



ESTUDO DA REMODELAÇÃO DÉRMICA INDUZIDA PELA TERAPIA FOTODINÂMICA (MAL-TFD) NA PELE FOTODANIFICADA

Maria Claudia Almeida Issa

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Dermatologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Medicina (Dermatologia).

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Mônica Manela-Azulay
Prof. Dr. Juan Piñeiro Maceira

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Issa, Maria Cláudia Almeida

Estudo da remodelação dérmica induzida pela terapia fotodinâmica (MAL-TFD) na pele fotodanificada / Maria Cláudia Almeida Issa. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2008.

xvi 123 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Mônica Manela-Azulay e Juan Piñeiro Maceira
Tese (Doutorado) – UFRJ, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina – Dermatologia, 2008.

Referências Bibliográficas: f. 111-123

1. Terapia fotodinâmica. 2. Fotoenvelhecimento. 3. Remodelação dérmica. 4. Metilaminolevulinato. 5. Matriz extracelular. 6. Dermatologia – Tese. I. Manela-Azulay, Mônica. II. Maceira, Juan Piñeiro. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina – Dermatologia. IV. Título.

ESTUDO DA REMODELAÇÃO DÉRMICA INDUZIDA PELA TERAPIA FOTODINÂMICA (MAL-TFD) NA PELE FOTODANIFICADA

Maria Claudia Almeida Issa

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Mônica Manela-Azulay
Prof. Dr. Juan Piñeiro Maceira

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Dermatologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Medicina (Dermatologia).

Aprovada por:

Presidente Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Soares de Azevedo

Prof. Dr. Beni Olej

Prof^a. Dr^a. Mayra Carrijo Rochael

Prof^a. Dr^a. Maria Katia Gomes

Prof^a. Dr^a Lucia Helena Ribeiro Soares

Rio de Janeiro

2008

Ao meu marido Alkamir, agradeço pelo apoio ao meu interesse acadêmico e a minha vida universitária e, principalmente, pela compreensão diante dos vários momentos de abandono a nossa família.

Às minhas filhas, peço desculpas por todas as minhas falhas como mãe e ofereço o exemplo da luta constante à conquista dos nossos objetivos. Espero ser exemplo de força e garra em busca de um ideal.

Aos meus pais, desculpas e agradecimentos eternos. Reconheço estar longe de ser uma filha carinhosa e presente, mas estou perto o suficiente para mostrá-los algumas das qualidades que me ensinaram, como perseverança, dignidade e honestidade na vida pessoal e profissional.

A Deus, agradeço sua presença na minha vida. Força divina para buscar sempre mais, matando a sede do eterno aprender.

AGRADECIMENTOS

À professora Mônica Manela-Azulay, professora adjunta da Dermatologia, chefe do Ambulatório de Cosmiatria do Setor de Dermatologia do HUCFF-UFRJ, pela atenção, dedicação e orientação não apenas na tese, como em várias etapas da minha vida profissional.

Ao professor Juan Piñeiro Maceira, professor do Departamento de Patologia da UFRJ, pela orientação e pelo equilíbrio nas colocações entre a clínica e o exame histopatológico.

Aos professores, colegas e funcionários da Dermatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, pelo carinho que me acolheram durante este curso.

Aos professores, colegas e funcionários da Dermatologia do Hospital Universitário Antônio Pedro, pela compreensão durante meu afastamento para a conclusão deste trabalho.

Ao professor Rogério Estevan Farias, professor do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e à Dr^a Mônica Pureza, médica da patologia da UFF, pela orientação e contribuição nas avaliações imuno-histoquímicas.

Ao professor Ronir Raggio Luiz, professor do Departamento de Estatística da UFRJ, pela contribuição nas análises estatísticas.

Ao professor Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, chefe do Laboratório de Morfometria e Morfologia Cardio-Vascular do Departamento de Anatomia da UERJ, pela oportunidade de realizar o estudo morfométrico em seu Serviço.

Aos meus queridos professores de Dermatologia da UFF, Neide Kalil Gaspar e Antônio Pedro Gaspar, pela amizade e ajuda profissional.

Ao professor Beni Olej, professor do Departamento de Imunologia da UFF, pela atenção e colaboração substancial no desenvolvimento das minhas teses de mestrado, e mais uma vez de doutorado.

À professora Enoi Villar, professora do Departamento de Patologia da UFF, pela amizade e dedicação às nossas primeiras avaliações histológicas em terapia

fotodinâmica, e no auxílio às fotografias.

Ao laboratório Anticorpos, em nome de Ivana Hopkin e Pablo Hopkin, pela dedicação e competência.

Aos técnicos de Laboratório Heliomar e Bruno, pela responsabilidade e eficiência na realização das técnicas especiais envolvidas no estudo.

Às minhas queridas amigas Sra. Wilma Alves, Sra. Marcella Lacerda e Dr^a Teresa Vieira, pela colaboração na redação final do texto e revisão bibliográfica.

À Sra. Daniela Lins, presidente da Galderma Brasil, pela percepção da importância do trabalho em conjunto da Indústria Farmacêutica com estudos de investigação científica.

À Galderma Indústria Farmacêutica, pelo fornecimento do fotossensibilizante e da fonte de luz.

RESUMO

ESTUDO DA REMODELAÇÃO DÉRMICA INDUZIDA PELA TERAPIA FOTODINÂMICA (MAL-TFD) NA PELE FOTODANIFICADA

Maria Claudia Almeida Issa

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Mônica Manela-Azulay
Prof. Dr. Juan Piñeiro Maceira

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Dermatologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Medicina (Dermatologia).

A Terapia Fotodinâmica está aprovada para tratamento do câncer de pele não melanoma. Estudos recentes apontam bons resultados clínicos com a utilização desta técnica no tratamento do fotoenvelhecimento, entretanto faltam dados histopatológicos que comprovem tais observações. Os objetivos deste estudo foram avaliar as modificações histopatológicas induzidas pela terapia fotodinâmica na remodelação dérmica da pele fotodanificada, através de exames histopatológicos, morfométricos e imuno-histoquímicos e identificar as modificações clínicas alcançadas. Foram estudados 14 pacientes do sexo feminino, com pele fotodanificada, idade entre 55 a 60 anos (média de 57,57 anos e desvio padrão de 1,95), submetidas a duas sessões de terapia fotodinâmica tópica. Clinicamente, todas apresentavam aspereza ao tato, melanoses solares, rugas, sulcos e flacidez. Apenas quatro apresentavam lesões de ceratose actínica. Histologicamente foi evidenciada em todos os casos elastose solar com intensidade variável. A avaliação morfométrica permitiu quantificar fibras colágenas e elásticas. Através da imuno-histoquímica foi analisada a expressão das enzimas responsáveis pela remodelação da matriz extracelular (MMP-1, 3, 7, 9, 12), do inibidor de metaloproteinases (TIMP-1) e dos colágenos tipo I e III, nos períodos pré-tratamento, pós três e seis meses. Para análise dos resultados foram usados os testes de Wilcoxon e X^2 de McNemar, de acordo com as variáveis numéricas e categóricas, respectivamente, que revelaram aumento estatisticamente significativo da expressão de MMP-9 (0,002), e de colágeno tipo I ($p=0,002$) na derme superficial, predominantemente, após 3 meses. Esse último se manteve aumentado ($p= 0,001$), após 6 meses de tratamento. A quantificação das fibras colágenas, à morfometria, também mostrou aumento significativo da densidade de colágeno após seis meses de tratamento ($p = 0,048$). A quantificação das fibras elásticas revelou diminuição estatisticamente significativa após 3 meses ($p=0,016$), e após 6 meses de tratamento ($p=0,008$). Até o momento, não está claro o mecanismo de remodelação dérmica na pele fotodanificada induzida pela terapia fotodinâmica. Entretanto, o estímulo à expressão e, possivelmente, à indução da atividade da MMP-9 poderia justificar a degradação das

fibras elásticas fragmentadas e colágenas degeneradas (gelatinas). Consequentemente, a indução simultânea à produção de novo colágeno ocorreria como uma resposta fisiológica e dinâmica da matriz extracelular. Essas modificações encontradas na derme sustentam a hipótese da remodelação dérmica induzida pela terapia fotodinâmica na pele fotodanificada e corrobora os achados clínicos de melhora global da pele dos pacientes tratados.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, fotoenvelhecimento da pele, remodelação dérmica, metilaminolevulinato, matriz extracelular

ABSTRACT

SKIN REMODELATION INDUCED BY PHOTODYNAMIC THERAPY (MAL-PDT) IN PHOTODAMAGED SKIN

Maria Claudia Almeida Issa

Orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Mônica Manela-Azulay
Prof. Dr. Juan Piñeiro Maceira

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Dermatologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Medicina (Dermatologia).

Photodynamic Therapy is approved to non melanoma skin cancer treatment. Recent studies are showing good clinical results with this procedure to photodamaged skin, however this findings have not been confirmed by histopathological analyses, through objective complementary techniques. The aim of this study was to analyze dermis remodeling of photodamaged skin induced by photodynamic therapy, through histopathology, morphometry and immunohistochemistry. Also, to identify the clinical benefits reached by this therapy. Fourteen patients with photodamaged skin, with an age range 55-60 years (mean:57,57 years, SD:1.95) were submitted to two sessions of photodynamic therapy. Clinically, all of them presented roughness, melanoses, wrinkles, folds and laxity. Among these 14 patients, only four presented actinic keratoses. Histologically, solar elastoses, with different intensity was noted in all of them. The morphometric evaluation allowed to quantify the collagen and elastic fibers. Through immunohistochemistry, metalloproteinases (MMP-1, 3, 7, 9, 12), metalloproteinases inhibitor (TIMP-1) and collagen type I and III were analyzed before, for three and six months after treatment. For statistical analyzes Wilcoxon test and X^2 Mc Nemar were applied, according to the numeric and categoric variables, respectively. Statistically significant score differences in the expression of MMP-9 and collagen type I were observed after treatment. Increase in MMP-9 expression was significant after three months ($p=0,002$). Increase in collagen type I expression was significant after three ($p=0,002$) and six months ($p= 0,001$). The amount of collagen fibers, by morphometry, also showed significant increase in collagen density after six month treatment ($p = 0,048$). The amount of elastic fibers presented significant decrease after 3 months ($p=0,016$), and after 6 month treatment ($p=0,008$). It is not clear whether the main mechanism involved in dermis remodeling induced by PDT in photodamaged skin. However, the trigger to MMP-9 expression and, probably, its activity may justify the breaking up of fragmented elastic and collagen fibers (gelatins). Consequently, the simultaneous induction to new collagen synthesis would occur, as a physiological and dynamic extracellular matrix response. These dermis modifications observed would sustain the hypothesis of dermic remodeling PDT

induced in photodamaged skin and corroborating the skin global clinical improvement after treatment.

Key-words: photodynamic therapy, photodamaged skin, dermis remodeling, metilaminolaevulinate, extracellular matrix.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES, DE TABELAS E GRÁFICOS	XIV
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 Terapia fotodinâmica	5
3.1.1 <i>Conceito</i>	5
3.1.2 <i>Histórico.....</i>	6
3.1.3 <i>Fotossensibilizantes em Terapia Fotodinâmica.....</i>	8
3.1.3.1 <i>Fotossensibilizantes sistêmicos</i>	10
3.1.3.2 <i>Fotossensibilizantes tópicos.....</i>	12
3.1.3.3 <i>Outros fotossensibilizantes</i>	14
3.1.4 <i>Fontes de luz.....</i>	16
3.1.5 <i>Mecanismo de ação</i>	18
3.1.6 <i>Aplicação em Dermatologia.....</i>	23
3.1.6.1 <i>Queratose Actínica.....</i>	23
3.1.6.2 <i>Câncer Cutâneo Não Melanoma.....</i>	26
3.1.6.3 <i>Doenças cutâneas não malignas</i>	29
3.1.7 <i>Efeitos adversos</i>	38
3.2 Fotoenvelhecimento	39
3.2.1 <i>Conceito</i>	39
3.2.2 <i>Classificação do envelhecimento</i>	40
3.2.3 <i>Etiopatogenia.....</i>	42
3.2.3.1 <i>Matriz Extracelular.....</i>	42
3.2.3.2 <i>Mecanismos Etiopatogênicos.....</i>	48
3.2.4 <i>Histopatologia do envelhecimento.....</i>	58
3.3 Relação entre Terapia Fotodinâmica e Fotoenvelhecimento	60
4 METODOLOGIA	65
4.1 Desenho do Estudo	65
4.2 Pacientes	65
4.2.1 <i>Critérios de inclusão:</i>	66
4.2.2 <i>Critérios de exclusão:</i>	66
4.3 Métodos	66
4.3.1 <i>Avaliação Clínica</i>	66
4.3.2 <i>Avaliação Histopatológica.....</i>	67
4.3.2.1 <i>Biópsias.....</i>	67
4.3.3 <i>Terapia Fotodinâmica.....</i>	72
4.3.3.1 <i>Técnica.....</i>	72

4.3.3.2	Efeitos Colaterais	74
4.3.4	<i>Análise Estatística</i>	74
5	RESULTADOS	76
6	DISCUSSÃO	103
7	CONCLUSÕES	109
8	SUGESTÕES	110
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
	ANEXOS	124

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	oxigênio <i>singlet</i> ou singleto
ALA	ácido aminolevulínico
AP-1	proteína ativadora 1
BPD	benzoporfirina
CBC	carcinoma basoelular
CEC	carcinoma espinocelular
Cu-ZnSOD	cobre -zinco superóxido dismutase
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FDA	Food and Drug Administration
GABA	ácido gama-aminobutírico
GAG	Glicosaminoglicano
G-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HO	radical hidroxila
Hp	hematoporfirina
HpD	derivado de hematoporfirina
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IL	Interleucina
J/cm^2	Joules/centímetro quadrado
LED	Light Emitting Diode
LIP	Luz Intensa Pulsada
MAL	metilaminolevulinato
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteinase
MnSOD	manganês superóxido dismutase
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
mW/cm^2	miliwatts/ centímetro quadrado

NF-κB	fator nuclear kappa B
nm	nanômetro
NPe6	N-aspartil-clorina e 6
O ₂ ⁻	ânion superóxido
PBG	porfobilinogênio
PDL	Pulsed Dye Laser – laser de corante
PG	prostaglandina
Pp IX	protoporfirina IX
PUVA	psoraleno + radiação ultravioleta A
QA	queratose ou ceratose actínica
ROO ⁻	radical peroxil
ROOH	peróxido orgânicos
ROS	Reactive Oxygen Species - espécies reativas de oxigênio
Se-GSHPx	selênio-glutationa peroxidase
SMAD	proteínas intracelulares sinalizadoras
SnET2	tin-etil-etiopurpurina
TFD	terapia fotodinâmica
TGF β	Fator de crescimento transformate beta
TIMPs	inibidor de metaloproteinases
TNFα	Fator de Necrose Tumoral alfa
UV	radiação ultravioleta

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, DE TABELAS E GRÁFICOS

Figura 1	Aplicação tópica do MAL na face	73
Figura 2	Curativo oclusivo	73
Figura 3	Proteção luminosa	74
Figura 4	Paciente 10: Melhora clínica significativa depois de 3 meses de tratamento	78
Figura 5	Paciente 2: Melhora clínica mínima depois de 6 meses de tratamento	78
Figura 6	Paciente 7: Melhora clínica significativa depois de 6 meses de tratamento	79
Figura 7	Paciente 10: Melhora da firmeza da pele (efeito <i>lifting</i>) depois de 6 meses de tratamento.....	79
Figura 8	Paciente 10: Cura completa das ceratoses actínicas após 6 meses de tratamento.....	80
Figura 9	Paciente 10: Reação inflamatória intensa no pós-tratamento imediato.....	81
Figura 10	Paciente 10: Descamação intensa após 10 dias de tratamento.....	82
Figura 11	Elastose solar difusamente dispersa na derme superficial antes do tratamento (HE – pequeno aumento).....	84
Figura 12	Close da Figura 1	84
Figura 13	Fibras colágenas entre material elastótico na derme superficial depois 3 meses de tratamento (HE – grande aumento).....	86
Figura 14	Área de fibras colágenas bem definidas, em faixa, abaixo da membrana basal depois de 6 meses de tratamento (HE – médio aumento)	86
Figura 15	Diminuição da compactação das fibras elásticas após 3 meses de tratamento. A: pré-tratamento e B: pós-tratamento (orceína – médio aumento)	87
Figura 16	Derme papilar ocupada por fibras elásticas finas, dispostas predominantemente em sentido perpendicular à superfície	

	epidérmica após 3 meses de tratamento (orceína- grande aumento).....	87
Figura 17	Leve marcação (coloração por fosfatase alcalina - cor rosa) de MMP-9 na derme, ao redor do folículo piloso, antes do tratamento (imuno-histoquímica grande aumento),.....	89
Figura 18	Leve marcação de fibras colágenas tipo I (coloração por fosfatase alcalina - cor rosa), entremeando a área de elastose solar, na derme reticular, antes do tratamento (imuno-histoquímica médio aumento)	90
Figura 19	Marcação (coloração por fosfatase alcalina - cor rosa) moderada a intensa de MMP-9 na derme papilar e reticular, próximo ao infiltrado inflamatório, após 3 meses de tratamento (imuno-histoquímica – médio aumento)	93
Figura 20	Moderada marcação de colágeno tipo I (coloração por fosfatase alcalina - cor rosa), na derme reticular, após 3 meses de tratamento (imuno-histoquímica médio aumento)	94
Figura 21	Moderada a intensa marcação de colágeno tipo I (coloração por fosfatase alcalina - cor rosa), na derme reticular, após 6 meses de tratamento (imuno-histoquímica - médio aumento)	94
Figura 22	Aumento da densidade das fibras colágenas na derme superior, entremeando as áreas de elastose, após 6 meses de tratamento, pela coloração picro sirius em microscopia com luz polarizada – médio aumento	101
Gráfico 1	Média das fibras elásticas e colágenas pela morfometria antes e depois do tratamento.....	100
Quadro 1	Atividade das MMPs nas alterações dermatológicas e na TFD	47
Quadro 2	Grau de Melhora Clínica (textura, rugas, firmeza) após 3 e 6 meses de tratamento.....	77
Quadro 3	Correlação da Melhora Clínica com o aumento da expressão de MMP-9 e colágeno I na derme induzido pela MAL-TFD.....	96
Quadro 4	Correlação da melhora clínica com a variação da expressão da MMP-9 e colágeno tipo I, à imuno-histoquímica, durante as fases do tratamento.....	99

Tabela 1	Efeitos Colaterais (n=14).....	82
Tabela 2	Modificações na intensidade da coloração de MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-12 e TIMP pela imuno-histoquímica durante o tratamento	91
Tabela 3	Modificações na intensidade da coloração de Colágeno tipo III pela imuno-histoquímica durante o tratamento	92
Tabela 4	Modificações na intensidade da coloração de Colágeno tipo I pela imuno-histoquímica durante o tratamento	97
Tabela 5	Modificações na intensidade da coloração de MMP-9 pela imuno-histoquímica durante o tratamento	98
Tabela 6	Estatísticas descritivas das fibras colágenas pela morfometria antes e depois do tratamento.....	102
Tabela 7	Estatísticas descritivas das fibras elásticas pela morfometria antes e depois do tratamento.....	102

1 INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica usada no tratamento de vários tumores malignos. Na dermatologia, está indicada no tratamento do câncer de pele não melanoma. Mais recentemente, vem sendo utilizada para dermatoses não neoplásicas, como nas alterações relacionadas ao fotoenvelhecimento. A relativa simplicidade do método desperta interesse dos dermatologistas. Essa terapia induz a citotoxicidade das células proliferativas por meio de uma fonte de luz, sendo necessário um agente fotossensibilizante e oxigênio. O advento de drogas de uso tópico, como o ácido 5 - aminolevulínico (ALA) e seu derivado lipofílico, o metilaminolevulinato (MAL), permitiu o desenvolvimento dessa técnica. O ALA ou MAL são precursores dos derivados porfirínicos fotossensíveis, que se acumulam, preferencialmente, em células neoplásicas (Fritsch *et al.*, 1998).

A TFD é uma boa indicação para ceratoses ou queratoses actínicas (QA), carcinoma basocelular (CBC) e doença de Bowen, pois proporciona melhora clínica semelhante aos tratamentos convencionais e permite tratamento de múltiplos tumores simultaneamente, com rápida recuperação. Além da boa tolerância do paciente, tem excelente resultado cosmético (Braathen *et al.*, 2007).

Estudos clínicos sobre TFD no tratamento do câncer de pele não melanoma relatam melhora da textura e da cor da pele no campo de tratamento, sobre a lesão e na região perilesional (Marmur *et al.*, 2004). Estudos histológicos, também em câncer de pele, citam que a fibrose que se forma após a TFD se estende além dos limites tumorais, medidos antes da realização do tratamento, mostrando haver uma

remodelação da derme (Fink-Puches et al., 1998). Esses achados clínicos e histopatológicos incentivaram estudos das fibras elásticas, colágenas e das metaloproteinases (MMPs) na pele fotodanificada, uma vez que, atualmente, a indicação da TFD no fotoenvelhecimento baseia-se, apenas, em relatos de melhora clínica. Além disso, estudos *in vitro* sobre ação da TFD em fibroblastos de pele normal e com esclerodermia, revelaram o aumento de MMP-1 e MMP-3, com diminuição da síntese de colágeno tipo I (Karrer et al., 2003). Esse efeito anti-fibrótico encontrado seria o oposto do que desejaríamos na remodelação da pele fotodanificada. Portanto, para avaliarmos os possíveis efeitos da TFD na pele fotodanificada, fez-se necessário o estudo da matriz extracelular (MEC), bem como das MMPs envolvidas na remodelação dérmica e no fotoenvelhecimento.

O tecido conjuntivo da derme é mantido em condições normais através de um controle entre a degradação das proteínas da MEC e a síntese de novos componentes. As MMPs envolvidas no processo de remodelação tecidual da pele fotodanificada incluem as MMP-1, 3, 7, 9 e 12. A MMP-1 cliva, principalmente, os colágenos I e III. A MMP-3 degrada o colágeno IV, proteoglicanos, fibronectina, laminina e gelatinas. Além da elastina, a MMP-7 também degrada colágeno IV, proteoglicanos, fibronectina e laminina. A MMP-9 é uma gelatinase que degrada colágenos tipo IV, V, VII, X, XI, e também colágeno desnaturado, chamado de gelatinas. A MMP-12 é uma enzima ativa contra elastina, e está aumentada no fotoenvelhecimento (Mauch *et al.*, 1988; Nagase e Woessner, 1999).

Mecanismos não relacionados com o efeito citotóxico da TFD, e provavelmente associados à resposta inflamatória, poderiam justificar a atuação da TFD em doenças onde a citotoxicidade não seja o mecanismo desejado. Embora as avaliações clínicas e histológicas da TFD no câncer de pele não melanoma estejam

vastamente documentadas, raros são os relatos das modificações histológicas na pele fotodanificada na ausência de tumor.

Acreditamos que o estudo das modificações dérmicas induzidas pela TFD na pele fotodanificada poderá contribuir para o entendimento do mecanismo de ação da TFD em indicações não neoplásicas, como no rejuvenescimento fotodinâmico. Desta forma, desenvolvemos um projeto como parte da linha de pesquisa do Grupo de Envelhecimento Cutâneo da Dermatologia Corretiva do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF).

2 OBJETIVOS

- ✓ Avaliar as alterações clínicas induzidas pela TFD na pele fotodanificada, através de exame dermatológico e estudo fotográfico.
- ✓ Verificar as alterações morfológicas e quantitativas ocorridas na remodelação dérmica induzida pela TFD na pele fotodanificada, através da histopatologia e morfometria.
- ✓ Avaliar através de estudo imuno-histoquímico a presença de metaloproteinases (MMPs 1, 3, 7, 9, 12), do inibidor tecidual de MMPs (TIMP-1) e colágenos tipo I e III.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Terapia fotodinâmica

3.1.1 Conceito

O uso de luz para tratamento de doenças é descrito há muitos séculos. Na sua forma mais simples, a pele é iluminada por uma fonte de luz apropriada, sendo denominada fototerapia. Nesses casos, como no manejo da icterícia neonatal, a emissão da luz isoladamente é suficiente para o benefício do paciente. A associação de luz e químicos para tratar doenças da pele é amplamente praticada na dermatologia. Esse processo é chamado de fotoquimioterapia, e o melhor exemplo é a associação de psoraleno e a ultravioleta A (PUVA) (Taylor e Brown, 2002).

A TFD poderia ser considerada uma forma especial de fotoquimioterapia. É definida como uma reação fotoquímica utilizada com objetivo de causar destruição seletiva de um tecido. É uma técnica terapêutica de duas etapas, na qual a utilização de uma droga sensibilizante, tópica ou sistêmica, é seguida da irradiação de uma luz visível. Para que essa reação ocorra é necessário um fotossensibilizante localizado no tecido alvo, uma fonte de luz e a presença de oxigênio. Os fotossensibilizantes, administrados exogenamente ou formados endogenamente, são ativados pela luz e transferem energia ao oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio para induzir morte celular (Kurwa e Barlow, 1999; Kalka *et al.*, 2000). A natureza, a localização, a quantidade de espécies reativas de oxigênio e a sensibilidade da célula alvo determinam o resultado da TFD (Qiang *et al.*, 2006).

A TFD tem eficácia comprovada no tratamento de vários tumores, e é considerada promissora para tratamento de algumas doenças não malignas. Para tratamento de tumores do trato gastrointestinal, cerebral ou tumor broncopulmonar, os fotossensibilizantes são administrados via oral ou endovenosa. Para tumores do endométrio e carcinoma da bexiga, por instilação predominantemente, e para tratamento de tumores cutâneos, as drogas podem ser aplicadas topicamente, com boa eficácia (Fritsch *et al.*, 1998).

3.1.2 Histórico

Relatos sobre o uso de luz com propósito medicinal iniciou-se há milhares de anos, nas culturas indiana e oriental. Hipócrates estudou e prescreveu luz com intenção terapêutica. Em 1903, Finsen recebeu o Prêmio Nobel por iniciar uma nova era de terapia por luz, acreditando ser um tratamento promissor (Allison *et al.*, 2006).

A TFD tem origem no início do século XX, em Munique, quando Oscar Raab e seu professor Herman von Tappeiner observaram os efeitos decorrentes de fotossensibilização em paramécio. Raab observou a morte rápida de *Paramecium caudatum* depois da exposição à luz na presença do corante acridina (*acridina orange*). Durante seus experimentos sobre a morte de paramécios com corante, a luz de uma tempestade modificou o resultado da pesquisa, levando a morte desses protozoários. A presença da luz, modificando a ação do corante, permitiu a identificação de um fotossensibilizante. Da mesma forma, pela observação da luminosidade emitida pelo paramécio, sob certa intensidade da luz, surgiu o conceito de fluorescência. Subseqüentemente, seu professor von Tappeiner ampliou as descobertas com outros experimentos e descobriu a necessidade da presença do

oxigênio para a reação, criando o termo TFD. Em 1907, von Tappeiner e Jodlbauer publicaram um livro texto sobre essa terapia, definida como processo de fotossensibilização dependente de oxigênio, no tratamento de tumor cutâneo e destruição de partículas infecciosas. Descreveram suas experiências com eosina tópica a 5% e luz artificial para tratamento de câncer cutâneo não melanoma e para outras dermatoses, como lupus vulgar e condiloma plano. Nessa época, postularam a idéia de que a eosina, assim como a acridina, depois de incorporada à célula, poderia produzir reação citotóxica quando exposta a fonte de luz adequada, na presença de oxigênio. Infelizmente, na época, este importante trabalho não alcançou uma repercussão merecida (Taub, 2004b).

Em 1911, Hausman e colaboradores (apud Kalka, 2000) relataram o uso de hematoporfirina (Hp) e seus efeitos como fotossensibilizante em porcos e camundongos. A capacidade das porfirinas de localizar tumor foi revelada por Policard em 1924 (apud Kalka, 2000), por Auler e Bamzer em 1942 (apud Kalka, 2000), e por Figge, Weiland e Manganiello em 1948 (apud Kalka, 2000). Esses investigadores descreveram a fluorescência do tecido neoplásico depois da aplicação de Hp. No início da década de 60, uma nova droga foi sintetizada a partir da purificação da Hp, chamado derivado de Hematoporfirina (HpD). Em 1970, foram relatadas respostas clínicas com o uso desse fotossensibilizante em diferentes lesões malignas, incluindo câncer da mama, cólon, próstata, micose fungóide, câncer basocelular e espinocelular, melanoma, condrossarcoma e angiossarcoma. A expansão clínica da TFD ocorreu após o trabalho pioneiro de Dougherty e colaboradores (apud Kalka, 2000) que relataram o sucesso da técnica para tratamento do câncer cutâneo e outras malignidades em 1978. Desde então, a TFD vem ganhando grande interesse em medicina para tratamento de tumores

localizados no pulmão, esôfago, cólon, peritônio, pleura, trato genito-urinário, cérebro, olho e pele. A fotossensibilidade prolongada com o uso de drogas sistêmicas, a obtenção de cura com métodos mais práticos e a escassez de literatura médica dificultaram a prática dessa técnica em dermatologia até 1990 (Kalka *et al.*, 2000). Nessa época, no Canadá, o porfimer sódico foi a primeira droga aprovada para uso terapêutico. Kennedy e colaboradores (Kennedy *et al.*, 1990) propuseram um novo método, utilizando ALA tópico como precursor metabólico de fotossensibilizante endógeno, a protoporfirina IX (Pp IX). A Pp IX é um potente agente fotossensibilizante e é degradado durante o processo de irradiação com fonte de luz específica. A TFD com uso de ALA tópico induz fotossensibilização seletiva na área cutânea desejada, em lesões superficiais como ceratose actínica (Kalka *et al.*, 2000).

O fácil acesso da pele à exposição luminosa permite grande aplicabilidade dessa técnica em dermatologia. Inúmeros estudos revelam resultados clínicos e histológicos, com respostas parcial ou completa em tratamentos de lesões pré-malignas e malignas. Mais recentemente, avaliações do potencial benéfico para distúrbios cutâneos não malignos, como psoríase vulgar, infecção viral e acne, e fotoenvelhecimento têm sido relatadas (Morton *et al.*, 2002; Gupta e Ryder, 2003; Gold e Goldman, 2004).

3.1.3 Fotossensibilizantes em Terapia Fotodinâmica

A fotobiologia e a fotoimunologia do HpD e seu agente purificado, liofilizado e concentrado, o porfimer sódico (Photofrin®), têm sido investigadas nos últimos 30 anos. Entretanto, o interesse pela TFD na dermatologia não cresceu até 1990,

quando uma nova técnica de aplicação tópica de fotossensibilizantes tornou-se disponível. A utilização de ALA e MAL, seguida da irradiação de luz vermelha de amplo espectro tornou-se um método simples e eficaz. Na mesma época, algumas novas drogas sintéticas sensibilizantes de segunda geração foram desenvolvidas (derivados de benzoporfirinas, fitalocianinas, clorinas e porfíricos). Esses compostos químicos são eficazes, seletivos e seguros. Eles estão em fase de avaliação clínica, mas não aprovados para uso clínico, até o momento (Calzavara-Pinton *et al.*, 2007).

