valor da área da epiderme de uma amostra controle. A Figura 28 ilustra uma magnificação de um corte histológico de uma amostra controle (pele sadia sem aplicação de precursor ou TFD) ilustrando a seleção da epiderme para determinação de sua área (região contornada em vermelho).

Figura 28 - Imagem de um corte histológico de condição controle em que a epiderme foi selecionada contornada (em vermelho) com ferramenta do programa QuPath e está indicada pela seta vermelha. A letra 'a' indica a extensão da derme papilar e 'b' a derme reticular, o símbolo '▲' indica a localização do estrato córneo, '●' um folículo piloso e '★' uma glândula sebácea. O A barra no canto inferior direito representa a escala de 100 μm .

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 29 estão os resultados da quantificação da área média de epiderme em função dos protocolos aplicados. As barras de erros referem-se ao desvio padrão da média entre as amostras.

Figura 29 - Área da epiderme estimada pelos cortes histológicos de cada protocolo a partir de seleção manual da epiderme realizada com o programa QuPath.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com a menor barra de erro para a condição controle, foi possível afirmar que a área média da epiderme íntegra nesta condição não apresentou grandes diferenças entre os animais, como esperado. Ao realizar a TFD com os diferentes protocolos existem, além das variações na produção e acúmulo do FS no tecido sadio, diferenças na resposta de cada animal ao tratamento e estabelecimento do dano. Estas diferenças estão associadas ao aumento das

barras de erro observadas para os grupos tratados. Considerando os valores de área média de epiderme íntegra comparada à condição controle, pode-se dizer que, as condições D2 e D2+C apresentam as menores áreas de epiderme íntegra e, portanto, maiores danos observados. Além disso, a associação do creme de uma forma geral resultou em maiores danos ao tecido.

Ainda buscando parâmetros quantitativos que permitissem a comparação entre os danos estabelecidos com os protocolos aplicados, foi elaborado o modelo descrito pela equação (8). Sendo η definido como um parâmetro de intensidade do dano, em que ‘1’ seria o maior dano possível e ‘0’ o valor para a amostra sem dano (controle). Como referência a direção longitudinal do corte histológico, L_d representa o comprimento total em que havia indícios de dano na amostra (regiões com formação de crosta ou inflamação, exemplificadas pelo símbolo ‘*’) e L_e representa o comprimento total em que a epiderme estava preservada na amostra (regiões indicadas por setas vermelhas). Alguns cortes histológicos e estas características consideradas no modelo estão exemplificados na Figura 30.

$$\eta = \frac{L_d}{L_d + L_e} \quad (8)$$

Figura 30 - Imagens de cortes histológicos para exemplificação dos danos observados após aplicação de TFD, nas quais são representadas a) uma região com crosta e preservação da epiderme, b) uma região em que apenas porções da epiderme foram preservadas e c) uma região com dano extremo em que toda epiderme foi destruída. As setas vermelhas indicam regiões com epiderme e o asterisco (“*”) indica regiões de dano tecidual (crosta, edema, inflamação). A barra no canto inferior direito representa a escala de 400 μ m.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 30a ilustra uma situação em que mesmo com a presença de crosta, a maior parte da epiderme é preservada. Se avaliarmos apenas a área de epiderme íntegra, este caso seria bem próximo da condição controle. Com o modelo proposto, porém, este aspecto tem um peso, mas leva em consideração a crosta na superfície ao estimar o dano. A Figura 30b ilustra uma situação em apenas porções de epiderme são preservadas e há sinais de dano em toda a extensão, um dos casos em que necessariamente o dano foi maior comparado ao caso anterior. Enquanto a Figura 30c por sua vez mostra um caso de dano extremo, em que nenhuma porção da epiderme íntegra pode ser observada abaixo do dano promovido pelo tratamento.

O programa *Pannoramic Viewer* (3DHISTECH, Hungria) foi utilizado para estimar os comprimentos das regiões de dano (L_d) e das regiões de epiderme preservada (L_e). Retas foram manualmente traçadas ao longo da amostra e a soma delas foi considerada como o comprimento total ($L_d + L_e$).

Os valores médios do parâmetro ' η ' foram estimados considerando a média entre os animais, e estes dados são apresentados na Figura 31.

Figura 31 - Parâmetro η médio estimado para os diferentes protocolos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim como as análises anteriores, há indícios de que a aplicação de solução com o dermatógrafo D2 ou quando associada à aplicação de creme, D2+C, possuem potencial para aumentar a entrega do precursor e aperfeiçoar a formação do FS em camadas mais profundas

da pele e, portanto, estabelecer um dano mais intenso na pele. Comparando as barras de erro, e levando em conta que o tamanho das barras é proporcional à dispersão dos valores de η entre os animais, é possível correlacionar o tamanho delas à variação da intensidade no dano. Portanto, podemos assumir que as barras de erros do protocolo D2+C mostram ser esta a condição de maior homogeneidade no estabelecimento do dano.

A fim de entender a resposta no modelo clínico em pacientes, portanto, foi feito um estudo com este dispositivo (D2) em modelo tumoral animal.

4.2.3 Modelo animal – tumoral

Como o protocolo de TFD clínico atual envolve a aplicação tópica de creme e não de solução, nesta parte do estudo optou-se pela aplicação intradérmica com o equipamento D2, porém, utilizando apenas o creme, conforme seria aplicado nos pacientes. Além disso, a fim de comparar os resultados do estudo com o protocolo clínico utilizado mundialmente com o creme comercial Metvix[®] (Galderma, EUA) optou-se pela utilização do M-ALA produzido pela empresa PDT Pharma LTDA (Cravinhos, SP, Brasil). Portanto, os experimentos foram realizados comparando a aplicação tópica do creme e intradérmica por dermógrafo.

Os experimentos foram conduzidos com tumores de volume médio de $30 \pm 4 \text{ mm}^3$. A Figura 32a ilustra como foi realizada a aplicação com o dermógrafo, tendo o creme sido previamente aplicado em sua superfície e o equipamento foi posicionado perpendicularmente em relação à superfície tumoral. A Figura 32b mostra a fonte de luz posicionada sobre o tumor para irradiação.

Figura 32 - a) Aplicação de creme com dermógrafo D2 no tumor e b) ponteira de irradiação posicionada para a TFD.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a sensibilização do tumor, o tempo de incubação foi de 1 hora. A diferença entre os tempos em relação à aplicação em modelo de pele sadia em ratos se deu pela diferença entre os modelos animais. A natureza exploratória do experimento investiga a possibilidade de aumentar a profundidade de penetração de precursores de PpIX a partir da superfície. Contudo, se na pele mais espessa do rato 2 horas poderiam provocar penetração muito maior, na pele mais fina do camundongo uma maior penetração poderia provocar no mesmo tempo a distribuição sistêmica do FS, interferindo na análise dos dados. Por isso, preferiu-se utilizar um tempo menor de incubação. Assim, antes e após a incubação foram coletados cinco espectros sobre o tumor e cinco espectros na pele em partes aleatórias do corpo do animal onde não havia sido aplicado o precursor, a fim de certificar que o FS não havia se distribuído de forma sistêmica.

A Figura 33 possui alguns espectros médios da intensidade de fluorescência antes e depois da aplicação do creme e do creme com dermógrafo, tanto na pele quanto no tumor.

Assim como para os espectros coletados nos experimentos em pele sadia de ratos, foi possível observar variações de intensidade na porção do espectro que se refere às características da pele (aproximadamente 510 nm). Portanto, a mesma normalização (dividindo o espectro pelo valor de intensidade em 450 nm) foi utilizada para avaliar a intensidade de fluorescência relacionada ao acúmulo de PpIX (635 nm).

Figura 33 - Espectros médios da intensidade de fluorescência para aplicação do a) creme e b) creme com dermógrafo, considerando autofluorescência e fluorescência após 1 hora de incubação na região do tumor fotossensibilizado e no tecido sadio sem fotossensibilização.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 34 possui espectros médios de um dos animais após a normalização. Antes da normalização, a intensidade de fluorescência da pele na região de 510 nm era mais intensa

comparada ao tumor. Após a normalização, esta diferença não é mais observada, tornando mais evidente as diferenças no pico em 635 nm.

Figura 34 - Espectros médios da intensidade de fluorescência normalizados para aplicação do a) creme e b) creme com dermógrafo, considerando autofluorescência e fluorescência após 1 hora de incubação na região do tumor fotossensibilizado e no tecido sadio sem fotossensibilização.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores da intensidade média de fluorescência normalizada no pico de 635 nm após 1 hora de incubação estão na Figura 35. Lembrando que nestes dados foram consideradas as medidas de oito animais, sendo quatro animais foram eutanasiados para avaliação do tumor por microscopia confocal de fluorescência e em quatro animais foi aplicada a TFD e posterior avaliação histológica dos tumores, em que ambos os casos foi feita a coleta de imagens e espectros de fluorescência.

Figura 35 - a) Gráfico tipo *boxplot* dos valores médio da intensidade de fluorescência normalizada no comprimento de onda de 635 nm referente aos espectros coletados no tumor 1 hora após a aplicação de M-ALA em creme com e sem a aplicação de dermógrafo. b) valor médio e desvio padrão da intensidade de fluorescência normalizada considerando todos os animais.

Fonte: Elaborada pela autora.

O fato da aplicação intradérmica de precursores aumentar a homogeneidade na produção do FS já foi relatada em tecido sadio. (32,78) O acúmulo do FS no tumor por é mais homogêneo que no tecido sadio devido às condições particulares das células neoplásicas, que interferem no tempo de eliminação e seletividade do FS. (79) A partir dos resultados, mesmo com intensidade média de fluorescência menor, é possível afirmar que a produção de PpIX deu-se de forma mais homogênea com a aplicação intradérmica por dermógrafo, dada a menor dispersão dos valores.

A Figura 36 apresenta imagens representativas ilustrando a fluorescência superficial antes da aplicação do precursor (fluorescência endógena do tumor), após 1 hora de incubação e consequente formação e acúmulo do FS, e sinais de degradação parcial após a irradiação.

Figura 36 - Imagens de campo amplo de fluorescência coletadas antes da aplicação do precursor (autofluorescência endógena do tumor e pele ao redor), 1 hora após a aplicação do precursor e após a irradiação da TFD; sendo a) aplicação tópica do M-ALA em creme e b) aplicação intradérmica do M-ALA em creme por dermógrafo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com as configurações utilizadas para excitação e coleta, a imagem de fluorescência de campo amplo mostra que a autofluorescência do tumor é mais escura que a da pele sadia do animal. Após 1 hora de incubação, a fluorescência em vermelho mostra um acúmulo superficial de PpIX para a aplicação tópica e intradérmica do creme, bem como o consumo parcial da PpIX após a aplicação da TFD em ambos os protocolos. A Figura 37 apresenta os resultados do processamento das imagens de campo amplo de fluorescência.

Figura 37 - a) Gráfico do tipo *boxplot* dos valores médio da intensidade no canal vermelho das imagens de fluorescência de campo coletadas no tumor 1 hora após a aplicação de M-ALA em creme com e sem a aplicação de dermógrafo. b) valor médio e desvio padrão da intensidade no canal vermelho das imagens de fluorescência de campo coletadas considerando todos os animais, nas mesmas condições em 1 hora de incubação e autofluorescência.

Fonte: Elaborada pela autora.

Fazendo a associação da intensidade média calculada no canal vermelho das imagens com o acúmulo superficial da PpIX, é possível afirmar que na superfície houve maior acúmulo de PpIX para aplicação tópica do creme do que foi observado com o creme aplicado por dermógrafo valores de obtidos pelo processamento de imagens de campo amplo corroboram com os resultados obtidos pelos espectros.

Na Figura 38 estão imagens para ilustrar a fluorescência do canal vermelho característica das condições controle (tumor sem aplicação do precursor), do creme aplicado via tópica e via intradérmica por dermógrafo. As imagens de fluorescência estão sobrepostas pelas imagens da microscopia de transmissão para facilitar a visualização das regiões do tumor.

Uma maior intensidade no canal vermelho na superfície do tumor foi observada para a condição em que o creme foi aplicado via tópica, corroborando com os resultados das técnicas utilizadas para medidas superficiais de fluorescência (espectroscopia e imagem de campo amplo). No protocolo em que o creme foi aplicado por dermógrafo foi possível perceber a existência de regiões com intensidade de fluorescência dispersas no interior do tumor, sendo um indicativo importante de que as agulhas facilitaram a permeação do creme e permitiram o acúmulo de FS nestas regiões. Contudo, a intensidade de fluorescência dessas regiões não foi tão intensa como a intensidade de fluorescência da epiderme quando o creme foi aplicado topicamente. Uma vez que a quantificação utilizada considera a média da intensidade no canal vermelho em áreas ao longo da profundidade do tumor e há uma heterogeneidade na

distribuição das regiões com FS, esse acúmulo acaba dificultando uma quantificação acurada de toda a PpIX produzida.

Figura 38 - Imagens representativas da microscopia confocal de fluorescência no canal vermelho com sobreposição da imagem de transmissão para os tumores, sendo a) tumor sem sensibilização (controle); b) tumor após 1 hora da aplicação de creme via tópica de M-ALA na concentração de 20%; c) tumor após 1 hora da aplicação via intradérmica por dermógrafo de M-ALA na concentração de 20% de creme. A barra no canto superior direito corresponde à escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após o processamento das imagens de fluorescência no canal vermelho, foi possível estimar a intensidade média em função da profundidade e a Figura 39 contem os resultados obtidos, considerando de profundidade de até 1 mm.

Foi calculado o valor da integral da intensidade como função da profundidade da Figura 39. Subtraindo o valor obtido para a condição controle, foi possível estimar a quantidade acumulada de PpIX (com base no sinal de fluorescência) no tumor em até 1 mm de profundidade. Os resultados mostram que, no geral, o acúmulo quando creme foi aplicado topicamente foi aproximadamente 2,2 vezes maior que quando aplicado de forma intradérmica via dermógrafo.