A qualidade do fotossensibilizador é importante para a eficácia da TFD. Entre as características ideais estão a pureza química, a capacidade de localização específica em tecido neoplásico, o intervalo pequeno entre a administração da droga e o acúmulo máximo no tumor, a meia vida curta, a eliminação rápida do tecido normal, a ativação por comprimentos de ondas com ótima penetração no tecido alvo e a capacidade de produzir grande quantidade de produtos citotóxicos (Kalka *et al.*, 2000). Os fotossensibilizantes são seletivos por penetrarem e se acumularem no tumor e no endotélio dos vasos neoformados, evitando, geralmente, o tecido sadio ao redor. O mecanismo de penetração através das membranas celulares e o padrão de localização intracelular influenciam fortemente o tipo de efeito celular. Em geral, os agentes sensibilizantes lipofílicos são captados pela célula por penetrarem diretamente pela membrana plasmática, e esta captação aumenta em proporção direta com a lipofilicidade. As moléculas hidrossolúveis, entretanto, são captadas por pinocitose. A seletividade do sensibilizante depende da sua capacidade de captação e retenção tanto pelas células tumorais hiperproliferativas como pelas células inflamatórias. Essa propriedade pode ser melhorada com a associação de alguns componentes biológicos ou farmacológicos, tais como lipossomos de fosfolípidos.

Outra maneira para aumentar a penetração dos sensibilizantes seria ligá-lo a moléculas de lipoproteínas de baixa densidade, uma vez que as células tumorais apresentam grande número de receptores de superfície para essas lipoproteínas (Calzavara-Pinton *et al.*, 2007).

Até o momento, não são bem esclarecidos os mecanismos pelos quais ocorre retenção seletiva dos fotossensibilizantes nos tecidos malignos. Algumas hipóteses incluem a permeabilidade alterada da membrana celular, o aumento do número e da permeabilidade dos vasos sanguíneos, bem como a drenagem linfática diminuída. Além disso, o pH baixo no fluido intersticial nos tumores facilita a biodistribuição seletiva dos fotossensibilizantes (Torezan, 2002).

Os fotossensibilizantes podem ser administrados por via sistêmica (oral e endovenosa) ou tópica. O desenvolvimento de fotossensibilizantes tópicos permitiu o tratamento eficaz da pele, com diminuição do tempo de fotossensibilização (Zelickson, 2005).

3.1.3.1 *Fotossensibilizantes sistêmicos*

A Hp e o porfimer sódico foram os primeiros fotossensibilizantes a serem sistemicamente utilizados em estudos clínicos de TFD. Apresentam espectro de absorção semelhante ao da PpIX, com pequenos picos entre 625-633 nm (Calzavara-Pinton *et al.*, 2007). Na prática, o comprimento de onda de 630 é o mais utilizado. A luz é administrada 24 - 72 horas depois da injeção da droga e a fotossensibilidade cutânea permanece por 1 a 3 meses. O Photofrin[®] vem sendo usado para câncer de bexiga, pulmão, esôfago e estômago (Qiang *et al.*, 2006).

O ALA é o primeiro intermediário na via de biossíntese do grupo Heme,

sintetizado de glicina e succinato. Essa reação é catalisada pela enzima ALA sintetase. No citoplasma da célula, duas moléculas de ALA formam o porfobilinogênio (PBG) e quatro moléculas de PBG formam o uroporfirinogênio. Esse, então, é convertido em coproporfirinogênio e, novamente no interior da mitocôndria, em protoporfirinogênio IX. O protoporfirinogênio IX converte-se em Pp IX por ação da protoporfirinogênio oxidase. O passo final da síntese do heme é a incorporação do ferro à Pp IX, pela ferroquelatase. A Pp IX é o intermediário porfirínico com atividade fotodinâmica e emite fluorescência vermelha intensa quando ativada por luz. O acúmulo de Pp IX induzido de parte do ALA exógeno é utilizado com finalidade terapêutica. O ALA pode ser administrado tópicamente ou sistemicamente, e o acúmulo de Pp IX nas células tumorais ocorre com as duas vias. Estudos em animais e voluntários humanos provaram que a Pp IX é eliminada do organismo entre 24 – 48 horas após a administração do ALA, por via tópica, oral ou endovenosa. Assim os riscos de fotossensibilidade prolongada são desprezíveis (Kurwa e Barlow, 1999).

O ALA, por si só, não é um agente fotossensibilizante, e depois de sua administração sistêmica, as porfirinas derivadas do ALA são sintetizadas predominantemente pela medula óssea e pelo fígado. A Pp IX pode ser sintetizada localmente por todas as células nucleadas e é detectada na epiderme em 3 – 8 horas depois da administração sistêmica do ALA. Doses terapêuticas de ALA (30 a 60 mg/Kg) estão associadas à náusea e vômito, e mais raramente, com alteração da função hepática (20 – 25% dos casos) (Kurwa e Barlow, 1999).

A fotossensibilização por ALA foi demonstrada em 1987. Subseqüentemente, Kennedy e colaboradores (Kennedy *et al.*, 1990) introduziram o uso de ALA-TFD para desordens cutâneas relatando sucesso de tratamento de

várias lesões malignas da pele. A administração sistêmica do ALA é usada predominantemente para tratamento de tumores gastrointestinais, broncopulmonares e cerebrais, enquanto a TFD com ALA tópico representa uma das técnicas de TFD mais populares em Dermatologia (Kalka *et al.*, 2000).

3.1.3.2 *Fotossensibilizantes tópicos*

Em dermatologia, a TFD com ALA tópico tem aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration) para tratamento de QA, desde 1999. Para tratamento de CBC e doença de Bowen, os resultados são variados na literatura. Vários estudos relatam, ainda, sucesso terapêutico para acne e fotorejuvenescimento, com diferentes protocolos, não existindo, entretanto, aprovação pelo FDA para essas outras indicações (Farah *et al.*, 2005).

O ALA é hidrofílico, e nas células de mamíferos penetra principalmente por mecanismo de transporte ativo. A taxa de transporte de ALA através da membrana plasmática é o único limite do acúmulo de porfirinas fluorescentes nas células tratadas. Esse sistema requer energia, depende do pH e da temperatura, é saturável e lento, sendo somente pouco mais acelerado em células tumorais. O ALA aplicado topicamente penetra na epiderme anormal, mas existem divergências sobre o melhor veículo a ser utilizado. Formulações podem ser feitas em água/óleo, óleo/água, e propilenoglicol. Os melhores resultados terapêuticos são obtidos com concentração entre 10 – 20%. A utilização de agentes coadjuvantes pode aumentar, direta ou indiretamente, a concentração de Pp IX na célula. Isto ocorre com a adição de agentes que inibem a ação da enzima ferroquelatase ou que aumentam a penetração do ALA no tecido, como ocorre com a desferroxamina, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o dimetilsulfóxido (DMSO) (Morton *et al.*, 2002).

O MAL é um derivado esterificado do ALA, é lipofílico e apresenta maior seletividade às células neoplásicas, quando comparado ao ALA. A maior lipofilicidade pode aumentar a eficácia por promover altos níveis de fototoxicidade induzida por Pp IX (Morton *et al.*, 2002). O MAL é transportado por mecanismo ativo e, também, por difusão passiva pela membrana. Esse mecanismo não requer energia e não é saturável, sendo eficiente principalmente nas células neoplásicas. A maior seletividade para células tumorais, detectadas por fluorescência da Pp IX, possa ser favorecida pela melhor penetração, através das membranas celulares quando comparado ao ALA. Logo após a penetração, o MAL é demetilado em ALA, e as etapas metabólicas subsequentes até a produção da PpIX intramitocondrial são as mesmas. O excesso de PpIX produzido na mitocôndria se difunde para o retículo endoplasmático e para a membrana plasmática, que são sítios de dano induzido pela TFD (Kalka *et al.*, 2000; Calzavara-Pinton *et al.*, 2007).

Existem relatos de que o transporte do ALA, mas não do MAL, seja mediado através de transportadores do ácido gama-aminobutírico (GABA). A captação do GABA nas terminações nervosas está relacionada à percepção da dor. Isto poderia explicar os relatos de que MAL-TFD seja menos dolorosa do que ALA-TFD (Langan e Collins, 2006). O MAL é aprovado para tratamento de QA bem como para tratamento de CBC na Europa desde 2001. Em 2004 foi aprovado para tratamento de QA nos EUA, e em 2006, aprovado no Brasil para QA e CBC superficial e nodular. Atualmente, a MAL-TFD está aprovada em muitos países da Europa, Ásia e Américas para QA, CBC e, também, para doença de Bowen. A TFD com MAL tem protocolo estabelecido, em que o preparo é realizado com curetagem superficial da lesão e aplicação do creme por um período de 3 horas com curativo oclusivo. Após este período, a lesão é iluminada com luz visível com comprimento de onda

vermelho (635 nm). Com o objetivo de avaliar eficácia da TFD no tratamento de QA e CBC, foram realizados vários estudos com acompanhamento de até 5 anos. (Freeman *et al.*, 2003; Zelickson, 2005).

3.1.3.3 *Outros fotossensibilizantes*

Os fotossensibilizantes de segunda geração têm alto coeficiente de absorção, e absorvem luz com comprimentos de onda no espectro de luz visível vermelha (660 – 700 nm) até próximo do infravermelho (700 – 850 nm). No espectro entre 700- 850 nm, a absorção na pele é aproximadamente de 20 mm, tendo maior capacidade de penetração, quando comparado às outras fontes de luz usadas para ALA ou MAL. Além disso, com este comprimento de onda seria possível tratar lesões pigmentadas, como metástase de melanoma (Kalka *et al.*, 2000).

As clorinas são um grupo heterogêneo de porfirinas ou moléculas semelhantes à clorofila e incluem o derivado da benzoporfirina (BPD), o N-aspartil-clorina e o tin-etil-etioporpurina). O BPD é um composto lipofílico com máxima absorção em 690 nm. Os CBC e carcinoma espinocelular (CEC) representam as principais indicações terapêuticas para esse grupo de medicamentos. De acordo com a farmacocinética da droga, a irradiação do tumor pode ser realizada no mesmo dia da administração da BPD, após 30 a 150 minutos da aplicação endovenosa. Pela rápida eliminação dos tecidos, a fotossensibilidade cutânea dura poucos dias após sua administração (Kalka *et al.*, 2000).

O N-aspartil-clorina e 6 (NPe6) é um fotossensibilizante sistêmico, solúvel em água com absorção máxima em 664 nm, que penetra na célula via endocitose e acumula-se predominantemente em lisossomas. A luz deve ser aplicada 4-8 horas

depois da injeção. Estudos encorajam seu uso em várias malignidades, incluindo adenocarcinoma da mama, e CBC e CEC (Kalka *et al.*, 2000).

O tin-etil-etioipurina (Sn ET₂) é uma molécula similar à clorofila com excitação máxima em 660 nm. A irradiação deve ser feita 24 - 72 horas depois da infusão. O fotossensibilizante é eliminado da pele em poucos dias após o tratamento, entretanto reações cutâneas podem ocorrer em meses após a TFD. Sn Et₂ pode ser usado para tratamento de CBC, doença de Bowen, metástase cutânea, de câncer de mama e Sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS (Kalka *et al.*, 2000).

Os porfíricos, isômeros sintéticos de porfirinas que absorvem a luz entre 550 - 650 nm, levam a remissão do tumor de forma superior à obtida com o Porfimer sódico (Fritsch *et al.*, 1998).

As fitalocianinas são porfirinas sintéticas e possuem absorção entre 675 – 700 nm. São administradas sistemicamente e induzem a fotossensibilidade por 1 – 7 dias, sendo pouco usadas em Dermatologia (Kurwa e Barlow, 1999).

Os fotossensibilizantes do futuro são chamados de substâncias de terceira geração. Essas estruturas apresentam características próprias que as diferenciam dos primeiros fotossensibilizantes. Entre as novas substâncias, está um grupo que combina o fotossensibilizante com um anticorpo monoclonal direcionado ao tumor. Outra nova geração combina um fotossensibilizante com uma parte radioativa, obtendo-se, desta forma, o efeito cumulativo de dano tumoral por TFD e por radiação. Neste último caso, o paciente receberia uma dose de radiação, podendo apresentar o risco de mielossupressão. A evolução dos fotossensibilizantes inclui o desenvolvimento de substâncias que possam atuar especificamente sobre uma proteína expressa em uma determinada célula tumoral, oferecendo um tratamento altamente específico contra um alvo de uma região anormal. Um próximo passo

inclui a introdução de um vetor dentro do tumor, e a criação de um fotossensibilizante destinado a eliminar este vetor. Desta forma, eliminando a malignidade como uma partícula infecciosa. Futuramente, o controle da localização do fotossensibilizante pode permitir a limitação da destruição celular, sem causar dano à membrana externa, e sem induzir resposta inflamatória (Calzavara-Pinton *et al.*, 2007).

3.1.4 Fontes de luz

Diversas fontes de luz podem ser usadas na TFD tópica. A absorção máxima da luz pelas porfirinas está próxima de 405 nm. Essa faixa de absorção máxima é denominada de *Soret Band*. Outros picos menores de absorção, chamados de *Q-bands* encontram-se em 510, 545, 580 e 630 nm. Embora as “Q-bands” sejam 10 a 20 vezes menores do que a *Soret Band*, a maioria dos estudos clínicos são realizados com luz de comprimentos entre 625 a 633 nm, que permitem maior penetração na pele. Além dos lasers, fontes de luz não coerentes são usadas com sucesso. Vários protocolos com diferentes fontes de luz e tempo de aplicação do fotossensibilizante tópico são descritos na literatura (Kalka *et al.*, 2000).

As fontes de luz disponíveis para TFD pertencem a três grandes grupos: as lâmpadas de amplo espectro, as lâmpadas de diodo e os lasers. As fontes de luz não coerentes descritas em estudos clínicos em TFD incluem as lâmpadas halógenas projetoras de diapositivos, as lâmpadas de diodo (LED), e mais recentemente luz intensa pulsada (LIP) (Zelickson, 2005).

Os lasers e as lâmpadas não coerentes são capazes de emitir luz com comprimento de onda coincidente com os picos de absorção do agente

fotossensibilizante escolhido. Muitos estudos, com lâmpadas não coerentes, relatam excelentes resultados clínicos para TFD em Dermatologia. Atualmente, é enorme a variedade de equipamentos que emitem luzes não coerentes, com espectro de emissão de luz coincidente com os picos de absorção da Pp IX. Apesar da maior ativação da Pp IX ocorrer com comprimento de onda azul, a maior penetração da luz na pele ocorre com comprimento de onda vermelha, tornando esse comprimento mais eficaz para TFD tópica, principalmente para tratamento de lesões mais profundas (Qiang *et al.*, 2006).

Luz com comprimento de onda de 635 nm é capaz de penetrar na pele em aproximadamente 6 mm, comparando com 1 a 2 mm do comprimento de onda entre 400-500 nm. A profundidade terapeuticamente efetiva, entretanto, parece estar próxima de 1-3 mm, quando utilizamos 635 nm. Isto se deve à capacidade de produção de uma reação fotodinâmica, a qual dependerá da dose de luz e, também, da quantidade de fotossensibilizante no tecido alvo (Morton, 2004).

As fontes ideais para TFD tópica incluem as que iluminam grandes áreas, capazes de fazer um tratamento de campo. Para destruição de tecido neoplásico, utilizando-se uma lâmpada de luz vermelha de amplo espectro (580-700 nm), uma dose de luz de 100-150 J/cm² (100-200 mW/cm²) deve ser escolhida. Para uma emissão de luz de menor espectro de um sistema de LED (com variação de 30 nm no espectro), a dose é muito menor, 37-50 J/cm². A intensidade da luz não deve exceder 200 mW/cm² para evitar efeitos térmicos. Para tratamento de doenças inflamatórias, entretanto, uma dose de luz vermelha de amplo espectro, entre 10-40 J/cm², com intensidade de luz de 50-70 mW/cm², é recomendada (Babilas *et al.*, 2005).

O laser apresenta um comprimento de onda específico correspondente ao

pico de absorção do fotossensibilizante. Sua capacidade de emissão de luz monocromática de alta fluência, associada à precisão do foco, permite tratar pequenas lesões, com mínimo dano ao tecido ao redor, e em curto intervalo de tempo. Os lasers são necessários para TFD no tratamento de tumores de órgãos internos ou também são usados nas investigações dos sensibilizantes de segunda geração. Entretanto, para o tratamento de condições dermatológicas com TFD e sensibilizantes a base de protoporfirinas, os lasers não apresentam vantagens sobre os equipamentos mais baratos e práticos, como as fontes de luz não coerentes. Esses últimos conseguem emitir grande campo de irradiação, possibilitando tratar maior área da superfície cutânea (Qiang *et al.*, 2006; Calzavara-Pinton *et al.*, 2007).

Os chamados lasers de corante (*Dye Lasers*) são os mais utilizados para TFD, uma vez que podem ser ajustados para produzir comprimentos de onda entre 630-690 nm. Esses *Dye Lasers* são bombeados por um segundo aparelho, que gera energia para excitar o meio ativado (corante). Lasers como argônio, vapor de cobre, Neodímio YAG de dupla frequência, são usados com essa função. O laser de vapor de ouro que emite luz em 628 nm, também pode ser usado na TFD (Kalka *et al.*, 2000; Torezan, 2002).

3.1.5 Mecanismo de ação

A TFD envolve a administração de um agente fotossensibilizante em um tecido tumoral, seguido da ativação deste agente por uma luz com comprimento de onda específico. O tratamento consiste em duas etapas e resulta em uma seqüência de processo fotoquímico e fotobiológico que causa um dano irreversível do tecido tumoral (Dougherty *et al.*, 1998). Na primeira etapa, o agente fotossensibilizante

acumula-se, preferencialmente nas células tumorais após sua administração tópica ou sistêmica. Na segunda, o tumor fotossensibilizado é exposto à luz de comprimento de onda que coincide com o espectro de absorção do agente fotossensibilizante. Este agente ativado transfere energia ao oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS)*. A subsequente oxidação dos lipídios, aminoácidos e proteínas induzem a necrose e apoptose. Além disso, os ROS, indiretamente, estimulam a transcrição e liberação de mediadores da inflamação (Calzavara-Pinton *et al.*, 2007).

Durante a TFD, o agente fotossensibilizante ligado ao tumor é ativado na presença de luz, saindo do estado de repouso para o estado de ativação, chamado de *singlet*. Nessa etapa, as moléculas podem retornar ao estado de repouso, por meio de liberação de fótons, ou progredirem na cadeia de reações químicas até atingirem o estado *triplet*. No estado *triplet*, as moléculas podem sofrer dois tipos de reações: na reação tipo I, as moléculas interagem diretamente com substratos biológicos para formar radicais livres; na reação tipo II, predominante na TFD, as moléculas transferem sua energia para o oxigênio intracelular, formando oxigênio *singlet*, altamente reativo, induzindo a morte celular. A oxidação dos constituintes celulares pelas espécies reativas de oxigênio danifica as membranas plasmáticas e as organelas celulares, com subsequente alteração de permeabilidade e função de transporte entre os meios intra e extracelular. A inibição de enzimas mitocondriais parece ser o evento chave na morte por TFD (Morton, 2004).

A maioria dos sensibilizantes utilizados em TFD não se acumula no núcleo celular e, por isso, a TFD geralmente tem baixo potencial em causar dano ao DNA, mutações e carcinogênese (Torezan, 2002).

* será escrito em inglês por não haver acrônimo consagrado na língua portuguesa

Robert Bissonnette e colaboradores (Bissonnette *et al.*, 2004a) revisaram a segurança e eficácia da TFD-ALA para tratamento QA. O potencial carcinogênico foi avaliado por estudo em que ratos foram tratados apenas com ALA, apenas com luz azul ou a associação de ALA e luz azul, semanalmente, por 10 meses. Após o tratamento, a observação por 2 meses não revelou aparecimento de tumor cutâneo em nenhum rato, em nenhum dos protocolos realizados.

Apesar da TFD com ALA ser rotineiramente administrada para o tratamento de QA, poucos são os estudos que avaliam os efeitos dessa terapia nas células da epiderme. Bissonnette e colaboradores (Bissonnette *et al.*, 2004b) estudaram a influência da irradiância e da dose de luz na localização e extensão do fotodano na pele do rato após a TFD com ALA. A localização histológica do fotodano foi influenciada pela irradiação e pela dose da luz. Com alta irradiância e baixa fluência, as células fotodanificadas foram principalmente localizadas na parte superior da epiderme; enquanto com baixa irradiância e alta fluência, toda a epiderme tornou-se necrótica depois de 24h da exposição à luz. A intensidade da fluorescência de Pp IX foi similar nas camadas superior e inferior da epiderme duas horas após injeção intraperitoneal de ALA.

Uma resposta apoptótica à TFD foi relatada por Agarwal e colaboradores em 1991 (Agarwal *et al.*, 1991). Estudos utilizando microscopia de fluorescência sugerem que a fotossensibilidade mitocondrial seja o principal motivo de morte celular induzida pela TFD. Independente da exata localização do efeito citotóxico, a consequência é a perda da integridade celular, havendo a liberação de fatores inflamatórios e a ativação em cascata do sistema complemento. As células malignas frequentemente deixam de caminhar para a apoptose, como mecanismo de proteção durante a quimioterapia. A apoptose é o mecanismo por onde o organismo inicia

morte celular através de um processo que é parte de um aparato genético. O resultado final é a fragmentação do DNA nuclear e a dissociação da célula em partículas da membrana e mínima liberação de produtos inflamatórios. A TFD pode iniciar diretamente uma resposta apoptótica, sem precisar de vias de transdução de sinais intermediários que podem faltar em certas células neoplásicas resistentes a drogas. A morte celular por TFD não parece depender da fase do ciclo da célula ou de fatores genéticos (ex: gen p 53) (Dougherty *et al.*, 1998).

O mecanismo de apoptose depois da TFD vem sendo explicado em relatos que indicam uma associação entre fotodano mitocondrial e resposta apoptótica. Sabe-se que a liberação de citocromo C e de outros fatores mitocondriais no citoplasma pode desencadear uma resposta apoptótica, efeito que também pode ser produzido pelo aumento da permeabilidade mitocondrial. Quando a TFD atua diretamente contra sítios sub-celulares que incluem mitocôndria, lisossoma, proteína Bcl-2 e retículo endoplasmático ocorre, geralmente, uma resposta apoptótica, levando à morte celular. Existem relatos de que os fotossensibilizantes que têm como alvo a membrana plasmática, levam ao atraso ou inibição da apoptose, mesmo que outros sítios sub-celulares também sejam alvos do fotodano. Estudos indicam que esses resultados foram associados com fotodano à caspase-3, principal elemento da fase de execução da apoptose (Kessel *et al.*, 1995; Kessel, 2002; Usuda *et al.*, 2003).

A reação tumoricida, *in vivo*, depois da TFD é acompanhada por uma resposta imune complexa. Recentemente, foi demonstrado que a TFD pode modular a expressão de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) nos tumores e nos tecidos normais *in vivo*. Os alvos da TFD incluem as células tumorais, a microvasculatura do leito tumoral, bem como a microvasculatura normal, e os

sistemas inflamatório e imune do hospedeiro. Parece claro que a combinação de todos esses componentes é necessária para um controle do tumor a longo prazo. O dano vascular contribui para o controle do tumor. A falta de oxigênio no tecido tumoral pode ser um limite para a morte celular através da TFD (Dougherty *et al.*, 1998).

Através da TFD, um processo iniciado em nível da membrana plasmática envolve transdução de sinais. Isto inclui a expressão aumentada de proteínas de *stress* e ativação de genes de regulação de processo apoptótico e, possivelmente, uma regulação aumentada da expressão de genes de algumas citocinas. A fotooxidação da membrana lipídica ativa as fosfolipases da membrana, ocasionando a degradação e a liberação de fragmentos lipídicos e metabólitos do ácido aracdônico. Diferenças na natureza e intensidade da reação inflamatória entre o tecido normal e o tecido maligno podem contribuir para a seletividade do dano tecidual induzido por TFD. A principal característica do processo inflamatório é a liberação de substâncias vasoativas, componentes do complemento, proteinases, peroxidases, citocinas, fatores de crescimento e outros imunorreguladores. A expressão do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) de IL-6 foi encontrada em tumores de ratos tratados com TFD. Existem evidências também do aumento da regulação de interleucina 1 beta (IL-1beta), interleucina 2 (IL-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa) e fator estimulador de colônia de granulócito (G-CSF) (Dougherty *et al.*, 1998).

Alterações histopatológicas induzidas pela TFD no CBC e na doença de Bowen foram relatadas recentemente por Fantini e colaboradores (Fantini *et al.*, 2008). Relatam que 15 minutos após a TFD, um dano difuso da epiderme pode ser observado (edema e vacuolização dos ceratinócitos). A derme superficial e média

mostrou infiltrado inflamatório misto de polimorfonucleares e mononucleares com extravasamento de hemáceas. Em ambos os tumores, a completa necrose da epiderme foi observada depois de 24 horas. A maioria das células neoplásicas encontra-se danificada (núcleo picnótico e citoplasma eosinofílico homogêneo), neste período. Depois de uma semana, a epiderme se regenera. Algumas células não danificadas puderam ser detectadas na superfície e na profundidade, circundadas por intenso infiltrado inflamatório, por mecanismo não esclarecido. Após, 2, 4 e 8 semanas, uma completa reconstituição da epiderme e fibrose dérmica foram encontradas. Um marcador de apoptose, a caspase-3, foi identificado precocemente, revelando células apoptóticas após 1 hora da TFD. Essas células apoptóticas aumentaram em um período de até 24 horas após a terapia. Entretanto, não estavam mais presentes após 48 horas. O estudo sugere que o principal mecanismo de ação da TFD está relacionado ao dano citotóxico direto às células malignas. O envolvimento da apoptose é demonstrado simultaneamente pelo aparecimento de marcadores histológicos e imuno-histoquímicos presentes na fase inicial da reação fotodinâmica. Os autores citam, ainda, que outros estudos não mostraram a presença de células apoptóticas tão precocemente.

3.1.6 Aplicação em Dermatologia

3.1.6.1 *Queratose Actínica*

A QA pode ser considerada uma lesão pré-maligna, evoluindo para CEC, em aproximadamente 5% a 20% dos casos, ao longo de 10 a 25 anos, com um índice de transformação anual variando entre 0,25% a 16%. Entre os tratamentos utilizados, atualmente, estão a criocirurgia, a curetagem, a eletrocoagulação, a

excisão cirúrgica, a dermo-abrasão, a quimioterapia, a laserterapia e a TFD (Braathen *et al.*, 2007).

A TFD para tratamento de QA foi aprovada pelo órgão regulatório americano, FDA, em 1999. Surge como uma modalidade promissora, uma vez que apresenta algumas vantagens em relação aos métodos anteriores. Em geral, a utilização da TFD tópica para tratamento das QA apresenta índice de cura entre 73% a 100%. Esses resultados são semelhantes aos tratamentos convencionais, entretanto com menos efeitos colaterais e menor tempo de recuperação (Goldman e Atkin, 2003; Braathen *et al.*, 2007). A TFD mostra-se eficaz na cura das QA em vários estudos, que serão citados a seguir, com tempo rápido de recuperação cutânea e excelente resultado cosmético (Marmur *et al.*, 2004).

No tratamento com ALA tópico (ALA-TFD), o fotossensibilizante pode ser usado em formulações com creme ou solução alcoólica. A fonte de luz pode ser um laser ou uma fonte de luz não coerente, como luz visível de comprimento de onda azul ou vermelha. ALA associado à luz azul tem se mostrado eficaz no tratamento de QA múltiplas (Piacquadio *et al.*, 2004). Nos estudos iniciais, o ALA deveria permanecer por um período de 14 – 18 horas de incubação, antes da iluminação. Estudos mais recentes sugerem que um período de incubação menor que 3 horas não mostra diferença na eficácia e segurança do tratamento (Alexiades-Armenakas e Geronemus, 2003). Outros autores citam eficácia também com tempo de incubação ainda menor, variando de 30 minutos à uma hora, para o tratamento das QA (Smith *et al.*, 2003; Touma *et al.*, 2004).

Alguns autores sugerem associações da TFD com outras terapias. Gilbert (Gilbert, 2005) cita a combinação sequencial de 5-fluorouracil e TFD. Estudo com 15 pacientes apresentando QA múltiplas na face mostrou a eficácia da utilização do

creme de 5-fluorouracil, uma vez à noite, por 5 dias antes da realização da TFD. Avaliações, após um mês e após um ano do tratamento, mostraram que 90% das QA tratadas sofreram remissão em 14 pacientes. Os autores concluem que a combinação de 5-fluorouracil antes de ALA-TFD, usando Luz Intensa Pulsada (IPL), é uma associação favorável no tratamento de QA múltiplas.

Estudos com MAL mostram maior penetração deste fotossensibilizante no tecido tumoral, quando comparado ao ALA (Fink-Puches *et al.*, 1998). Um estudo realizado por Freeman e colaboradores, 2003, mostra a eficácia de TFD com MAL no tratamento de QA, comparando com a crioterapia e placebo. Concluem que a TFD com MAL por 3 horas de oclusão, seguido da iluminação com fonte de luz de 570-670 nm de comprimento (dose total de 75 J/cm²), em 2 sessões com intervalo de 1 semana, foi ótima opção de tratamento. MAL-TFD foi estatisticamente mais eficaz do que placebo-TFD e mais do que um único ciclo de congelamento/descongelamento com spray de nitrogênio líquido (Freeman *et al.*, 2003)

Dragieva e colaboradores (Dragieva *et al.*, 2004) avaliaram a eficácia da TFD com MAL em pacientes transplantados. O estudo duplo cego com 2 sessões de MAL-TFD ou placebo, com intervalo de 1 semana foi realizado em 17 pacientes com número total de 129 lesões de QA. A resolução completa ou a redução do número ou tamanho das lesões ocorreu em até 16 semanas após o final do tratamento com MAL-TFD (fonte de luz não coerente). Não houve, entretanto, modificação das lesões na área tratada com placebo. O estudo conclui que o tratamento com MAL-TFD é seguro e eficaz no tratamento de QA em pacientes transplantados, podendo reduzir o risco de transformação para carcinoma escamoso invasivo. Outros estudos sobre a eficácia de tratamento e possível prevenção do câncer de pele não melanoma em pacientes com múltiplas lesões vêm sendo realizados.

3.1.6.2 Câncer Cutâneo Não Melanoma

O CBC é o tumor maligno cutâneo mais comum (70%) na idade adulta, e está usualmente localizado em áreas expostas ao sol. O tratamento deve ser escolhido de acordo com o tipo clínico, tamanho e localização do tumor. Uma grande variedade de opções terapêuticas está disponível para tratamento do CBC. Entre elas, a excisão cirúrgica, eletrocoagulação e curetagem, a crioterapia, os imunomoduladores, os agentes citotóxicos e a radioterapia. A TFD é uma modalidade terapêutica recente para tratamento do câncer de pele não melanoma, e pode ser considerada a primeira escolha em muitos casos. Devido à penetração limitada da luz, a espessura do tumor é um parâmetro determinante de resposta na TFD. Quando a luz vermelha é utilizada, a espessura do tumor não deve exceder 2 a 3 mm para que haja destruição completa do tumor. O uso de ALA-TFD para CBC tem resultados pobres. Melhor resultado é descrito com MAL, possivelmente pela maior lipofilicidade, maior seletividade e capacidade de penetração (Szeimies, 2007).

A TFD com MAL e luz vermelha tem eficácia comprovada para essas indicações, alcançando taxa de cura próxima a 95% no CBC superficial, e de 73% a 94% para CBC nodular. A taxa de recidiva para CBC superficial é de aproximadamente 22%, semelhante a dos tratamentos convencionais, como a crioterapia, que apresenta taxa de recidiva em torno de 19%. Para CBC nodular, a taxa de recidiva encontra-se próxima a 14%, comparada à recidiva de 4% da cirurgia, tratamento padrão para CBC nodular. Esses dados estatísticos do tratamento com MAL-TFD foram realizados por estudos multicêntricos, com grande número de pacientes e com duração de 5 anos de acompanhamento (Braathen *et al.*, 2007).

A taxa de cura para CBC tratado com excisão cirúrgica varia de 90 a 98%. A cirurgia de Mohs tem taxa de cura de 98% - 99%, sendo indicada principalmente nos casos de difícil tratamento, como para as lesões que apresentam alta taxa de recidiva. O tratamento de CBC combinando curetagem e eletrocoagulação, particularmente para tumores pequenos (menor do que 2 cm de diâmetro) e não profundos (menor do que 2 mm de profundidade) apresenta taxa de cura de 90% - 95%. Alguns autores citam taxa de cura para CBC superficial com 5- fluorouracil entre 86% a 95% sem recorrência, com acompanhamento de até 5 anos (Fink-Puches *et al.*, 1998).

A taxa de cura e recorrência do CBC com TFD tópica varia na literatura. Uma revisão da literatura sobre laser e ALA-TFD no tratamento de câncer de pele não melanoma foi realizada por Marmur e colaboradores (Marmur *et al.*, 2004). Vinte artigos foram incluídos (10 para CBC, 4 para QA e 6 para CEC). O período de acompanhamento desses doentes foi de 1 a 36 meses. A taxa de cura foi de até 100% para CBC superficial, QA e CEC *in situ*, e de apenas 8% para CEC invasivo. A taxa de recorrência variou de 0% a 31% para CBC superficial, 16% a 31% para QA, e 0% a 52% para CEC *in situ*.

Um estudo sobre MAL-TFD para CBC superficial e nodular localizados na face, tronco e membros, revelou que a taxa de cura de 310 lesões foi de 89%. O tratamento com MAL-TFD foi realizado com uma sessão apenas, na maioria dos casos. A taxa de recorrência foi de 11% após 35 meses aproximadamente. A taxa de cura dos 279 CBC superficiais primários foi de 91%, e para os que já haviam sido tratados por outros métodos, há mais de 6 meses, foi de 71% (Soler *et al.*, 2001). Outro estudo sobre uso de MAL-TFD para CBC superficial e nodular relata taxa de cura variando entre 85% a 93% em três meses para CBC superficial. Com

acompanhamento de até 60 meses, a taxa de cura da TFD foi de 75%, comparável à 74% da criocirurgia. Para CBC nodular, a taxa de cura varia de 75% a 82% em três meses, e 77% em até 60 meses (Lehmann, 2007).

Fink-Puches e colaboradores (Fink-Puches *et al.*, 1998) avaliaram as alterações clínicas e histológicas dos cânceres cutâneos não-melanoma tratados com ALA-TFD. Usaram ALA a 20% com oclusão por 4 horas e luz visível de diferentes comprimentos de onda. Concluíram que a TFD com ALA e luz visível tem taxa de cura baixa quando realizado um acompanhamento a longo prazo para lesões superficiais de CBC e CEC. O estudo mostrou, ainda, aumento significativo de fibrose na derme, depois da ALA-TFD. Entre 15 das 16 lesões de CBC examinadas, o limite entre o tecido fibrótico e não fibrótico foi mais profundo na derme do que a maior espessura do tumor antes da terapia. Os autores sugeriram que a pequena resposta clínica citada não pode ser justificada pela penetração insuficiente da terapia, uma vez que a fibrose encontrada na derme como efeito do ALA-TFD alcançou maior profundidade do que o limite inferior do tecido neoplásico antes do procedimento. O mecanismo pelo qual a ALA-TFD induz a fibrose permanece em investigação.

Em 2004, Itkin e Gilchrest (Itkin e Gilchrest, 2004) relataram o uso de ALA-TFD com luz azul (410 nm), para tratamento de CBC múltiplos em pacientes com síndrome de Nevo Basocelular. A resposta clínica foi observada em 8 de 9 (89%) das lesões de CBC superficiais e 5 de 16 (31%) das lesões de CBC nodular, localizadas na face, e 18 de 27 (67%) das lesões de CBC superficiais localizadas nos membros inferiores. As 21 lesões restantes melhoraram parcialmente. Nenhuma lesão nova de CBC foi observada na área tratada durante 8 meses de observação. Mais estudos são necessários para confirmar os dados encontrados e sugerem que

a TFD possa ser utilizada para tratamento e prevenção de lesões em pacientes portadores da Síndrome do Nevo Basocelular.

Muitos autores enfatizam que as principais vantagens da TFD no tratamento de neoplasias malignas não melanoma são o significativo encurtamento do tempo de recuperação, o excelente resultado cosmético, a alta taxa de cura e a taxa de recorrência semelhante às relatadas com métodos alternativos à cirurgia. Entre as principais indicações estão o tratamento de lesões múltiplas, principalmente em pacientes idosos, para os que apresentam contra-indicações para cirurgia, e quando as lesões encontram-se em localizações que dificultam a cicatrização. De acordo com as diretrizes relatadas no artigo de consenso internacional sobre o uso de TFD para tratamento do câncer de pele não melanoma, a MAL-TFD é uma opção eficaz no tratamento do CBC superficial, principalmente para lesões de grande diâmetro ou para múltiplas lesões. Também tem mostrado eficácia a longo prazo, com acompanhamento de 5 anos, no tratamento de CBC nodular (Braathen *et al.*, 2007).

3.1.6.3 Doenças cutâneas não malignas

3.1.6.3.1 Acne

Embora uma grande variedade de tratamentos orais e tópicos sejam disponíveis para o tratamento da acne, alguns pacientes podem não responder adequadamente ou apresentar muitos efeitos colaterais. Para esses pacientes então, as novas modalidades terapêuticas baseadas em luz, como a TFD poderia ser uma opção (Elman e Lebzelter, 2004).

O tratamento da acne através de luz é baseado no princípio fotobiológico comum ao tratamento de outras dermatoses. A bactéria gram positiva microaerófila

da pele, *Propionibacterium acnes*, implicada na etiopatogênese da acne vulgar, produz substâncias fotossensibilizantes (protoporfirina e coproporfirinas) como parte de seu metabolismo normal. Esses fotossensibilizantes absorvem energia luminosa, com subsequente desencadeamento de reações químicas nas células (Ashkenazi *et al.*, 2003). A excitação de porfirinas por absorção de luz, leva à formação de oxigênio *singlet* e de radicais livres. Como o maior pico de absorção de luz pelas porfirinas endógenas está no comprimento de luz azul (407-420 nm), as fontes de luz que usam este espectro estariam indicadas para tratamento da acne. Os mecanismos da TFD envolvidos no tratamento da acne incluem a fotodestruição de *P. acnes*, a redução do tamanho das glândulas sebáceas e da produção de sebo, além da diminuição da hipercornificação folicular (Katsambas e Dessinioti, 2008).

As primeiras fontes de luz usadas para tratamento da acne eram lâmpadas convencionais. Fototerapia com luz visível com alta intensidade para acne foi descrita por Meffert e colaboradores (1990 apud Elman e Lebzelter, 2004) que utilizaram uma fonte de luz capaz emitir não somente de luz visível, como também UVA. Outros autores usaram luz com filtro de 390 nm, com picos de 405 e 420 nm (Elman e Lebzelter, 2004).

Makoto Kimura e colaboradores (Kimura *et al.*, 2004) administraram ALA sistêmico, via oral, na dose de 10 mg/kg e após 4 horas da administração, a área afetada foi exposta a luz policromática visível (próximo de 630nm). Concluíram que o uso de ALA oral associado à luz visível policromática é eficaz para o tratamento da acne no tronco. Relatam também que fontes de luz policromáticas podem irradiar grandes áreas da superfície cutânea uniformemente, além de terem custo muito menor quando comparado aos equipamentos de laser. Essas vantagens também são citadas por outros autores (Itoh *et al.*, 2000).

Outra fonte de luz policromática como a luz de halogênio (600-700 nm), após incubação de 4 horas de ALA no tratamento de acne, foi descrita por Itoh e colaboradores (Itoh *et al.*, 2001). Neste estudo, todos os 13 pacientes apresentavam acne vulgar de difícil tratamento, e obtiveram melhora das lesões com acompanhamento de até 6 meses. Entre os efeitos colaterais foram citados desconforto, queimação, eritema e edema por 3 dias.

Alguns artigos citam o uso isolado da luz azul, e outros comparam o maior benefício de ALA associado à luz azul quando comparado à luz azul sem aplicação prévia do fotossensibilizante. O tempo de incubação do ALA é variável nos estudos, entre 15 minutos a 3 horas (Futsaether *et al.*, 1995; Taub, 2004a; Tzung *et al.*, 2004).

Wichai Hongcharu e colaboradores (Hongcharu *et al.*, 2000) estudaram clínica e histologicamente pacientes com acne no dorso. Dividiram o dorso em quatro áreas de tratamentos diferentes, uma delas com ALA 20% e luz vermelha, outra apenas com ALA, outra com luz vermelha isolada, e outro sítio de controle sem tratamento. O ALA foi ocluído por 3 horas e a fonte luz usada tinha comprimento de onda 550-700nm. Foram realizados tratamentos uma vez por semana, por quatro semanas. A área tratada com ALA e luz vermelha apresentou foliculite acneiforme transitória. A acne inflamatória melhorou significativamente em até 20 semanas após tratamento. Histologicamente, as glândulas sebáceas apresentaram alteração estrutural com diminuição no tamanho, 20 semanas após a TFD. Além de esfoliação e crostas, os autores observaram hiperpigmentação transitória. Concluíram que ALA e luz vermelha foram eficazes no tratamento de acne vulgar, causando fototoxicidade aos folículos sebáceos, com prolongada supressão da função sebácea. Outros estudos confirmam esses dados (Pollock *et al.*, 2004).

Muitos estudos relatam a melhora da acne com TFD usando luz visível, mas o primeiro estudo, comparando dois fotossensibilizantes ALA e MAL, foi relatado em 2006. Estudo duplo cego com quinze pacientes apresentando acne facial que foram tratados com ALA 20% em creme manipulado (produto não industrializado) ou MAL (produto industrializado) em cada hemiface, de forma aleatória. Ambos os lados foram irradiados com luz vermelha após 3 horas de oclusão dos fotossensibilizantes. Doze semanas depois do tratamento, houve melhora de 59% das lesões inflamatórias, sem diferença estatística entre os dois fotossensibilizantes. Cerca de 75% dos pacientes tratados com ALA, e 83% dos pacientes tratados com MAL tiveram melhora de leve a moderada. Doze pacientes apresentaram maior intensidade dos efeitos colaterais como dor, eritema, erupções pustulosas e esfoliação, no lado tratado com ALA. Foi sugerido pelos autores que a reação adversa mais acentuada no lado onde foi aplicado o ALA possa ser devido ao maior acúmulo de Pp IX na pele normal do que no lado onde foi aplicado o MAL (Wiegell e Wulf, 2006).

O uso de LIP também tem sido descrito como eficaz para tratamento de acne. O tempo de incubação do ALA pode ser menor, o que se denomina tratamento de contato curto, por um período de 30 minutos a 1 hora (Gold *et al.*, 2004b).

Alexiades-Armenakas (Alexiades-Armenakas, 2006) relatou que o uso da TFD com PDL (595 nm) e ALA parece seguro e eficaz no tratamento de acne recalcitrante comedoniana, inflamatória ou cística de diferentes graus de gravidade. A TFD com ALA-PDL pode ser considerada uma alternativa importante ao uso de isotretinoína. Através dessa técnica, poucos efeitos colaterais foram relatados e uma manutenção da melhora obtida foi acompanhada por 6 meses.

3.1.6.3.2 Pele Fotodanificada

A exposição à radiação ultravioleta é a principal causa de desordens cutâneas como queimadura solar, fotodano e câncer de pele. Atualmente, parece claro que a exposição à radiação ultravioleta (UV) ocorre predominantemente durante as circunstâncias diárias, com exposição adicional no período de férias. Sob exposição à luz, uma cascata de reações químicas e biológicas fotoinduzidas ocorre no tecido alvo (Cesarini *et al.*, 2003).

Os sinais visíveis da pele fotodanificada são caracterizados por rugas, textura áspera da pele, alteração de pigmentação, telangiectasias e, em alguns casos, as QA e carcinomas (CBC e CEC) (Ruiz-Rodriguez *et al.*, 2002). O fotorejuvenescimento envolve o uso de uma fonte de luz (laser ou não) para reverter os sinais do fotoenvelhecimento (Avram e Goldman, 2004).

Na última década, terapias a base de luz têm se tornado tratamento popular em dermatologia para controle de algumas doenças e também para procedimentos cosméticos, como o rejuvenescimento. Recentemente, novos equipamentos conseguiram atuar nas anormalidades pigmentares e/ou vasculares, e induzir a síntese de colágeno sem danificar significativamente a epiderme e derme. Esses novos procedimentos não ablativos são melhor tolerados e levam a um menor tempo de recuperação do paciente. Exemplos dessas novas tecnologias incluem a LIP, o laser de corante (*Pulsed Dye Laser-PDL*), laser de *Neodimium: yttrium aluminium garnet* - Nd:Yag 1320 nm) e *Erbium: yttrium aluminium garnet* - Er:Yag), radiofrequência (RF), as lâmpadas de diodo (*light-emitting diodes* - LED) e, recentemente, a TFD, usando diferentes comprimentos de onda (Nestor, 2004).

Atualmente, a TFD, apesar de ainda não ser aprovada pelo FDA, vem sendo

usada no tratamento de doenças não malignas, como acne e fotoenvelhecimento. As fontes de luz usadas na TFD, para essas indicações, incluem lâmpadas que emitem luz visível de amplo espectro, luz vermelha, azul, laser de argônio, PDL e LIP (Touma e Gilchrest, 2003).

A LIP no tratamento do fotoenvelhecimento é capaz de melhorar cada diferente componente do fotodano, exceto as QA. A associação de um fotossensibilizante, como ALA ou MAL, ao equipamento de LIP será, então, capaz de tratar todos os componentes da pele fotodanificada. Muitos artigos citam a utilização de LIP, como fonte de luz, para tratamento da pele fotodanificada através da TFD (Gold *et al.*, 2006). Mesmo quando o fotossensibilizante é usado apenas sobre a lesão de QA é possível observar a melhora da pele ao redor da lesão (Touma e Gilchrest, 2003).

Ruiz-Rodriguez e colaboradores (Ruiz-Rodriguez *et al.*, 2002) relataram o uso de ALA a 20% por 4 horas de incubação e LIP (filtro de 615 nm) para QA em 17 pacientes com pele fotodanificada. Os pacientes receberam 2 tratamentos com intervalo de 1 mês. Trinta e três das 38 lesões de QA (91%) foram resolvidas, com acompanhamento de 3 meses.

Key (Key, 2005) avaliou o uso de TFD tópica para tratamento do fotoenvelhecimento e observou a reversão das alterações da pele fotodanificada, com melhora de rugas finas, textura, QA e pigmentação com a combinação de ALA e PDL.

David Avram e Mitchel Goldman (Avram e Goldman, 2004) citaram cura de 68% das QA depois de uma sessão de ALA – LIP, associado a melhora de 55% das telangiectasias e 48% das alterações pigmentares e 25% na aspereza da pele com acompanhamento de 3 meses. Porém, o tempo de acompanhamento curto após o

tratamento das QA com ALA-LIP pode levar a uma falsa segurança e eficácia do método. É citada na literatura a necessidade de acompanhamento por um período entre 1 a 3 anos após TFD, que corresponde ao período de recorrência das QA após o tratamento com terapias-padrão, como o uso de 5-fluorouracil tópico (Ruiz-Rodriguez *et al.*, 2002).

Tina Alster e colaboradores (Alster *et al.*, 2005) publicaram o primeiro artigo comparando o uso de ALA e LIP e LIP isolado em metade da face para tratamento do rejuvenescimento. Relataram que a combinação ALA - LIP é seguro e mais eficaz para o tratamento de rejuvenescimento quando comparado LIP isolado, sem aplicação prévia do fotossensibilizante.

3.1.6.3.3 Outras dermatoses

Além do tratamento do câncer de pele não melanoma, outras indicações da TFD são divididas por categorias em: outras neoplasias (dermatológicas e não dermatológicas), doenças inflamatórias e imunológicas, doenças infecciosas, e grupo das miscelâneas (Taub, 2007). Entre as dermatoses neoplásicas, está o linfoma cutâneo. Entre as indicações infecciosas, estão as verrugas virais, e entre as inflamatórias, a psoríase e a esclerodermia (Welch e Kelly, 2005). Algumas dessas indicações serão descritas a seguir.

Avaliações da TFD em linfomas cutâneos incluem um estudo piloto com três pacientes portadores de linfoma cutâneo de células B. Foi avaliado o uso de ALA (4 horas) em 2 casos, e MAL (3 horas sob oclusão) em outro. A irradiação foi feita com luz vermelha de 630 nm (37 J/cm²) para ambos fotossensibilizantes. O paciente que fez uso de MAL foi submetido a uma segunda sessão com intervalo de uma semana, como preconizado pelo protocolo desse fotossensibilizante. Todos os pacientes

apresentaram melhora clínica e confirmação histológica uma semana após o final do tratamento. O acompanhamento clínico foi realizado por um período de 24 meses. Os autores concluíram que a TFD foi eficaz no tratamento do linfoma cutâneo de células B indolentes com placas localizadas e superficiais, como alternativa à radioterapia. Entretanto, estudos com maior número de pacientes são necessários. (Mori *et al.*, 2006). Alguns autores descreveram cura completa de lesões limitadas de micose fungóide com TFD tópica com tempo de acompanhamento de 4 a 33 meses, sem recorrência. Enfatizaram, porém, a necessidade de mais estudos sobre esse tema (Welch e Kelly, 2005).

A utilização de TFD para hiperplasia sebácea, dermatite perioral e hidrosadenite supurativa também é relatada (Katz e Patel, 2006; Richey e Hopson, 2006). Michael Gold e colaboradores (Gold *et al.*, 2004a) relataram melhora de 75 – 100% em 4 pacientes com hidrosadenite não responsivos a outros tratamentos. Realizaram 4 tratamentos com ALA por 30 minutos e luz azul, com intervalo de 1 a 2 semanas, e tiveram acompanhamento por 3 meses. A hiperplasia sebácea, uma proliferação benigna das glândulas sebáceas, ocorre como consequência do envelhecimento cutâneo, por exposição à radiação ultravioleta e por imunossupressão. Um estudo em transplantados renais, pacientes suscetíveis à hiperplasia sebácea, particularmente na face, relata que a TFD pode ser uma alternativa segura e eficaz. A TFD foi realizada com duas sessões de MAL (3 horas de oclusão) e luz vermelha, com intervalo de 3 semanas (Perrett *et al.*, 2006).

O potencial mecanismo para o uso de TFD em hiperplasia sebácea e acne é baseado na captação do fotossensibilizante na glândula sebácea, com consequente destruição dessas. A TFD com ALA por 45-60 minutos seguido de ativação por luz azul (8-12 minutos) pode ser uma alternativa para o tratamento das hiperplasias

sebáceas. Em média 4 tratamentos com intervalo de 4 semanas podem levar a melhora de 70% das lesões em até 6 meses de acompanhamento. Outra fonte de luz, a PDL com 595 nm, após uma hora de ALA é descrita como opção eficaz no tratamento da hiperplasia sebácea. Entretanto, com menor número de sessões e menor efeito colateral (eritema, edema transitório e crostas focais) (Alster e Tanzi, 2003; Richey e Hopson, 2004).

Herzinger e colaboradores (Herzinger *et al.*, 2006) relataram o uso de ALA 20% e PDL de argônio em nove pacientes com condiloma genital e sugeriram que a TFD não deva ser recomendada como primeira linha de tratamento para essa dermatose. Entretanto, pode ser uma terapia alternativa para pacientes que apresentaram falha terapêutica com os tratamentos convencionais.

Recentemente, foi relatado o uso de TFD para tratamento de melasma. Apesar do mecanismo não elucidado, os autores relataram melhora em um paciente com uso de ALA 20% e luz visível azul (10J/cm²) e descreveram o efeito *peeling*, como possível mecanismo de ação. Concluíram que ALA-TFD com luz azul pode ser uma alternativa para melasma, mas que outros estudos com número maior de pacientes e com outras fontes de luz são necessários (Marcus, 2006).

Michael Gold (Gold, 2007) lembra que, apesar de muitas novas possibilidades terapêuticas tenham sido descritas, o caminho futuro da TFD, inclui principalmente pesquisas sobre o desempenho da TFD na quimioprevenção. Em particular importância está a indicação da TFD para pacientes com múltiplas lesões de QA, ou em imunossuprimidos. Ainda não existe um protocolo definido, quanto ao número de sessões ou quanto ao intervalo entre elas, na quimioprevenção do câncer de pele não melanoma em indivíduos sadios e em pacientes imunossuprimidos.

3.1.7 Efeitos adversos

Em contraste com as terapias convencionais de tratamento contra câncer, a TFD tem poucos efeitos colaterais e são de caráter transitório. Durante exposição à luz, os pacientes podem apresentar dor tipo queimação, sensação de ardência ou prurido restrito à área tratada. O desconforto tem início em minutos após o início da irradiação, diminuindo em alguns minutos depois do final da iluminação, refletindo o estímulo nervoso e/ou o dano tecidual pelo oxigênio reativo. Ocasionalmente a dor continua por algumas horas e diminui com o tempo. Geralmente, a TFD tópica com uso de ALA ou MAL para QA, CBC e doença de Bowen não requer o uso de analgesia. Eritema e edema podem ser tratados com corticóide tópico ou, eventualmente, sistêmico. O curso normal ocorre com crostas, descamação e prurido, em torno de 2-8 semanas. Fotofobia e desconforto ocular podem ocorrer. As discromias, tanto a hipocromia quanto a hiperpigmentação são, geralmente, reversíveis em alguns meses. Bolhas, úlceras ou necrose são raras, sugerindo dose alta de energia, com fototoxicidade (Zelickson, 2005). Stender e Wulf (1996 apud Kalka et al., 2000) relataram fenômeno de Koebner na área tratada e exacerbação de psoríase após o uso de ALA tópico para câncer de pele não melanoma. A fotoproteção química e física é recomendada pós-tratamento (Zelickson, 2005).

Com relação aos fotossensibilizantes sistêmicos, a fotossensibilidade cutânea generalizada é o principal efeito colateral. O HpD pode causar náusea, vômito, gosto metálico e toxicidade hepática. Outros efeitos indesejáveis, como as cicatrizes, têm sido relatados com o uso de porfímer sódico para tratamento de Sarcoma de Kaposi. Npe 6 endovenoso pode levar a exsudação serosanguinolenta no sítio tratado, além de náusea, prurido, cefaléia, diarreia, tontura. O ALA pode levar à náusea e vômito

em 7% a 19%, e também a alterações transitórias de enzimas hepáticas. Abranson, Alui e Mullody (1993 apud Kalka et al., 2000) descreveram exacerbação de lupus eritematoso sistêmico depois de exposição à luz de amplo espectro com HpD em papilomas laríngeos. Em adição, a reação alérgica aos fotossensibilizadores ou aos veículos deve ser considerada. Wooten e colaboradores (1988 apud Kalka et al., 2000) observaram urticária transitória durante infusão com HPD (Kalka *et al.*, 2000).

3.2 Fotoenvelhecimento

3.2.1 Conceito

A pele humana, como outros órgãos, caminha para o envelhecimento. Entretanto, diferente desses órgãos, a pele está em contato direto com o meio ambiente e, por este motivo, envelhece também como consequência dos danos ambientais (Fisher *et al.*, 2002). O envelhecimento cutâneo é um processo contínuo que afeta a função da pele e sua aparência. Porém, nem todos os indivíduos envelhecem com a mesma velocidade. Alguns indivíduos parecem mais velhos do que sua idade cronológica e outros mais jovens. Fatores intrínsecos e ambientais, bem como o estilo de vida do paciente, contribuem com o envelhecimento da pele. A exposição solar crônica tem sido identificada como uma das injúrias ambientais mais importantes. Entretanto, o envelhecimento prematuro da pele pode ser observado em algumas doenças hereditárias, associadas a defeitos genéticos envolvidos no reparo do dano ao DNA (Guinot *et al.*, 2002).

Existem dois processos que levam às alterações cutâneas associadas ao envelhecimento: o intrínseco e o extrínseco. O envelhecimento cronológico (intrínseco) afeta a pele de modo similar aos outros órgãos. A ação sobreposta de

fatores ambientais ao processo inato é responsável pelo envelhecimento extrínseco. A foto-oxidação induzida pela radiação UV é o principal fator envolvido no dano do tecido conectivo da pele. Existem evidências de que os processos de envelhecimento intrínseco e extrínseco têm, ao menos em parte, mecanismos biológicos, bioquímicos e moleculares em comum (Naderi-Hachtroudi et al, 2002). As agressões externas do meio ambiente, como radiação UV, fumo, vento e exposições a agentes químicos estão envolvidas no processo de envelhecimento extrínseco (Elson, 1995; Gendler, 1997; Manela-Azulay, 2003).

As alterações clínicas na pele cronologicamente envelhecida incluem flacidez, rugas finas e palidez cutânea. Outros achados clínicos como aspereza, pigmentação irregular, telangiectasias, rugas profundas e neoplasias estão presentes na pele fotodanificada (Gilchrest, 1989; Oikarinen, 1990; Chung *et al.*, 2001; Manela-Azulay, 2006). Entre as modificações epidérmicas, as mais proeminentes são as alterações de pigmentação. Entretanto, as alterações mais importantes do fotoenvelhecimento ocorrem na derme (Kligman, 1996; Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997).

3.2.2 Classificação do envelhecimento

Há alguns anos, Dr. Richard Glogau criou uma classificação que auxilia o dermatologista a direcionar melhor o tratamento da face envelhecida. A classificação é dividida em quatro categorias e se baseia na idade e gravidade das mudanças ocorridas na pele (Glogau, 1996)

- GRUPO I: Sem rugas
 - ✓ Fotoenvelhecimento leve (28-35 anos)

- ✓ Discretas alterações pigmentares
- ✓ Rírides mínimas
- ✓ Necessidade de pouca ou nenhuma maquiagem
- GRUPO II: Rugas com movimento
 - ✓ Fotoenvelhecimento moderado (35 a 50 anos)
 - ✓ Lentigo solar
 - ✓ Ceratoses palpáveis, mas não visíveis
 - ✓ Pouca maquiagem
- GRUPO III: Rugas em repouso
 - ✓ Fotoenvelhecimento avançado (50-60 anos)
 - ✓ Discromias, telangiectasias
 - ✓ Ceratoses visíveis
 - ✓ Rugas mesmo quando em repouso
 - ✓ Muita maquiagem
- GRUPO IV: Somente rugas
 - ✓ Fotoenvelhecimento grave (acima de 65 anos)
 - ✓ Cor amarela-acinzentado da pele
 - ✓ Ceratoses e câncer de pele
 - ✓ Rugas por toda a parte, sem pele normal
 - ✓ A maquiagem não consegue cobrir as lesões

3.2.3 Etiopatogenia

3.2.3.1 *Matriz Extracelular*

Para entendermos melhor os mecanismos envolvidos na patogênese do envelhecimento, faz-se necessário uma breve revisão sobre MEC do tecido conjuntivo da derme.

A MEC foi considerada uma substância inerte durante várias décadas. Acreditava-se que tivesse como funções apenas manter os tecidos unidos e dar suporte às células. Atualmente, sabe-se que a MEC compreende um conjunto de estruturas moleculares, formado por proteínas colagênicas e não colagênicas que estão em constante equilíbrio dinâmico. Seus componentes e suas interações criam um ambiente necessário para modular o comportamento celular, permitindo a manutenção das propriedades normais do tecido e sua remodelação (Brew *et al.*, 2000). Três grandes famílias de macromoléculas extracelulares constituem a MEC: as proteínas fibrosas (colágeno e a elastina); os proteoglicanos; e as proteínas adesivas e anti-adesivas (Almeida, 2008).

O colágeno, nome genérico da família de proteínas que representa o principal componente fibroso da pele, é extremamente resistente à degradação por enzimas proteolíticas, exceto à colagenase. Onze tipos de colágeno já foram detectados na pele humana. Cada tipo de colágeno tem um papel funcional dentro da distribuição compartimental da pele. O colágeno tipo I, principal constituinte do tecido conectivo intersticial, é responsável pela estabilidade e força tensora da derme. Predomina na pele humana adulta e compreende 80% do colágeno total. O colágeno tipo III está presente em menor quantidade e está associado ao colágeno tipo I para formar uma rede, compreende 10% do colágeno dérmico total e têm

propriedades tensoras adicionais. O colágeno IV é o principal constituinte da membrana basal da junção dermo-epidérmica. Na membrana basal podemos encontrar além do colágeno IV, os colágenos VII (fibrilas de ancoragem), XVII, e o colágeno XV (colágeno transmembrana). Os fibroblastos são a maior fonte de proteínas para a recomposição da MEC (Uitto e Kouba, 2000).

A elasticidade dos tecidos é mantida pelas fibras elásticas. Consistem morfologicamente de dois componentes distintos (elastina e microfibrilas). Entre as proteínas que constituem as microfibrilas estão as fibrilinas e as glicoproteínas microfibrilares (Ohnishi *et al.*, 2000). São produzidas e secretadas principalmente pelos fibroblastos. O sistema elástico tem papel na manutenção da arquitetura da pele, particularmente da junção dermo-epidérmica, fazendo parte do sistema de ancoragem (Cotta-Pereira *et al.*, 1976).

Os proteoglicanos, também conhecidos como mucopolissacarídeos, constituem uma família com ao menos 30 moléculas, que apresentam um *core* protéico e estão ligados às cadeias de carboidratos, denominadas glicosaminoglicanos (GAGs). Os principais tipos de GAGs identificados são: ácido hialurônico, condroitin sulfato, dermatan sulfato, heparan sulfato, queratan sulfato e heparina. Na pele humana encontramos principalmente o ácido hialurônico e proteoglicanos que contêm dermatan sulfato. Os proteoglicanos modulam o processo de agrupamento das fibras colágenas, têm a capacidade de se ligar à fibronectina e à laminina, e contribuem para a manutenção da hidratação dos tecidos e da arquitetura da MEC. Também estão envolvidos com o comportamento celular por sua relação com fatores de crescimento e citocinas (Uitto *et al.*, 1989).

Entre as proteínas adesivas estão a fibronectina, a tenascina e a laminina. Essas proteínas se ligam às superfícies celulares, ao colágeno e aos proteoglicanos,

mantendo a união dos componentes da MEC com as células. A principal molécula adesiva do tecido conjuntivo é a fibronectina. Predomina na pele humana, sendo produzida por fibroblastos e ceratinócitos. A tenascina é expressa transitoriamente durante a embriogênese. No adulto, é encontrada no pericôndrio e periósteo, ligamentos, tendões e junções miotendinosas. Nos processos de cicatrização de feridas, a tenascina é expressa transitoriamente. O fator de crescimento transformante beta (TGF- β) já foi identificado como indutor da expressão dessa proteína. A laminina é uma molécula adesiva produzida pelas células epiteliais da camada basal. O receptor de laminina na superfície celular liga-se ao colágeno IV da membrana basal (Chiquet-Ehrismann, 1990).