Figura 39 - Intensidade média no canal vermelho das imagens de microscopia confocal de fluorescência em função da profundidade, para tumores sem sensibilização (controle) e tumores após 1 hora da aplicação de M-ALA em creme na concentração de 20% com aplicação via tópica ou via intradérmica por dermógrafo. O valor da área para cada aplicação foi calculado pelo programa Origin e está relacionado com a integral dos valores em função da profundidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 40 mostra os resultados da Figura 39 para as distâncias entre 0,5 e 1 mm. Os altos valores das barras de erro se devem à heterogeneidade da distribuição da PpIX discutida para a aplicação intradérmica. Apesar disso, neste intervalo de profundidade avaliado, a média de intensidade no canal vermelho foi maior quando o creme foi aplicado com o dermógrafo.

Figura 40 - Intensidade média no canal vermelho das imagens de microscopia confocal de fluorescência em função da profundidade (de 0,5 a 1 mm), para tumores sem sensibilização (controle) e tumores após 1 hora da aplicação de M-ALA em creme na concentração de 20% com aplicação via tópica ou via intradérmica por dermógrafo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 41 possui imagens representativas dos cortes histológicos dos tumores, considerando como controle o tumor sem aplicação de precursor ou irradiação e tumores coletados 72 horas após a realização de TFD com aplicação tópica e intradérmica do creme. A partir da imagem da Figura 41a é possível confirmar que a indução tumoral foi dada de forma intradérmica. Tanto na aplicação tópica do creme quando na aplicação intradérmica por dermatógrafo foi possível observar a presença de crosta na superfície do tumor e sinais de inflamação.

Figura 41 - Imagens de cortes histológicos de a) tumor controle (sem aplicação de precursor ou irradiação); b) tumor coletado após 72 horas da aplicação de TFD com protocolo de aplicação tópica de creme contendo 20% de M-ALA, e c) tumor coletado após 72 horas da aplicação de TFD com protocolo de aplicação intradérmica do creme contendo 20% de M-ALA por dermatógrafo. A seta azul indica a extensão da pele (epiderme e derme), a seta verde indica a extensão do tumor intradérmico, as setas amarelas indicam regiões com infiltrados inflamatórios e o símbolo asterisco (“*”) indica regiões com crosta e edema. A barra no canto superior direito representa a escala de 250 µm.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com a avaliação qualitativa das lâminas histológicas, não foi possível observar diferenças significativas no estabelecimento do dano entre os protocolos avaliados.

4.3 Conclusões do capítulo

A partir dos resultados dos experimentos realizados em pele sadia de ratos foi possível confirmar que a distribuição do precursor e consequente formação da PpIX deu-se de forma mais eficiente em relação à profundidade quando o precursor foi aplicado por dermatógrafo. A análise histológica mostrou que o dano tecidual após a realização da TFD também foi mais intenso quando houve aplicação intradérmica.

No modelo tumoral em camundongos, a intensidade de fluorescência na superfície a partir de imagem de campo amplo e espectroscopia de fluorescência mostrou que a aplicação tópica do creme foi mais eficiente em termos de intensidade de emissão, relacionada à quantidade de produção de FS. Contudo, a partir da aplicação intradérmica do creme por dermógrafo, foi possível obter maior homogeneidade na distribuição na superfície. Com os resultados de microscopia confocal de fluorescência confirmou-se que a intensidade de fluorescência nas primeiras camadas foi menor para a aplicação intradérmica, porém, foi possível demonstrar que a distribuição do FS, ainda que menos intensa, deu-se alcançando camadas mais profundas. Com o protocolo de TFD utilizado, não foi possível identificar diferença no estabelecimento do dano entre a aplicação tópica e intradérmica, todos os casos apresentaram crostas e infiltrados inflamatórios em proporções similares.

Com os resultados apresentando eficiência para entrega mais profunda do precursor em relação à aplicação tópica, e considerando que a aplicação por dermógrafo é de simples manuseio e os equipamentos já possuem aprovação da ANVISA para aplicação clínica, as observações encorajaram o desenvolvimento do estudo clínico em pacientes acometidos por CBC nodular.

Os indícios de que a aplicação intradérmica por dermógrafo permite a entrega mais eficiente em profundidade mostram o potencial que a técnica apresenta como ferramenta em busca de melhorar o tratamento de lesões mais espessas por TFD.

5 DERMÓGRAFO: ESTUDO CLÍNICO

Nesta sessão, serão apresentadas a metodologia, resultados, discussão e conclusões do teste clínico envolvendo a aplicação de dermógrafo.

5.1 Material e métodos

5.1.1 Seleção de pacientes

Como critério de inclusão, os pacientes obedeceram aos seguintes critérios: pacientes de ambos os sexos; maiores de 18 anos com lesões malignas do tipo carcinoma basocelular (CBC) subtipo nodular (segundo a Classificação Internacional de Doenças CID 10, código D04.9) com diâmetro máximo de 2 (dois) centímetros (lesões iniciais). Pacientes com lesões múltiplas também foram tratados, desde que cada lesão se enquadrasse nas mesmas características descritas.

Para critério de exclusão, os pacientes com as seguintes características não foram inseridos no estudo: pacientes com alergia a qualquer um dos excipientes presente na fórmula; carcinoma basocelular infiltrativo subtipo histológico micro-infiltrativo, esclerodermiforme e plano-cicatricial, terebrante, assim como carcinoma espinocelular ou epidermóide e melanoma; pacientes com porfiria; lesões de carcinoma basocelular tipo nodular maiores de 2 cm de diâmetro; menores de 18 anos; mulheres grávidas e lactantes; mulheres em idade fértil; doenças fotossensíveis, por exemplo, lúpus.

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), parecer nº 2.568.611, os estudos clínicos foram realizados em parceria com o Hospital Amaral Carvalho (HAC), situado da cidade de Jaú-SP, no Centro de Desenvolvimento de Novas Terapias.

Os pacientes voluntários da pesquisa foram orientados sobre as etapas do tratamento e que as imagens coletadas seriam utilizada em um estudo científico, os mesmos tiveram a identidade preservada e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.1.2 Dermógrafo

Foi utilizado o equipamento comercial de origem nacional (Dermaflox, FLOX, São Paulo/SP) com registro na ANVISA (Nº 80700629002). As cápsulas (contendo agulhas e ponteiras) são comercializadas estéreis pela empresa, e, após serem utilizadas em cada

paciente de forma exclusiva, são devidamente descartadas. O equipamento permite fixar a profundidade de penetração das agulhas, portanto, foi feita uma calibração prévia para que a penetração máxima no tecido fosse de 2 mm.

5.1.3 *Anestesia tópica*

Considerando que a aplicação por meio de dermógrafo podia gerar leve desconforto e, além disso, como a maioria dos pacientes possuem idade avançada e possível sensibilidade elevada, optou-se pelo uso de um anestésico tópico antes da realização dos procedimentos. Portanto, foi utilizado um anestésico a base de lidocaína - 4% (Dermomax[®] Laboratório Ache, São Paulo, Brasil). Este medicamento tem demonstrado eficácia em procedimentos injetáveis como venopunção, injeções intradérmicas, subcutâneas ou intramusculares em adultos e crianças, bem como antes de tratamentos a laser sobre a pele ou microinfusão de medicamentos. (80) O anestésico utilizado não apresenta ação de vasoconstrição, essa característica foi analisada na escolha do composto para que não interferisse na ação fotodinâmica do tratamento.

O protocolo foi efetuado com a sequência de aplicação do anestésico, tempo de espera para efeito de 30 minutos, realização da curetagem e aplicação do precursor, respectivamente. Para padronização, mesmo na aplicação que não envolveu o uso do dermógrafo, caso da aplicação exclusivamente tópica de M-ALA, também foi utilizado o anestésico.

5.1.4 *Precursor de PpIX*

A disponibilização do fotossensibilizador endógeno, a PpIX, foi estimulada pela aplicação do precursor metabólico, M-ALA na concentração de 20% em creme.

5.1.5 *Fluorescência de campo amplo*

A realização das imagens de fluorescência de campo amplo, o mesmo procedimento adotado nos experimentos em animais, não oferece risco ao paciente. Portanto, no estudo clínico piloto foram coletadas imagens da autofluorescência epitelial, imagens de fluorescência da PpIX produzida na superfície da lesão (decorridos 90 e 180 minutos da aplicação do M-ALA) e do consumo do FS (após as aplicações da TFD). Estas imagens foram

feitas para avaliar a formação de PpIX com aplicação do creme por dermógrafo no estudo clínico em paciente.

5.1.6 *Terapia fotodinâmica*

Para a irradiação, foi utilizado o sistema comercial de iluminação LINCÉ[®] (MMOptics, Brasil), composto por LEDs centrados no comprimento de onda 630 ± 10 nm. Para a irradiação, foi mantido o protocolo clínico aplicado rotineiramente no ambulatório, com irradiância de 125 mW/cm^2 e fluência de 150 J/cm^2 , que leva 20 minutos para realização. (14) Foram aplicadas duas irradiações em um mesmo dia, sendo a primeira após 180 minutos de incubação e a segunda após mais 90 minutos de incubação, seguindo o trabalho de Angarita *et al.* como referência. (81)

5.1.7 *Estudo piloto*

Um estudo piloto foi conduzido em um paciente com Síndrome de Gorlin, que por este motivo é afetado por múltiplas lesões de CBC (82). O paciente do sexo masculino, 58 anos, possuía cinco lesões de CBC nodulares localizadas na perna direita e uma na perna esquerda. A aplicação do creme contendo foi feita com o dermógrafo (D2), sendo que a aplicação foi feita uma vez após a curetagem e repetida após a primeira sessão de TFD.

Foi feita a coleta de imagens de autofluorescência epitelial, imagens de fluorescência da PpIX produzida na superfície da lesão (decorridos 90 e 180 minutos da aplicação do precursor) e do consumo do FS (após as realizações da TFD). A avaliação histopatológica foi feita para o material coletado no procedimento de curetagem antes do tratamento e da biópsia por *punch* de 2 mm coletada 30 dias após o procedimento. Após seis meses do tratamento foi feita a avaliação clínica.

5.1.8 *Estudo clínico*

Para o estimativa amostral de cada grupo do estudo clínico foi utilizada a equação (9) que considera o cálculo de variável qualitativa entre amostras não pareadas. (83)

$$n = \frac{(p_1 \cdot q_1 + p_2 \cdot q_2) \cdot (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{(p_1 - q_1)^2} \quad (9)$$

Sendo, n - tamanho da amostra para cada grupo; $Z_{\alpha/2}$ - valor do erro, usualmente 1,96 (5%); Z_{β} valor do erro β , usualmente 0,84 (20%); p_1 e p_2 proporção de resultados favoráveis no grupo 1 ou 2; q_1 e q_1 proporção de resultados desfavoráveis do subgrupo 1 ou 2.

Com base em referências bibliográficas, consideramos o valor de p_1 como 86%, valor referente à resposta completa para tratamento de CBC nodular com protocolo tradicional de TFD em centros experientes; (14) 98% o valor para p_2 como comparação foi escolhida a taxa de sucesso do procedimento padrão para o tratamento desse tipo de lesão que é cirurgia. (84) Esta análise resultou num total de 77 lesões por grupo.

Para a seleção prévia do protocolo de tratamento a ser aplicado para cada paciente, foi feita randomização simples utilizando um algoritmo no programa MATLAB® (The MathWorks, EUA). Durante a triagem dos pacientes, as lesões foram selecionadas para o projeto sem saber qual protocolo seria aplicado, e a determinação do protocolo foi feita de acordo com a sequência desta tabela de randomização.

Foi feito um estudo randomizado controlado, de forma a aplicar aleatoriamente a TFD em cada uma das três modalidades: curetagem seguida da aplicação tópica do creme (GRUPO A), curetagem seguida de aplicação do creme por dermógrafo (GRUPO B) e aplicação do creme por dermógrafo sem a curetagem prévia (GRUPO C); todos os grupos envolveram duas sessões de TFD realizadas no mesmo dia. No GRUPO C, como não houve o processo de curetagem, a lesão foi perfurada três vezes no início do tratamento e duas vezes após a primeira irradiação.

A sequência de procedimentos no protocolo clínico deu-se a partir da assepsia da lesão, coleta de imagem de fluorescência para visualizar a autofluorescência da lesão e tecido epitelial sadio adjacente, seguida da anestesia tópica. Após aguardar 30 minutos, foi realizada a curetagem da lesão (apenas nos grupos A e B). O material colhido na curetagem foi submetido à análise histopatológica para confirmação do diagnóstico clínico. Em seguida foi aplicado o M-ALA conforme a o protocolo do grupo que foi selecionado de forma aleatória. Após 180 minutos da aplicação do precursor, foi feita a irradiação, que ocorreu por 20 minutos e, após o seu término, foi coletada mais uma imagem de fluorescência para posterior análise do consumo do FS. Em seguida, foi reaplicado o M-ALA da mesma forma que no início do tratamento, e após 90 minutos foi feita mais uma coleta de imagem de fluorescência seguida da realização da segunda sessão de TFD. A irradiação, por conseguinte, ocorreu por

mais 20 minutos e, após o seu término, foi coletada mais uma imagem de fluorescência para avaliar o consumo do FS.

Assim como o protocolo já realizado na rotina do ambulatório, após 30 dias do tratamento com TFD foi coletada uma biópsia com *punch* de 2 mm para avaliar a eficiência do tratamento. Após seis meses, foi feita a avaliação clínica para verificar possíveis recidivas.

A proporção de falha do tratamento e a taxa de sobrevida livre de doença foram estimadas usando a análise de sobrevida de Kaplan-Meier. (85) Os tratamentos envolvendo curetagem com aplicação tópica de creme (GRUPO A) ou intradérmica por dermógrafo (GRUPO B), assim como a aplicação intradérmica por dermógrafo sem curetagem prévia (GRUPO C) foram comparados usando análise de tempo-a-evento da probabilidade cumulativa de sobrevida livre de doença, tendo em conta as diferenças no seguimento entre pacientes e sucesso do tratamento. Além disso, o teste de log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para avaliar a significância da divergência entre os protocolos aplicados, sendo consideradas significativas estatisticamente quando o valor de 'p' foi menor que 0,05. Esta análise foi realizada no programa "Statistical Package for the Social Sciences", versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Estudo piloto

As imagens representativas da autofluorescência da lesão e etapas de formação e degradação da PpIX estão ilustradas na Figura 42.