É sabido que a interação das células com a MEC tem efeitos importantes em grande número de processos biológicos, como angiogênese, tumorigênese, e metabolismo da própria MEC (Pazos e Nader, 2007).

O tecido conjuntivo é mantido em condições normais através de um controle entre a degradação das proteínas da MEC e a síntese de novos componentes. Três grandes famílias de proteases são envolvidas neste processo: as serinaproteinases (plasmina), as cisteínaproteinases (catepsina B) e as MMPs. Essas últimas, também chamadas de matrixinas, são as principais enzimas degradadoras da MEC (Mauch *et al.*, 1988; Nagase e Woessner, 1999; Nagase *et al.*, 2006).

As MMPs são enzimas proteolíticas envolvidas no processo de remodelação tecidual relacionado à doença ou ao tecido normal. Dividem propriedades estruturais e funcionais, mas diferem quanto à especificidade do substrato (Mauch *et al.*, 1988). Mais de 20 matrixinas já foram descritas e podem ser divididas em subclasses. Estudos bioquímicos dividem os principais grupos de MMPs em collagenases específicas (intersticiais), estromelinas, estromelinas-símile (matrilisinas),

gelatinases, e tipo membranas.

As colagenases específicas (MMP-1, MMP-8, MMP-13) clivam principalmente os colágenos I e III. A MMP 13 (colagenase 3) cliva também colágeno IV, IX, X, XIV, fibronectina, laminina e tenascina (Mauch *et al.*, 1988). É expressa durante o desenvolvimento fetal nos condrócitos hipertróficos e osteoblastos, mas não é expressa na pele do adulto (Kahari e Saarialho-Kere, 1997; Culhaci *et al.*, 2004). É estimulada em fibroblastos dérmicos durante a remodelação associada à cicatrização, e está presente em úlceras crônicas. (Vaalamo *et al.*, 1997). A MMP-1 é observada a partir do terceiro mês da vida fetal nos ceratinócitos basais da epiderme e fibroblastos dérmicos, bem como nas células ao redor dos folículos pilosos, diminuindo gradativamente com o desenvolvimento. No adulto, a MMP-1 não é expressa na epiderme intacta, porém pode ser expressa ocasionalmente por fibroblastos da derme reticular. É responsável pela degradação do colágeno I, (Kahari e Saarialho-Kere, 1997). Está aumentada na radiação por UV e na TFD (Karrer *et al.*, 2004).

As estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11) degradam colágeno IV e catalizam a degradação de vários componentes da MEC, incluindo o core protéico de proteoglicanos, fibronectina, laminina, gelatinas, bem como substratos não matriciais, como o precursor do TNF- α . As estromelinas, a MMP-7 (matrilisina), a MMP-12 (metaloelastase) e as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são as MMPs mais ativas sobre as fibras elásticas (Patroi *et al.*, 2003).

As matrilisinas (MMP-7, MMP-26) têm substratos similares às estromelinas, degradando não somente a elastina, como também o colágeno IV, os proteoglicanos, a fibronectina e a laminina. A MMP-12, produzida principalmente pelos macrófagos, é a principal enzima ativa contra elastina (Suomela *et al.*, 2001).

As collagenases tipo IV de 72 kDa (gelatinases A ou MMP-2) e de 92 kDa (gelatinase B ou MMP-9) degradam os colágenos tipo IV, V, VII, X, XI, e também o colágeno desnaturado, chamado de gelatina. Essas gelatinases completam a degradação dos produtos gelatinosos de clivagem da collagenase intersticial (Mauch *et al.*, 1988). A MMP-2 é expressa por fibroblastos dérmicos e por ceratinócitos da camada basal da epiderme, na pele do adulto. A MMP-9 é observada nas células mesenquimais da derme superior na pele fetal, enquanto no adulto é expressa na epiderme. É produzida por ceratinócitos, macrófagos e células malignas, e é estocada nos grânulos de neutrófilos e eosinófilos (Karelina *et al.*, 1993; Kahari e Saarialho-Kere, 1997; Ohnishi *et al.*, 2000). É descrito que a MMP-9, secretada por ceratinócitos, tem função na cicatrização de feridas e na apoptose induzida por UVB. O fator de crescimento epidérmico, também envolvido na cicatrização, induz produção de MMP-9 pelos ceratinócitos. Tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 são secretadas por fibroblastos quando estimulados por TGF-beta e TNF-alfa, entretanto na ausência de citocinas, os fibroblastos secretam apenas a MMP-2 (Quadro 1) (Kobayashi *et al.*, 2003).

Metaloproteinases	Substratos na pele	Atividade Enzimática das MMPs	
		Alterações Dermatológicas	TFD
MMP-1	Colágenos I e III	Aumentada no fotoenvelhecimento	Aumentada
MMP-2	Colágeno IV, V, VII, X, XI, gelatina, fibras elásticas	Aumentada no fotoenvelhecimento e em tumores	
MMP-3	Colágeno IV, proteoglicanos, fibronectina, laminina, gelatina, TNF-alfa	Aumentada no fotoenvelhecimento	Aumentada
MMP-7	Fibras elásticas, colágeno IV, proteoglicanos, fibronectina, laminina	Aumentada no fotoenvelhecimento	
MMP-8	Colágeno I e III	Aumentada no fotoenvelhecimento	
MMP-9	Colágeno IV, V, VII, X, XI, gelatina, fibras elásticas	Aumentada no fotoenvelhecimento e em tumores	Aumentada (ratos)
MMP-10	Colágeno IV, proteoglicanos, fibronectina, laminina, gelatina, TNF-alfa		
MMP-11	Colágeno IV, proteoglicanos, fibronectina, laminina, gelatina, TNF-alfa		
MMP-12	Fibras elásticas	Aumentada no fotoenvelhecimento	
MMP-13	Colágenos I, III, IV, IX, X, XIV, fibronectina, laminina, tenascina	Aumentada em úlceras crônicas, cicatrização de feridas e fotoenvelhecimento	

Quadro 1 Atividade das MMPs nas alterações dermatológicas e na TFD

In vivo, as MMPs não são estocadas nas células da pele, exceto MMP-7, MMP-8, MMP-9, sendo sintetizadas tão logo haja sinalização (Mauch *et al.*, 1988; Brew *et al.*, 2000). A expressão da maioria das MMPs é regulada por fatores de

crescimento, hormônios, citocinas, interações célula-MEC e célula-célula. A expressão das MMPs nos fibroblastos pode ser inibida pelo TGF- β e pelo ácido retinóico. O TGF- β é considerado fibrogênico não somente por reprimir a expressão de MMP-1 em fibroblastos, mas também por estimular a produção TIMP-1 e de proteínas estruturais da MEC. Em ceratinócitos, porém, o TGF- β estimula a produção de MMP-1 (Mauch *et al.*, 1988; Brew *et al.*, 2000).

O controle da degradação do tecido conjuntivo é regulado pela quantidade de MMPs e de TIMPs (Mauch *et al.*, 1988). Até o momento são conhecidas as TIMP-1, -2, -3, -4 (Brew *et al.*, 2000). A TIMP-1 se liga a todas as MMPs ativas, mas inibe preferencialmente as colagenases específicas. É expressa por fibroblastos dérmicos e, esporadicamente, nas glândulas sebáceas e folículos pilosos da pele normal (Kahari e Saarialho-Kere, 1997). A TIMP-2 é mais eficiente que TIMP-1 contra a MMP-2 (Mauch *et al.*, 1988). É secretada por fibroblastos, ceratinócitos e células endoteliais (O'Grady *et al.*, 2007). Apesar da denominação, os inibidores de MMPs não estão envolvidos somente na inibição dessas enzimas. Possuem várias funções biológicas, fisiológicas e bioquímicas, que incluem inibição das MMPs ativas, promoção do crescimento celular, inibição da angiogênese e indução da apoptose. As atividades biológicas dos TIMPs são independentes da sua atividade inibitória. A superexpressão destes inibidores (TIMP-1, -2, -3) reduz o crescimento tumoral (Nagase e Woessner, 1999; Brew *et al.*, 2000).

3.2.3.2 *Mecanismos Etiopatogênicos*

Entre os efeitos da radiação solar prolongada estão a imunossupressão e o câncer de pele. Mais recentemente, o envelhecimento cutâneo, como consequência

da radiação UVA e UVB, tem sido bem documentado (Brenneisen *et al.*, 2002). Durante as últimas décadas, houve um progresso no entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no envelhecimento cronológico e no fotoenvelhecimento. Informações recentes revelam que os dois tipos de envelhecimento compartilham mecanismos moleculares fundamentais. Essa convergência de mecanismos desperta novas oportunidades no desenvolvimento de terapias anti-envelhecimento (Fisher *et al.*, 2002).

Jin Ho Chung e colaboradores (Chung *et al.*, 2001) estudaram a modulação do metabolismo do colágeno na pele envelhecida cronologicamente e na pele fotoenvelhecida, *in vivo*. Os resultados sugeriram que no processo de envelhecimento natural, a síntese de colágeno diminui, e a expressão de MMPs aumenta. Enquanto no fotoenvelhecimento ocorre aumento da síntese de colágeno e um aumento, ainda maior, na expressão de MMPs na pele humana. Assim, o balanço entre a síntese e a degradação de colágeno leva à deficiência de colágeno de maneira diferente no envelhecimento cronológico e no fotoenvelhecimento. Os autores citam, ainda, outros trabalhos que relataram aumento de RNA de colágeno e elastina, comparando com controle, em pacientes submetidos a tratamento com psoraleno e ultravioleta. Sugeriram que durante o dano actínico, um processo de reparo é desencadeado com ativação da síntese de tecido conectivo.

O fotoenvelhecimento ocorre por superposição da radiação UV solar com a idade cronológica. Para exercer efeitos biológicos, a radiação UV deve ser absorvida por moléculas (cromóforos) na pele. A UVB absorvida pelo DNA causa dano, com formação de dímeros de ciclobutano-pirimidina e fotoprodutos, os quais são reparados por excisão de nucleotídeos; enquanto que a UVA é absorvida por cromóforos cutâneos que transferem energia ao oxigênio e geram espécies reativas

de oxigênio, que oxidam constituintes celulares, tais como proteínas, lipídeos e DNA (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997).

Além da absorção direta de fótons de UVB pelo DNA, e sua subsequente modificação estrutural, tanto a radiação UVA quanto a UVB, em conjunto com os fotossensibilizantes intracelulares, tem mostrado gerar altos níveis de ROS (Naderi-Hachtroudi *et al.*, 2002). A geração de ROS ocorre após absorção de fótons pelas moléculas fotossensibilizantes endógenas, em horas a dias após a radiação. Entre elas estão riboflavina, porfirinas, quinonas e bilirrubinas em células de mamíferos. O ácido urocânico derivado de histidina, e produzido por ceratinócito, tem sido relatado como cromóforo que absorve UVA. Os fotossensibilizantes excitados reagem com outro substrato (reação tipo I) ou com O₂ (reação tipo II). Os produtos resultantes da reação tipo I são radicais ou íon radicais, enquanto os produtos resultantes da reação tipo II são os ROS. Assim, o fotoenvelhecimento é mediado por absorção direta do UV e por reações fotoquímicas mediadas por ROS (Fisher *et al.*, 2002).

A radiação UV ativa receptores de superfície, como receptores para fator de crescimento epidérmico, IL-1, insulina e fator de necrose tumoral. Esses receptores ativados estimulam sinalização intracelular, através do estímulo a proteíno-quinases. A ativação dessas quinases induz a transcrição nuclear do complexo AP-1. Essa proteína ativadora é formada pelo complexo de proteínas c-Jun e c-Fos (Schieke *et al.*, 2003). A transcrição da AP-1 parece ser induzida mesmo sob doses suberitematogênicas de UVB. Nos fibroblastos, AP-1 inibe a expressão gênica de pro-colágeno tipo I e III e, também, induz a transcrição de genes das metaloproteinases (MMP-1 e MMP-9) (Kalka *et al.*, 2000; Freeman *et al.*, 2003; Touma e Gilchrest, 2003). Além disso, interfere com a síntese de colágeno I e III, por bloquear o efeito do TGF-beta, citocina que aumenta a transcrição gênica do

colágeno e diminui a proliferação de ceratinócitos. Os efeitos da TGF-beta são mediados por ativação de proteínas intracelulares sinalizadoras, SMAD₂ e SMAD₃, e são antagonizadas por SMAD₇. A radiação UV induz SMAD₇ na pele humana (Yaar e Gilchrist, 2007).

Um estudo multicêntrico realizado no Japão, em 2004, (Watanabe *et al.*, 2004) relatou que a biossíntese de MMP-1 é estimulada por citocinas e fatores de crescimento como IL-1 alfa e beta, TNF-alfa, IL-6, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento derivado de plaquetas, numa variedade de células, incluindo os fibroblastos. Os autores citam, ainda, a importância do fator de inibição de migração dos macrófagos na patogênese do fotoenvelhecimento. Essa citocina pleiotrópica está presente, particularmente, na camada basal da epiderme. Sua participação no fotoenvelhecimento, deve-se ao estímulo à produção de MMP-1, via tirosino-quinase e via fator de transdução nuclear AP-1 em fibroblastos dérmicos. A radiação UV também ativa fator de transcrição NF-κB (fator nuclear kappa B) que estimula a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 Beta, TNF-alfa, IL-6 e IL-8. Além de estimular essas citocinas, ativam receptores de fatores de crescimento na superfície dos ceratinócitos e fibroblastos, bem como de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular -1 (ICAM -1) (Rittie e Fisher, 2002).

Com objetivo de entender melhor o mecanismo do envelhecimento induzido por radiação solar crônica, Naru e colaboradores. (Naru *et al.*, 2005) examinaram os efeitos crônicos da UVA na proliferação e função celular, usando fibroblastos dérmicos como modelo de fotoenvelhecimento *in vitro*. Os autores mostraram que a exposição crônica de fibroblastos à UVA levava ao encurtamento da vida celular, à medida que a intensidade da radiação aumentava, sugerindo que a toxicidade pela

ultravioleta não poderia ser completamente reparada. Entretanto, baixa intensidade de radiação UVA não afetava o ciclo celular, uma vez que mecanismos de reparo eram paralelamente desencadeados. O aumento da radiação UVA também provocava aumento da expressão do nível de MMP-1. A presença de L-histidina, como quelante de oxigênio *singlet*, inibiu o encurtamento celular induzido por UVA, o que indica a ação desta espécie reativa de oxigênio como indutor deste encurtamento (Yaar e Eller, 2002).

No fotoenvelhecimento, o número de fibroblastos da pele fotodanificada é similar ao da pele fotoprotetida no mesmo paciente, e a capacidade de síntese de pro-colágeno tipo I é a mesma para os fibroblastos cultivados de ambas as áreas. Isto sugere que a regulação negativa sobre os fibroblastos, na pele fotodanificada, se deva principalmente ao meio dérmico em que se encontram. Alguns resultados sugerem que o aumento da densidade de colágeno quebrado em grandes fragmentos, por ação da MMP-1, atua regulando negativamente a síntese de pro-colágeno tipo I. A MMP-9 degrada o colágeno já clivado pela MMP-1, chamado de gelatina, em pequenos peptídeos. Esses pequenos fragmentos não inibem a síntese de pró-colágeno, como fazem os fragmentos maiores. Conclui-se que as MMPs induzidas pela irradiação UV danificam a derme por dois mecanismos: o direto através da degradação do colágeno; e o indireto, pela inibição da síntese de colágeno em resposta a presença de fragmentos de proteínas, gerados pela MMP-1. Quando comparada à pele jovem, a pele envelhecida apresenta diminuição do número de fibroblastos, e também redução da sua capacidade de síntese de pro-colágeno I (Fisher *et al.*, 2002).

Brennan e colaboradores (Brennan *et al.*, 2003) utilizaram fluido de cultura de pele de ser humano expostos a UVB ou a um simulador de luz solar para estudar

a atividade colagenolítica de MMP. Concluíram que a MMP-1, mais do que a MMP-13 é a principal enzima colagenolítica responsável pelo dano do colágeno no fotoenvelhecimento. Citam, também, estudos que demonstraram a função limitada da MMP-8, pois apesar desta MMP ser induzida com luz ultravioleta, seu estímulo é mínimo e, provavelmente, contribui pouco para prejudicar o colágeno do fotoenvelhecimento.

Se o dano ao DNA causado pela radiação UV é muito intenso e não pode ser reparado, as vias de indução de apoptose são ativadas para eliminar as células danificadas. Após o dano ao DNA, a transcrição de p-53 é estimulada e a proteína P-53 é ativada por fosforilação de serina 15 e serina 20. O gen p-53 é o alvo mais freqüente das alterações genéticas identificadas nos cânceres humanos. A perda ou a mutação desse gen tem sido demonstrada em aproximadamente 50% de todos os cânceres humanos. A carcinogênese por radiação UV frequentemente envolve a inativação de um ou mais genes supressores tumorais ou a ativação de estimuladores de crescimento de proto-oncogenes. Esses agem no controle da proliferação e diferenciação celular. O acúmulo de proteína P-53 ativada induz ao repouso do ciclo celular, permitindo o reparo do DNA antes de sua replicação. A proteína P-53 pode induzir apoptose por estimular a expressão de gens promotores de apoptose como *bax*, *faz/apo-1*, ou por inibir a expressão de gens supressores da apoptose como *bcl-2*. O p-53 também contribui para a manutenção da estabilidade genômica e reparo, além de promover a replicação adequada de DNA, e a inibição da angiogênese, tendo um papel fundamental na proteção da pele contra a radiação UV (Matsumura e Ananthaswamy, 2004).

O sistema imune da pele normal protege contra infecção, remove células danificadas e impede reações auto-imunes indesejáveis. Entretanto, sob exposição

solar, o sistema imune também pode promover envelhecimento. A reação inflamatória induzida por UV parece participar na promoção do envelhecimento, através da geração de ROS, produção de enzimas proteolíticas, inibição do suporte imunológico e produção de fatores de crescimento para células malignas (Bennett *et al.*, 2008).

As prostaglandinas induzidas pela UV têm papel importante na inflamação induzida por radiação solar, fotocarcinogênese e processo de fotoenvelhecimento. A produção de prostaglandinas é controlada por cicloxigenases que mediam a conversão inicial do ácido aracônico em prostaglandina H₂ (PGH₂), precursor comum de todos os prostanóides. A prostaglandina E₂ (PGE₂) induz a liberação de várias MMPs, incluindo colagenase e estromelisina, pelos macrófagos e fibroblastos, contribuindo para a deficiência de colágeno no fotodano (Seo *et al.*, 2003)

Mittal e colaboradores (Mittal *et al.*, 2003) relataram que o infiltrado de leucócitos, induzido pela radiação UV, contribui para o desenvolvimento do *stress* oxidativo da pele irradiada, e que o aumento do infiltrado de células CD 11 b⁺ (marcador de superfície de monócitos ativados ou macrófagos e neutrófilos) é a principal fonte deste *stress*, contribuindo para o fotodano e para a promoção de crescimento tumoral. O infiltrado inflamatório inicia na derme após 6 horas de radiação UV e o pico máximo é encontrado entre 48-72 horas. Um estudo em animal, citado por esses autores, revelou que as células do infiltrado pós-irradiação UV foram a principal fonte de IL-10 na pele do rato, justificando, em parte, o motivo da imunossupressão. As MMPs eram secretadas pelos ceratinócitos e pelos fibroblastos e quebravam o colágeno e outras proteínas, modulando a MEC (Cesarini *et al.*, 2003).

Os ceratinócitos irradiados por UVB liberam citocinas que estimulam a

produção de MMPs, como a collagenase intersticial e a estromelina-1, pelos fibroblastos. É descrito que a liberação de MMPs pelos fibroblastos, após a irradiação de UVB, é dependente da liberação de IL-6 pelos ceratinócitos radiados. A IL-1 alfa tem papel principal na indução da produção de IL-6 durante a interação de ceratinócitos e fibroblastos, levando ao aumento de MMP-1 e MMP-3 (Brenneisen *et al.*, 1999; Fagot *et al.*, 2004). Os autores concluem que a IL-1 alfa e IL-1 beta aumentam a atividade da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e o nível de mRNA de c-Jun em fibroblastos irradiados por UVA. A IL-1 alfa também aumenta o nível de mRNA de c-Fos, que leva a produção de MMP-1 nos fibroblastos irradiados por UVA. Assim, a IL-1 induzida por ultravioleta tem papel importante no mecanismo de fotoenvelhecimento (Wang *et al.*, 2005).

O TGF-beta é uma citocina multifuncional que regula a proliferação e a diferenciação celular, bem como a remodelação e reparo tecidual. É um potente inibidor de crescimento epidérmico, enquanto na derme age positivamente como fator de crescimento, induzindo a síntese de proteínas da MEC. O TGF-Beta se liga, inicialmente, ao receptor tipo II, resultando na formação de um complexo heterodimérico entre receptor TGF-Beta tipo I e tipo II. A expressão aumentada de receptores I ou II aumenta a produção de colágeno. Essa citocina ligada ao receptor interage e ativa as proteínas Sma e Mad, que são transdutores de sinais intracelulares. É sabido que o TGF-Beta, além de estimular a proliferação de fibroblastos na derme e induzir a síntese de proteínas da MEC, também inibe a expressão de enzimas proteolíticas como collagenases e estromelinas (Yin *et al.*, 2003; Son *et al.*, 2005).

A quantidade de oxidantes é controlada por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos intracelulares. O desequilíbrio na produção de ROS e de antioxidantes,

com predomínio dos oxidantes, leva ao dano do DNA, de proteínas e de lipídeos, o que é denominado *stress* oxidativo. A oxidação do DNA resulta em mutações, a oxidação de proteínas, em diminuição da função celular, e a oxidação de membranas lipídicas, em diminuição da eficiência de transporte e, possivelmente, alteração na sinalização transmembrana. Sistemas antioxidantes celulares como as vitaminas e oligoelementos agem através de metaloenzimas, cobre e zinco superóxido dismutase (Cu-Zn SOD), e selênio-glutationa peroxidase (Se-GSH Px), compensando o *stress* oxidativo (Nola e Kotrulja, 2003).

Brenneisen e colaboradores (Brenneisen *et al.*, 1999) citam que existem evidências da ação da UVA em fibroblastos dérmicos, levando à indução de uma rede de citocinas como IL-1 alfa, IL-1 beta e IL-6. Essas induzem a liberação de colagenase, contribuindo para a perda de colágeno intersticial, uma característica da pele fotodanificada. A liberação epidérmica de IL-1 alfa, IL-1 beta, TNF alfa foram identificadas como mediadoras, ao menos em parte, de enzimas antioxidantes, como a manganês superóxido dismutase (Mn SOD). A MnSOD é uma enzima, localizada na mitocôndria, sendo parte do complexo interdependente de enzimas antioxidantes que protegem as células do dano oxidativo, por converter rapidamente o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. A MnSOD é de particular interesse por sua habilidade em catalizar o superóxido na mitocôndria, seu sítio de produção. O H₂O₂ é subseqüentemente inativado por catalase ou por glutathione peroxidase na mitocôndria e no citosol. A MnSOD é a única entre as enzimas antioxidantes que é modulado em resposta a estímulos como fatores de crescimento, citocinas (incluindo IL-1) e radiações ionizantes. Embora a MnSOD corresponda apenas a 25% da atividade total das enzimas superóxido dismutases, é a primeira linha de defesa contra os radicais superóxidos gerados por fosforilação

oxidativa da mitocôndria, radiação UV e processos inflamatórios. A MnSOD tem sido identificada como principal fator de controle da senescência celular, com função no controle da gênese tumoral e do envelhecimento celular. Estudos mostram que o aumento de MnSOD nos fibroblastos humanos é parcialmente mediado, via parácrina, por IL-1 alfa, IL-beta e TNF alfa, liberados pelos ceratinócitos, como mediadores solúveis, em resposta a irradiação UVB. A radiação UVA também estimula a liberação de enzimas antioxidantes. Entretanto, a IL-1, antagonicamente, induz a geração de ROS nos fibroblastos (Naderi-Hachtroudi *et al.*, 2002; Nelson e Melendez, 2004).

A causa do envelhecimento cronológico é muito menos clara do que a do fotoenvelhecimento. Muitas teorias tentam explicá-lo. Uma delas é a teoria dos radicais livres, em que o envelhecimento resultaria do dano celular por excesso de ROS, que são gerados como consequência do metabolismo oxidativo mitocondrial por complexos enzimáticos, durante a fosforilação oxidativa. As espécies reativas de oxigênio podem ser subclassificadas em radicais livres e compostos não radicais. Entre os radicais livres estão ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (HO) e radical peróxil (ROO^{\cdot}). São considerados compostos não radicais, oxigênio *singlet* (1O_2), peróxido orgânicos (ROOH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Fisher *et al.*, 2002).

A senescência celular está relacionada com o encurtamento do telômero. Durante a mitose das células somáticas, a DNA polimerase não pode replicar os pares de base finais de cada cromossomo, telômero, resultando em encurtamento progressivo a cada divisão celular. Assim, os fibroblastos humanos encurtam o telômero mais de 30% durante a vida adulta. O encurtamento dos telômeros sinaliza para a senescência ou para apoptose, dependendo do tipo de célula. Durante a senescência, os fibroblastos aumentam a expressão de genes que codificam

proteínas da MEC, como a fibronectina, bem como proteases envolvidas na sua modulação, como colagenases e estromelosinas. Nesta fase da vida, o nível de certos inibidores das MMPs (TIMPs) estão diminuídos (Fisher *et al.*, 2002).

3.2.4 Histopatologia do envelhecimento

Histologicamente, existem diferenças do envelhecimento na pele exposta e na não exposta. Nas regiões cobertas do corpo, as mudanças são menos evidentes, com adelgaçamento da epiderme, heterogenicidade do ceratinócito basal, aplainamento da junção dermo-epidérmica e perda ou diminuição do tecido celular subcutâneo. Em contraste, na pele fotoexposta, a epiderme apresenta-se atrófica com espessamento do estrato córneo, acompanhada de perda da polaridade do ceratinócito, atipia celular e irregularidade no tamanho das células de Langerhans (Lavker e Kligman, 1988).

As alterações mais características do fotoenvelhecimento ocorrem nas fibras elásticas e de colágeno. O número de fibras elásticas aumenta e essas tornam-se mais espessas, enroladas, emaranhadas e finalmente homogêneas. O colágeno diminui, e a derme da pele fotodanificada é ocupada principalmente por fibras elásticas e glicosaminoglicanos. Essas mudanças recebem o nome de degeneração basofílica do colágeno. A área afetada se limita à parte superior da derme e está separada da epiderme por uma estreita faixa de tecido colágeno normal (zona de Grenz). Os neutrófilos infiltram a pele exposta à radiação UV, rapidamente, entretanto, monócitos/macrófagos predominam no infiltrado e participam na proteólise, na fagocitose e na imunossupressão. O dano actínico também envolve a microcirculação, muitos vasos tornam-se obliterados e o restante torna-se dilatado. A

pele fotoenvelhecida pode ser chamada de cronicamente inflamada (Bennett *et al.*, 2008).

No envelhecimento cronológico, as células na derme se tornam escassas. O metabolismo do fibroblasto diminui com a idade e sua habilidade em sintetizar a MEC está diminuída, resultando na atrofia da derme. Simultaneamente, o balanço entre elastase e colagenase e seus inibidores está alterado, levando a modificações na propriedade mecânica da pele. Uma das principais conseqüências histológicas é a alteração da rede elástica, predominantemente na derme papilar, alterando não apenas a junção dermo epidérmica como também contribuindo para perda da elasticidade e da resistência (Nola e Kotrulja, 2003).

Hase e colaboradores, através de estudos imuno-histoquímicos, estudaram o infiltrado inflamatório na pele fotoexposta. Entre as células do infiltrado foram observados linfócitos T duplamente marcados, para CD₃ e para MMP-1. Esses linfócitos encontravam-se em contato com outras células também marcadas para MMP-1. Esses achados morfológicos sugeriram que os linfócitos T na pele fotodanificada poderiam contribuir na degeneração e na redução do colágeno através da atividade de MMP-1. Os autores citaram, ainda, que os linfócitos T expressavam MMP-2, MMP-9 e MMP-10, e que os macrófagos também secretavam MMP-1. Além disso, descreveram que a produção de MMP-1 por macrófagos e fibroblastos era potencializada na presença de linfócitos T (Hase *et al.*, 2000).

Rijken e colaboradores (Rijken *et al.*, 2005) relataram que o infiltrado neutrofilico na pele que acompanha a exposição solar pode ter função importante no fotoenvelhecimento da pele humana. Através de zimografia *in situ*, detectaram liberação de enzimas ativas como elastase de neutrófilos, colagenase (MMP-1) e gelatinase (MMP-9). Observaram, através de imuno-histoquímica, aumento de MMP-

1, MMP-8 e MMP-9 somente na pele irradiada com dose maior ou igual a dose eritematosa mínima de radiação simulada de sol. Além disso, esse estudo demonstra que a dupla coloração da célula, tanto para elastase de neutrófilo como para MMP-1, sugere que essas MMPs sejam derivadas de neutrófilos, e não de queratinócitos ou fibroblastos.

3.3 Relação entre Terapia Fotodinâmica e Fotoenvelhecimento

Os efeitos da luz sobre a pele envolvem mecanismos complexos. O balanço entre o dano dérmico e a indução ao reparo parece definir o efeito final. A TFD foi utilizada como possível método indutor da remodelação dérmica na pele fotodanificada, na ausência de tumor. Desta forma, são de fundamental importância os estudos que avaliaram a resposta da MEC à radiação UV.

O fotoenvelhecimento é mediado por absorção direta da radiação UV e por reações fotoquímicas mediadas por ROS. Esses têm papel importante na etiopatogenia do envelhecimento (Naderi-Hachtroudi *et al.*, 2002), e também participam do mecanismo de ação da TFD (Calzavara-Pinton *et al.*, 2007), podendo participar de uma via de mecanismo em comum entre o processo de fotodano e a TFD.

O envelhecimento é um processo inflamatório crônico que desencadeia, continuamente, um mecanismo de reparo compensatório (Nola e Kotrulja, 2003). O colágeno maduro encontra-se em contínuo *turn over* para que o tecido conectivo mantenha função adequada. Além disso, quando a pele sofre injúria, o tecido conectivo deve ser remodelado. É descrito que o dano à MEC, pela ação das MMPs, e seu reparo, através da síntese de colágeno, podem ser modulados por

mecanismos inflamatórios (Kang *et al.*, 2001). Talvez, esses mecanismos possam ser regulados pela TFD, de modo similar ao que ocorre na remodelação dérmica induzida pela própria radiação ultravioleta, no processo de dano e reparo do envelhecimento.