A imagem de luz branca não permite visualizar com clareza a delimitação da lesão que é mais acentuada na imagem de autofluorescência (0 min). Após 90 minutos de incubação, é possível observar que a lesão apresenta intensa fluorescência e que, em 180 minutos, essa fluorescência encontra-se saturada, porém atingindo uma maior extensão ao redor da lesão. Após a primeira sessão de TFD, o sinal de fluorescência fica menos expressivo devido à degradação das moléculas do FS pela ação da luz. Com mais 90 minutos, na segunda incubação, ocorreu um novo aumento na fluorescência vermelha no interior e nas bordas da lesão, que voltou a diminuir após a segunda sessão de TFD.

Figura 42 - M. S. A., homem, 58 anos, CBC nodular localizado na perna direita, com diâmetro médio de 1,6 cm. Sendo, (a) imagem de luz branca de uma das lesões, seguida pela (b) imagem de autofluorescência da lesão coletada antes da curetagem e as imagens de fluorescência ao longo da incubação e tratamento: (c) após 90 minutos, (d) 180 minutos da aplicação do creme por dermógrafo, (e) após primeira sessão de TFD, (f) após 90 minutos da reaplicação do creme com dermógrafo e (g) após segunda sessão de TFD. A seta branca indica a delimitação da lesão (contorno branco na imagem 'b' e 'd') e o contorno preto (imagem 'd') representa a região considerada como borda da lesão.

Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens coletadas das lesões ao longo do procedimento foram processadas com um algoritmo escrito em MATLAB[®] que quantificou a intensidade média de fluorescência na região da lesão e ao redor dela. Estes dados estão expressos na Figura 43.

Figura 43 - Intensidade de fluorescência da PpIX estimada a partir da intensidade média no canal vermelho das imagens de campo amplo de fluorescência na lesão e na borda ao longo das etapas do tratamento. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da média entre as lesões avaliadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

As bordas da lesão sempre apresentaram menor intensidade de fluorescência ao longo das etapas do tratamento. Durante a primeira incubação foi possível verificar que o sinal de

fluorescência em 180 minutos é maior que em 90 minutos, indicando que, na superfície, a aplicação intradérmica por dermógrafo não otimizou o tempo de produção de PpIX.

De acordo com as intensidade de fluorescência das imagens, o acúmulo de PpIX superficial na segunda incubação é similar à produção observada no tempo de 90 minutos da primeira incubação. Isto pode indicar que mesmo após os efeitos da TFD da primeira sessão, ainda há células viáveis remanescentes capazes de produzir PpIX.

Quanto ao protocolo de duas aplicações em visita única do paciente baseado no trabalho de Angarita et al. (81) a realização do tratamento em apenas um dia traz mais conforto e comodidade ao paciente, mesmo que levando mais tempo de tratamento que o convencional, uma vez que o mesmo não precisa se deslocar duas semanas seguidas para o hospital e ainda não há a necessidade de realizar a curetagem da lesão duas vezes.

Após 30 dias da realização do tratamento, o paciente retornou ao ambulatório e foi feita uma biópsia e o resultado do exame foi negativo para a presença de lesão em todos os casos. Seis meses após a data da coleta da biópsia, o paciente retornou ao ambulatório e nenhuma recidiva foi diagnosticada.

Mesmo que o estudo piloto tenha envolvido uma amostra reduzida para análise, os resultados foram encorajadores para que fosse feita a submissão de um projeto clínico no Comitê de Ética (CEP/CONEP).

5.2.2 *Estudo clínico*

Devido ao tempo para a obtenção da aprovação do Comitê de Ética para realização do estudo clínico completo, realizada após avaliação dos resultados dos estudos *in vivo* em animal e do piloto clínico, o tratamento do número de lesões foi ligeiramente menor que o estimado no cálculo amostral proposto. Mesmo sendo um centro de referência para o tratamento de câncer com TFD e, portanto, receber um grande número de pacientes com lesões de pele, diversas dessas lesões não foram selecionadas por não atender aos critérios de inclusão do estudo. Além disso, outros estudos estavam em andamento no ambulatório simultaneamente ao desenvolvimento do estudo, limitando a disponibilidade para o estudo. Portanto, entre o começo do estudo clínico e o fim da elaboração da tese, os protocolos utilizados neste estudo foram aplicados e monitorados para um total de 69 pacientes e 106 lesões.

Através de randomização simples estas lesões foram distribuídas nos três protocolos. Um paciente com uma lesão tratada não retornou após 30 dias do tratamento e cinco lesões

não foram confirmadas como CBC na análise histopatológica do material colhido na curetagem e, portanto, seis lesões foram desconsideradas do estudo. Restando então um total de 65 pacientes e 101 lesões do tipo de CBC nodular. Por fim, 50 lesões foram consideradas para a aplicação tópica de creme com curetagem prévia (GRUPO A), 40 para aplicação intradérmica de creme por dermatógrafo com curetagem prévia (GRUPO B) e 11 para aplicação intradérmica de creme por dermatógrafo sem a curetagem prévia (GRUPO C). Destes pacientes 30 eram mulheres e 35 homens com média de 64 anos para ambos os sexos.

O diâmetro das lesões era medido antes da realização da curetagem e nos casos em que a lesão não era arredondada dois valores eram coletados e a média desses valores era considerada como diâmetro médio da lesão. A localização anatômica das lesões também era registrada, e depois dividida nas macrorregiões: cabeça e pescoço (CP), tronco (T), membro superior (MS) e membro inferior (MI). A distribuição das lesões nas localizações em função dos grupos está expressa na Figura 44.

Figura 44 - Quantidade de lesões em porcentagem em função dos grupos. Sendo as siglas, CP: cabeça e pescoço, T: tronco, MS: membro superior e MI: membro inferior. Sendo, A: aplicação tópica de creme com curetagem prévia, B: aplicação intradérmica de creme por dermatógrafo com curetagem prévia e C: aplicação intradérmica de creme por dermatógrafo sem curetagem prévia.

Fonte: Elaborada pela autora.

Avaliando todas as lesões tratadas, abrangendo todos os diâmetros, para todos os grupos predominou-se a localização de CP, seguido de T, MS e MI, respectivamente. A maior incidência em CP era esperada por ser a região mais exposta ao sol (86-87) e consequentemente mais propícia ao desenvolvimento de câncer de pele.

Definindo resposta parcial (RP) como a situação na qual o resultado histopatológico da biópsia coletada 30 dias após o tratamento detectou presença de CBC, ou seja, ainda restava parte da lesão após a TFD. A resposta completa (RC) representa a porcentagem dos casos que apresentaram ausência de lesão no resultado desta biópsia em relação ao total de lesões que foram tratadas. Os pacientes que tiveram RP após 30 dias do tratamento foram removidos do estudo e um novo tratamento foi prescrito de acordo com a dermatologista responsável que avaliou os casos individualmente e optando por cirurgia ou novas sessões de TFD.

Após seis meses, alguns pacientes não retornaram para avaliação clínica e 16 lesões não puderam ser reavaliadas. Portanto as lesões avaliadas neste período restringem apenas aos pacientes que retornaram e desconsiderando os casos de RP previamente diagnosticados. Nesta avaliação clínica o dermatologista responsável analisou por dermatoscopia a região tratada e detectou se havia a presença de recidiva no local. Em caso positivo, a taxa de recidiva para o protocolo era calculada considerando a porcentagem de recidivas em relação ao total de lesões avaliadas após seis meses. Os resultados de cada grupo, considerando os diâmetros médios das lesões, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados da avaliação de 30 dias e após seis meses da TFD para os grupos tratados, considerando as lesões de todos os diâmetros, sendo A: aplicação tópica de creme com curetagem prévia, B: aplicação intradérmica de creme por dermógrafo com curetagem prévia e C: aplicação intradérmica de creme por dermógrafo sem curetagem prévia. (RP: resposta parcial; RC: resposta completa)

	Total de lesões por grupo	Diâmetro médio (cm)	Total de lesões avaliadas	RP	RC	Total de lesões reavaliadas	Número de recidivas	Taxa de recidiva
				30 dias		Após seis meses		
A	50	0,6 ± 0,3	50	3 (6%)	47 (94%)	42	4	9,52%
B	40	0,7 ± 0,3	40	2 (5%)	38 (95%)	28	0	0%
C	11	0,7 ± 0,3	11	8 (72,73%)	3 (27,27%)	2	2	100%

Fonte: Elaborada pela autora.

A taxa de RC estimada para o GRUPO A na avaliação de 30 dias foi de 94%. Este resultado corrobora com os resultados obtidos por Angarita *et al.*, estudo no qual o protocolo de TFD deste estudo foi baseado. Os autores obtiveram 93,75% de RC após 30 dias do tratamento de 64 CBCs nodulares. (81) Contudo, no nosso estudo, o acompanhamento de seis meses mostrou que a taxa de recidiva para este protocolo foi de 9,52%.

Com o protocolo de aplicação intradérmica do creme por dermógrafo com curetagem prévia (GRUPO B) a taxa de RC em 30 dias foi de 95% e nenhuma recidiva foi detectada após seis meses da TFD. Este fator é uma grande vantagem do procedimento, uma vez que a lesão que teve boa resposta ao tratamento em 30 dias tem menores chances de retornar e,

consequentemente, de o paciente ser submetido outra vez ao tratamento, o que representa vantagem terapêutica e para o sistema de saúde.

Após avaliação dos resultados de 11 lesões, o protocolo do GRUPO C foi interrompido devido à taxa RC insatisfatória e alta taxa de recidiva verificada após seis meses do tratamento. Inicialmente, acreditava-se que o procedimento de curetagem poderia ser substituído pela aplicação intradérmica, mas os resultados mostraram que a associação da curetagem à aplicação do precursor é indispensável para obter RC completa satisfatória no tratamento de lesões espessas, como demonstrado nos estudos publicados por Christensen e Thissen. (88-89)

Para verificar se há relação entre as taxas de RC e de recidivas com o tamanho das lesões foi feita uma separação dos resultados em função do diâmetro. Foram separadas em subgrupos as lesões com diâmetro menores ou igual 0,5 cm; as lesões de diâmetro maiores que 0,5 cm e menores ou iguais a 1 cm; e as lesões maiores que 1 cm e menores ou iguais a 2 cm. Estes dados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados da avaliação de 30 dias e após seis meses da TFD para os grupos tratados, separando as lesões por diâmetro. Sendo, A: aplicação tópica de creme com curetagem prévia, B: aplicação intradérmica de creme por dermógrafo com curetagem prévia e C: aplicação intradérmica de creme por dermógrafo sem curetagem prévia. (RP: resposta parcial; RC: resposta completa)

Total de lesões por grupo	Diâmetro médio (cm)	Total de lesões avaliadas	RP	RC	Total de lesões reavaliadas	Número de recidivas	Taxa de recidiva
			30 dias				
A 23		23	2 (8,7%)	21 (91,30%)	19	2	10,53%
B 16	≤ 0,5	16	0 (0%)	16 (100%)	12	0	0%
C 6		6	5 (83,33%)	16,67%	1	1	100%
A 22		22	1(4,55%)	95,45%	19	1	5,26%
B 23	> 0,5 e ≤ 1,0	23	2 (8,7%)	91,30%	16	0	0%
C 5		5	3 (60%)	2 (40%)	1	1	100%
A 5		5	0 (0%)	5 (100%)	4	1	25%
B 6	> 1,0 e ≤ 2	6	0 (0%)	6 (100%)	4	0	0%
C 0		0	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Para lesões com diâmetro menor ou igual a 0,5 cm, a taxa de RC para o GRUPO B foi maior comparada ao GRUPO A, 100% e 91,3% respectivamente, com nenhuma recidiva observada após seis meses do tratamento. A taxa de RC de 91,30% do GRUPO A pode ser considerada satisfatória, porém, houve 10,53% de taxa de recidiva após seis meses com este protocolo. Estes resultados indicam que a entrega intradérmica favoreceu tanto a RC quando a taxa de recidiva para lesões consideradas pequenas.

Para lesões de diâmetro maiores que 0,5 cm e menores ou iguais a 1 cm, a RC para a aplicação tópica do GRUPO A ainda se mantém satisfatória e apresenta taxa de recidiva de 5,26%. O GRUPO B por sua vez, mantém a taxa de recidiva igual a 0%, sendo 91,3% a taxa de RC.

No caso das lesões maiores que 1 cm e menores ou iguais a 2 cm, o número amostral foi menor comparado às análises anteriores. Desta forma, os resultados obtidos não podem ser considerados representativos.

A Figura 45 contém as curvas de sobrevida livre de doenças geradas com o método de Kaplan-Meier. A data da última informação de cada lesão é considerada como um traço sobreposto na curva de sobrevida. No momento em que há RP (lesão residual diagnosticada 30 após a TFD) ou recidiva detectada ao longo do acompanhamento dos pacientes, a porcentagem de sobrevida livre de doença diminui e um ‘degrau’ pode se observado na curva.

Figura 45 - Curvas de porcentagem de sobrevida livre de doença em função tempo de acompanhamento dos pacientes pelo método de Kaplan-Meier. Sendo, A: aplicação tópica de creme com curetagem prévia, B: aplicação intradérmica de creme por dermógrafo com curetagem prévia e C: aplicação intradérmica de creme por dermógrafo sem curetagem prévia. Os traços na vertical sobrepostos nas curvas de sobrevida representam a data da última informação de cada lesão.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com os resultados gerados, pode-se afirmar que o GRUPO B possui maior eficiência de tratamento em função do tempo, uma vez que a maior parte dos casos tratados permanece livre de doença. A partir do método estatístico de log-rank (Mantel-Cox) foi

possível concluir que há alta diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos avaliados. A Tabela 3 contém os dados gerados pela análise de Kaplan-Meier.

Tabela 3 - Parâmetros da análise da curva de sobrevida livre de doença em função tempo de acompanhamento dos pacientes pelo método de Kaplan-Meier. Sendo, A: aplicação tópica de creme com curetagem prévia, B: aplicação intradérmica de creme por dermógrafo com curetagem prévia e C: aplicação intradérmica de creme por dermógrafo sem curetagem prévia.

Grupos	Total de casos	Lesões residuais ou recidivas	Média de tempo de sobrevida livre de doença (dias)	Desvio Padrão (dias)	Máximo de tempo de acompanhamento (dias)	Média de sobrevida livre de doença (%)
<i>A</i>	50	7	619	40	738	84
<i>B</i>	40	2	560	22	591	95
<i>C</i>	11	10	222	82	700	32

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 46 possui imagens de lesões tratadas com os três protocolos propostos no estudo. A primeira coluna apresenta fotos realizadas antes do procedimento de curetagem, a segunda coluna ilustra o aspecto das regiões 30 dias após a TFD e a terceira coluna reúne imagens feitas com mais de seis meses após o tratamento.

No caso apresentado com o índice ‘a’, a lesão foi selecionada para ser tratada com o protocolo do GRUPO A. Após 30 dias (‘a2’) é possível observar hipocromia local e este aspecto se mantém na imagem coletada oito meses após a realização da TFD (‘a3’). O paciente tratado possui diversas marcas de cirurgias próximas à região tratada com TFD, tornando nítida a diferença na resposta estética entre os procedimentos.

Para o caso apresentado com o índice ‘b’, a lesão foi selecionada para ser tratada com o protocolo do GRUPO B e apresentou resultado semelhante ao caso anterior, com menor diferença na coloração após dez meses da TFD (‘b3’). O efeito temporário de hiperpigmentação ou hipocromia na região tratada são reações comumente observadas após tratamento com TFD tópico. (90)

A sequência apresentada com o índice ‘c’ refere-se a uma lesão selecionada para ser tratada com o protocolo do GRUPO C. Na imagem ‘c2’, após 30 dias da TFD foi detectada lesão residual no exame histopatológico embora não apresentasse lesão clínica visível, o paciente foi encaminhado para a cirurgia e na imagem ‘c3’ pode ser observada a cicatriz do procedimento cirúrgico.

Figura 46 - a) H. D. Z, homem, 52 anos, tratado com o protocolo de aplicação tópica de creme com curetagem prévia (GRUPO A), sendo: a1) CBC nodular de 0,5 cm de diâmetro médio localizado no trapézio esquerdo, a2) aspecto da região após 30 dias a TFD; a3) aspecto da região após oito meses após a TFD. b) L. S. S, mulher, 90 anos, tratada com o protocolo de aplicação intradérmica de creme por dermógrafo com curetagem prévia (GRUPO B) sendo: b1) CBC nodular de 0,6 cm de diâmetro médio localizado na região malar direita, b2) aspecto da região após 30 dias a TFD; b3) aspecto da região após dez meses após a TFD. c) A. H, homem, 80 anos, tratado com o protocolo de aplicação intradérmica de creme por dermógrafo sem curetagem prévia (GRUPO C) sendo: c1) CBC nodular de 0,8 cm de diâmetro médio localizado na região malar direita, c2) aspecto da região após 30 dias a TFD com diagnóstico histopatológico de CBC residual; c3) aspecto da região após realização da cirurgia. O círculo preto nas imagens com índice '2' refere-se à posição na qual a lesão era localizada antes do tratamento e as setas pretas nas imagens com índice '3' apontam a região tratada avaliada após seis meses da TFD.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 Conclusões do capítulo

Esta etapa do estudo tratou de uma investigação clínica do uso do dermógrafo, um equipamento de produção nacional, com baixo custo e simples manuseio, baseada nos resultados obtidos *in vivo*.

Com base na informação da fluorescência de campo amplo, o teste piloto demonstrou que o acúmulo de PpIX no tempo de 3 horas foi maior tanto nas bordas quanto no centro da lesão.

Os resultados dos tratamentos demonstraram-se promissores para o aperfeiçoamento da TFD no tratamento de lesões epiteliais.

O estudo foi conduzido utilizando três protocolos distintos, o grupo que utilizava o dermógrafo para administração do creme sem curetagem prévia, demonstrou resultado de tratamento insatisfatório e precisou ser interrompido, evidenciando a necessidade da curetagem das lesões para boa eficiência do procedimento da TFD. Nos demais grupos, a taxas de RC foram todas acima de 90%, utilizando ou não dermógrafo após a curetagem.

Para o uso do dermógrafo, lesões de até 0,5 cm tiveram 100% de RC e lesões entre 0,5 e 1,0 cm tiveram 91,30%, ambos sem recidiva, enquanto a aplicação do creme via tópica apresentou recidivas para lesões até 1,0 cm. Para lesões maiores de 1 cm, as duas técnicas com curetagem tiveram 100% de RC, mas houve casos de recidivas apenas para o protocolo com aplicação de creme sem dermógrafo.

As taxas nulas de recidiva, com excelentes taxas de RC, mostram que o dermógrafo em todos os casos contribuiu positivamente com o tratamento das lesões por TFD.

Além disso, a análise de Kaplan-Meier mostrou diferenças significativas entre a aplicação dos métodos ($p < 0,005$) e demonstrou novamente que a aplicação do creme por dermógrafo é a metodologia mais eficiente de tratamento em longo prazo, diminuindo os eventos de recidivas nos pacientes e desta forma favorecendo sua qualidade de vida e a aplicação da TFD no sistema de saúde.

6 MICROAGULHAS DISSOLVÍVEIS: EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Durante o desenvolvimento da presente tese doutorado, foi realizado um período de sanduíche de quatro meses fomentado pelo Programa Institucional de Doutorado-sanduíche no Exterior (PDSE) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Processo: 88881.132995/2016-01. A tese durante esse período esteve sob co-supervisão do Prof. Dr. Ryan F. Donnelly na *Queen's University of Belfast* na cidade de Belfast, na Irlanda do Norte. O professor Donnelly é pioneiro no desenvolvimento de bioadesivos e microagulhas poliméricas para entrega de fármacos em TFD e possui um extenso currículo de publicações na área (68,69,91–98). Este período permitiu a adequação da técnica de fabricação de microagulhas poliméricas para a incorporação de ALA e M-ALA no modelo de microagulhas dissolvíveis, o que possibilitou concluir o estudo desenvolvido aplicando as microagulhas em modelo tumoral animal no retorno ao Brasil.

6.1 Material e métodos

6.1.1 Formulação

Duas variações do precursor de PpIX (ALA e M-ALA) foram utilizadas para a fabricação das microagulhas dissolvíveis. Os insumos de ALA e M-ALA foram adquiridos da empresa brasileira PDT Pharma LTDA (Cravinhos, SP, Brasil).

A base utilizada nas microagulhas dissolvíveis é vendida comercialmente sob marca registrada genérica Gantrez, um copolímero de metil vinil éter e anidrido maleico e suas formas derivadas. As moléculas são biodegradáveis, possuem baixa toxicidade, alta biocompatibilidade e propriedades bioadesivas. (99-100) Com o objetivo de avaliar qual polímero proveria melhor desempenho mecânico, foram avaliadas formulações contendo de 20% de Gantrez AN-139 ou Gantrez S-97 dissolvidos em água, seguindo a preparação descrita na literatura. (101-102)

O pó do precursor de PpIX foi dissolvido nas concentrações de 2,5%, 5%, 10% e 20% em massa na base polimérica, e após a formulação ser misturada em temperatura ambiente, foi centrifugada a 1500 RPM por 15 minutos para homogeneização.

6.1.2 Molde e arranjo de microagulhas

Para fabricação das microagulhas, foram utilizados moldes de silicone com um arranjo denso de 361 furos em formato de pirâmides distribuídos em 19 linhas e 19 colunas. A Figura 47 ilustra o molde e uma micrografia dos furos que o compõe. A formulação foi colocada manualmente utilizando em uma seringa de 1 mL. O volume aproximado de 100 μ L foi depositado sob o molde e a respectiva massa sempre era mensurada.

Figura 47 - a) Molde de silicone usado para fazer os arranjos de microagulhas e b) micrografia do molde ilustrando os furos e distância entre eles. A barra no canto inferior direito representa a escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após deposição da formulação nos moldes, a fim de diminuir a quantidade de bolhas e preencher os orifícios, foi utilizado um galão pressurizado (Airprowu[®], Airpro Industry Corp., New Taipei City, Taiwan). O molde com a formulação era posicionado no galão, a pressão era elevada para 4 bar e mantida por 5 minutos; após despressurização lenta, esse processo era repetido mais uma vez. Em seguida, os moldes com a formulação permaneciam na bancada em temperatura ambiente por 48 horas para secagem.

Depois de retirado do molde, o arranjo de microagulhas tem a aparência ilustrada na Figura 48.

Figura 48 - Foto de um arranjo de microagulhas com representação das dimensões de uma microagulha isolada. Sendo x o comprimento no qual as 19 microagulhas estão distribuídas, d a distância entre elas, h_0 a altura e l a largura da base.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com o fabricante, as 19 microagulhas estão distribuídas em 6,5 mm (x), tem altura média (h_0) de aproximadamente 500 μm , espaçamento (d) de 50 μm entre elas, sendo l a largura da base da microagulha de 300 μm . A equação (10) representa o cálculo do volume total V_T das microagulhas, ou seja, desconsiderando a formulação da base ao redor, uma vez que esse formato é variável para cada arranjo por depender da deposição da formulação sob o molde antes do processo de secagem.

$$V_T = 361 \left(\frac{l^2 h_0}{3} \right) \quad (10)$$

6.1.3 Quantidade de precursor nas microagulhas

Para calcular a quantidade de precursor nas microagulhas e, assim, estimar o quanto de precursor de fato terá contato com a pele com a inserção do arranjo, é preciso calcular a densidade do precursor na formulação.

Considerando a concentração inicial de precursor de 5%, foram feitos quatro filmes para cada formulação contendo ALA ou M-ALA na mistura de Gantrez AN-139 e água. A formulação foi depositada em um molde de silicone de superfície lisa, como ilustrado na Figura 49. Após centrifugação a 1500 RPM por 15 minutos, os filmes permaneceram nos moldes por 48 horas em temperatura ambiente para secagem.

Figura 49 - Molde de silicone com superfície lisa para formação do filme e filme após secagem e remoção do molde.

Fonte: Elaborada pela autora.

Depois da retirada do molde, foi feito o corte das bordas utilizando uma lâmina de bisturi aquecida. As espessuras das laterais (z) foram estimadas a partir das imagens

registradas usando um microscópio digital Leica EZ4D (Leica Microsystems, Milton Keynes, Reino Unido). Com o mesmo microscópio também foram coletadas imagens da superfície do filme e as respectivas áreas (A) foram medidas utilizando o programa ImageJ[®]. Os valores médios foram estimados considerando cinco medidas de espessura e três medidas de área para cada filme. Então, a densidade da formulação após a secagem (D) foi calculada a partir da equação (11), sendo m_f a massa total do filme do após a secagem.

$$D = \frac{m_f}{Az} \quad (11)$$

Como neste experimento foi preciso cortar as bordas dos filmes produzidos, a medida de massa da formulação depositada para confeccionar o filme antes do processo de secagem não pode ser considerada para comparação com a massa total do filme após a secagem.

A fim de estimar de quanto é a perda de água característica da formulação produzida devido ao processo de secagem, foram confeccionados três lotes com 10 microagulhas em cada, tanto para ALA quanto M-ALA na concentração de 5%. Cada arranjo de microagulhas foi pesado tanto antes (m_0) quanto depois (m_f) do processo de secagem. A equação (12) refere-se ao cálculo da redução média de água ($\%H_2O$) característica da formulação. Definindo a concentração inicial do precursor na formulação como ' C_0 ', a correção da concentração é dada pela equação (13), sendo ' C_f ' a concentração final do precursor após secagem.

$$\%H_2O = \left(\frac{m_0 - m_f}{m_f} \right) 100 \quad (12)$$

$$C_f = \frac{C_0}{100 - \%H_2O} \quad (13)$$

Sabendo o volume total das microagulhas que compõe o arranjo (V_T) e a densidade da formulação após a secagem (D), foi possível estimar qual a massa total da formulação está compreendida apenas nas microagulhas (m_T) do arranjo a partir da equação (14). A equação (15), portanto, permite calcular a massa total do precursor (M) nas microagulhas do arranjo.

$$m_T = DV_T \quad (14)$$

$$M = m_T C_f \quad (15)$$

6.1.4 Teste de estabilidade

Para o teste de estabilidade, as microagulhas foram colocadas em uma estufa programada para 37 °C e 40% de umidade. Um dos lotes ficou por três semanas e outro por quatro semanas. Foram testados microagulhas de ALA e M-ALA, um lote de quatro microagulhas foi armazenado e vedado em embalagem de alumínio enquanto outro lote foi armazenado exposto, como mostra a Figura 50. A avaliação deu-se por observação de estrutura e coloração.

Figura 50 - a) Imagem de um arranjo de microagulhas a ser depositado em um recipiente aberto e b) embalagem de alumínio lacrada para teste de estabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

6.1.5 Teste de compressão

Para avaliação da resistência mecânica das microagulhas, foi utilizado um equipamento para compressão controlada (Stable Micro Systems[®], Surrey, Reino Unido). Para compressão, cada microagulha foi acoplada em uma haste metálica (área de 1 cm²), pressionada por 30 segundos com uma força de 32 N, seguindo protocolo já publicado na literatura. (103) Cada lado da microagulha teve sua imagem registrada pelo microscópio digital Leica EZ4D (Leica Microsystems, Milton Keynes, Reino Unido) com uso dois filtros polarizadores. Cinco pirâmides aleatórias de cada uma das quatro laterais foram medidas

antes (h_0) e depois (h_f) da compressão para estimar a altura média das microagulhas. Este experimento foi replicado para quatro arranjos de microagulhas.

6.1.6 *Teste de inserção e dissolução*

O modelo de membrana *in vitro* proposto por Larrañeta *et al.* foi aplicado para simular a inserção das microagulhas na pele. (103) Este modelo mostrou-se tão representativo quanto modelo *in vitro* comercial utilizado para avaliação de penetração e o modelo de pele porco neonatal *in vitro*. No modelo de Larrañeta, oito camadas de um filme polimérico comercial (Parafilm M[®], Bemis Company, Inc, EUA) composto de uma mistura de poliolefina e cera de parafina foram empilhadas para formar uma película de aproximadamente 1 mm de espessura.

No teste de inserção, as microagulhas foram pressionadas sobre a película montada com Parafilm[®], e depois disso, cada camada foi separada e observada no microcópio. Desta forma, foi possível quantificar a porcentagem média de furos em cada camada e assim, estimar a penetração que a microagulhas teriam ao serem inseridas na pele.