A resposta à radiação UV envolve vias complexas que se iniciam em receptores de superfície celular que ativam fatores de transcrição AP-1 e NF-Kapa B. Entre os genes regulados por esses fatores, estão os genes da MMP-1, MMP-9, MMP-3 e MMP-10. Além de degradar o colágeno IV e a elastina, a MMP-9 quebra o colágeno já clivado por MMP-1, anteriormente. A clivagem, pela MMP-9, das frações de alto peso molecular do colágeno, já clivado por MMP-1, interrompe a inibição da síntese de novo colágeno tipo I (Fisher *et al.*, 2002). A AP-1 é induzida por fatores de crescimento, citocinas e luz solar, e sua ativação aumenta a transcrição de citocinas, como a IL-2, e também a transcrição de algumas MMPs. O NF-kapa B é responsável, ao menos em parte, pelo recrutamento de células da circulação para a pele. Isto ocorre através da regulação da expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 beta e TNF-alfa. A infiltração de neutrófilos é responsável pelo aumento de MMP-8 (colagenase), que contribui para a degradação da derme (Kang *et al.*, 2001).

Por outro lado, a liberação epidérmica do IL-1 α , IL-1 β e TNF- α foi identificada como mediadora de enzimas antioxidantes, como a MnSOD. Desta forma, contribuindo para o reparo das modificações dérmicas, através de um efeito parácrino da epiderme para a derme (Chung *et al.*, 2001; Naderi-Hachtroudi *et al.*, 2002). Outro importante regulador da remodelação dérmica é o TGF beta, não só por estimular a síntese de colágeno, como também por inibir suas enzimas degradadoras. O TGF beta é uma citocina multifuncional que regula positivamente a

produção de pró-colágeno tipo I e III, e sua ação é mediada por receptores celulares de superfície (Kang *et al.*, 2001).

Recentemente, foi demonstrado que a TFD pode modular a expressão de interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10) nos tumores e nos tecido normais. A TFD induz alterações na membrana plasmática e nas membranas das organelas. Esse dano à célula pode desencadear a ativação de genes reguladores do processo apoptótico e, possivelmente, de genes de algumas citocinas. Conseqüentemente, uma resposta inflamatória acompanha o mecanismo de destruição do tumor mediado por TFD. A principal característica do processo inflamatório é a liberação de substâncias vasoativas, componentes do complemento, proteinases, peroxidases, citocinas, fatores de crescimento e outros imunoreguladores. Há relatos também do aumento da liberação de IL-1 β , IL-2, TNF- α e fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) (Dougherty *et al.*, 1998).

Foi demonstrado que os ceratinócitos são a principal fonte de citocinas, na epiderme. Essas citocinas podem modular, não apenas seu próprio fenótipo através de uma via autócrina, como também influenciar o fenótipo de células dérmicas por um mecanismo parácrino, podendo ter efeitos mais distais (Brenneisen *et al.*, 1999). Assim, durante a TFD as citocinas derivadas dos ceratinócitos podem desencadear respostas dos fibroblastos dérmicos. Estudos, *in vitro*, para a quantificação de MMPs e da expressão do mRNA do colágeno, mostraram aumento de MMP- 1 e -3 e redução da expressão do colágeno tipo I, em cultura de fibroblastos tratados com ALA e luz vermelha (Karrer *et al.*, 2003). Nesse estudo, os fibroblastos dérmicos foram retirados da pele normal e com esclerodermia e, posteriormente, submetidos à TFD. O resultado obtido sugere um efeito anti-esclerótico da TFD na pele.

Outro estudo, *in vitro*, de extrema importância para a avaliação da resposta

inflamatória e imunológica dos ceratinócitos e fibroblastos, induzida pela TFD, foi realizado por Sigrid Karrer e colaboradores (Karrer *et al.*, 2004) que desta vez, usaram dois modelos de investigação diferentes. No primeiro, os ceratinócitos foram tratados por ALA-TFD e, depois, os produtos de liberação dessas células foram aplicados aos fibroblastos. No segundo modelo, foi criada uma membrana com colágeno IV (simulando a membrana basal), separando os ceratinócitos e os fibroblastos. Nesse segundo estudo, os produtos de liberação dos ceratinócitos tratados por TFD precisavam atravessar a membrana para exercer o efeito parácrino nos fibroblastos. No primeiro modelo, houve apenas aumento da produção de IL-1 no fluido da cultura de ceratinócitos isolados. E somente depois que os fibroblastos eram expostos a esses produtos de liberação de ceratinócitos, um aumento de MMP-1 e MMP-3 era observado. O que demonstra que a TFD leva a aumento de MMPs pelos fibroblastos e não pelos ceratinócitos. No segundo modelo, também havia aumento de MMP-1 e MMP-3. Entretanto, um maior tempo era necessário para que esses produtos de liberação de ceratinócitos atravessassem a membrana até os fibroblastos. Nesse estudo, nenhum dos modelos levou à diminuição de mRNA de colágeno tipo I, sugerindo que a síntese desse colágeno não é regulada pelo efeito parácrino dos ceratinócitos aos fibroblastos, diferente do que ocorreu com as MMPs 1 e 3. A associação dos resultados dos dois estudos de Karrer e colaboradores, permitem concluir que, após a TFD, os fibroblastos podem aumentar a produção de MMPs por via direta ou parácrina (aumento de IL-1). E que a síntese de colágeno tipo 1 é diminuída, apenas, por efeito direto sobre os fibroblastos, *in vitro*. Desta forma, o modelo, *in vitro*, que mimetiza a pele, *in vivo*, demonstra que a TFD pode aumentar a liberação de MMP1 e 3, mas não modificar a capacidade de síntese de colágeno tipo I. Com base nesses dados, talvez possamos especular que

a remodelação da derme induzida pela TFD, *in vivo*, dependa da produção parácrina de citocinas pelos ceratinócitos, as quais estimulariam produção de MMPs pelos fibroblastos, sem impedir a síntese de novo colágeno por essas células.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo de intervenção do tipo antes e depois, sem grupo controle sobre as modificações clínicas, histológicas e imunohistoquímicas induzidas pela TFD em 14 pacientes do sexo feminino apresentando pele fotodanificada. Para a realização da TFD, o medicamento fotossensibilizante escolhido foi o MAL e a fonte de luz, uma lâmpada de diodo com comprimento de onda de 635 nm. Os estudos histológicos e imunohistoquímicos avaliaram os sistemas colágeno e elástico, bem como o sistema degradador da matriz extracelular. A escolha do tamanho da amostra para a pesquisa foi baseada na homogeneidade do grupo com relação à sexo, idade e fototipo, sendo 14 pacientes considerado adequado aos objetivos do estudo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUCFF, com número de protocolo de pesquisa: 023/06 CEP (Anexo 1).

4.2 Pacientes

Trinta e cinco pacientes foram examinados durante o processo de seleção da amostra estudada. Foram selecionados 14 pacientes do sexo feminino, faixa etária entre 55 e 60 anos de idade, fototipo III, apresentando pele fotodanificada, grupo II e III pela classificação de Glogau, sem tratamento prévio por no mínimo três meses, acompanhadas no ambulatório de Dermatologia Corretiva do HUCFF/UFRJ. Após as devidas explicações, todas as pacientes assinaram o termo de

consentimento livre e esclarecido, com informações detalhadas sobre a pesquisa (Anexo 2).

4.2.1 Critérios de inclusão:

Pacientes do sexo feminino, entre 55 e 60 anos de idade, fototipo III, apresentando pele fotodanificada, com ou sem ceratoses actínicas clinicamente evidentes, sem tratamento prévio por no mínimo três meses.

4.2.2 Critérios de exclusão:

Foram excluídas as mulheres que estivessem fazendo uso de reposição hormonal, bem como as que apresentassem qualquer contra-indicação para o tratamento proposto, como porfirias e colagenoses.

4.3 Métodos

4.3.1 Avaliação Clínica

Uma ficha individual, para anotações das consultas realizadas, foi preenchida com as informações cedidas pelas pacientes e com as avaliações do médico pesquisador (Anexo 3). Durante o estudo, as pacientes não fizeram uso de qualquer medicamento tópico, e foram orientadas a usar protetor solar com FPS 30, em veículo creme. As pacientes foram acompanhadas no ambulatório de Dermatologia corretiva do HUCFF no período de 48 horas, sete e quinze dias após cada sessão de TFD, nos primeiros dois meses. As avaliações subseqüentes foram

realizadas a cada 30 dias por mais sete meses.

O exame dermatológico e o estudo fotográfico foram realizados pelo médico pesquisador (máquina fotográfica tipo Sony Cyber-shot 5.0 megapixels), no ambulatório de Dermatologia Corretiva do HUCFF. Outro estudo fotográfico foi realizado por fotógrafo profissional (Fujy S2 10.2 megapixels), em estúdio fotográfico. Os critérios de avaliação clínica foram: melhora da textura (diminuição da aspereza ao toque), das rugas (superficialização), da firmeza (efeito *lifting*), da pigmentação (diminuição do número de melanoses) e das ceratoses actínicas (diminuição do número), no terceiro e no sexto mês de tratamento. O grau de melhora da textura, das rugas e da firmeza não pode ser quantificado, clinicamente, e por isso essas variáveis foram avaliadas, subjetivamente, através da escala descrita por Tina Alster e colaboradores (Alster *et al.*, 2005), no estudo de avaliação da eficácia da TFD na pele fotodanificada. Essa escala considera melhora mínima (< 25%); moderada (25%-50%); significativa (51-75%), e excelente (>75%). As variáveis melanoses e ceratoses actínicas foram avaliadas objetivamente, por quantificação numérica.

4.3.2 Avaliação Histopatológica

4.3.2.1 *Biópsias*

4.3.2.1.1 Técnica

Uma ficha para anotações dos resultados morfológicos, morfométricos e imuno-histoquímicos foi preenchida pelo médico pesquisador (Anexo 4). Foram realizadas biópsias de pele na região pré-auricular antes, três e seis meses após a

última sessão do procedimento proposto (MAL + luz vermelha) em todas as pacientes selecionadas. A biópsia pré-tratamento foi feita na região pré-auricular esquerda, por escolha aleatória. As biópsias após as duas sessões de TFD foram realizadas na região pré-auricular contralateral, mantendo-se uma margem de distância de aproximadamente 1 cm entre a segunda biópsia (após 3 meses de tratamento) e a terceira (pós 6 meses de tratamento). As biópsias foram realizadas com um punch de 5 mm, e a sutura realizada com fio mononylon 5.0 (dois pontos).

4.3.2.1.2 Processamento dos fragmentos de pele

O fragmento de pele foi encaminhado à histopatologia para processamento no período máximo de 12 horas. O material foi fixado em formol tamponado a 10%, incluído em parafina e submetido às técnicas usuais de processamento. Além da coloração de rotina, hematoxilina e eosina (HE), colorações especiais foram realizadas para avaliação dos sistemas colágeno (picro sirius) e elástico (orceína). Também foram realizados estudos de morfometria para a quantificação das fibras colágenas e elásticas, e de imuno-histoquímica para a avaliação da expressão das MMPs (1, 3, 7, 9, 12), do inibidor tecidual de MMPs (TIMP- 1) e dos tipos de colágenos envolvidos (tipos I e III).

Colorações de rotina e especiais

As colorações de rotina e especiais foram realizadas no Laboratório Anticorpos, entretanto as avaliações dos achados obtidos por essas colorações foram feitas no departamento de Anatomia Patológica do HUCFF. Os critérios de avaliação histopatológica na epiderme, analisados pelo HE, foram: a retificação dos cones interpapilares e a despolarização das células da camada basal. Na derme: a

presença e tipo de infiltrado inflamatório, e a distribuição da degeneração basofílica do colágeno. Com o objetivo de facilitar a identificação das possíveis modificações na elastose dérmica, decidimos classificá-la, neste estudo, em: elastose difusa, quando sua distribuição era uniforme na derme reticular sem formação de massas; elastose com formação de massas isoladas; e elastose em faixa compacta.

As colorações pela orceína, para fibras elásticas, e pelo picro sirius, para fibras colágenas, foram usadas para avaliação quanto à morfologia e à distribuição dessas fibras, na derme, seguindo os mesmos critérios de avaliação utilizados na análise pelo HE. Essas colorações especiais também foram usadas para quantificação dessas fibras através da morfometria.

Morfometria

O estudo de morfometria foi realizado no Laboratório de Morfometria e Morfologia Cardio-Vascular do Departamento de Anatomia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, pelo médico pesquisador, sob orientação do professor responsável pelo Laboratório, professor Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda. Para a realização desta técnica, utilizamos imagens capturadas de três campos microscópicos diferentes da derme superficial e média, de cada paciente, antes, três e seis meses após o tratamento. Estas imagens foram observadas com objetiva x 20 (com luz polarizada no caso da coloração pelo vermelho de picro sirius). Na coloração pelo picro sirius, usando a microscopia com luz polarizada, as fibras colágenas ficam birrefringentes com coloração vermelho-alaranjado e verde intenso, e o fundo, em preto. Para capturar as imagens usou-se um sistema de videomicroscopia analógica composto de um microscópio OLYMPUS B 5, câmera de vídeo Evolution LC color. A calibração do sistema foi sempre a mesma, tanto no sistema óptico quanto no digital, com o uso apropriado do diafragma do

condensador do microscópio, contraste, brilho e gama do programa de aquisição com iluminação do tipo Köehler. A análise das imagens foi feita com o auxílio do programa Image Pro Plus versão 5.0 (Cybernetics INC). A partir da definição da variação de cores correspondente ao colágeno, o sistema utilizou como recurso uma máscara binária, em que o colágeno foi representado em branco e o fundo em preto. A densidade de colágeno foi definida em cada campo microscópico analisado, como a proporção de *pixels* brancos na imagem. Da mesma forma, utilizando a coloração de orceína, foi possível quantificar as fibras elásticas.

Imuno-histoquímica

Para estudo imuno-histoquímico, foram utilizados blocos parafinados cortados em micrótomo, para obter cortes de 4 micrômetros. Esses foram estendidos em lâminas previamente lavadas em solução sulfocrômica, emulsionadas com adesivo à base de poli-L-lisina (Poly-L-Lysine, da marca Sigma, USA, cód. P8920) a 10% e colocadas em estufa a 60°C durante 12 horas para melhor aderência do tecido. As lâminas foram identificadas para cada anticorpo e voltaram à estufa a 60°C por 20 minutos. A seguir, foram colocadas em três banhos de xilol (5 minutos cada) e em 3 banhos de álcool em concentrações decrescentes de 95%, 70% e 50% (cinco minutos cada), em temperatura ambiente. Todos os anticorpos seguiram a recuperação antigênica seguindo os procedimentos descritos nas bulas dos testes usados. Para isso, as lâminas foram mergulhadas em tampão citrato de sódio com pH igual a 6.0 em banho-maria a 95 °C por 40 minutos. Foram retiradas do banho-maria e ficaram descansando por 20 minutos em temperaturas ambiente. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água destilada e cicladas por uma caneta hidrofóbica de marca Dako cód. S2002 para evitar que a solução com o anticorpo escorresse. Os anticorpos foram previamente diluídos em solução de TRIS-

TWIN20+BSA a 0,1% e pingados nas lâminas dentro da área circundada pela caneta. Depois de uma hora, as lâminas foram lavadas em tampão TRIS-TWIN20. Posteriormente, foram aplicados os anticorpos secundários do kit da Dako LSAB+ system AP. Ao fim de cada etapa, as lâminas foram lavadas em tampão TRIS-TWIN20 e o cromógeno RED marca Dako cód. K0640 (DILUIÇÃO 1:200) foi adicionado por 3 a 5 minutos, em média. Os anticorpos utilizados foram MMP-1 (Rabbit Polyclonal) Lab Vision – Cat.: RB-1536-P0, MMP-3 (Clone SL-11ID4) Lab Vision - Cat.: MS-810-P0, MMP-7 (Clone ID2) Lab Vision - Cat.: MS-813-P0, MMP-9 (Rabbit Polyclonal) Lab Vision - Cat.: RB-1539-P0, MMP-12 (Goat Polyclonal) Santa Cruz Biotechnology - Cat.: SC-12361, TIMP (Clone 102D1) Lab Vision - Cat.: MS-608-P0, Collagen Type I (Clone COL-1) Sigma - Cat.: C2456, Collagen Type III (Clone HWD1.1) BioGenex - Cat.: MU167-UC. As diluições dos anticorpos foram de 1:50 para MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, TIMP. Diluição de 1:75 para MMP-12 e diluição de 1:100 para colágenos tipos I e III.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e contra-coradas em hematoxilina de Harris, azuladas em água corrente, depois de secas foram montadas com goma de Damar da marca Proquímios para fixação das lamínulas e posterior observação ao microscópio óptico. A intensidade da coloração dos substratos, avaliados pela imuno-histoquímica, foi classificada de acordo com a escala de Bakos (Bakos *et al.*, 2007) modificada: ϕ , ausência de marcação ou marcação ocasional; +, marcação do substrato de forma pontual, com coloração de leve intensidade; ++, marcação de forma multifocal ou descontínua, com coloração de moderada intensidade; +++, marcação de forma contínua com coloração moderada à intensa. A avaliação dos resultados imuno-histoquímicos, de acordo com a escala utilizada, foi realizada no Laboratório Anticorpos, pelo médico

pesquisador e outros dois observadores, médicos patologistas responsáveis pelos exames de imuno-histoquímica desse laboratório. Uma ficha com os critérios de avaliação foi preenchida pelos médicos, e os resultados das suas observações foram comparados. Caso houvesse divergência de opiniões quanto aos resultados encontrados, uma nova avaliação seria feita para um acordo comum.

4.3.3 Terapia Fotodinâmica

4.3.3.1 *Técnica*

A TFD foi realizada em duas sessões com intervalo de quatro semanas, em 14 pacientes. O fotossensibilizante tópico usado foi o MAL (metvix[®] -GALDERMA), e a fonte de luz para iluminação da pele foi uma LED de fonte de luz visível com comprimento de onda vermelha, 635 nm (AKTILITE[®]-PHOTOCURE). Uma camada de aproximadamente 1mm de espessura do medicamento fotossensibilizante foi aplicada em toda a face, aproximadamente 1g para toda a área tratada, em cada sessão (Figura 1). O tempo de aplicação do MAL foi de 2 horas, com curativo oclusivo, usando filme plástico, para aumentar a penetração (Figura 2). O curativo oclusivo foi recoberto com papel alumínio para proteção luminosa com objetivo de impedir a influência da luz ambiente durante o processo de produção de protoporfirina (Figura 3). O excesso do medicamento foi retirado com soro fisiológico a 0,9% e gaze, antes da exposição da luz. A distância entre a LED e a pele foi aproximadamente 8 cm. A lâmpada utilizada foi o AKTILITE[®], produzida pela Photocure, indústria norueguesa, que tem irradiância de 70-100 mW/cm² e está programada para oferecer a dose de 37 J/cm², dose padrão, no período de 7 a 10 minutos e desligar automaticamente. Durante o estudo, a lâmpada foi revisada por

técnico especializado para que pudéssemos ter a certeza de que a mesma dose de energia seria utilizada em cada sessão para todas as pacientes. Após cada sessão, as pacientes foram orientadas a não submeterem-se à exposição solar por 48 horas.



Figura 1 Aplicação tópica do MAL na face



Figura 2 Curativo oclusivo



Figura 3 Proteção luminosa

4.3.3.2 *Efeitos Colaterais*

Os efeitos colaterais como eritema, edema e descamação foram avaliados pelo médico observador. A escala utilizada foi a de valor numérico de zero a dez, e definida em leve (1 a 3), moderado (4 a 6) e intenso (maior que 7). A dor foi classificada subjetivamente pelos pacientes utilizando-se a mesma escala.

4.3.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no Laboratório de Análise de Dados Epidemiológicos (LADE) do Instituto de Estudos em Saúde Coletiva (IESC) da UFRJ. A escolha do tamanho da amostra para a pesquisa foi baseada na homogeneidade do grupo com relação à sexo e idade, sendo o grupo de 14 pacientes considerado adequado aos objetivos do estudo.

Os testes estatísticos utilizados foram os de Wilcoxon e de X^2 de Mc Nemar, de acordo com a escala de mensuração das variáveis. Para a avaliação dos

resultados da expressão imuno-histoquímica de MMPs 1, 3, 7, 12, para TIMP-1 e colágeno tipo III foi utilizado o teste χ^2 de Mc Nemar, onde os resultados pareados mostraram apenas duas categorias da escala ordinal. O teste de Wilcoxon foi utilizado para analisar os resultados da expressão imuno-histoquímica da MMP-9 e de colágeno tipo I, no qual os resultados pareados mostraram mais de duas categorias ordinais. O teste de Wilcoxon, também, foi usado para a análise da morfometria, que apresenta resultado numérico. O nível de significância estatística foi estabelecido como $p < 0,05$. O programa utilizado para a análise dos dados foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences – versão 13.0).

5 RESULTADOS

Entre as 14 pacientes avaliadas, com média de idade de 57,57 anos, 10 apresentavam fotoenvelhecimento moderado (grupo II pela classificação de Glogau), com melanoses solares e ceratoses palpáveis, mas não visíveis; quatro apresentavam fotoenvelhecimento avançado (grupo III pela classificação de Glogau), com discromias, telangiectasias e ceratoses actínicas visíveis.

Quatro das 14 pacientes apresentaram melhora clínica global (textura, rugas e firmeza), ao exame dermatológico após 3 meses tratamento. Conforme a escala utilizada para este estudo (Quadro 2), houve melhora mínima (n=1), melhora moderada (n=1), melhora significativa (n=2) (Figura 4) e melhora excelente (n=0), neste período. Essa melhora clínica somente foi observada em outras seis pacientes entre o terceiro e sexto mês, o que justificou a necessidade de uma terceira biópsia (após o sexto mês de tratamento). Após o sexto mês de tratamento (Quadro 2), observamos melhora mínima (n=1) (Figura 5), melhora moderada (n=3), melhora significativa (n=2) (Figura 6) e melhora excelente (n=0). Neste período, foi possível observar melhora da firmeza da pele, chamado de efeito *lifting* por alguns autores, em um total de 10 pacientes (Figura 7). Entre essas 10, três pacientes apresentavam ceratoses actínicas no exame pré-tratamento. Duas evoluíram com melhora significativa já nos primeiros três meses após tratamento, e diminuição do número de ceratoses. Uma delas apresentou melhora clínica moderada somente no sexto mês de tratamento, com involução total das lesões de ceratose actínica.

Pacientes	Tempo	Grau de melhora clínica (textura, rugose firmeza)
1	-	Nenhuma
2	6 meses	Mínima
3	6 meses	Moderada
4	3 meses	Significativa
5	3 meses	Mínima
6	6 meses	Moderada
7	6 meses	significativa
8	6 meses	Moderada
9	-	Nenhuma
10	3 meses	Significativa
11	-	Nenhuma
12	-	Nenhuma
13	6 meses	Significativa
14	3 meses	Moderada

Mínima (< 25%); Moderada (25% a 50%); Significativa (51% a 75%); Excelente (> 75%)

Quadro 2 Grau de Melhora Clínica (textura, rugas, firmeza) após 3 e 6 meses de tratamento



Figura 4 Paciente 10: Melhora clínica significativa depois de 3 meses de tratamento



Figura 5 Paciente 2: Melhora clínica mínima depois de 6 meses de tratamento



Figura 6 Paciente 7: Melhora clínica significativa depois de 6 meses de tratamento



Figura 7 Paciente 10: Melhora da firmeza da pele (efeito *lifting*) depois de 6 meses de tratamento

Dez pacientes apresentavam melanoses solares, totalizando 213 lesões. Apenas duas pacientes não apresentaram diminuição do número de melanoses. Ao final de 3 meses, nove pacientes totalizaram 125 lesões de melanoses, observando-se uma melhora de 58.68%. Quatro pacientes que apresentavam lesões de ceratose actínica somavam o total de 55 lesões antes do início do estudo. Todas apresentaram melhora, com cura completa de 89,09% das lesões (55 lesões antes e somente seis após o terceiro mês). Ao final de seis meses, a taxa de cura das ceratoses actínicas manteve-se inalterada (Figura 8).



Figura 8 Paciente 10: Cura completa das ceratoses actínicas após 6 meses de tratamento

Os efeitos colaterais como eritema, edema e descamação foram avaliados pelo médico observador, e houve uma concordância de opinião entre os pacientes e o médico quanto ao grau desses efeitos. Eritema, edema, descamação foram avaliados em leve (n= 11), moderado (n=2) e intenso (n=1) (Figura 9), conforme classificação usada neste estudo, e foram semelhantes nas duas sessões de

tratamento. Entre os efeitos colaterais, o mais importante foi a dor tipo queimação, relatada por todos os pacientes, de intensidade moderada (n= 13) a intensa (n=1) (Tabela 1). Este desconforto iniciava-se aos primeiros 2 minutos de iluminação, mantendo-se até o final dessa. Posteriormente, era observada uma melhora progressiva da dor em um período de 2 a 24 horas após o procedimento. Uma sensação de ardência discreta foi relatada entre 24 e 48 horas. O eritema e o edema puderam ser observados durante a iluminação e imediatamente após o procedimento, com regressão gradual em três dias, seguido de descamação no período de 7 a 14 dias (Figura 10).



Figura 9 Paciente 10: Reação inflamatória intensa no pós-tratamento imediato

Tabela 1 Efeitos Colaterais (n=14)

	LEVE	MODERADO	INTENSO
DOR	0	13	1
ERITEMA	11	2	1
EDEMA	11	2	1
DESCAMAÇÃO	11	2	1

**Figura 10** Paciente 10: Descamação intensa após 10 dias de tratamento

O exame histopatológico pré-tratamento, pelo HE, revelou que três pacientes apresentavam retificação dos cones interpapilares e quatro, displasia das células epidérmicas (três com dano actínico leve e uma com dano actínico representado por

ceratose actínica). Uma paciente apresentava lentigo solar. Todas as 14 pacientes apresentavam elastose solar, com formação de área amorfa do colágeno estendendo-se desde a derme papilar até a derme média, à altura do músculo eretor do pêlo, tornando-se menos evidente ao atingir a derme profunda. Oito pacientes apresentavam elastose de forma difusa - três de forma difusa leve, quatro com elastose difusa moderada, uma difusa intensa (Figura 11 e 12). Quatro pacientes apresentavam elastose com massas isoladas (três de forma moderada e uma com formação de massas isoladas de forma intensa). Apenas duas pacientes apresentavam intensa elastose na forma de faixa na derme reticular. Pela coloração orceína, poucas fibras elásticas na derme papilar e reticular superior mantinham seu aspecto morfológico normal ao exame pré-tratamento. A configuração da elastose solar foi bem evidenciada por essa coloração, que mostrou formação de massas de material elastótico na derme reticular, ou a presença de elastose com distribuição difusa ou em faixa, conforme descrito anteriormente pelo HE. Com relação à presença do infiltrado inflamatório, doze pacientes apresentavam infiltrado leve a moderado, predominantemente linfocitário, com raros eosinófilos, ao redor de vasos e anexos.

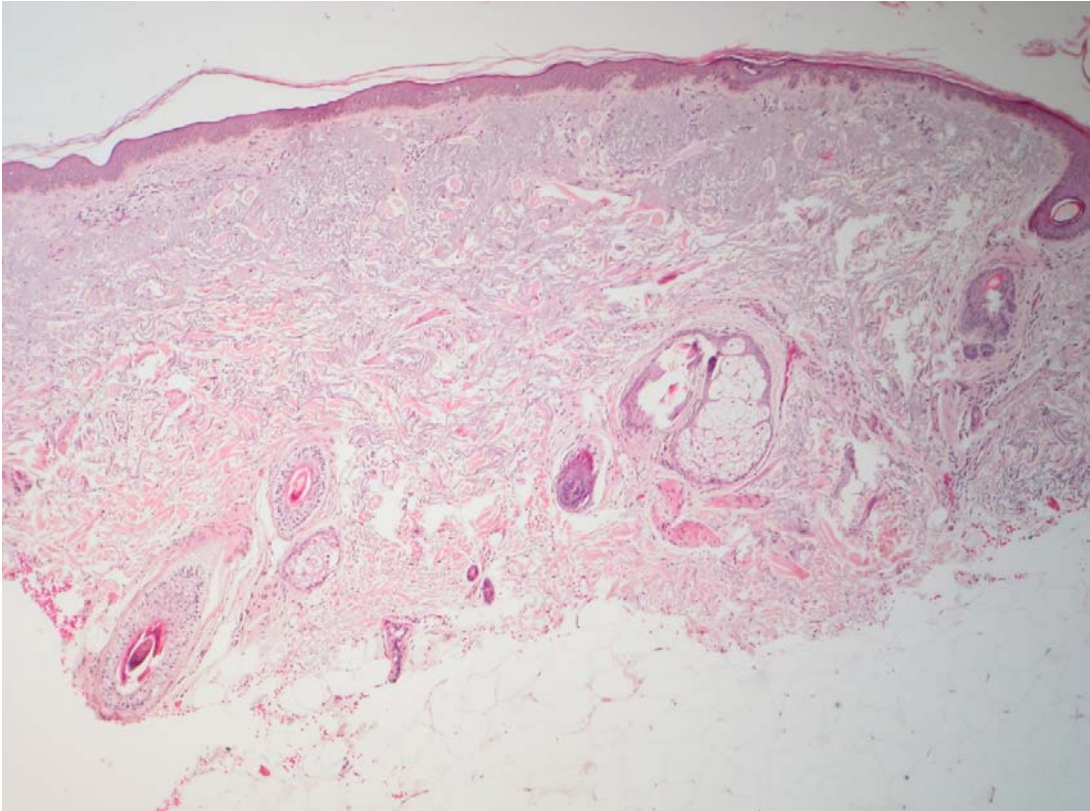


Figura 11 Elastose solar difusamente dispersa na derme superficial antes do tratamento (HE – pequeno aumento)

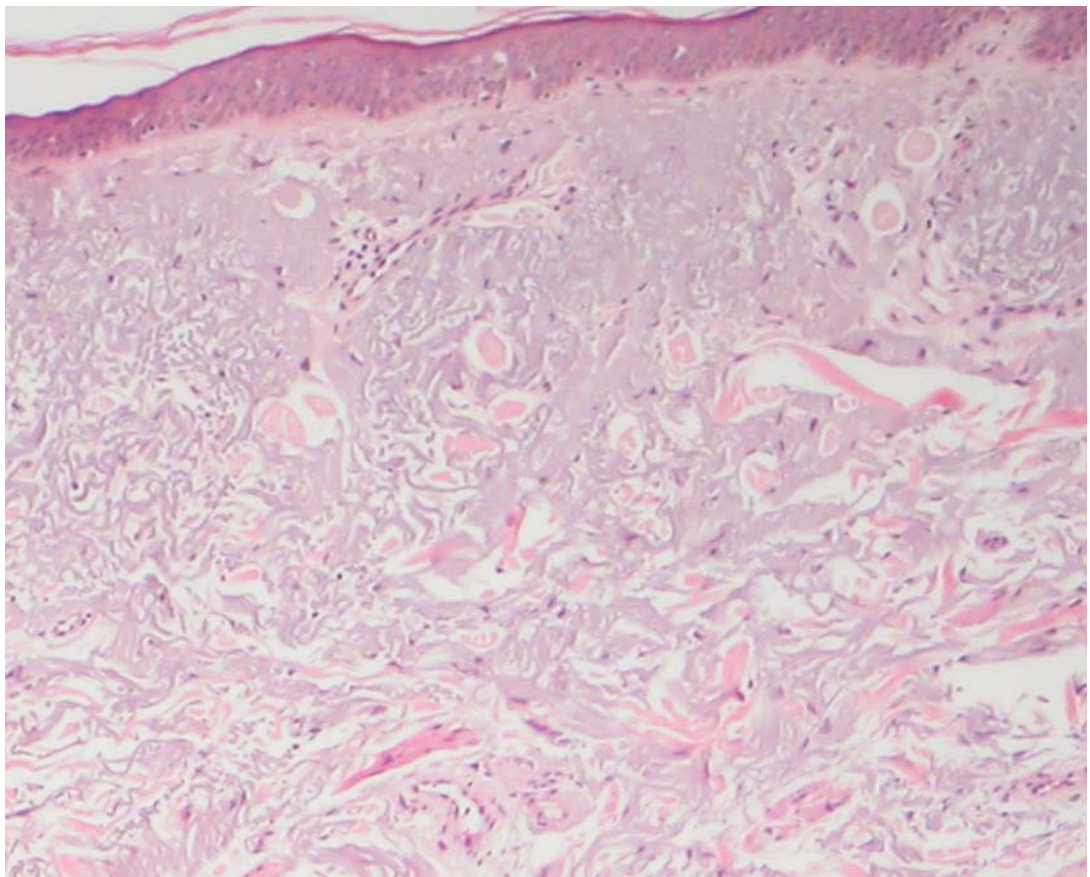


Figura 12 Close da Figura 1

Após três meses, o exame histopatológico à coloração pelo HE, mostrou que a retificação dos cones interpilares foi mantida. As pacientes com displasia do epitélio e ceratose actínica não mais apresentavam pleomorfismo dos núcleos ou figuras de mitose. O lentigo solar não se modificou. Todas mantiveram o infiltrado linfocitário perianexial e perivasular, predominantemente. Neste período, foi possível observar uma modificação do aspecto na área de elastose solar em cinco casos, onde fibras de colágeno mais individualizadas, ausentes no exame anterior, surgiram entremeando o material amorfo (Figura 13). Em três desses casos e em outros dois casos, também, foi possível observar uma área bem delimitada abaixo da lâmina basal com fibras de colágeno bem individualizadas (Figura 14). Essa área, formando uma faixa, se mostrava bem mais evidente do que no exame pré-tratamento, onde a área amorfa de elastose alcançava a derme papilar até o nível da membrana basal. A modificação do padrão de apresentação da elastose solar, da forma de massas isoladas para a forma difusa, ocorreu em apenas uma paciente. Neste período, houve diminuição da compactação das fibras elásticas, que se mostravam espessas e aglomeradas, pela coloração orceína, em uma paciente (Figura 15). Em outro caso, foi possível observar fibras elásticas mais finas na derme superior, com aspecto em candelabro na derme papilar (Figura 16).

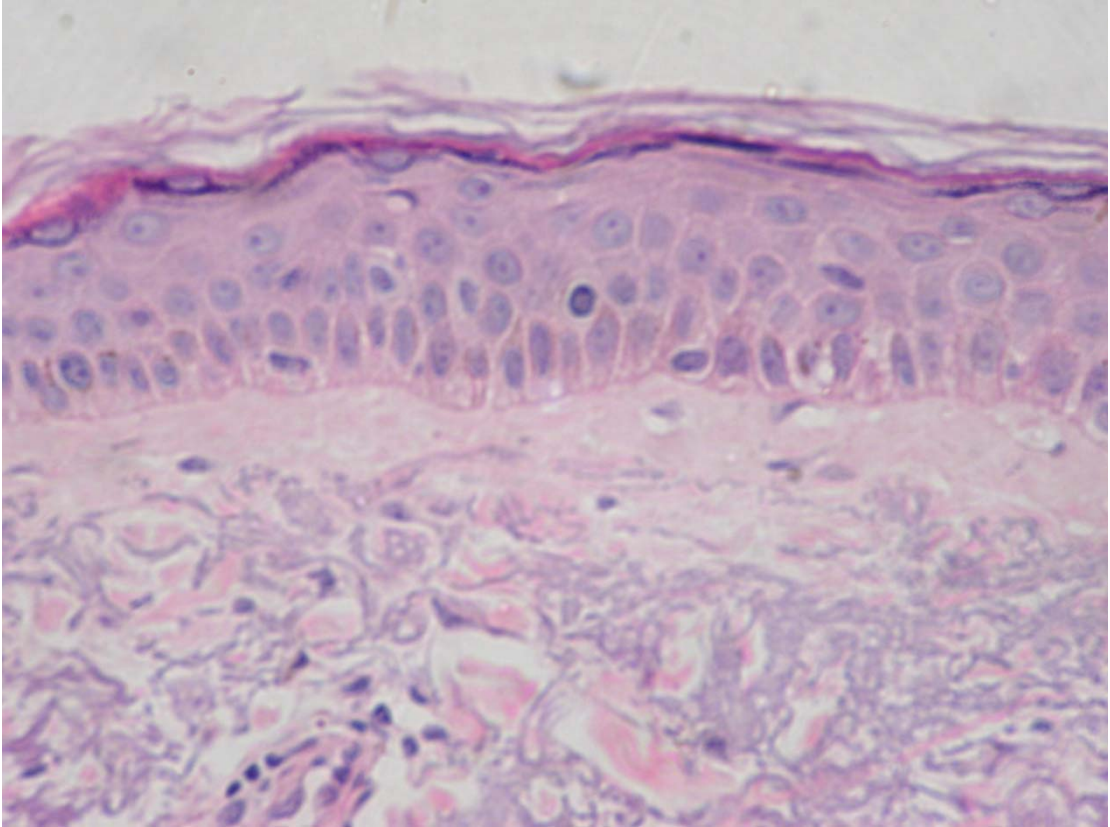


Figura 13 Fibras colágenas entre material elastótico na derme superficial depois 3 meses de tratamento (HE – grande aumento)

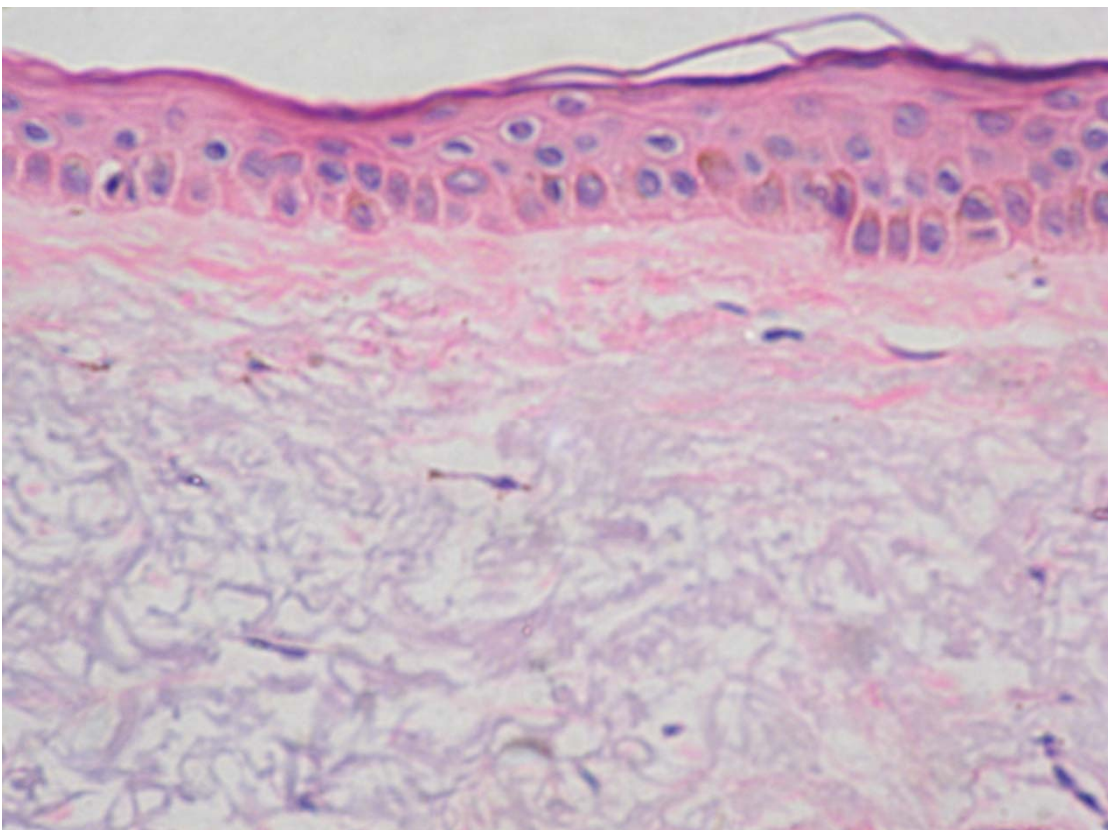


Figura 14 Área de fibras colágenas bem definidas, em faixa, abaixo da membrana basal depois de 6 meses de tratamento (HE – médio aumento)

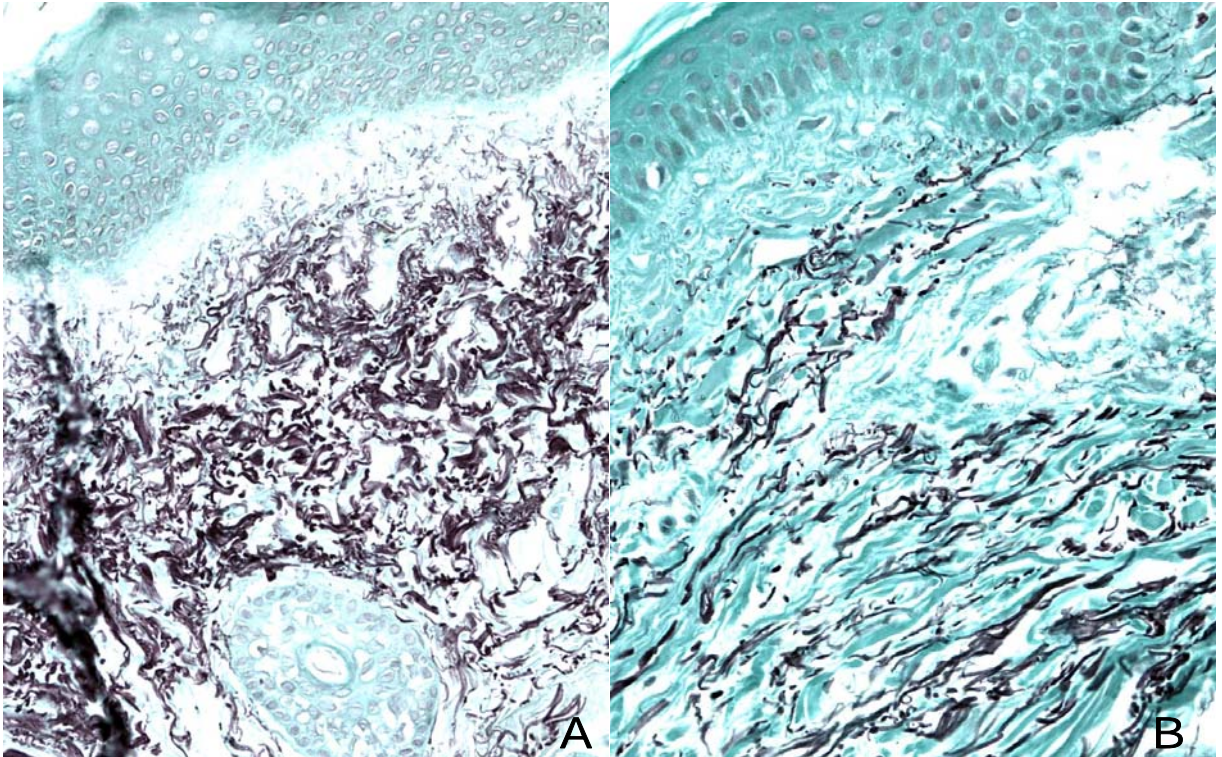


Figura 15 Diminuição da compactação das fibras elásticas após 3 meses de tratamento. A: pré-tratamento e B: pós-tratamento (orceína – médio aumento)

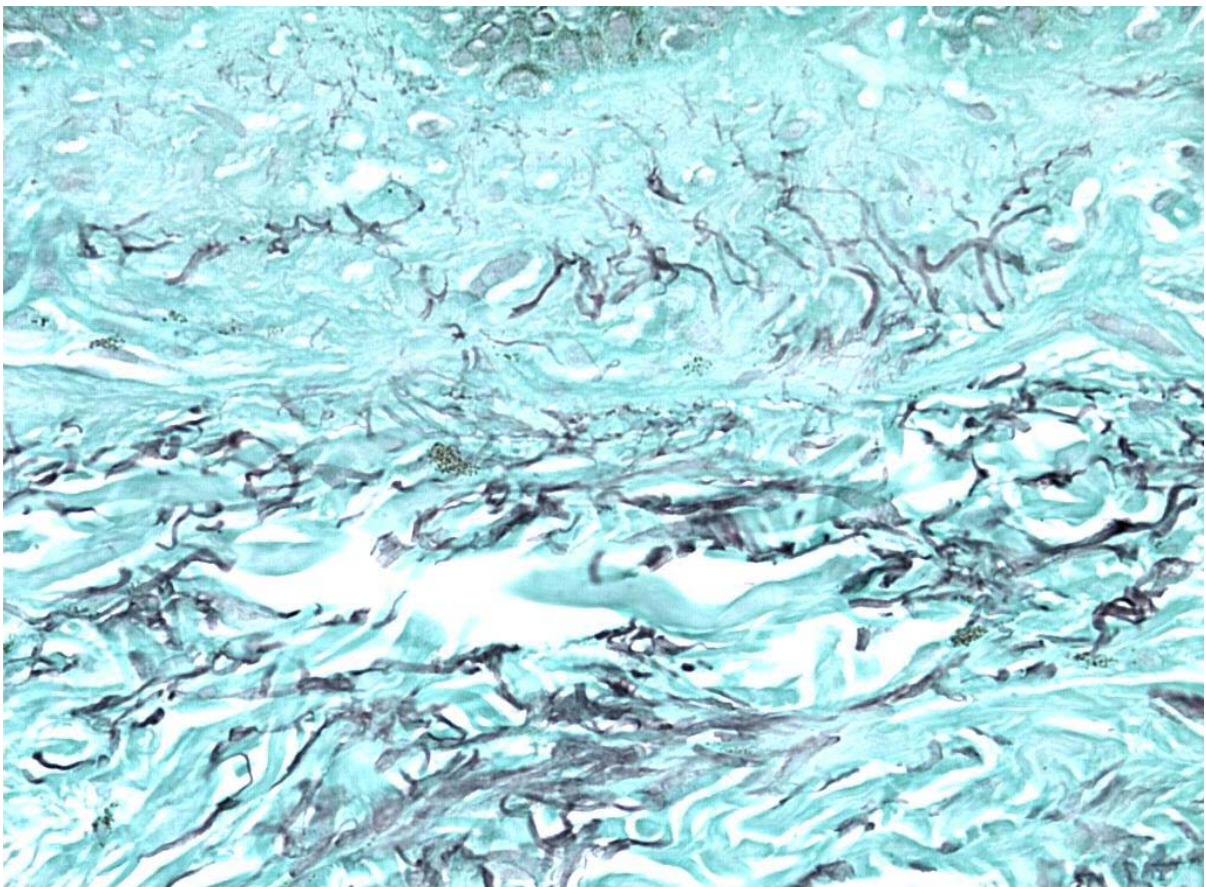


Figura 16 Derme papilar ocupada por fibras elásticas finas, dispostas predominantemente em sentido perpendicular à superfície epidérmica após 3 meses de tratamento (orceína- grande aumento)

Após 6 meses de tratamento, outras cinco pacientes também apresentaram aumento do número de fibras de colágeno individualizadas dentro do material elastótico na derme superior, o que não havia sido revelado ao exame pré ou pós três meses. O infiltrado inflamatório se manteve como no exame anterior. Desta forma, ao final de seis meses, a presença das fibras colágenas entremeando o material elastótico foi observado em 10 das 14 pacientes.

Pela coloração da orceína, uma diminuição da compactação do material elastótico foi observada em cinco pacientes. O aparecimento de fibras elásticas mais finas, com aspecto aparentemente normal, foi observado em três pacientes.

À Imuno-histoquímica, foi possível observar um padrão de distribuição diferente entre os substratos avaliados. A MMP-9 apresentou marcação de leve à moderada intensidade tanto na epiderme quanto na derme (Figura 17). Na epiderme pode ser observada em todas as camadas, predominantemente suprabasal. Todos os outros substratos apresentaram marcação apenas na derme.

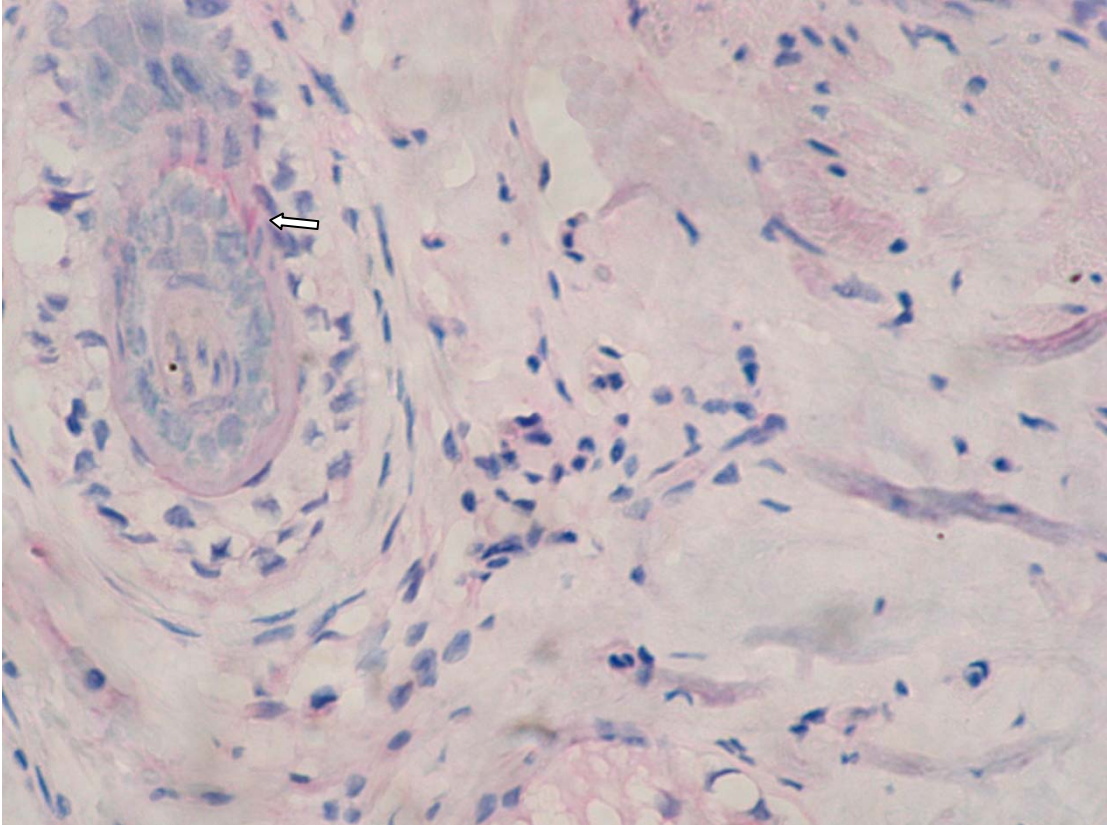


Figura 17 Leve marcação (coloração por fosfatase alcalina - cor rosa) de MMP-9 na derme, ao redor do folículo piloso, antes do tratamento (imuno-histoquímica grande aumento),

A distribuição da marcação de colágeno tipo I foi evidenciada em toda a derme (Figura 18). A coloração para colágeno III apresentou distribuição diferente do colágeno tipo I, sendo mais evidentemente marcada ao redor de vasos e anexos e, também dentro da área de elastose. A distribuição de MMP-1 foi observada no estroma dérmico, mas principalmente dentro da área de elastose. A MMP-3 estava presente nas células do estroma dérmico, no endotélio e, raramente, nos linfócitos. Quanto à MMP-7, a marcação foi observada principalmente nos folículos pilosos e ao redor desses, e também dentro da área de elastose solar. A MMP-9 foi evidenciada nas células do estroma dérmico, nas células endoteliais e inflamatórias, sendo mais evidente ao redor de vasos e anexos e dentro da área de elastose solar.

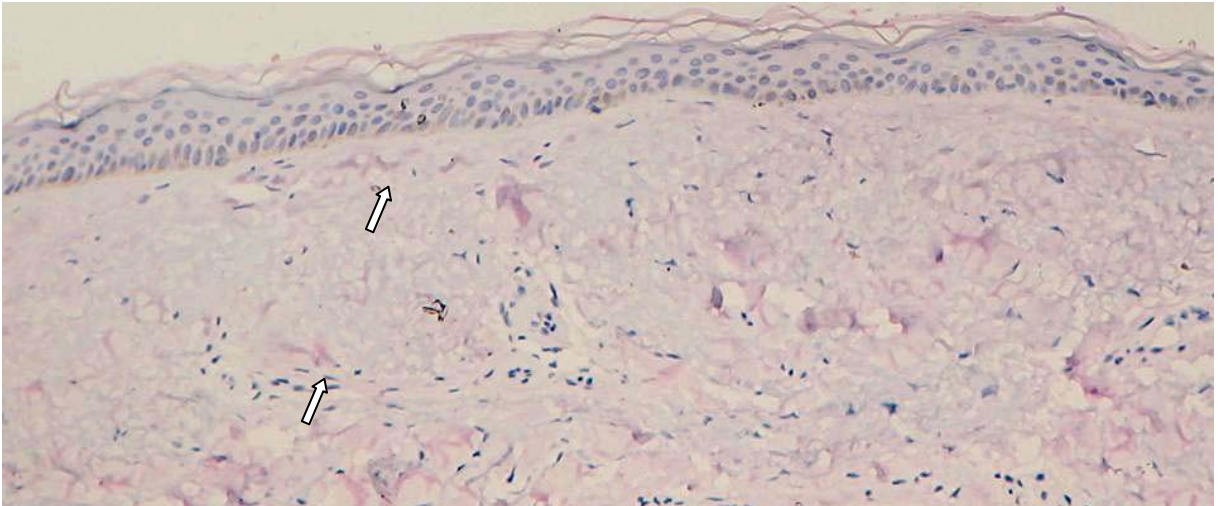


Figura 18 Leve marcação de fibras colágenas tipo I (coloração por fosfatase alcalina - cor rosa), entremeando a área de elastose solar, na derme reticular, antes do tratamento (imuno-histoquímica médio aumento)

A intensidade da imuno marcação, na derme, foi ausente ou ocasional para MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-12 e TIMP-1, sem modificação significativa durante o período de tratamento (Tabela 2). A marcação para colágeno tipo III variou de intensidade leve a moderada, sem modificação significativa da marcação no período pós três e seis meses (Tabela 3).

Tabela 2 Modificações na intensidade da coloração de MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-12 e TIMP pela imuno-histoquímica durante o tratamento

MMPs e TIMP-1	Antes do tratamento		Valor de p Teste de χ^2 de McNemar
	0	+	
MMP-1	Depois de 3 meses		0,500
	0	2	
	+	11	
	Depois de 6 meses		0,500
0	2		
+	11		
MMP-3	Depois de 3 meses		0,375
	0	4	
	+	9	
	Depois de 6 meses		0,070
0	7		
+	6		
MMP-7	Depois de 3 meses		1,000
	0	1	
	+	10	
	Depois de 6 meses		1,000
0	2		
+	9		
MMP-12	Depois de 3 meses		0,063
	0	0	
	+	3	
	Depois de 6 meses		0,250
0	0		
+	3		
TIMP-1	Depois de 3 meses		1,000
	0	0	
	+	4	
	Depois de 6 meses		1,000
0	2		
+	2		

0= ausência de marcação ou marcação ocasional

+= marcação do substrato de forma pontual, com coloração de leve intensidade

++= marcação de forma multifocal ou descontínua, com coloração de moderada intensidade

+++= marcação de forma contínua com coloração moderada à intensa

Nota: Os escores ++ e +++ não foram observados na marcação destes substratos

Tabela 3 Modificações na intensidade da coloração de Colágeno tipo III pela imuno-histoquímica durante o tratamento

Colágeno tipo III	Antes do tratamento		Valor de p Teste de χ^2 de McNemar
	+	++	
Depois de 3 meses			
+	5	1	1,000
++	1	7	
Depois de 6 meses			
+	6	5	0,063
++	0	3	

0= ausência de marcação ou marcação ocasional

+ = marcação do substrato de forma pontual, com coloração de leve intensidade

++ = marcação de forma multifocal ou descontínua, com coloração de moderada intensidade

+++ = marcação de forma contínua com coloração moderada à intensa

Nota: Os escores 0 e +++ não foram observados para a marcação destes substratos

A marcação para MMP-9 e colágeno tipo I mostrou-se de leve a moderada intensidade, variando significativamente de acordo com o período de tratamento. Dez pacientes apresentaram aumento da intensidade da marcação de MMP-9 após 3 meses (Figura 19). Entre esses, todos mostraram diminuição da marcação após o sexto mês. Apenas quatro pacientes não mostraram modificação da marcação de MMP-9 durante todo o tratamento.

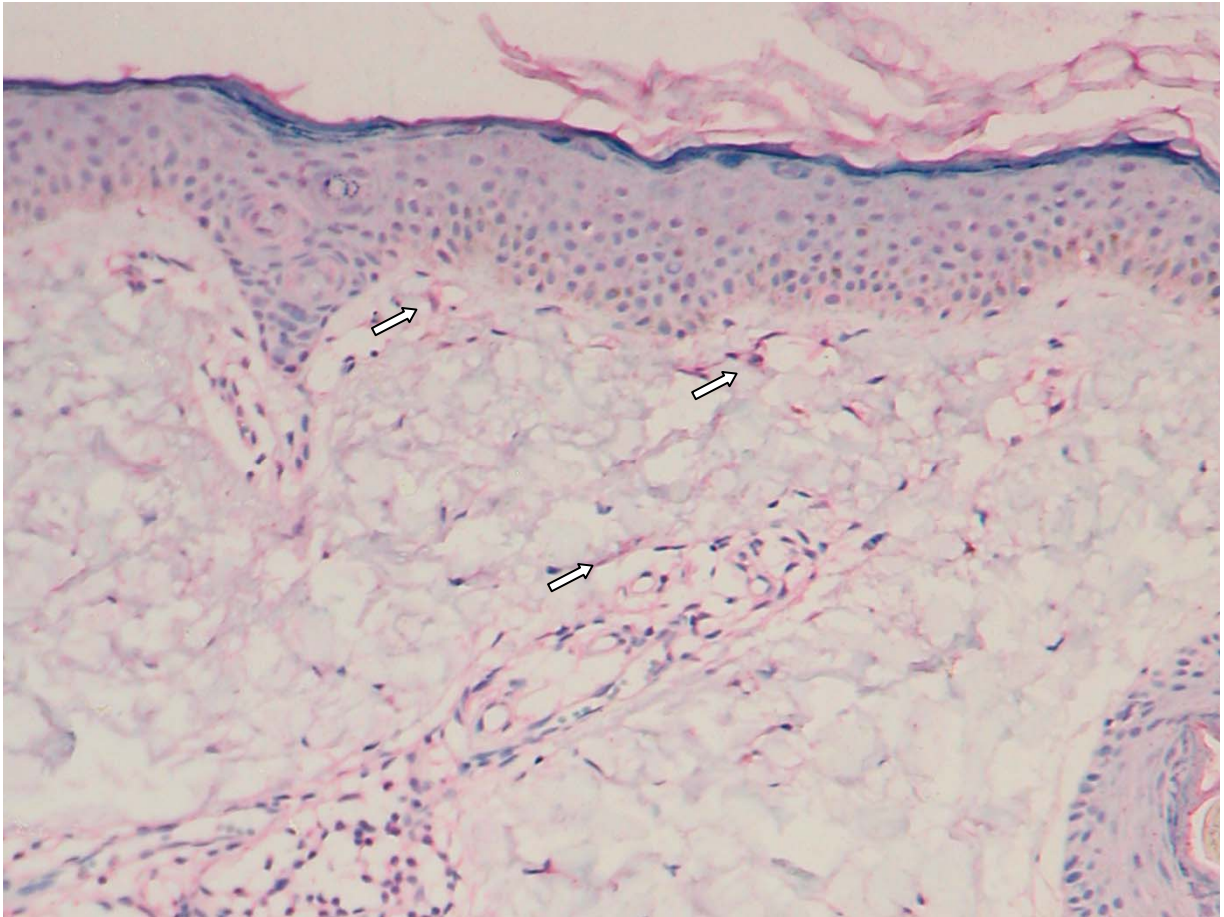


Figura 19 Marcação (coloração por fosfatase alcalina - cor rosa) moderada a intensa de MMP-9 na derme papilar e reticular, próximo ao infiltrado inflamatório, após 3 meses de tratamento (imunohistoquímica – médio aumento)

Com relação ao colágeno tipo I, 11 pacientes apresentaram aumento da intensidade da marcação ao terceiro mês (Figura 20). Entre elas, cinco mantiveram a intensidade da marcação alcançada no terceiro mês, cinco apresentaram aumento da intensidade da marcação no sexto mês e uma apresentou diminuição ao final do de seis meses (Figura 21), comparado ao terceiro.