Após o teste em modelo artificial, foi feita a aplicação em modelo *in vitro* em pele de porco neonato, considerada um bom modelo para simular as propriedades ópticas e físicas da pele humana. (104) A pele do animal (aproximadamente 0,5 mm) foi removida com menos de 24 horas após o nascimento, imediatamente embrulhada em papel alumínio e então mantida a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do experimento. Após descongelamento, os pelos foram removidos com lâmina e soro fisiológico. Após aplicação dos arranjos de microagulhas, o experimento deveria ser conduzido em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada arranjo seria retirado após intervalos determinados de tempo (5, 15, 30, 60 minutos) e então avaliados no microscópio, a fim de estimar a dissolução no tecido em função do tempo.

6.1.7 *Modelo animal – tumoral*

Com base nos resultados de caracterização das microagulhas nos quais a formulação final possui uma concentração reduzida de precursor comparada aos cremes comerciais utilizados, associados aos relatos na literatura de que a molécula de ALA tem sido associada a uma maior formação de PpIX quando comparada à sua forma metilada (utilizada quando se espera maior penetração na pele), (105) optou-se pela aplicação de microagulhas contendo ALA nos testes em modelo animal.

A comparação da aplicação das microagulhas foi feita com a aplicação tópica de um volume aproximado de 30 UI de creme de ALA na concentração de 5%, utilizando uma seringa para insulina sem agulha de 1 mL, o que correspondeu a uma massa de aproximadamente 75,7 mg de creme e, portanto, 3,79 mg de precursor.

O modelo tumoral utilizado foi o mesmo descrito na sessão 4.1.9, seguindo mesmo protocolo de indução, com tumores de volume médio de $26 \pm 2 \text{ mm}^3$. Foram repetidas as medidas de fluorescência superficial por espectroscopia e imagem, microscopia confocal de fluorescência, realização de TFD e preparo de lâminas histológicas, conforme previamente descrito nas sessões 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5 e 4.1.6, respectivamente.

O arranjo de microagulhas foi posicionado em uma fita adesiva a prova de água (First Aid[®], Nexcare, 3M, EUA) para aplicação no tumor, em seguida uma fita porosa para curativo (Micropore[®], 3M, EUA) foi sobreposta para garantir fixação do curativo que continha o arranjo (Figura 51a).

Após um teste piloto, foi possível detectar que as microagulhas não apresentavam eficiência de dissolução aceitável após 1 hora em contato com tumor. A fim de melhorar este processo e aperfeiçoar a entrega do precursor, foi feito um aquecimento local por 15 minutos, a uma temperatura de 40 °C com o equipamento comercial (Derma Cool DC[®], Dermius, Brasil), conforme ilustrado na Figura 51b.

Figura 51 - a) Microagulha aderida na fita adesiva para aplicação e coberta com fita adesiva branca de curativo para fixação no animal, b) posicionamento do equipamento para aquecimento local por 15 minutos à 40°C após aplicação da microagulha.

Fonte: Elaborada pela autora.

6.2 Resultados e discussão

6.2.1 Caracterização das microagulhas

As primeiras microagulhas foram feitas utilizando o polímero Gantrez AN-139 na concentração de 20%.

A formulação atual do creme com ALA ou M-ALA aplicado para o tratamento de câncer de pele com TFD no Brasil possui concentração de 20% em massa do precursor. A fim de comparar o efeito deste creme com a entrega pelas microagulhas dissolvíveis, os primeiros testes foram feitos contendo 20% de concentração de precursor de PpIX. Entretanto, mesmo após 10 dias as microagulhas não haviam secado e não era possível removê-las do molde, como pode ser observado na Figura 52a. Foi feita a redução para a concentração de 10% e, após quatro dias, foi possível remover o arranjo do molde, porém, a o mesmo era muito flexível e não apresentava rigidez suficiente para perfuração (Figura 52b). Por fim, foi testada a formulação com 5% de concentração e desta vez, com 48 horas de secagem, foi possível obter um arranjo rígido o suficiente para manipulação (Figura 52c).

Figura 52 - Microagulhas preparadas com Gantrez AN-139 com concentração de a) 20%, b) 10% e c) 5% de M-ALA.

Fonte: Elaborada pela autora.

O mesmo comportamento foi observado para microagulhas preparadas com ALA. A estabilidade da molécula de ALA em solução aquosa é descrita na literatura como sensível a pH, concentração, temperatura e grau de oxigenação da solução. (93) O pH da base polimérica contendo 20% de Gantrez AN-139 em água é de 1,85 enquanto para a base de Gantrez S-97 a 20% é de 2. Novo *et al.* (106) relataram que a solução de ALA em água destilada na concentração de 0,3M (aproximadamente 3,9% em massa) em pH igual a 2 é estável em diversas condições de armazenamento, portanto, é possível supor que o uso de altas concentrações das formulações testadas para as microagulhas (10 e 20% em massa) seja o que dificultou o processo de secagem.

A Figura 53a ilustra a aparência do arranjo de microagulhas e o aumento utilizado na Figura 53b permite a visualização das microagulhas com definição para verificação do formato piramidal.

Figura 53 - a) Visão microscópica do arranjo de microagulhas e b) micrografia com aumento para visualização do formato piramidal das microagulhas. A barra do canto inferior direito representa escala de 1 mm. Fonte: Elaborada pela autora.

Para verificar qual combinação teria melhor desempenho mecânico, também foram confeccionadas microagulhas com a base de 20% de Gantrez S-97. Além disso, também foi testada uma formulação contendo M-ALA com concentração de 2,5%. A Figura 54 mostra o tamanho médio das microagulhas antes e após a compressão. Este teste foi replicado com quatro microagulhas por formulação.

Figura 54 - Altura média das microagulhas antes e após compressão por 30 segundos com força de 32 N em função da concentração M-ALA nas formulações contendo 20% de Gantrez S-97 ou 20% de Gantrez AN-139

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a concentração de 2,5% de M-ALA, não houve diferença significativa em relação ao tamanho das microagulhas entre as bases poliméricas utilizadas. Visando a maior entrega possível de precursor, optou-se então pela concentração de 5%. Considerando a menor interferência no tamanho da microagulha após a compressão, foi selecionada a base de Gantrez AN-139 para incorporação, com diminuição de 5,69% enquanto a base de Gantrez S-97 teve redução de 25,73% na altura das microagulhas. A maior resistência observada para a formulação contendo 20% de Gantrez concorda com os resultados obtidos por Donnelly *et al.* que avaliou microagulhas com a mesma concentração de polímero e demonstrou desempenho superior às produzidas a partir de polímeros farmacêuticos comumente usados. (107)

Para o teste de estabilidade, portanto, foram fabricados quatro arranjos de microagulhas com cada precursor com 5% de concentração, 20% de Gantrez AN-139 e água. Algumas imagens representativas dos resultados para os arranjos contendo M-ALA estão representados na Figura 55.

Foi possível observar que as microagulhas de M-ALA se mantiveram íntegras apenas quando colocadas em embalagem fechada, e mesmo assim sua coloração se tornou amarelada. Esta alteração de cor se intensificou após quatro semanas, independente da forma de armazenamento. A coloração amarela observada nos testes de estabilidades pode ser relacionada com os produtos de degradação e oxidação. (108)

Figura 55 - Micrografia dos arranjos de microagulhas de M-ALA após teste de estabilidade a 37 °C e 40% de umidade nas (a,c) embalagens de alumínio lacradas ou (b,d) em recipiente aberto, por (a,b) três e (b,d) quatro semanas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Já para a formulação contendo ALA, conforme observado na Figura 56, quando em embalagem fechada, as microagulhas também mantiveram sua estrutura, enquanto se dissolveram completamente quando expostas à atmosfera da estufa em recipiente aberto. Em

comparação à formulação contendo M-ALA, os arranjos com ALA sempre apresentaram coloração mais amarelada quando preservadas nas mesmas condições.

Figura 56 - Micrografia dos arranjos de microagulhas de ALA após teste de estabilidade a 37 °C e 40% de umidade nas (a,c) embalagens de alumínio lacradas ou (b,d) em recipiente aberto, por (a,b) três e (b,d) quatro semanas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após os resultados do teste de estabilidade, todos os arranjos de microagulhas preparados foram mantidos em embalagem fechada e em geladeira após o processo de secagem até o momento de realização dos experimentos.

A Figura 57 ilustra os filmes nos quais foram feitas as medidas de área e espessura para determinação da densidade de precursor na formulação, após o processo de secagem e a estimativa da quantidade de precursor nas microagulhas.

Figura 57 - a) Filme após corte das bordas e b) imagem microscópica da lateral do filme para estimativa da largura. A barra do canto inferior direito representa escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

A densidade calculada para a formulação contendo M-ALA após o processo de secagem foi de aproximadamente 1,28 mg/mm³ enquanto para a formulação com ALA foi de 1,47 mg/mm³. De acordo com a equação (10), o volume teórico das microagulhas que compõem o arranjo é 5,415 mm³. Considerando a densidade da formulação estimada e o

volume teórico total das microagulhas, a massa da formulação nas microagulhas é de aproximadamente 6,93 mg para a composição com M-ALA e 7,96 mg para a formulação contendo ALA.

Considerando dez arranjos de cada precursor para cada lote, foi feita a estimativa de perda de água característica das formulações e os resultados estão expressos na Figura 58.

Figura 58 - Porcentagem de redução de água após 48 horas de secagem, considerando três lotes com 10 arranjos de microagulhas em cada, para as formulações contendo 5% de ALA e 5% de M-ALA.

Fonte: Elaborada pela autora.

A porcentagem de redução de água entre os lotes e entre as formulações não teve variações significativas, sendo aproximadamente 70,7% o resultado médio para M-ALA e 70,6% para ALA.

Considerando os valores médios de perda de água, é possível estimar que a concentração final para ambos os precursores no arranjo de microagulhas após o processo de secagem é de 17%. Comparando com a massa da formulação nas microagulhas, pode-se afirmar que a massa aproximada de precursores nas microagulhas é de 1,18 mg para a que é composta de M-ALA e 1,35 mg para a que contém ALA.

Para estimar alterações no tamanho das microagulhas após compressão, foi conduzido o teste de compressão com os arranjos de microagulhas controle (apenas polímero e água) e arranjos contendo ALA e M-ALA. A Figura 59 ilustra como o arranjo foi posicionado para que as laterais fossem observadas, no próprio microscópio cinco microagulhas eram mensuradas antes e após a compressão.

Figura 59 - a) Arranjo posicionado para coleta de imagem no microscópio para visualização do tamanho das pirâmides., imagem de um dos lados do arranjo b) antes e c) depois da compressão. A barra de escala no canto inferior direito representa escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

A altura média para cada formulação foi quantificada e estes dados estão expressos na Figura 60. Os arranjos controle apresentaram maior deformação, aproximadamente 2%, sem diferença estatística. Não houve diferença significativa entre a formulação contendo ALA e M-ALA.

Figura 60 - Altura média das microagulhas antes e após compressão por 30 segundos com força de 32 N com formulação contendo 20% de Gantrez AN-139, 5% de ALA ou M-ALA em 20% de Gantrez AN-139.

Fonte: Elaborada pela autora.

Durante o teste de compressão, os arranjos foram posicionados nas camadas de Parafilm® para avaliação da capacidade de inserção de cada formulação. Imagens da montagem e das primeiras camadas perfuradas estão ilustradas na Figura 61.

Figura 61 - a) Modelo de membrana artificial para avaliação da penetração das microagulhas com oito camadas de Parafilm®, exemplo de furos na b) primeira, c) segunda, d) terceira e e) quarta camada. A barra no canto inferior a direita representa escala de 2 mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

A porcentagem de furos observados em cada camada foi estimada a partir das imagens coletadas e os resultados estão na Figura 62.

Figura 62 - Porcentagem de furos causados pelas microagulhas nas de Parafilm® em função da profundidade e quantidade de camadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

As microagulhas contendo 5% de ALA e de M-ALA tiveram um melhor desempenho comparado à formulação controle, o que concorda com o teste de compressão, sendo um indicativo de que os precursores de alguma forma contribuíram para melhor resistência das microagulhas. Aproximadamente 80% das microagulhas de ALA e M-ALA penetraram até 250 μm de profundidade.

Um estudo publicado em 2018 considerou diferentes regiões do corpo humano e estimou a espessura média da epiderme por histometria. Os resultados foram uma variação de 76,9 a 267,4 μm para mulheres e 112,4 a 244,8 μm para homens. (109) Considerando estes valores, a penetração das microagulhas estimada no teste de permeação seria suficiente para fazer a entrega intradérmica dos precursores em pacientes.

Para camundongos fêmeas do tipo *nude* de aproximadamente oito semanas, o valor estimado por histologia da espessura da epiderme junto com a derme é de aproximadamente 225 μm . (110) Contudo, como a aplicação da microagulha nos experimentos *in vivo* será no modelo tumoral induzido intradermicamente, a espessura a ser considerada é maior e, portanto, não há a possibilidade de perfuração da camada de gordura ou músculo do animal com as microagulhas.

Com o teste de permeação no modelo *in vitro* em pele de porco neonato, após 5 minutos da aplicação dos arranjos de microagulhas, ou seja, antes que o experimento pudesse ser conduzido para a estufa, foi possível observar que já havia ocorrido a dissolução, como observado na Figura 63.

Figura 63 - Teste *in vitro* em pele de porco neonato para estimar o tempo de dissolução das microagulhas a) após a aplicação manual por 30 segundos e apoio de peças metálicas para manter pressionada e b) após 5 minutos da dissolução.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 64 apresenta as micrografias dos arranjos após a dissolução. Tanto para os arranjos contendo ALA quanto M-ALA não foi possível estimar a altura das microagulhas, devido à intensa dissolução observada.

Figura 64 - Micrografias dos arranjos de microagulhas de (a,b,c,d) ALA e (e,f,g,h) M-ALA após o teste de dissolução *in vitro* em pele de porco neonato.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 4 resume os parâmetros calculados para as duas formulações caracterizadas. As principais diferenças foram observadas em relação a densidade da formulação e consequentemente, na massa do precursor que está de fato nas microagulhas. Considerando estes valores, o arranjo de microagulhas contendo ALA possui 12,6% a mais de massa de precursor comparado ao com M-ALA na mesma concentração.

Tabela 4 - Parâmetros calculados para os arranjos de microagulhas e formulações contendo ALA e M-ALA na concentração de 5%.

Parâmetro	Sigla	Teórico	Experimental
<i>Volume total das microagulhas (mm³)</i>	V_T	5,415	$5,054 \pm 0,002$
<i>Altura das microagulhas (mm)</i>	h_0	0,5	$0,493 \pm 0,007$
		M-ALA	ALA
<i>Redução de H₂O da formulação (%)</i>	%H ₂ O	$70,7 \pm 0,4$	$70,6 \pm 0,4$
<i>Concentração inicial do precursor na formulação</i>	C_0	5%	5%
<i>Concentração do precursor na formulação após secagem</i>	C_f	17%	17%
<i>Densidade (mg/mm³)</i>	D	$1,28 \pm 0,06$	$1,47 \pm 0,05$
<i>Massa total nas microagulhas (mg)</i>	m_{Tp}	6,93	7,96
<i>Massa do precursor nas microagulhas (mg)</i>	M	1,18	1,35
<i>Altura média das microagulhas antes da compressão (μm)</i>	h_0	502 ± 7	502 ± 6
<i>Altura média das microagulhas após compressão (μm)</i>	h_f	504 ± 7	500 ± 8

Fonte: Elaborada pela autora.

Os arranjos de microagulhas na concentração de 5% foram caracterizados e apresentaram boa resistência mecânica, com diminuição desprezível da altura após a

compressão. Cerca de 80% da microagulhas penetraram até 250 μm , profundidade suficiente para a entrega intradérmica do precursor. O tempo de dissolução observado no estudo *in vitro* foi de aproximadamente 5 minutos.

Portanto, estes resultados de caracterização demonstram a viabilidade de exploração segura e confiável da entrega de precursor por microagulhas e da avaliação da produção de PpIX após liberação em modelo *in vivo* tumoral.

6.2.2 Modelo animal – tumoral

No estudo piloto em modelo tumoral, mesmo após uma hora de inserção no tecido, as microagulhas não apresentavam dissolução significativa, ou seja, continuavam praticamente com o mesmo tamanho após 1 hora de incubação no tumor. Por isso, optou-se pelo aquecimento local após a aplicação das microagulhas para estimular a dissolução. A Figura 65 ilustra o aspecto característico de uma microagulha após 1 hora em contato com o tumor, tendo sido aquecida nos primeiros 15 minutos a aproximadamente 40 °C.

Figura 65 - Microscopia confocal de fluorescência de um arranjo de microagulhas após 1 hora de dissolução no modelo tumoral animal. A barra no canto inferior a direita representa escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Desta forma, foi possível promover uma maior dissolução comparada ao protocolo sem aquecimento local. Contudo, apesar disso não foi possível obter total dissolução das microagulhas. Entretanto, considerando que o tempo de incubação total no animal foi de 1 hora, para que fosse possível a comparação com os resultados obtidos para a aplicação intradérmica com dermógrafo, optou-se por não prolongar o aquecimento e avaliar a formação de PpIX nestas condições.

A Figura 66 possui alguns espectros médios da intensidade de fluorescência antes e depois da aplicação do creme e da microagulha, tanto na pele quanto no tumor. Assim como

para os espectros coletados nos experimentos em que foi avaliada a aplicação do creme por dermógrafo, foi possível observar variações de intensidade na porção do espectro que se refere às características da pele (aproximadamente 510 nm). Portanto, a mesma normalização foi utilizada para avaliar a intensidade de fluorescência relacionada ao acúmulo de PpIX.

Figura 66 - Espectros médios da intensidade de fluorescência para aplicação do a) creme e b) microagulha, considerando autofluorescência e fluorescência após 1 hora de incubação na região do tumor fotossensibilizado e no tecido sadio sem fotossensibilização.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 67 possui espectros médios de um dos animais após a normalização. Antes da normalização, a intensidade de fluorescência da pele na região de 510 nm era mais intensa comparada ao tumor. Após a normalização, esta diferença não é mais observada, tornando mais evidente as diferenças no pico em 635 nm.

Figura 67 - Espectros médios da intensidade de fluorescência normalizados para aplicação do a) creme e b) microagulha, considerando autofluorescência e fluorescência após 1 hora de incubação na região do tumor fotossensibilizado e no tecido sadio sem fotossensibilização.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores da intensidade média de fluorescência normalizada no pico de 635 nm após 1 hora de incubação estão na Figura 68. De acordo com os resultados obtidos, a intensidade média de fluorescência após 1 hora da aplicação da microagulha é aproximadamente 2,3 vezes maior que com o uso do creme.

Figura 68 - a) Gráfico do tipo *boxplot* dos valores médio da intensidade de fluorescência normalizada no comprimento de onda de 635 nm referente aos espectros coletados no tumor 1 hora após a aplicação ALA via creme ou via microagulha. b) gráfico em coluna do valor médio e desvio padrão da intensidade de fluorescência normalizada considerando todos os animais.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 69 apresenta imagens representativas ilustrando a fluorescência endógena do tumor, fluorescência após 1 hora de incubação e após a irradiação.

As imagens de fluorescência de campo amplo mostraram que a distribuição do FS foi mais localizada quando utilizada a microagulha (Figura 69b). O motivo pode estar relacionado com o fato que a espessura do tumor (e, portanto, a distância entre a superfície perfurada do tumor e a da pele sadia adjacente) era maior que o comprimento das microagulhas (comprimento h_0 , Figura 48) e, portanto, após a aplicação do arranjo, as microagulhas não necessariamente entravam em contato com a pele ao redor do tumor, mas apenas com o tecido da própria lesão. As microagulhas contendo apenas a base polimérica, ou seja, sem ALA, não apresentaram fluorescência na região do vermelho após a incubação, como era esperado.

Figura 69 - Imagens de campo amplo de fluorescência coletadas antes da aplicação do precursor (autofluorescência endógena do tumor e pele ao redor), 1 hora após a aplicação do precursor e após a irradiação da TFD; sendo a) aplicação tópica do ALA creme, b) aplicação intradérmica do ALA por microagulhas dissolvíveis, c) aplicação intradérmica de microagulhas dissolvíveis sem precursor.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 70 apresenta os resultados do processamento das imagens de campo amplo de fluorescência, e partir desta análise não houve diferença significativa entre os protocolos.

Figura 70 - a) Gráfico do tipo *boxplot* dos valores médio da intensidade no canal vermelho das imagens de fluorescência de campo coletadas no tumor 1 hora após aplicação ALA via creme ou via microagulha. b) valor médio e desvio padrão da intensidade no canal vermelho das imagens de fluorescência de campo coletadas considerando todos os animais, nas mesmas condições em 1 hora de incubação e autofluorescência.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 71 estão imagens para ilustrar a fluorescência do canal vermelho características das condições com o ALA aplicado via tópica por creme e via intradérmica por microagulhas dissolvíveis. As imagens de fluorescência estão sobrepostas pelas imagens da microscopia de transmissão para facilitar a visualização das regiões do tumor.

Figura 71 - Imagens representativas da microscopia confocal de fluorescência no canal vermelho com sobreposição da imagem de transmissão para os tumores, sendo a) tumor após 1 hora da aplicação de creme via tópica de ALA na concentração de 5%; b) tumor após 1 hora da aplicação via intradérmica por microagulhas dissolvíveis contendo ALA na concentração de 5%. A barra no canto superior direito corresponde à escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com as imagens, não é possível observar diferenças na intensidade de fluorescência na epiderme. Porém, para a condição em que o ALA foi entregue por microagulhas, é nítida a maior presença do sinal de fluorescência em camadas mais profundas, ou seja, o precursor foi entregue em maiores profundidades, e permitiu que a produção e distribuição do FS fossem mais profundas comparadas à aplicação tópica.

Após o processamento das imagens de fluorescência no canal vermelho, foi possível quantificar a intensidade média de fluorescência em função da profundidade e a Figura 72 contém os resultados obtidos, considerando de profundidade de até 1 mm.

Figura 72 - Intensidade média no canal vermelho das imagens de microscopia confocal de fluorescência em função da distância, para tumores sem sensibilização (controle) e tumores após 1 hora da aplicação de ALA na concentração de 5% com aplicação via tópica por creme ou via intradérmica por microagulha dissolvível. O valor da área para cada aplicação foi calculado pelo programa Origin e está relacionado com a integral dos valores em função da profundidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

Até aproximadamente 200 μm não foi observada diferença significativa na intensidade de fluorescência entre as aplicações (exceto controle). Porém, a partir desta profundidade, no protocolo envolvendo a aplicação intradérmica por microagulha, a intensidade de fluorescência sempre é maior que a aplicação tópica. O integral dos valores em função da profundidade da Figura 72 foi calculado, considerando a subtração do valor para a condição controle, foi possível estimar a quantidade acumulada de PpIX no tumor em até 1 mm de profundidade. Os resultados mostram que, no geral, o acúmulo quando o ALA foi aplicado por microagulha foi aproximadamente 2,2 vezes maior que quando aplicado por creme.

A Figura 73 possui imagens representativas dos cortes histológicos dos tumores, considerando como controle o tumor sem aplicação de precursor ou irradiação e tumores coletados 72 horas após a realização de TFD com aplicação tópica do creme e intradérmica por microagulhas dissolúveis.

Figura 73 - Imagens de cortes histológicos de a) tumor controle (sem aplicação de precursor ou irradiação); b) tumor coletado após 72 horas da aplicação de TFD com protocolo de aplicação tópica de creme contendo 5% de ALA, e c) tumor coletado após 72 horas da aplicação de TFD com protocolo de aplicação intradérmica por microagulha dissolúvel contendo 5% de M-ALA. A seta azul indica a extensão da pele (epiderme e derme), a seta verde indica a extensão do tumor intradérmico, as setas amarelas indicam regiões com infiltrados inflamatórios e o símbolo asterisco (“*”) indica regiões com crosta e edema. A barra no canto superior direito representa a escala de 250 μ m.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em ambos os protocolos de entrega de ALA, após a TFD foi possível observar a sutil presença de crosta na superfície do tumor e sinais de inflamação. A partir de uma análise qualitativa destes dados não foi possível determinar se houve diferenças significativas no estabelecimento do dano.

6.3 Conclusões do capítulo

A partir da caracterização das microagulhas dissolúveis foi possível estabelecer uma formulação com concentração de 5% de precursor que fosse rígida o suficiente para permitir permeação de 80% das microagulhas em até aproximadamente 250 μ m sem deformações significativas.

A dissolução em modelo tumoral em camundongos deu-se de maneira satisfatória após aquecimento local por 15 minutos a 40 °C.

Por meio do uso de técnicas de quantificação da fluorescência superficial não foi observada diferença significativa ao comparar a aplicação tópica de creme com a aplicação de microagulhas dissolúveis, tanto por espectroscopia de fluorescência quanto por imagem de campo amplo de fluorescência. No entanto, após avaliação das biópsias coletadas após 1 hora de incubação, foi possível observar que a distribuição do FS em profundidade deu-se de forma

mais eficiente por meio da aplicação de microagulhas dissolvíveis. A análise qualitativa histológica não mostrou diferenças significativas entre as aplicações.

Não há relatos de estudos na literatura envolvendo a confecção ou aplicação de microagulhas dissolvíveis contendo precursores de PpIX. Os resultados obtidos nos quais as microagulhas dissolvíveis superaram a aplicação tópica mesmo utilizando uma concentração menor que a formulação convencional sugere que a técnica seja extremamente promissora para estudos de aplicações clínicas.

A permeação do fármaco entre as camadas da pele é uma das principais limitações da TFD tópica. Por isso, alternativas que possibilitem uma entrega mais eficiente de fotossensibilizadores ou precursores podem favorecer o tratamento de tumores mais espessos, para os quais o índice de sucesso da TFD é comumente menor que em tumores superficiais.

Estudos clínicos com as microagulhas serão de extrema importância para confirmar a eficácia da aplicação para o tratamento de lesões. Além deles, aprofundar os estudos básicos em busca de melhor eficiência no tempo dissolução para viabilizar a aplicação clínica deve tornar a técnica ainda mais versátil.

7 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS

Nesta seção, alguns dos dados previamente discutidos foram agrupados para uma breve comparação entre os métodos utilizados.

A Figura 74 contém os resultados da espectroscopia de fluorescência no modelo tumoral em camundongos. Após uma hora de incubação, a intensidade de fluorescência normalizada (associada ao acúmulo superficial do FS) foi maior para a aplicação de ALA que para a aplicação de M-ALA, independente do método de entrega.

Figura 74 - Gráfico do tipo *boxplot* dos valores médios da intensidade de fluorescência normalizada no comprimento de onda de 635 nm referente aos espectros coletados no tumor 1 hora após aplicação de M-ALA a 20% em creme via tópica ou intradérmica por dermatógrafo e de ALA via creme ou via microagulha.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em termos de intensidade de fluorescência média, a aplicação de ALA na concentração de 5% por microagulha dissolúvel foi maior que por aplicação tópica do creme. No caso do M-ALA, embora a intensidade média da fluorescência não tenha sido relevante, as barras de erro mostram que existiu uma vantagem da aplicação por dermatógrafo quanto à homogeneidade da intensidade de fluorescência detectada na superfície. No caso das microagulhas para o ALA, a homogeneidade, é semelhante à do creme consideradas as barras de erro, mas a intensidade média do sinal de fluorescência é superior à do creme. Esse resultado confirma que o uso das técnicas intradérmicas de entrega favorecem a disponibilização dos fármacos de formas diferentes conforme a abordagem: para o

dermógrafo, em termos de homogeneidade, e para as microagulhas em termos de quantidade de fármaco detectada no tecido. Os resultados são encorajadores quanto às possibilidades de exploração das técnicas de acordo com o efeito esperado na lesão em questão. Pode-se pensar em uma sensibilização personalizada das lesões de acordo com suas características e necessidades de tratamento.

A Figura 75 reúne imagens de tumor em que não foi feita a aplicação de precursor e tumores coletados após 1 hora de incubação dos precursores.