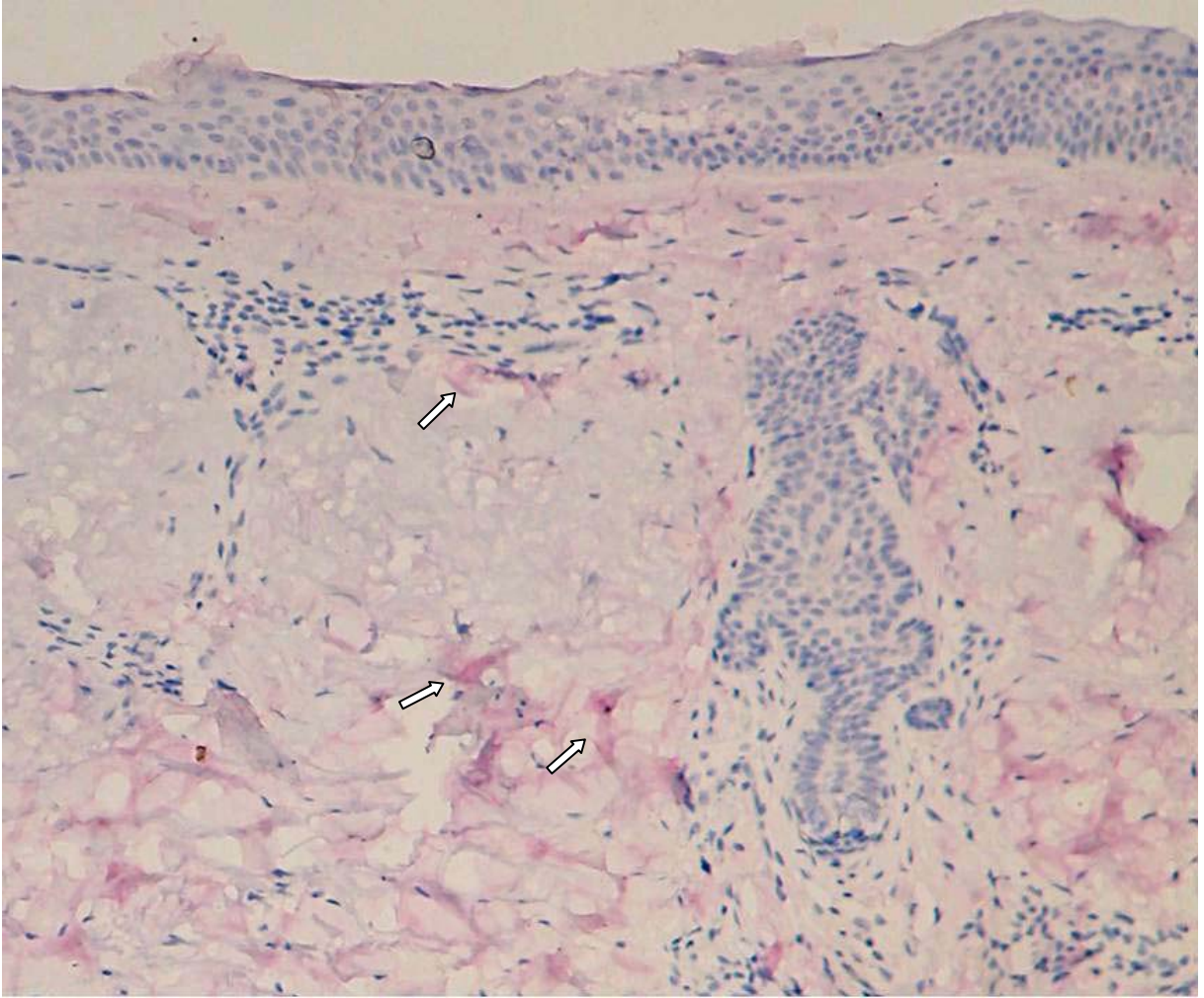


Figura 20 Moderada marcação de colágeno tipo I (coloração por fosfatase alcalina - cor rosa), na derme reticular, após 3 meses de tratamento (imuno-histoquímica médio aumento)

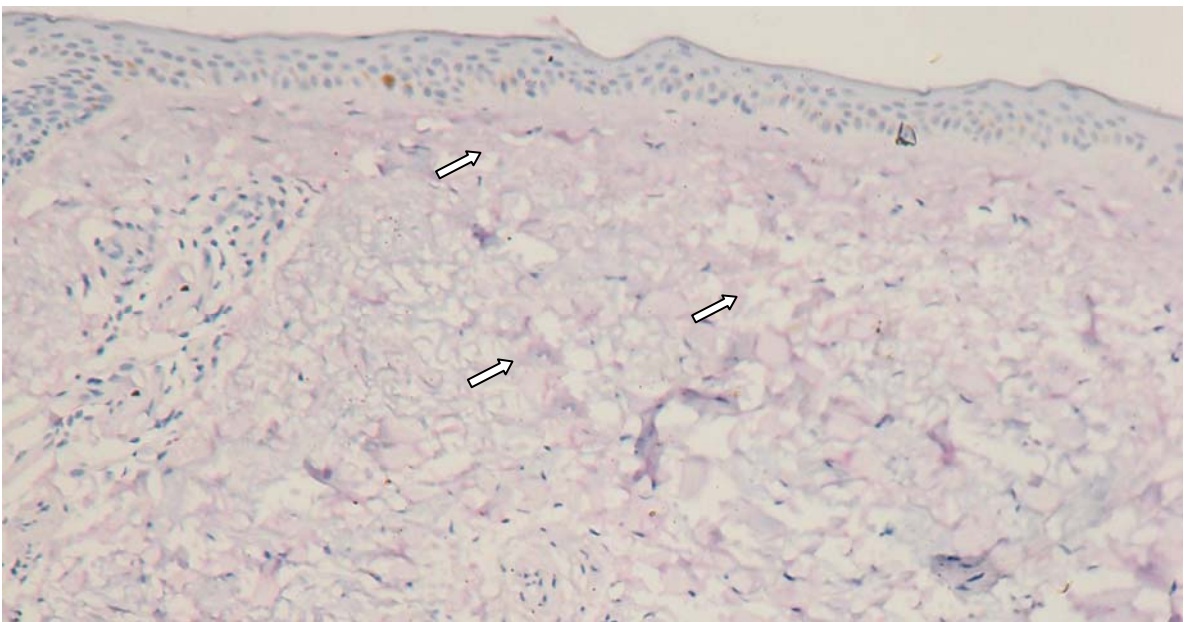


Figura 21 Moderada a intensa marcação de colágeno tipo I (coloração por fosfatase alcalina - cor rosa), na derme reticular, após 6 meses de tratamento (imuno-histoquímica - médio aumento)

Entre as 10 pacientes com aumento da marcação de MMP-9 ao terceiro mês, oito também revelaram aumento da intensidade da marcação de colágeno tipo I neste período, e sete delas mantiveram aumento de colágeno tipo I ao final do sexto mês.

Após correlacionarmos os resultados clínicos com os imuno-histoquímicos, observamos que: entre as 10 pacientes que obtiveram melhora clínica global, oito apresentaram aumento da expressão de colágeno tipo I ao final de seis meses de tratamento. Entre essas, sete apresentaram aumento da expressão de MMP-9 ao terceiro mês. Apenas uma paciente que mostrou melhora clínica moderada ao sexto mês, apresentou aumento da expressão de colágeno tipo I neste período, sem modificação da expressão de MMP-9 em nenhuma fase do tratamento. Uma paciente apresentou aumento da expressão de MMP-9 ao terceiro mês e aumento da expressão de colágeno ao sexto mês de tratamento, sem, entretanto, apresentar melhora clínica evidente (Quadro 3).

Pacientes	Melhora Clínica (textura, firmeza, rugas)		Número de Melanoses solares		Número de Ceratoses Actínicas		Expressão de MMP-9 na derme		Expressão de colágeno I na derme	
	Pós 3 meses	Pós 6 meses	Pós 3 meses	Pós 6 meses	Pós 3 meses	Pós 6 meses	Pós 3 meses	Pós 6 meses	Pós 3 meses	Pós 6 meses
1	Nenhuma	Nenhuma	Diminuição	Melhora Mantida	-	-	Aumento	Diminuição	Aumento	Aumento
2	Nenhuma	Mínima	Sem melhora	Sem melhora	-	-	Aumento	Diminuição	Aumento	Mantido
3	Nenhuma	Moderada	-	-	-	-	Aumento	Diminuição	Aumento	Aumento
4	Significativa	Mantida	Diminuição	Melhora Mantida	Diminuição	Melhora Mantida	Aumento	Diminuição	Sem modificação	Aumento
5	Mínima	Mantida	Sem melhora	Sem melhora	-	-	Aumento	Diminuição	Aumento	Diminuição
6	Nenhuma	Moderada	Diminuição	Melhora Mantida	-	-	Sem modificação	Sem modificação	Aumento	Mantido
7	Nenhuma	Significativa	-	-	-	-	Aumento	Diminuição	Sem modificação	Sem modificação
8	Nenhuma	Moderada	-	-	Cura	Cura	Aumento	Diminuição	Aumento	Aumento
9	Nenhuma	Nenhuma	Diminuição	Melhora Mantida	-	-	Sem modificação	Sem modificação	Sem modificação	Aumento
10	Significativa	Mantida	Diminuição	Melhora Mantida	Diminuição	Melhora Mantida	Aumento	Diminuição	Aumento	Aumento
11	Nenhuma	Nenhuma	Diminuição	Melhora Mantida	Diminuição	Melhora Mantida	Sem modificação	Sem modificação	Aumento	Mantido
12	Nenhuma	Nenhuma	Diminuição	Melhora Mantida	-	-	Sem modificação	Sem modificação	Aumento	Mantido
13	Nenhuma	Significativa	-	-	-	-	Aumento	Diminuição	Aumento	Mantido
14	Moderada	Mantida	Diminuição	Melhora Mantida	-	-	Aumento	Diminuição	Aumento	Aumento

Quadro 3 Correlação da Melhora Clínica com o aumento da expressão de MMP-9 e colágeno I na derme induzido pela MAL-TFD

Não houve divergência de opiniões entre os observadores, quanto aos resultados encontrados no estudo imuno-histoquímico. Esses resultados, analisados pelos testes descritos na metodologia, foram estatisticamente significativos na expressão imuno-histoquímica de colágeno tipo I após 3 meses de tratamento ($P=0,002$), e também depois de 6 meses ($P=0,001$) (Tabela 4). Aumento estatisticamente significativo também foi encontrado na expressão de MMP-9, após 3 meses de tratamento ($P=0,002$) (Tabela 5). A expressão imuno-histoquímica de MMPs (1, 3, 7, 12), TIMP-1 e de colágeno tipo III não revelaram modificação estatisticamente significativa comparando os exames pré e pós-tratamento.

Tabela 4 Modificações na intensidade da coloração de Colágeno tipo I pela imuno-histoquímica durante o tratamento

Colágeno tipo I	Antes do tratamento				Valor de p Teste de Wilcoxon
	0	+	++	+++	
Depois de 3 meses					
0	0	0	0	0	0,002
+	1	2	0	0	
++	1	8	1	0	
+++	0	1	0	0	
Depois de 6 meses					
0	0	0	0	0	0,001
+	1	0	0	0	
++	0	7	1	0	
+++	1	4	0	0	

0= ausência de marcação ou marcação ocasional

+= marcação do substrato de forma pontual, com coloração de leve intensidade

++= marcação de forma multifocal ou descontínua, com coloração de moderada intensidade

+++= marcação de forma contínua com coloração moderada à intensa

Tabela 5 Modificações na intensidade da coloração de MMP-9 pela imunohistoquímica durante o tratamento

MMP-9	Antes do tratamento				Valor de p Teste Wilcoxon
	0	+	++	+++	
Depois de 3 meses					
0	0	0	0	0	0,002
+	0	2	0	0	
++	0	9	2	0	
+++	0	0	1	0	
Depois de 6 meses					
0	0	2	1	0	0,102
+	0	9	0	0	
++	0	0	2	0	
+++	0	0	0	0	

0= ausência de marcação ou marcação ocasional

+= marcação do substrato de forma pontual, com coloração de leve intensidade

++= marcação de forma multifocal ou descontínua, com coloração de moderada intensidade

+++= marcação de forma contínua com coloração moderada à intensa

A correlação entre a melhora clínica (textura, rugas, firmeza, número de melanoses e ceratoses) das pacientes e a modificação na intensidade da expressão da MMP-9 na derme e do Colágeno tipo I, à imunohistoquímica, durante as fases do tratamento pode ser mais claramente observada pelo Quadro 4.

PACIENTE	IDADE	MELHORA CLÍNICA (TEXTURA, RUGAS E FIRMEZA)*		MELANOSSES E CERATOSSES SOLARES			EXPRESSÃO DE MMP-9 (DERME)			EXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPO I		
		PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES
1	56	Nenhuma	Nenhuma	melanoses (8) ceratoses (0)	melanoses (3) ceratoses (0)	melanoses (3) ceratoses (0)	2	3	0	1	2	3
2	60	Nenhuma	Mínima	melanoses (3) ceratoses (0)	melanoses (3) ceratoses (0)	melanoses (3) ceratoses (0)	1	2	0	0	1	1
3	59	Nenhuma	Moderada	melanoses (0) ceratoses (0)	melanoses (0) ceratoses (0)	melanoses (0) ceratoses (0)	1	2	0	0	2	3
4	56	Significativa	Mantida	melanoses (1) ceratoses (20)	melanoses (0) ceratoses (2)	melanoses (0) ceratoses (2)	1	2	1	1	1	2
5	60	Mínima	Mantida	melanoses (2) ceratoses (0)	melanoses (2) ceratoses (0)	melanoses (2) ceratoses (0)	1	2	1	1	3	2
6	55	Nenhuma	Moderada	melanoses (12) ceratoses (0)	melanoses (5) ceratoses (0)	melanoses (5) ceratoses (0)	1	1	1	1	2	2
7	58	Nenhuma	Significativa	melanoses (0) ceratoses (0)	melanoses (0) ceratoses (0)	melanoses (0) ceratoses (0)	1	2	1	2	2	2
8	60	Nenhuma	Moderada	melanoses (0) ceratoses (1)	melanoses (0) ceratoses (0)	melanoses (0) ceratoses (0)	1	2	1	1	2	3
9	57	Nenhuma	Nenhuma	melanoses (23) ceratoses (0)	melanoses (7) ceratoses (0)	melanoses (7) ceratoses (0)	1	1	1	1	1	2
10	56	Significativa	Mantida	melanoses (14) ceratoses (8)	melanoses (5) ceratoses (1)	melanoses (5) ceratoses (1)	1	2	1	1	2	3
11	55	Nenhuma	Nenhuma	melanoses (25) ceratoses (26)	melanoses (21) ceratoses (3)	melanoses (21) ceratoses (3)	2	2	2	1	2	2
12	56	Nenhuma	Nenhuma	melanoses (58) ceratoses (0)	melanoses (49) ceratoses (0)	melanoses (49) ceratoses (0)	2	2	2	1	2	2
13	58	Nenhuma	Significativa	melanoses (0) ceratoses (0)	melanoses (0) ceratoses (0)	melanoses (0) ceratoses (0)	1	2	1	1	2	2
14	60	Moderada	Mantida	melanoses (67) ceratoses (0)	melanose (30) ceratoses (0)	melanose (30) ceratoses (0)	1	2	1	1	2	3

Nota: Os escores da intensidade da imunomarcção de 0 a +++ foram identificados por algarismos

* Todas as pacientes apresentavam alteração da textura, rugas e firmeza no primeiro exame clínico.

Quadro 4 Correlação da melhora clínica com a variação da expressão da MMP-9 e colágeno tipo I, à imuno-histoquímica, durante as fases do tratamento

Através da morfometria, a quantificação da densidade de fibras colágenas e elásticas mostrou variação significativa após o tratamento (Gráfico 1). A média da quantidade de fibras colágenas foi de 6,99 no exame pré-tratamento; 7,61 após o terceiro mês, e de 9,73 após o sexto mês. Desta forma, observamos que houve aumento progressivo na quantidade de colágeno após tratamento (Figura 22). A análise estatística revelou que a diferença na quantidade média de colágeno encontrada entre o período pré e pós três meses foi de 0,62 ($p=0,157$), e entre pré e seis meses foi de 2,74 ($p=0,048$) (Tabela 6). Com relação à quantificação das fibras elásticas, a média foi de 21,03, no exame pré-tratamento; 13,94 após 3 meses; e 14,00 após o sexto mês. A diferença na quantidade média de fibras elásticas entre o período pré e pós três meses de tratamento foi de 7,09 ($p=0,016$), e entre pré e seis meses foi de 7,03 ($p=0,008$) (Tabela 7).

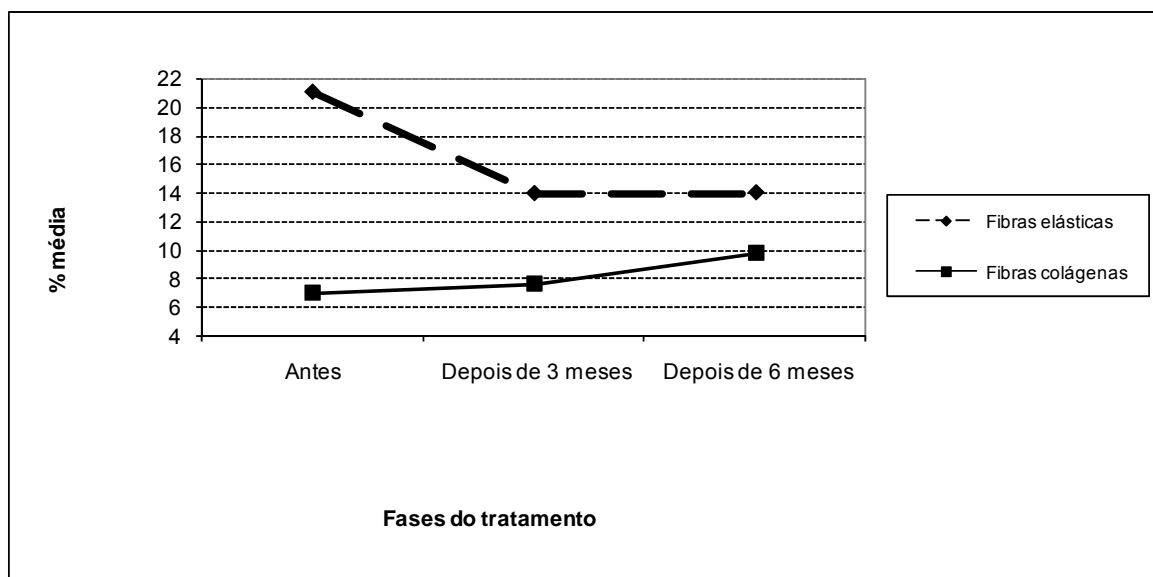


Gráfico 1 Média das fibras elásticas e colágenas pela morfometria antes e depois do tratamento

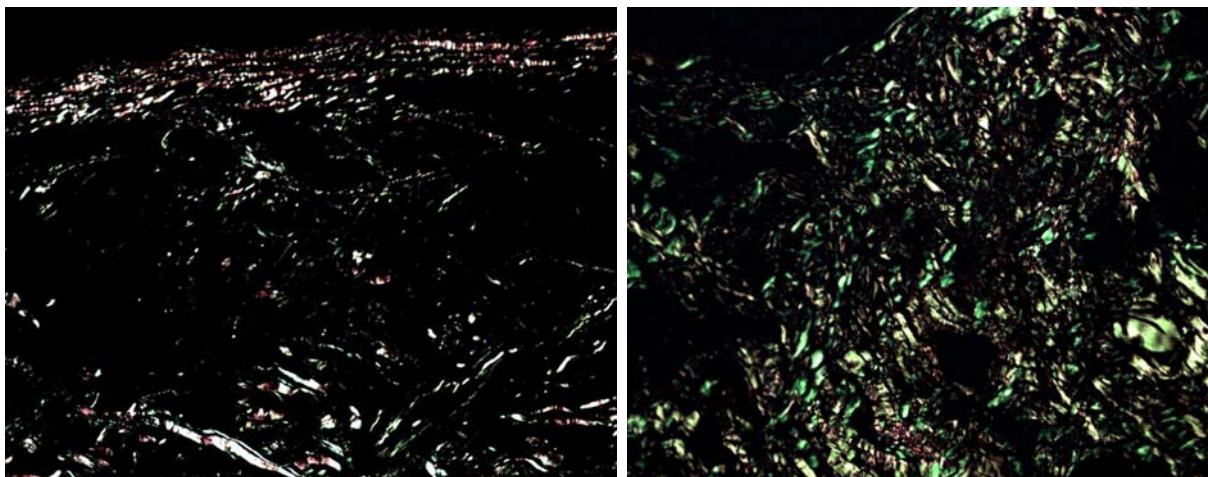


Figura 22 Aumento da densidade das fibras colágenas na derme superior, entremeando as áreas de elastose, após 6 meses de tratamento, pela coloração picro sirius em microscopia com luz polarizada – médio aumento

Tabela 6 Estatísticas descritivas das fibras colágenas pela morfometria antes e depois do tratamento

Estatísticas descritivas	Fibras colágenas (%) para cada momento de tratamento			Diferenças dos valores iniciais	
	Antes	Depois de 3 meses	Depois de 6 meses	Depois de 3 meses	Depois de 6 meses
Média	6,99	7,61	9,73	0,62	2,74
Desvio padrão	3,59	2,80	2,55	1,95	4,55
Mediana	6,25	7,30	10,70	1,25	3,20
Valor de p - Teste de Wilcoxon				0,157	0,048

Tabela 7 Estatísticas descritivas das fibras elásticas pela morfometria antes e depois do tratamento

Estatísticas descritivas	Fibras elásticas (%) para cada momento de tratamento			Diferenças dos valores iniciais	
	Antes	Depois de 3 meses	Depois de 6 meses	Depois de 3 meses	Depois de 6 meses
Média	21,03	13,94	14,00	-7,09	-7,03
Desvio padrão	8,60	6,29	8,05	9,53	7,52
Mediana	21,05	14,50	13,85	-6,30	-8,00
Valor de p - Teste de Wilcoxon				0,016	0,008

6 DISCUSSÃO

A TFD tópica utilizando o ALA e o MAL está aprovada no tratamento do câncer de pele não melanoma. Essas substâncias apresentam propriedades diferentes quanto à seletividade e à capacidade de penetração no tumor cutâneo. O ALA, associado a várias fontes de luz, está aprovado apenas para tratamento da QA, apesar de vários trabalhos relatando seu uso em carcinomas, bem como no tratamento do fotoenvelhecimento (Farah *et al.*, 2005). O MAL está aprovado para utilização com luz vermelha nos casos de QA e também CBC. Nos pacientes com múltiplas lesões de QA, o tratamento de toda a região afetada com MAL, e não apenas em lesões isoladas, leva a melhora clínica global da pele, e por isso também vem sendo utilizado para o rejuvenescimento cutâneo (Braathen *et al.*, 2007). A praticidade da TFD tópica e os relatos de melhora de todos os componentes do fotodano, como textura, rugas, melanoses e ceratoses despertaram o interesse dos dermatologistas, tornando esse método uma nova opção terapêutica para o fotoenvelhecimento. Essa nova indicação, entretanto, é baseada apenas em estudos clínicos, não havendo respaldo histopatológico da remodelação dérmica da pele fotodanificada na ausência de tumor. A formação de fibrose além dos limites tumorais após a TFD foi descrita em carcinoma basocelular (Fink-Puches *et al.*, 1998). Essa fibrose acompanha o processo de cicatrização das neoplasias cutâneas, mas não se sabe de que forma a presença da QA poderia interferir na remodelação dérmica durante o processo de cicatrização. O desenho deste estudo permitiu avaliar clinicamente pacientes com e sem QA, e identificar as modificações histológicas induzidas pelo tratamento, sendo o primeiro estudo na literatura mundial

a apresentar essa proposta. A falta de protocolo definido para ALA-TFD, até mesmo para o tratamento de QA, onde diferentes fontes de luz e diferentes tempos de incubação do fotossensibilizante são utilizados, apontou o MAL como uma boa opção para a realização do nosso estudo. As 14 pacientes estudadas foram submetidas a sessões de MAL-TFD, com luz vermelha, que embora não esteja aprovada para fotorejuvenescimento, foi capaz de promover melhora global da pele fotodanificada em 10 casos, entre os quais sete não apresentavam lesões de QA clinicamente evidentes, e não apenas nos casos de pele fotodanificada com QA, como descrito na literatura.

No envelhecimento cutâneo, um processo inflamatório crônico desencadeia continuamente um mecanismo de reparo compensatório (Nola e Kotrulja, 2003). O balanço entre a síntese e a degradação de colágeno leva à deficiência de colágeno no fotoenvelhecimento, e de alguma maneira a TFD poderia alterar a regulação entre dano e reparo da MEC. Em nosso estudo, a TFD foi utilizada como possível método indutor da remodelação dérmica e, portanto, a avaliação dos sistemas colágeno e elástico, bem como das enzimas degradadoras da MEC foi fundamental. Pela coloração de rotina (HE) foi possível identificar que todas as pacientes selecionadas apresentavam elastose solar, alteração histopatológica característica do fotoenvelhecimento. Essa degeneração se limitava à parte superior da derme, separada da epiderme por uma estreita faixa de tecido colágeno normal (zona de Grenz), como descrito na literatura (Bennett *et al.*, 2008). Uma das primeiras modificações histológicas induzidas pela TFD, observada já ao terceiro mês de tratamento ao HE, foi o espessamento dessa faixa de colágeno, a qual se encontrava associada ou não ao aumento de fibras colágenas bem individualizadas entremeando a área de degeneração basofílica em cinco casos. As fibras elásticas,

aumentadas em número, encontravam-se espessadas, enroladas e emaranhadas. A diminuição de fibras elásticas e o aumento de fibras colágenas na derme foram evidenciados pelas colorações especiais utilizadas, orceína e picrossirius, respectivamente. A descrição subjetiva das modificações dessas fibras não seria suficiente para análise criteriosa da remodelação dérmica. Desta forma, foi realizada a quantificação dessas fibras de forma objetiva, através da morfometria. Esse método mostrou diminuição estatisticamente significativa das fibras elásticas após três e seis meses de tratamento, e aumento estatisticamente significativo das fibras colágenas após 6 meses.

O fotoenvelhecimento é mediado por absorção direta da radiação UV e por reações fotoquímicas mediadas por ROS (Naderi-Hachtroudi *et al.*, 2002). Essas reações também participam do mecanismo de ação da TFD (Calzavara-Pinton *et al.*, 2007), podendo ser uma via de mecanismo em comum entre o processo de fotodano e a TFD. Apesar do mecanismo de ação da TFD na pele fotodanificada ainda não está esclarecido, sabemos que a radiação UV induz a liberação de MMPs que são responsáveis pela degradação da MEC (Yaar e Eller, 2002). O controle da degradação do tecido conjuntivo é regulado pela quantidade de MMPs e de seus inibidores, as TIMPs (Mauch *et al.*, 1988). As MMPs envolvidas no processo de remodelação tecidual da pele fotodanificada incluem as MMP-1, 3, 7, 9 e 12 (Mauch *et al.*, 1988; Nagase e Woessner, 1999). Entre avaliações imuno-histoquímicas realizadas no estudo, não houve modificação estatisticamente significativa das MMPs 1, 3, 7, 12, TIMP-1 ou colágeno tipo III. A liberação de MMPs pelos fibroblastos, após a irradiação de UVB, é dependente da liberação de IL-6 pelos queratinócitos irradiados. A IL-1 alfa tem papel principal na indução da produção de IL-6 durante a interação de queratinócitos e fibroblastos, levando ao aumento de MMP-1

e MMP-3 (Brenneisen *et al.*, 1999; Fagot *et al.*, 2004). A MMP-7 degrada proteínas colagênicas e não colagênicas, como a elastina. A MMP-12, produzida principalmente pelos macrófagos, é a principal enzima ativa contra elastina (Suomela *et al.*, 2001). Normalmente, o colágeno tipo III encontra-se em menor quantidade e está associado ao colágeno tipo I, formando uma rede. A TIMP-1 é expressa principalmente por fibroblastos dérmicos e se liga a todas as MMPs ativas, mas inibe preferencialmente as collagenases específicas (Kahari e Saarialho-Kere, 1997). A expressão de MMP-1 e de MMP-3 não se alterou durante todas as fases de tratamento do nosso estudo, diferente do achado de Karrer e colaboradores (Karrer *et al.*, 2003) que cita um efeito anti-fibrótico da TFD na pele normal e na esclerodermia, desencadeado pelo aumento de MMP-1 e MMP-3.

A expressão da maioria das MMPs, como a MMP-9, é regulada por fatores de crescimento, hormônios e citocinas, que podem ser liberadas pela radiação UV. Em nossos casos, a expressão da MMP-9 ocorreu tanto na epiderme quanto na derme, revelando uma modificação do padrão esperado na pele normal do adulto, onde é encontrada apenas na epiderme. É descrito que em condições normais, os fibroblastos humanos secretam apenas a MMP-2, e tornam-se capazes de secretar também a MMP-9, na presença de citocinas (Kobayashi *et al.*, 2003; Bakos *et al.*, 2007). A radiação UV ativa fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear kappa B) que estimula a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 Beta, TNF-alfa, IL-6 e IL-8. Na derme, a MMP-9 foi observada nas células do estroma dérmico, nas células endoteliais e inflamatórias, sendo mais evidente ao redor de vasos e anexos, e dentro da área de elastose solar. Essa MMP apresentou sua expressão aumentada após nosso tratamento. Como várias citocinas (TNF-alfa, IL-1 e IL-6) são liberadas durante a resposta inflamatória desencadeada pela TFD

(Dougherty *et al.*, 1998), nossa intervenção pode ser a responsável pela modificação da expressão da MMP-9. Um estudo sobre modificações na MEC induzidas pela TFD realizado por Pazos e colaboradores (Pazos e Nader, 2007) também revelou aumento da expressão e da atividade enzimática da MMP-9 nas células inflamatórias, mas diferente do nosso estudo, esses autores avaliaram a TFD em tumores de ratos. Em nossos casos não houve modificação significativa na quantidade do infiltrado, quando comparamos o período pré e pós-tratamento, como citado por esses autores.

Observamos aumento da densidade de colágeno, à morfometria, que foi identificado como colágeno tipo I pela imuno-histoquímica. Este resultado, também difere dos achados de Karrer e colaboradores (Karrer *et al.*, 2004) que estudaram TFD *in vitro*, e revelaram que fibroblastos podem aumentar a produção de MMPs por via direta ou parácrina (aumento de IL-1), e que a síntese de colágeno tipo I é diminuída, por efeito direto sobre os fibroblatos, *in vitro*. Esses autores também usaram um modelo *in vitro* mimetizando a pele, *in vivo*, e demonstraram que a TFD pode aumentar a liberação de MMP1 e 3, mas não modificar a capacidade de síntese de colágeno tipo I. Como sabemos, a MMP-9, aumentada em nossos casos, completa a degradação dos produtos gelatinosos de clivagem da MMP-1. Os pequenos peptídeos, resultantes da quebra da gelatina pela MMP-9, não são capazes de inibir a síntese de pró-colágeno, como fazem os fragmentos maiores, produtos da clivagem por MMP-1 isolada (Fisher *et al.*, 2002). Desta forma, o estímulo à expressão da MMP-9 e, possivelmente, à indução da sua atividade enzimática pela TFD em nosso modelo de estudo, permitiu a síntese de novo colágeno, justificando a diferença entre nossos resultados e os encontrados por karrer e colaboradores. A degradação do material elastótico (fibras elásticas

fragmentadas e de fibras colágenas degeneradas), com a participação da MMP-9, foi demonstrada pelo exame histopatológico (HE, picro sirius e orceína), já no terceiro mês de tratamento. Simultaneamente, de acordo com a dinâmica fisiológica da remodelação da MEC, tornou-se possível a indução da síntese de novo colágeno. Esses achados estão de acordo com dados da literatura que citam a importância da clivagem do colágeno, previamente quebrado pela MMP-1, chamado de gelatina, pela ação da MMP-9 (gelatinase), com o objetivo de modificar a relação entre fibroblasto e MEC.

A partir desses dados podemos especular que as modificações histopatológicas obtidas com o tratamento ocorreram como consequência da resposta inflamatória que acompanha a TFD, possivelmente pela produção parácrina de citocinas pelos ceratinócitos que estimularam a síntese e liberação de MMP-9. Correlacionando os nossos resultados com os dados da literatura, podemos supor que após a ação dessa enzima, capaz de degradar o material elástico na derme fotodanificada, houve uma modificação da relação entre fibroblastos e MEC, permitindo a síntese de novo colágeno tipo I. Até o momento, este é o primeiro trabalho que mostra resultados histopatológicos com análises morfológicas e quantitativas das modificações dérmicas induzidas pela TFD na pele fotodanificada, além de propor um mecanismo de ação para essa remodelação. Este estudo permite admitir que a MAL-TFD é capaz de induzir a remodelação dérmica da pele fotodanificada, ratificando as observações clínicas encontradas por nós e relatadas na literatura.