Figura 75 - Imagens representativas da microscopia confocal de fluorescência no canal vermelho com sobreposição da imagem de transmissão para os tumores, sendo a) tumor sem sensibilização (controle); b) tumor após 1 hora da aplicação de creme via tópica de M-ALA na concentração de 20%; c) tumor após 1 hora da aplicação via intradérmica por dermógrafo de M-ALA na concentração de 20% de creme; d) tumor após 1 hora da aplicação de creme via tópica de ALA na concentração de 5%; e) tumor após 1 hora da aplicação via intradérmica por microagulhas dissolúveis contendo ALA na concentração de 5%. A barra no canto superior direito corresponde à escala de 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir da intensidade de fluorescência no canal vermelho, pode-se dizer que o maior acúmulo na epiderme deu-se para a aplicação de M-ALA em creme na concentração 20% a partir da aplicação via tópica (Figura 75b), aplicações de ALA na concentração de 5% por creme e por microagulhas dissolúveis (Figura 75d e Figura 75e).

A aplicação do M-ALA em creme via intradérmica por dermógrafo (Figura 75c) destacou-se pelo acúmulo do FS em regiões mais profundas do tumor em relação a outras aplicações, mesmo que com um sinal de fluorescência menos intenso. No caso da aplicação de ALA por microagulhas dissolúveis (Figura 75e), o perfil de distribuição do FS em maior profundidade comparada à aplicação tópica também ocorreu e deu-se de forma mais homogênea que a aplicação por dermógrafo.

A Figura 76 apresenta a quantificação da intensidade de fluorescência no canal vermelho das imagens dos tumores obtidas por microscopia confocal de fluorescência, sendo

a barra de erro correspondente ao desvio padrão entre os animais. A partir desta análise em função da profundidade do tumor, torna-se nítido que as microagulhas dissolvíveis tiveram o melhor desempenho, favorecendo a produção de PpIX em maior concentração e uniformidade em camadas mais profundas. A 0,5 mm de profundidade, a intensidade de fluorescência média foi quatro vezes maior com a aplicação de microagulhas dissolvíveis quando comparada às demais aplicações.

Mesmo considerando que com o tempo de incubação e os parâmetros de aquecimento utilizados ainda não foi possível obter completa dissolução das microagulhas ainda pode-se afirmar que as microagulhas dissolvíveis avaliadas neste estudo possuem potencial para otimizar o tratamento de lesões espessas por TFD, com a vantagem de utilizar concentração quatro vezes menor que a da formulação utilizada presentemente na clínica.

Figura 76 - a) Intensidade média no canal vermelho das imagens de microscopia confocal de fluorescência em função da profundidade, para tumores sem sensibilização (controle), tumores após 1 hora da aplicação de M-ALA na concentração de 20% com aplicação de creme via tópica ou intradérmica por dermatógrafo; ALA na concentração de 5% com aplicação via tópica por creme ou via intradérmica por microagulha dissolúvel. b) dados da parte 'a' com escala reduzida de intensidade média no canal vermelho e profundidade de 0,5 a 1 mm para melhor visualização dos resultados das aplicações neste intervalo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com base nos resultados obtidos, o uso do dermatógrafo mostrou-se ser uma ferramenta eficaz na distribuição do creme nos estudos em animais e permitiu a redução da taxa de recidivas no tratamento de CBC por TFD clinicamente. Por ser um equipamento com aprovação para uso em pacientes associado ao fato do creme estar atualmente em processo de aprovação pela ANVISA, esta combinação permite que o procedimento receba adesão mais imediata pela comunidade médica.

No caso da aplicação dos precursores por microagulhas dissolvíveis, os resultados demonstraram o grande potencial da técnica, mostrando a viabilidade de um estudo clínico. É possível, por exemplo, que dada à eficiência na produção do FS em maiores profundidades, estudar a possibilidade de realizar curetagens de lesões superficiais mais brandas, ou mesmo eliminá-las por completo, tornando o procedimento mais simples e menos doloroso para os pacientes. Elas também favoreceriam outras aplicações dermatológicas, como psoríase, acne e fotorejuvenescimento. Além disso, os resultados mais promissores na formação de PpIX a partir das microagulhas dissolvíveis foram obtidos com concentrações cinco vezes menores que a concentração do creme utilizado na clínica. Este é um fator importante em termos dos custos de fabricação das medicações, que estão diretamente ligados com uma maior viabilidade na disseminação da técnica, já que afeta diretamente a relação custo-benefício da terapia.

8 CONCLUSÃO

Este estudo propôs investigar os aspectos fundamentais da administração intradérmica de precursores de FS por meio de ferramentas que permitissem melhorar sua permeação através da pele, a fim de aumentar a profundidade de formação do FS e assim, expandir as possibilidades de utilizar a TFD como opção preferencial no tratamento de uma maior gama de lesões de pele, particularmente tumores.

Modelos animais de pele sadia e tumoral foram explorados em ratos e camundongos, é avaliados por fluorescência e histologia. No modelo de pele sadia de ratos, verificou-se que aplicação intradérmica de precursores de PpIX por diferentes dermógrafos mostrou-se mais eficiente que sua aplicação tópica. As análises qualitativa e quantitativa das lâminas histológicas mostraram que o dano após a TFD foi mais intenso para aplicação intradérmica. Em modelo tumoral em camundongos, por sua vez, as técnicas de fluorescência foram mais relevantes em demonstrar que a aplicação do dermógrafo também promoveu a distribuição do FS em maiores profundidades que a aplicação tópica do creme. Tais resultados qualitativos nos camundongos inspiram investigação mais aprofundada das lâminas histológicas em busca de uma quantificação destes resultados, de modo a dar robustez à análise do dano tecidual.

O estudo clínico conduzido para o tratamento de lesões nodulares de CBC com TFD comparou a aplicação de creme de M-ALA por dermógrafo (com e sem curetagem prévia) com aplicação tópica (com curetagem prévia). Quando a curetagem foi aplicada, os resultados das biópsias coletadas 30 dias após o tratamento mostraram que não houve diferenças significativas para entre os protocolos (94% e 95% de RC). Contudo, com a avaliação clínica após seis meses do tratamento, a taxa de recidiva quando a aplicação do creme foi dada por dermógrafo foi nula enquanto aproximadamente 10% dos casos tratados recidivaram quando a aplicação do creme foi apenas tópica. Foi verificado que a aplicação sem curetagem prévia possuiu taxa de cura insatisfatória (27%) e o protocolo foi interrompido antes do fim do estudo. A análise de sobrevida livre de doença comprovou que a aplicação do creme fazendo uso do dermógrafo foi a metodologia mais eficiente de tratamento em longo prazo, diminuindo os eventos de recidivas nos pacientes e, desta forma, com potencial para oferecer maior qualidade de vida e favorecer a implementação da TFD no sistema de saúde.

Foram confeccionadas microagulhas dissolvíveis contendo ALA ou M-ALA em 20% de Gantrez AN-139. A formulação contendo 5% de precursor mostrou-se estável quando mantidas em geladeira, apresentou resistência mecânica, capacidade de inserção e dissolução encorajadoras para a aplicação nos testes *in vivo*. Quando aplicadas no modelo tumoral em

camundongos, as microagulhas dissolvíveis com ALA demonstraram formação de PpIX superficial comparável à aplicação de creme na mesma concentração, avaliada a partir de medidas de espectroscopia de fluorescência e imagem de fluorescência de campo amplo. A quantificação da distribuição do FS em profundidade mostrou que a aplicação por microagulhas teve um desempenho mais eficiente que a aplicação tópica.

Através deste estudo, foi possível alcançar mais profundo entendimento acerca dessas técnicas de entrega intradérmica de precursores de FS, as quais podem ser capazes de solucionar problemas práticos relacionados à TFD clínica. Os instrumentos para entrega intradérmica relacionados a este estudo mostraram-se promissores para o aperfeiçoamento da TFD, proporcionando disponibilização de FS com maior penetração no tecido quando comparados à sua aplicação tópica convencional.

REFERÊNCIAS

- 1 DE SOUZA, R. J. S. A. P. et al. Estimativa do custo do tratamento do câncer de pele tipo não-melanoma no estado de São Paulo - Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 657-662, 2011.
- 2 BAGNATO, V. S. **Terapia fotodinâmica dermatológica: programa TFD Brasil**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2015.
- 3 BAGNATO, V. S. et al. PDT experience in Brazil: a regional profile. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p. 107-118, 2005.
- 4 GRECCO, C. et al. Single LED-based device to perform widefield fluorescence imaging and photodynamic therapy. **Proceedings of SPIE**, v. 9531, 2015. doi: 10.1117/12.2185925
- 5 GERALDE, M. C. et al. Pneumonia treatment by photodynamic therapy with extracorporeal illumination - an experimental model. **Physiological Reports**, v. 5, n. 5, p. e13190, 2017.
- 6 ULIANA, M. P. et al. Photobiological characteristics of chlorophyll a derivatives as microbial PDT agents. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 8, p. 1137-1145, 2014.
- 7 DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008.
- 8 LIANG, Y. et al. Photodynamic therapy as an antifungal treatment (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, n. 1, p. 23-27, 2016.
- 9 KHARKWAL, G. B. et al. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 755-767, 2011.
- 10 BIEL, M. Advances in photodynamic therapy for the treatment of head and neck cancers. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 349-355, 2006.
- 11 SOUZA, C. S. et al. Optimized photodynamic therapy with systemic photosensitizer following debulking technique for nonmelanoma skin cancers. **Dermatologic Surgery**, v. 33, n. 2, p. 194-198, 2007.
- 12 TRIESSCHEIJN, M. et al. Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, v. 11, n. 9, p. 1034-1044, 2006.
- 13 BUZZÁ, H. H. et al. Photodynamic therapy: progress toward a scientific and clinical network in Latin America. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 261, 2015. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.08.004
- 14 RAMIREZ, D. P. et al. Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response: preliminary results of a national Brazilian project. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 1, p. 22-26, 2014.

- 15 BUZZÁ, H. H. et al. Overall results for a national program of photodynamic therapy for basal cell carcinoma: a multicenter clinical study to bring new techniques to social health care. **Cancer Control**, v. 26, n. 1, 2019. doi: 10.1177/1073274819856885.
- 16 BISSON, M. A. et al. Do plastic surgeons resect basal cell carcinomas too widely? a prospective study comparing surgical and histological margins. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 55, n. 4, p. 293-297, 2002.
- 17 DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.
- 18 LOVELL, J. F. et al. Activatable photosensitizers for imaging and therapy. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2839-2857, 2010.
- 19 PERVAIZ, S.; OLIVO, M. Art and science of photodynamic therapy. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 5-6, p. 551-556, 2006.
- 20 ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 96, n. 1, p. 1-8, 2009.
- 21 KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H.; PROSS, D. C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 6, n. 1-2, p. 143-148, 1990.
- 22 FERNANDEZ, J. M.; BILGIN, M. D.; GROSSWEINER, L. I. Singlet oxygen generation by photodynamic agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 37, n. 1-2, p. 131-140, 1997.
- 23 SACHAR, M.; ANDERSON, K. E.; MA, X. Protoporphyrin IX: the good, the bad, and the ugly. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, n. 2, p. 267-275, 2016.
- 24 GOLD, M. H. Therapeutic and aesthetic uses of photodynamic therapy part five of a five-part series: ALA-PDT and MAL-PDT what makes them different. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 2, n. 2, p. 44-7, 2009.
- 25 SÁLVIO, A. G. et al. Non-invasive treatment of extensive eyelid cancerous lesion by photodynamic therapy: a case report. **Journal of Aesthetic & Reconstructive Surgery**, v. 1, p. 1-5, 2015. doi: 10.4172/2472-1905.10005
- 26 SOTIRIOU, E.; APALLA, Z.; IOANNIDES, D. Complete resolution of a squamous cell carcinoma of the skin using intralesional 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy intralesional PDT for SCC. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 26, n. 5, p. 269-271, 2010.
- 27 KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging skin: histology, physiology, and pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 229-234, 2011.
- 28 ARORA, A.; PRAUSNITZ, M. R.; MITRAGOTRI, S. Micro-scale devices for transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 227-236, 2008.

- 29 KASSUGA, L. E. DE B. P.; ISSA, M. C. A.; CHEVRAND, N. S. Aplicação transepidérmica de medicamento associado a terapia fotodinâmica no tratamento de ceratoses actínicas. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 3, n. 4, p. 89-92, 2011.
- 30 LI, X. et al. Needle-free injection of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy for the treatment of condylomata acuminata. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 6, n. 1, p. 236-240, 2013.
- 31 BAROLET, D.; BOUCHER, A. No-needle jet intradermal aminolevulinic acid photodynamic therapy for recurrent nodular Basal cell carcinoma of the nose: a case report. **Journal of Skin Cancer**, v. 2011, p. 790509, 2011. doi: 10.1155/2011/790509.
- 32 RODRIGUES, P. G. S. et al. Assessment of ALA-induced PpIX production in porcine skin pretreated with microneedles. **Journal of Biophotonics**, v. 8, n. 9, p. 723-729, 2015.
- 33 REQUENA, M. B. et al. Topical and intradermal delivery of PpIX precursors for photodynamic therapy with intense pulsed light on porcine skin model. **Lasers in Medical Science**, 2019. doi: 10.1007/s10103-019-02771-y
- 34 RODRIGUES, P. G. S. et al. New alternatives to improve the transdermal application of ALA, M-ALA in photodynamic therapy using needle-free injection. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 360, 2015.
- 35 ROLLAKANTI, K. R. et al. Techniques for fluorescence detection of protoporphyrin IX in skin cancers associated with photodynamic therapy. **Photonics & Lasers in Medicine**, v. 2, n. 4, p. 287-303, 2013.
- 36 WAGNIÈRES, G. A.; STAR, W. M.; WILSON, B. C. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. **Photochemistry and Photobiology**, v. 68, n. 5, p. 603-632, 1998.
- 37 ANDRADE, C. T. et al. Identification of skin lesions through aminolaevulinic acid-mediated photodynamic detection. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 3, p. 409-415, 2014.
- 38 GARCIA, M. R. et al. Assembly of a PDT device with a near-infrared fluorescence monitoring of PpIX during treatment. **Proceedings of SPIE**, v. 108600, 2019. doi: 10.1117/12.2507344.
- 39 ROBERTS, D. W. et al. Red-light excitation of protoporphyrin IX fluorescence for subsurface tumor detection. **Journal of Neurosurgery**, v. 128, n. 6, p. 1690-1697, 2018.
- 40 BODANESS, R. S. et al. The two-photon laser-induced fluorescence of the tumor-localizing photosensitizer hematoporphyrin derivative. resonance-enhanced 750 nm two-photon excitation into the near-UV Soret band. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 26, p. 12098-12101, 1986.
- 41 VALDES, P. A. et al. Quantitative wide-field imaging techniques for fluorescence guided neurosurgery. **Frontiers in Surgery**, v. 6, p. 31, 2019. doi: 10.3389/fsurg.2019.00031

- 42 BIGIO, I. J.; MOURANT, J. R. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: Fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 42, n. 5, p. 803-814, 1997.
- 43 LIM, L. et al. Probe pressure effects on human skin diffuse reflectance and fluorescence spectroscopy measurements. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 1, p. e011012, 2011.
- 44 WHITSON, W. J. et al. Confocal microscopy for the histological fluorescence pattern of a recurrent atypical meningioma: case report. **Neurosurgery**, v. 68, n. 6, p. 1768-1772, 2011.
- 45 OLIVO, M.; WILSON, B. C. Mapping ALA-induced PPIX fluorescence in normal brain and brain tumour using confocal fluorescence microscopy. **International Journal of Oncology**, v. 25, n. 1, p. 37-45, 2004.
- 46 DEY, P. Fluorescence and confocal microscope: basic principles and applications in pathology. **Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology**. Singapore: Springer, 2018. p. 245-252. doi: 10.1007/978-981-10-8252-8_25.
- 47 RAGAZZI, M. et al. Fluorescence confocal microscopy for pathologists. **Modern Pathology**, v. 27, n. 3, p. 460-471, 2014.
- 48 VAN DER VELDEN, E. M. et al. Dermatography with bleomycin as a new treatment for verrucae vulgaris. **International Journal of Dermatology**, v. 36, n. 2, p. 145-150, 1997.
- 49 ARBACHE, S.; GODOY, C. E. DE. Microinfusão de medicamentos na pele através de máquina de tatuagem. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 5, n. 1, p. 70-74, 2013.
- 50 GARG, G.; THAMI, G. P. Micropigmentation: tattooing for medical purposes. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 8, p. 928-931; 2005.
- 51 VELDEN, E. M. VAN DER et al. Applications in surgery. **International Journal of Cosmetic Surgery and Aesthetic Dermatology**, v. 3, n. 2, p. 151-159, 2001.
- 52 SHIO, M. T. et al. Drug delivery by tattooing to treat cutaneous leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 4, p. 4156, 2014. doi: 10.1038/srep04156.
- 53 QUINN, H. L.; HUGHES, C. M.; DONNELLY, R. F. Novel methods of drug administration for the treatment and care of older patients. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, n. 2, p. 366-373, 2016.
- 54 MOONEY, K.; MCELNAY, J. C.; DONNELLY, R. F. Children's views on microneedle use as an alternative to blood sampling for patient monitoring. **International Journal of Pharmacy Practice**, v. 22, n. 5, p. 335-344, 2014.
- 55 DONNELLY, R. F. et al. Microneedle-mediated intradermal delivery of 5-aminolevulinic acid: potential for enhanced topical photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 129, n. 3, p. 154-162, 2008.
- 56 GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, P. et al. Hydrogel-forming and dissolving microneedles for enhanced delivery of photosensitizers and precursors. **Photochemistry and Photobiology**, v. 104, n. 3, p. 641-647, 2014.

- 57 RODGERS, A. M. et al. Control of *Klebsiella pneumoniae* infection in Mice by using dissolving microarray patches containing gentamicin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 5, p. e02612-e02618, 2019.
- 58 QUINN, H. L. et al. The role of microneedles for drug and vaccine delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 11, p.1769-1780, 2014.
- 59 ALI, A. A. et al. DNA vaccination for cervical cancer; a novel technology platform of RALA mediated gene delivery via polymeric microneedles. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v.13, n. 3, p. 921-932, 2017.
- 60 COLE, G. et al. DNA vaccination for cervical cancer: strategic optimisation of RALA mediated gene delivery from a biodegradable microneedle system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 127, p. 288-297, 2018. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.02.029.
- 61 PERMANA, A. D. et al. New HPLC-MS method for rapid and simultaneous quantification of doxycycline, diethylcarbamazine and albendazole metabolites in rat plasma and organs after concomitant oral administration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 170, p. 243-253, 2019. doi: 10.1016/j.jpba.2019.03.047.
- 62 PERMANA; MCCRUDDEN; DONNELLY. Enhanced intradermal delivery of nanosuspensions of antifilaria drugs using dissolving microneedles: a proof of concept study. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 7, p. 346, 2019.
- 63 PAMORNPATHOMKUL, B. et al. Dissolving polymeric microneedle arrays for enhanced site-specific acyclovir delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 121, p. 200-209, 2018. doi: 10.1016/j.ejps.2018.05.009.
- 64 MIGDADI, E. M. et al. Hydrogel-forming microneedles enhance transdermal delivery of metformin hydrochloride. **Journal of Controlled Release**, v. 10, n. 285, p. 142-151, 2018.
- 65 KEARNEY, M. C. et al. Microneedle-mediated delivery of donepezil: potential for improved treatment options in Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 103, p. 43-50, 2016. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.03.026
- 66 RAMÖLLER, I. K. et al. Rapidly dissolving bilayer microneedle arrays - a minimally invasive transdermal drug delivery system for vitamin B12. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 566, p. 299-306, 2019. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.05.066.
- 67 LARRAÑETA, E. et al. Microneedle arrays as transdermal and intradermal drug delivery systems: Materials science, manufacture and commercial development. **Materials Science and Engineering R: reports**, v. 134, p. 1-32, 2016. doi: 10.1016/j.mser.2016.03.001.
- 68 DONNELLY, R. F. et al. Hydrogel-forming and dissolving microneedles for enhanced delivery of photosensitizers and precursors. **Photochemistry and Photobiology**, v. 90, n. 3, p. 641-647, 2014.
- 69 KEARNEY, M. C. et al. Potential of microneedles in enhancing delivery of photosensitising agents for photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 4, p. 459-466, 2014.

- 70 MISHRA, R.; MAITI, T. K.; BHATTACHARYYA, T. K. Development of SU-8 hollow microneedles on a silicon substrate with microfluidic interconnects for transdermal drug delivery. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 28, n. 10, 2018. doi: 10.1088/1361-6439/aad301
- 71 RAMIREZ ANGARITA, D. P. **Avaliação da cicatrização da pele de rato wistar após múltiplas sessões de terapia fotodinâmica**. 2012. 118 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.
- 72 DAMY, S. B. et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.
- 73 HO, D. T. et al. Growth inhibition of an established A431 xenograft tumor by a full-length anti-EGFR antibody following gene delivery by AAV. **Cancer Gene Therapy**, v. 16, n. 2, p. 184-194, 2009.
- 74 DI BENEDETTO, M. et al. Inhibition of epidermoid carcinoma A431 cell growth and angiogenesis in nude mice by early and late treatment with a novel dextran derivative. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 12, p. 1987-1994, 2003.
- 75 BORISOVA, E. et al. Optical biopsy of human skin - a tool for cutaneous tumours' diagnosis. **International Journal Bioautomation**, v.16, n.1, p. 53-72. 2012.
- 76 ANDRADE, C. T. **Identificação de lesões de pele por detecção fotodinâmica mediada por ácido aminolevulínico**. 2012. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 77 RODRIGUES, P. G. S. **Estudos da formação de protoporfirina IX induzida por ácido aminolevulínico: um enfoque para o aprimoramento da terapia fotodinâmica**. 2017. 117 p, Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- 78 GRACIELLI SOUSA, R. P. et al. Microneedles rollers as a potential device to increase ALA diffusion and PpIX production: evaluations by wide-field fluorescence imaging and fluorescence spectroscopy. **Proceedings of SPIE**, v. 8926, 2014. doi:10.1117/12.2040618.
- 79 MEHRABAN, N.; FREEMAN, H. S. Developments in PDT sensitizers for increased selectivity and singlet oxygen production. **Materials**, v. 8, n. 7, p. 4421-4456, 2015.
- 80 CONTIN, L. A. Male androgenetic alopecia treated with microneedling alone or associated with injectable minoxidil by microinfusion of drugs into the skin. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 8, n. 2, 2016. doi: 10.5935/scd1984-8773.201682782.
- 81 RAMIREZ, D. P. et al. Single visit PDT for basal cell carcinoma - a new therapeutic protocol. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 375-382, 2019. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.04.016
- 82 BASSET-SEGUIN, N. et al. Consensus recommendations for the treatment of basal cell carcinomas in Gorlin syndrome with topical methylaminolaevulinate-photodynamic therapy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, n. 5, p. 626-632, 2014.

- 83 MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 4, p. 275-278, 2011.
- 84 BATH-HEXTALL, F. et al. Surgical excision versus imiquimod 5% cream for nodular and superficial basal-cell carcinoma (SINS): a multicentre, non-inferiority, randomised controlled trial. **Lancet Oncology**, v. 15, n. 1, p. 96-105, 2014.
- 85 KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American Statistical Association**, v. 53, n. 282, p. 457-481, 1958.
- 86 JANJUA, O. S.; QURESHI, S. M. Basal cell carcinoma of the head and neck region: an analysis of 171 cases. **Journal of Skin Cancer**, v. 2012, 2012. doi: 10.1155/2012/943472
- 87 NAKAYAMA, M. et al. Basal cell carcinoma of the head and neck. **Journal of Skin Cancer**, v. 2011, p. 1-9, 2011. doi: 10.1155/2011/496910
- 88 CHRISTENSEN, E.; MØRK, C.; FOSS, O. A. Pre-treatment deep curettage can significantly reduce tumour thickness in thick basal cell carcinoma while maintaining a favourable cosmetic outcome when used in combination with topical Photodynamic therapy. **Journal of Skin Cancer**, v. 2011, 2011. doi: 10.1155/2011/240340
- 89 THISSEN, M. R. T. M.; SCHROETER, C. A.; NEUMANN, H. A. M. Photodynamic therapy with delta-aminolaevulinic acid for nodular basal cell carcinomas using a prior debulking technique. **British Journal of Dermatology**, v. 142, n. 2, p. 338-339, 2000.
- 90 IBBOTSON, S. H. Adverse effects of topical photodynamic therapy. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 27, n. 3, p. 116-130, 2011.
- 91 DONNELLY, R. F. et al. Pharmaceutical analysis of 5-aminolevulinic acid in solution and in tissues. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 82, n. 1, p. 59-71, 2006.
- 92 CASSIDY, C. M. et al. Drug and light delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) of pulmonary pathogens: a pilot study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2011.
- 93 DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; WOOLFSON, A. D. Derivatives of 5-aminolevulinic Acid for photodynamic therapy. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 0, p. 49-63, 2008.
- 94 MORROW, D. I. J. et al. Influence of penetration enhancers on topical delivery of 5-aminolevulinic acid from bioadhesive patches. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 685-695, 2010.
- 95 CAFFAREL-SALVADOR, E. et al. Methylene blue-loaded dissolving microneedles: Potential use in photodynamic antimicrobial chemotherapy of infected wounds. **Pharmaceutics**, v. 7, n. 4, p. 397-412, 2015.
- 96 MCCARRON, P. A. et al. Design and evaluation of a water-soluble bioadhesive patch formulation for cutaneous delivery of 5-aminolevulinic acid to superficial neoplastic lesions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 2-3, p. 268-279, 2006.

- 97 CASSIDY, C. M. et al. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: From benchtop to clinical practice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 95, n. 2, p. 71-80, 2009.
- 98 DONNELLY, R. F. et al. Hydrogel-forming microneedles prepared from “super swelling” polymers combined with lyophilised wafers for transdermal drug delivery. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e111547, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0111547
- 99 GARDNER, C. M. et al. Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) polymers for cell encapsulation. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 22, n. 16, p. 2127-2145, 2011.
- 100 IGLESIAS, T. et al. In vitro evaluation of the genotoxicity of poly(anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, n. 1, p. 418-426, 2017.
- 101 RAJ SINGH, T. R. et al. Investigation of swelling and network parameters of poly(ethylene glycol)-crosslinked poly(methyl vinyl ether-co-maleic acid) hydrogels. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 4, p. 1239-1249, 2009.
- 102 MIKOLAJEWSKA, P. et al. Microneedle pre-treatment of human skin improves 5-aminolevulinic acid (ALA) - and 5-aminolevulinic acid methyl ester (MAL) - induced PpIX production for topical photodynamic therapy without increase in pain or erythema. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 10, p. 2213-2020, 2010.
- 103 LARRAÑETA, E. et al. A proposed model membrane and test method for microneedle insertion studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, n. 1-2, p. 65-73, 2014.
- 104 MEYER, W. Porcine skin as biological model for the human integument. **Hautarzt**, v. 47, n. 3, p. 178-182, 1996.
- 105 KRIEG, T.; BICKERS, D. R.; MIYACHI, Y. **Therapy of skin diseases: a worldwide perspective on therapeutic approaches and their molecular basis**. Berlin: Springer Science & Business Media, 2010.
- 106 NOVO, M.; HÜTTMANN, G.; DIDDENS, H. Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 34, n. 2-3, p. 143-148, 1996.
- 107 DONNELLY, R. F. et al. Design, optimization and characterisation of polymeric microneedle arrays prepared by a novel laser-based micromoulding technique. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 1, p. 41-57, 2011.
- 108 DE BLOIS, A. W. et al. Development of a stable solution of 5-aminolaevulinic acid for intracutaneous injection in photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 17, n. 3, p. 208-215, 2002.
- 109 OLTULU, P. et al. Measurement of epidermis, dermis, and total skin thicknesses from six different body regions with a new ethical histometric technique. **Türk Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Dergisi**, v. 26, n. 2, p. 56-61, 2018.

110 CALABRO, K. et al. Gender variations in the optical properties of skin in murine animal models. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 1, p. 011008, 2011. doi: 10.1117/1.3525565.