7 CONCLUSÕES

- ✓ Houve melhora clínica de todos os componentes de fotodano (alteração da textura, rugas finas, flacidez, melanoses solares e QA), após tratamento com duas sessões de TFD tópica (MAL-Aktilite), em 71,4% dos casos, em pacientes com ou sem ceratoses actínicas clinicamente evidentes.
- ✓ A remodelação dérmica pode ser avaliada pelas modificações na morfologia e na distribuição das fibras elásticas e colágenas, à histopatologia. Esses achados foram quantitativamente mensurados, pela morfometria, onde a diminuição da densidade de fibras elásticas e o aumento da densidade de colágeno foram estatisticamente significativos após três e seis meses de tratamento.
- ✓ O aumento da expressão de MMP-9 na derme foi identificado pela imuno-histoquímica, no terceiro mês de tratamento, e sua atividade enzimática foi representada pela quebra do material elastótico na derme, evidenciada pela orceína, e quantificada pela morfometria.
- ✓ Desta forma, o aumento da expressão e, possivelmente, da atividade da MMP-9, na derme, levou à degradação da elastose solar, com modificação da MEC, permitindo a síntese de novo colágeno.

8 SUGESTÕES

- ✓ Avaliar as citocinas envolvidas na TFD para melhor esclarecimento do mecanismo de ação da TFD no tratamento das dermatoses não neoplásicas, como no caso do rejuvenescimento fotodinâmico, justificando a continuidade da nossa pesquisa.
- ✓ Quantificar, através da zimografia, a atividade da MMP-9, induzida pela TFD na pele fotodanificada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR, Oleinick NL. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.* 1991 Nov 1; 51(21):5993-5996.
- Alexiades-Armenakas M. Long-pulsed dye laser-mediated photodynamic therapy combined with topical therapy for mild to severe comedonal, inflammatory, or cystic acne. *J Drugs Dermatol.* 2006 Jan; 5(1):45-55.
- Alexiades-Armenakas MR, Geronemus RG. Laser-mediated photodynamic therapy of actinic keratoses. *Arch Dermatol.* 2003 Oct; 139(10):1313-1320.
- Allison RR, Bagnato VS, Cuenca R, Downie GH, Sibata CH. The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncol.* 2006 Feb; 2(1):53-71.
- Almeida MP. Expressão e distribuição de metaloproteinases e seus inibidores teciduais no lúquen escleroso vulvar [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008.
- Alster TS, Tanzi EL. Photodynamic therapy with topical aminolevulinic acid and pulsed dye laser irradiation for sebaceous hyperplasia. *J Drugs Dermatol.* 2003 Oct; 2(5):501-504.
- Alster TS, Tanzi EL, Welsh EC. Photorejuvenation of facial skin with topical 20% 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light treatment: a split-face comparison study. *J Drugs Dermatol.* 2005 Jan-Feb; 4(1):35-38.
- Ashkenazi H, Malik Z, Harth Y, Nitzan Y. Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenous porphyrins after illumination with high intensity blue light. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003 Jan 21; 35(1):17-24.
- Avram DK, Goldman MP. Effectiveness and safety of ALA-IPL in treating actinic keratoses and photodamage. *J Drugs Dermatol.* 2004 Jan-Feb; 3(1 Suppl):S36-39.

- Babilas P, Karrer S, Sidoroff A, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology--an update. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005 Jun; 21(3):142-149.
- Bakos RM, Bakos L, Edelweiss MI, Cartell A, Mariante JC, Masiero NC. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in melanocytic nevi is altered by ultraviolet B. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2007 Dec; 23(6):250-254.
- Bennett MF, Robinson MK, Baron ED, Cooper KD. Skin immune systems and inflammation: protector of the skin or promoter of aging? *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2008 Apr; 13(1):15-19.
- Bissonnette R, Bergeron A, Liu Y. Large surface photodynamic therapy with aminolevulinic acid: treatment of actinic keratoses and beyond. *J Drugs Dermatol*. 2004a Jan-Feb; 3(1 Suppl):S26-31.
- Bissonnette R, Sharfaei S, Viau G, Liu Y. Irradiance and light dose influence histological localization of photodamage induced by photodynamic therapy with aminolaevulinic acid. *Br J Dermatol*. 2004b Sep; 151(3):653-655.
- Braathen LR, Szeimies RM, Basset-Seguín N, Bissonnette R, Foley P, Pariser D, *et al*. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005. *J Am Acad Dermatol*. 2007 Jan; 56(1):125-143.
- Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, *et al*. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem Photobiol*. 2003 Jul; 78(1):43-48.
- Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Nov; 973:31-43.
- Brenneisen P, Wlaschek M, Wenk J, Blaudschun R, Hinrichs R, Dissemond J, *et al*. Ultraviolet-B induction of interstitial collagenase and stromelysin-1 occurs in human dermal fibroblasts via an autocrine interleukin-6-dependent loop. *FEBS Lett*. 1999 Apr 16; 449(1):36-40.
- Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 7; 1477(1-2):267-283.

- Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007 Mar; 21(3):293-302.
- Cesarini JP, Michel L, Maurette JM, Adhoue H, Bejot M. Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003 Aug; 19(4):182-189.
- Chiquet-Ehrismann R. What distinguishes tenascin from fibronectin? *Faseb J*. 1990 Jun; 4(9):2598-2604.
- Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie G, *et al*. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 2001 Nov; 117(5):1218-1224.
- Cotta-Pereira G, Guerra Rodrigo F, Bittencourt-Sampaio S. Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol*. 1976 Mar; 66(3):143-148.
- Culhaci N, Metin K, Copcu E, Dikicioglu E. Elevated expression of MMP-13 and TIMP-1 in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness. *BMC Cancer*. 2004 Aug 3; 4:42.
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korblik M, *et al*. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Jun 17; 90(12):889-905.
- Dragieva G, Prinz BM, Hafner J, Dummer R, Burg G, Binswanger U, *et al*. A randomized controlled clinical trial of topical photodynamic therapy with methyl aminolaevulinate in the treatment of actinic keratoses in transplant recipients. *Br J Dermatol*. 2004 Jul; 151(1):196-200.
- Elman M, Lebzelter J. Light therapy in the treatment of acne vulgaris. *Dermatol Surg*. 2004 Feb; 30(2 Pt 1):139-146.
- Elson ML. Soft tissue augmentation. A review. *Dermatol Surg*. 1995 Jun; 21(6):491-500; quiz 501-492.
- Fagot D, Asselineau D, Bernerd F. Matrix metalloproteinase-1 production observed after solar-simulated radiation exposure is assumed by dermal fibroblasts but involves a paracrine activation through epidermal keratinocytes. *Photochem Photobiol*. 2004 Jun; 79(6):499-505.

- Fantini F, Greco A, Cesinaro AM, Surrenti T, Peris K, Vaschieri C, *et al.* Pathologic changes after photodynamic therapy for Basal cell carcinoma and Bowen disease: a histologic and immunohistochemical investigation. *Arch Dermatol.* 2008 Feb; 144(2):186-194.
- Farah JB, Ralston J, Zeitouni NC. ALA-PDT treatment of pre-skin cancer. In: Goldman MP, editor. *Photodynamic Therapy.* 1^a ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 1-12.
- Fink-Puches R, Soyer HP, Hofer A, Kerl H, Wolf P. Long-term follow-up and histological changes of superficial nonmelanoma skin cancers treated with topical delta-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Arch Dermatol.* 1998 Jul; 134(7):821-826.
- Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, *et al.* Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol.* 2002 Nov; 138(11):1462-1470.
- Freeman M, Vinciullo C, Francis D, Spelman L, Nguyen R, Fergin P, *et al.* A comparison of photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate (Metvix) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Dermatolog Treat.* 2003 Jun; 14(2):99-106.
- Fritsch C, Goerz G, Ruzicka T. Photodynamic therapy in dermatology. *Arch Dermatol.* 1998 Feb; 134(2):207-214.
- Futsaether CM, Kjeldstad B, Johnsson A. Intracellular pH changes induced in *Propionibacterium acnes* by UVA radiation and blue light. *J Photochem Photobiol B.* 1995 Dec; 31(3):125-131.
- Gendler EC. Topical treatment of the aging face. *Dermatol Clin.* 1997 Oct; 15(4):561-567.
- Gilbert DJ. Treatment of actinic keratoses with sequential combination of 5-fluorouracil and photodynamic therapy. *J Drugs Dermatol.* 2005 Mar-Apr; 4(2):161-163.
- Gilchrest BA. Skin aging and photoaging: an overview. *J Am Acad Dermatol.* 1989 Sep; 21(3 Pt 2):610-613.
- Glogau RG. Aesthetic and anatomic analysis of the aging skin. *Semin Cutan Med Surg.* 1996 Sep; 15(3):134-138.

- Gold M, Bridges TM, Bradshaw VL, Boring M. ALA-PDT and blue light therapy for hidradenitis suppurativa. *J Drugs Dermatol*. 2004a Jan-Feb; 3(1 Suppl):S32-35.
- Gold MH. Photodynamic therapy in dermatology: the next five years. *Dermatol Clin*. 2007 Jan; 25(1):119-120.
- Gold MH, Bradshaw VL, Boring MM, Bridges TM, Biron JA. Split-face comparison of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light versus intense pulsed light alone for photodamage. *Dermatol Surg*. 2006 Jun; 32(6):795-801; discussion 801-793.
- Gold MH, Bradshaw VL, Boring MM, Bridges TM, Biron JA, Carter LN. The use of a novel intense pulsed light and heat source and ALA-PDT in the treatment of moderate to severe inflammatory acne vulgaris. *J Drugs Dermatol*. 2004b Nov-Dec; 3(6 Suppl):S15-19.
- Gold MH, Goldman MP. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy: where we have been and where we are going. *Dermatol Surg*. 2004 Aug; 30(8):1077-1083; discussion 1083-1084.
- Goldman M, Atkin D. ALA/PDT in the treatment of actinic keratosis: spot versus confluent therapy. *J Cosmet Laser Ther*. 2003 Jun; 5(2):107-110.
- Guinot C, Malvy DJ, Ambroisine L, Latreille J, Mauger E, Tenenhaus M, *et al*. Relative contribution of intrinsic vs extrinsic factors to skin aging as determined by a validated skin age score. *Arch Dermatol*. 2002 Nov; 138(11):1454-1460.
- Gupta AK, Ryder JE. Photodynamic therapy and topical aminolevulinic acid: an overview. *Am J Clin Dermatol*. 2003; 4(10):699-708.
- Hase T, Shinta K, Murase T, Tokimitsu I, Hattori M, Takimoto R, *et al*. Histological increase in inflammatory infiltrate in sun-exposed skin of female subjects: the possible involvement of matrix metalloproteinase-1 produced by inflammatory infiltrate on collagen degradation. *Br J Dermatol*. 2000 Feb; 142(2):267-273.
- Herzinger T, Wienecke R, Weisenseel P, Borelli C, Berking C, Degitz K. Photodynamic therapy of genital condylomata in men. *Clin Exp Dermatol*. 2006 Jan; 31(1):51-53.

- Hongcharu W, Taylor CR, Chang Y, Aghassi D, Suthamjariya K, Anderson RR. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. *J Invest Dermatol.* 2000 Aug; 115(2):183-192.
- Itkin A, Gilchrest BA. delta-Aminolevulinic acid and blue light photodynamic therapy for treatment of multiple basal cell carcinomas in two patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Surg.* 2004 Jul; 30(7):1054-1061.
- Itoh Y, Ninomiya Y, Tajima S, Ishibashi A. Photodynamic therapy for acne vulgaris with topical 5-aminolevulinic acid. *Arch Dermatol.* 2000 Sep; 136(9):1093-1095.
- Itoh Y, Ninomiya Y, Tajima S, Ishibashi A. Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical delta-aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients. *Br J Dermatol.* 2001 Mar; 144(3):575-579.
- Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol.* 1997 Oct; 6(5):199-213.
- Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2000 Mar; 42(3):389-413; quiz 414-416.
- Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Photoaging: pathogenesis, prevention, and treatment. *Clin Geriatr Med.* 2001 Nov; 17(4):643-659, v-vi.
- Karelina TV, Hruza GJ, Goldberg GI, Eisen AZ. Localization of 92-kDa type IV collagenase in human skin tumors: comparison with normal human fetal and adult skin. *J Invest Dermatol.* 1993 Feb; 100(2):159-165.
- Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, Landthaler M, Szeimies RM. Influence of 5-aminolevulinic acid and red light on collagen metabolism of human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2003 Feb; 120(2):325-331.
- Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, Landthaler M, Szeimies RM. Keratinocyte-derived cytokines after photodynamic therapy and their paracrine induction of matrix metalloproteinases in fibroblasts. *Br J Dermatol.* 2004 Oct; 151(4):776-783.
- Katsambas A, Dessinioti C. New and emerging treatments in dermatology: acne. *Dermatol Ther.* 2008 Mar-Apr; 21(2):86-95.

- Katz B, Patel V. Photodynamic therapy for the treatment of erythema, papules, pustules, and severe flushing consistent with rosacea. *J Drugs Dermatol*. 2006 Feb; 5(2 Suppl):6-8.
- Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B*. 1990 Jun; 6(1-2):143-148.
- Kessel D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2002 Nov; 1(11):837-840.
- Kessel D, Woodburn K, Henderson BW, Chang CK. Sites of photodamage in vivo and in vitro by a cationic porphyrin. *Photochem Photobiol*. 1995 Nov; 62(5):875-881.
- Key DJ. Aminolevulinic Acid-Pulsed Dye Laser Photodynamic Therapy for the Treatment of Photoaging. *J Cosmet Dermatol*. 2005; 18(1):31-36.
- Kimura M, Itoh Y, Tokuoka Y, Kawashima N. Delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for acne on the body. *J Dermatol*. 2004 Dec; 31(12):956-960.
- Kligman LH. Re: Menter JM, Sayre RM, Etemadi AA, Agin PP, Willis I. Chronic exposure of SK-1 hairless mice to narrow-band ultraviolet A (320-355 nm). *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1996 Oct; 12(5):222-223.
- Kobayashi T, Hattori S, Shinkai H. Matrix metalloproteinases-2 and -9 are secreted from human fibroblasts. *Acta Derm Venereol*. 2003; 83(2):105-107.
- Kurwa HA, Barlow RJ. The role of photodynamic therapy in dermatology. *Clin Exp Dermatol*. 1999 May; 24(3):143-148.
- Langan SM, Collins P. Randomized, double-blind, placebo-controlled prospective study of the efficacy of topical anaesthesia with a eutetic mixture of lignocaine 2.5% and prilocaine 2.5% for topical 5-aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for extensive scalp actinic keratoses. *Br J Dermatol*. 2006 Jan; 154(1):146-149.
- Lavker RM, Kligman AM. Chronic heliodermatitis: a morphologic evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells. *J Invest Dermatol*. 1988 Mar; 90(3):325-330.

- Lehmann P. Methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy: a review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 2007 May; 156(5):793-801.
- Manela-Azulay M. Efeitos clínicos e histológicos resultantes da aplicação da vitamina "C" tópica a 5% no tratamento do fotoenvelhecimento [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2003.
- Manela-Azulay M. Fotoenvelhecimento. In: Azulay, Azulay, editors. *Dermatologia*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 677-678.
- Marcus L. Treatment of hyperpigmentation-melasma with photodynamic therapy. *J Drugs Dermatol.* 2006 Feb; 5(2 Suppl):9-11.
- Marmur ES, Schmults CD, Goldberg DJ. A review of laser and photodynamic therapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer. *Dermatol Surg.* 2004 Feb; 30(2 Pt 2):264-271.
- Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Mar 15; 195(3):298-308.
- Mauch C, Hatamochi A, Scharffetter K, Krieg T. Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. *Exp Cell Res.* 1988 Oct; 178(2):493-503.
- Mittal A, Elmets CA, Katiyar SK. CD11b+ cells are the major source of oxidative stress in UV radiation-irradiated skin: possible role in photoaging and photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 2003 Mar; 77(3):259-264.
- Mori M, Campolmi P, Mavilia L, Rossi R, Cappugi P, Pimpinelli N. Topical photodynamic therapy for primary cutaneous B-cell lymphoma: a pilot study. *J Am Acad Dermatol.* 2006 Mar; 54(3):524-526.
- Morton CA. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer--and more? *Arch Dermatol.* 2004 Jan; 140(1):116-120.
- Morton CA, Brown SB, Collins S, Ibbotson S, Jenkinson H, Kurwa H, *et al.* Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br J Dermatol.* 2002 Apr; 146(4):552-567.

- Naderi-Hachtroudi L, Peters T, Brenneisen P, Meewes C, Hommel C, Razi-Wolf Z, *et al.* Induction of manganese superoxide dismutase in human dermal fibroblasts: a UV-B-mediated paracrine mechanism with the release of epidermal interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha. *Arch Dermatol.* 2002 Nov; 138(11):1473-1479.
- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006 Feb 15; 69(3):562-573.
- Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 30; 274(31):21491-21494.
- Naru E, Suzuki T, Moriyama M, Inomata K, Hayashi A, Arakane K, *et al.* Functional changes induced by chronic UVA irradiation to cultured human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol.* 2005 Dec; 153 Suppl 2:6-12.
- Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med.* 2004 Sep 15; 37(6):768-784.
- Nestor MS. Combination therapy in clinical and cosmetic dermatology: the marriage of device and drug. *J Drugs Dermatol.* 2004 Sep-Oct; 3(5 Suppl):S4-11.
- Nola I, Kotrulja L. Skin photodamage and lifetime photoprotection. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2003; 11(1):32-40.
- O'Grady A, Dunne C, O'Kelly P, Murphy GM, Leader M, Kay E. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression. *Histopathology.* 2007 Dec; 51(6):793-804.
- Ohnishi Y, Tajima S, Akiyama M, Ishibashi A, Kobayashi R, Horii I. Expression of elastin-related proteins and matrix metalloproteinases in actinic elastosis of sun-damaged skin. *Arch Dermatol Res.* 2000 Jan; 292(1):27-31.
- Oikarinen A. The aging of skin: chronoaging versus photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1990 Feb; 7(1):3-4.
- Patroi I, Annessi G, Girolomoni G. Mid-dermal elastolysis: a clinical, histologic, and immunohistochemical study of 11 patients. *J Am Acad Dermatol.* 2003 Jun; 48(6):846-851.

- Pazos MC, Nader HB. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Aug; 40(8):1025-1035.
- Perrett CM, McGregor J, Barlow RJ, Karran P, Proby C, Harwood CA. Topical photodynamic therapy with methyl aminolevulinate to treat sebaceous hyperplasia in an organ transplant recipient. *Arch Dermatol.* 2006 Jun; 142(6):781-782.
- Piacquadio DJ, Chen DM, Farber HF, Fowler JF, Jr., Glazer SD, Goodman JJ, *et al.* Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. *Arch Dermatol.* 2004 Jan; 140(1):41-46.
- Pollock B, Turner D, Stringer MR, Bojar RA, Goulden V, Stables GI, *et al.* Topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris: a study of clinical efficacy and mechanism of action. *Br J Dermatol.* 2004 Sep; 151(3):616-622.
- Qiang YG, Zhang XP, Li J, Huang Z. Photodynamic therapy for malignant and non-malignant diseases: clinical investigation and application. *Chin Med J (Engl).* 2006 May 20; 119(10):845-857.
- Richey DF, Hopson B. Photodynamic therapy for perioral dermatitis. *J Drugs Dermatol.* 2006 Feb; 5(2 Suppl):12-16.
- Richey DR, Hopson B. Treatment of Sebaceous Hyperplasia with Photodynamic Therapy. *J Cosmet Dermatol.* 2004 August 2004; 17(8):525-529.
- Rijken F, Kiekens RC, Bruijnzeel PL. Skin-infiltrating neutrophils following exposure to solar-simulated radiation could play an important role in photoageing of human skin. *Br J Dermatol.* 2005 Feb; 152(2):321-328.
- Rittie L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev.* 2002 Sep; 1(4):705-720.
- Ruiz-Rodriguez R, Sanz-Sanchez T, Cordoba S. Photodynamic photorejuvenation. *Dermatol Surg.* 2002 Aug; 28(8):742-744; discussion 744.
- Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blaudschun R, Wenk J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol Chem.* 1997 Nov; 378(11):1247-1257.

- Schieke SM, Schroeder P, Krutmann J. Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003 Oct; 19(5):228-234.
- Seo JY, Kim EK, Lee SH, Park KC, Kim KH, Eun HC, *et al*. Enhanced expression of cyclooxygenase-2 by UV in aged human skin in vivo. *Mech Ageing Dev*. 2003 Aug-Sep; 124(8-9):903-910.
- Smith S, Piacquadio D, Morhenn V, Atkin D, Fitzpatrick R. Short incubation PDT versus 5-FU in treating actinic keratoses. *J Drugs Dermatol*. 2003 Dec; 2(6):629-635.
- Soler AM, Warloe T, Berner A, Giercksky KE. A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5-aminolaevulinate-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. *Br J Dermatol*. 2001 Sep; 145(3):467-471.
- Son ED, Lee JY, Lee S, Kim MS, Lee BG, Chang IS, *et al*. Topical application of 17beta-estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating tgf-Beta signaling in aged human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 2005 Jun; 124(6):1149-1161.
- Suomela S, Kariniemi AL, Snellman E, Saarialho-Kere U. Metalloelastase (MMP-12) and 92-kDa gelatinase (MMP-9) as well as their inhibitors, TIMP-1 and -3, are expressed in psoriatic lesions. *Exp Dermatol*. 2001; 10:175-183.
- Szeimies RM. Methyl aminolevulinate-photodynamic therapy for basal cell carcinoma. *Dermatol Clin*. 2007 Jan; 25(1):89-94.
- Taub AF. Photodynamic therapy for the treatment of acne: a pilot study. *J Drugs Dermatol*. 2004a Nov-Dec; 3(6 Suppl):S10-14.
- Taub AF. Photodynamic therapy in dermatology: history and horizons. *J Drugs Dermatol*. 2004b Jan-Feb; 3(1 Suppl):S8-25.
- Taub AF. Photodynamic therapy: other uses. *Dermatol Clin*. 2007 Jan; 25(1):101-109.
- Taylor EL, Brown SB. The advantages of aminolevulinic acid photodynamic therapy in dermatology. *J Dermatolog Treat*. 2002; 13 Suppl 1:S3-11.

- Torezan LAR. Terapia Fotodinâmica em Dermatologia. In: Osório N, Torezan LAR, editors. Laser em Dermatologia. 1ª ed. São Paulo: Editora Roca; 2002. p. 121-136.
- Touma D, Yaar M, Whitehead S, Konnikov N, Gilchrest BA. A trial of short incubation, broad-area photodynamic therapy for facial actinic keratoses and diffuse photodamage. *Arch Dermatol*. 2004 Jan; 140(1):33-40.
- Touma DJ, Gilchrest BA. Topical photodynamic therapy: a new tool in cosmetic dermatology. *Semin Cutan Med Surg*. 2003 Jun; 22(2):124-130.
- Tzung TY, Wu KH, Huang ML. Blue light phototherapy in the treatment of acne. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2004 Oct; 20(5):266-269.
- Uitto J, Kouba D. Cytokine modulation of extracellular matrix gene expression: relevance to fibrotic skin diseases. *J Dermatol Sci*. 2000 Dec; 24 Suppl 1:S60-69.
- Uitto J, Olsen DR, Fazio MJ. Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. *J Invest Dermatol*. 1989 Apr; 92(4 Suppl):61S-77S.
- Usuda J, Chiu SM, Murphy ES, Lam M, Nieminen AL, Oleinick NL. Domain-dependent photodamage to Bcl-2. A membrane anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine photosensitization. *J Biol Chem*. 2003 Jan 17; 278(3):2021-2029.
- Vaalamo M, Mattila L, Johansson N, Kariniemi AL, Karjalainen-Lindsberg ML, Kahari VM, *et al*. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *J Invest Dermatol*. 1997 Jul; 109(1):96-101.
- Wang X, Bi Z, Chu W, Wan Y. IL-1 receptor antagonist attenuates MAP kinase/AP-1 activation and MMP1 expression in UVA-irradiated human fibroblasts induced by culture medium from UVB-irradiated human skin keratinocytes. *Int J Mol Med*. 2005 Dec; 16(6):1117-1124.
- Watanabe H, Shimizu T, Nishihira J, Abe R, Nakayama T, Taniguchi M, *et al*. Ultraviolet A-induced production of matrix metalloproteinase-1 is mediated by macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*. 2004 Jan 16; 279(3):1676-1683.

- Welch EM, Kelly K. Other Dermatologic indications for ALA-PDT. In: Goldman MP, editor. Photodynamic Therapy. 1st ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 1-12.
- Wiegell SR, Wulf HC. Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid versus methyl aminolevulinate. *J Am Acad Dermatol*. 2006 Apr; 54(4):647-651.
- Yaar M, Eller MS. Mechanisms of aging. *Arch Dermatol*. 2002 Nov; 138(11):1429-1432.
- Yaar M, Gilchrist BA. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol*. 2007 Nov; 157(5):874-887.
- Yin L, Morita A, Tsuji T. The crucial role of TGF-beta in the age-related alterations induced by ultraviolet A irradiation. *J Invest Dermatol*. 2003 Apr; 120(4):703-705.
- Zelickson BD. Mechanisms of action of topical aminolevulinic acid. In: Goldman MP, editor. Photodynamic Therapy. 1st ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 1-12.

ANEXOS

Anexo 1 Aprovação do Protocolo de Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:

CEP - MEMO - nº 479/06

Rio de Janeiro, 14 de junho de 2006.

Luiz Carlos Duarte
de Miranda

Médico - Prof. Adjunto

Secretário:

Mário Teixeira Antonio
Farmacêutico - Especialista

Membros Titulares:

Alice Helena Dutra Violante
Médico - Prof. Adjunto

Antonio de Magalhães
Marinho

Enfermeiro - Mestre

Beatriz Moriz Trope

Médico - Doutoranda

Eduardo Jorge Bastos

Cótes

Médico - Prof. Assistente

Eliza Regina Ambrosio

Assistente Social - Mestre

Luiz Borfim Pereira da

Cunha

Médico - Especialista

Maria de Fátima Gustavo

Lopes

Representante dos Usuários

Paulo Feijó Barros

Médico - Prof. Adjunto

Zuzara Rodrigues da Silva

Professora

Membros Suplentes

Alberto Krayem Arbex

Médico - Doutorando

Daniel Savignon Marinho

Farmacêutico - Especialista

Helena Warzyusky

Representante dos Usuários

Luzia da Conceição de

Araújo Marques

Enfermeiro - Mestre

Maria Adelaide Moreira

dos Santos

Nutricionista - Mestre

Mário Fernando Petzhold

Engenheiro - Doutor

Orlando Nunes Cosenza

Sociólogo - Doutor

Roberto Couty Pedrosa

Médico - Doutor

Vania Dias de Oliveira

Assistente Social

Do: Coordenador do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dra. Maria Claudia Almeida Issa

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. Sa que o CEP constituído nos Termos da Resolução n. ° 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 023/06 - CEP

Título : "Estudo da remodelação dérmica induzida pela terapia fotodinâmica na pele fotodanificada"

Pesquisador (a) responsável: Dra. Maria Claudia Almeida Issa

Data de apreciação do parecer: 08/06/06

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 08/12/06, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n. ° 196/96 – CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof. Luiz Carlos Duarte de Miranda
Coordenador do CEP

Anexo 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO
SERVIÇO DE DERMATOLOGIA**

Av. Brigadeiro Trompowsky, s/nº, Ilha do Fundão
CEP 21941-590 – Rio de Janeiro - RJ
Telefones: (021) 2280-7211 e 2562-2580

TÍTULO DO ESTUDO

ESTUDO DA REMODELAÇÃO DÉRMICA INDUZIDA PELA TERAPIA FOTODINÂMICA NA PELE FOTODANIFICADA

JUSTIFICATIVA

Você apresenta alterações na pele causadas pelo envelhecimento cronológico e, também, pelos danos provocados pelo sol. Você está sendo convidado pelo seu médico a tomar parte de um estudo clínico e histológico para avaliar a melhora da pele induzida pelo tratamento proposto. Você será entrevistado, fotografado, biopsiado e submetido ao tratamento que será dividido em duas sessões com intervalo de 4 semanas. Vários estudos mostram melhora da cor e da textura da pele, das rugas, bem como das lesões pré-malignas e malignas causadas pelo sol, através da terapia fotodinâmica tópica. Esta terapia consiste na aplicação de um medicamento em creme sobre a pele, seguido da aplicação de uma luz.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é avaliar a melhora da pele danificada pelo sol, bem como estudar as modificações da pele, através do microscópio, induzidas pela Terapia Fotodinâmica (TFD) tópica, que é a utilização de um medicamento em creme na pele e posterior aplicação de uma luz própria para o tratamento.

PROCEDIMENTOS

Você será atendido pelos médicos do Ambulatório de Dermatologia, que irão lhe informar sobre o questionário, fotografias e a realização das biópsias de pele. Essas serão necessárias para que possamos estudar as alterações da pele antes do procedimento proposto (TFD) e as modificações obtidas pelo tratamento.

A biópsia é um método de exame simples para podermos ver ao microscópio as alterações da pele causadas pelo sol. Será realizada por um profissional experiente, dermatologista, com os seguintes passos: 1. Limpeza com álcool; 2. Injeção superficial na pele com anestesia 0,5 ml (proporcional a 10 gotas); 3. Retirada de pequeno pedaço da pele de 0,5 cm (menor que um botão), 4. Sutura, com 1 (um) ponto, com agulha e fio finos, próprios para a biópsia da face, e 5. Curativo com esparadrapo. O fechamento completo do local é observado em 7 dias, quando será retirado o ponto, pode deixar mancha mais clara ou mais escura, menor do que o tamanho da biópsia.

Você será acompanhada ambulatorialmente e submetida ao tratamento proposto (TFD) em 2 sessões, com intervalo de 4 semanas. O tratamento consiste na aplicação de um medicamento em creme (ME-ALA) em toda a face por um período de 3 horas. Durante esse período você ficará aguardando em uma sala sem exposição solar. Após esse período será exposta a uma luz por um período de 7 minutos. A lâmpada ficará a 8 cm de distância da face. Durante a aplicação da luz, você poderá sentir discreto desconforto, como ardência de alguns pontos da pele, locais mais danificados

pelo sol. O tratamento, a TFD poderá causar alguns efeitos colaterais, como edema (inchaço), eritema, (vermelhidão), dor, formação de crostas e descamação, por um período de 1 a 7 dias.

DESCONFORTOS E RISCOS

1)Pela biópsia: dor de pequena intensidade, uso de esparadrapo no local, pequena cicatriz e infecção bacteriana, apesar de raro.

2) Pelo tratamento: sensação de ardência, até dor de pequena intensidade, vermelhidão, inchaço, descamação da área tratada. Infecções bacteriana ou viral (herpes simples) podem ocorrer, apesar de pouco frequente.

POSSÍVEIS BENEFÍCIOS

Melhora da textura da pele, das manchas escuras, das rugas superficiais, das lesões pré-malignas, se existentes.

ORIENTAÇÕES GERAIS

Você não é obrigado a participar deste estudo. Você pode recusar participar dele e até mesmo deixá-lo a qualquer momento, sem ter que fornecer as razões para tanto. Sua decisão não afetará seu direito a assistência médica.

O médico pesquisador estará a sua disposição para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir a respeito do estudo. Você pode se comunicar com Dra. Maria Claudia Almeida Issa pelos telefones 27041680, 2620-7162, 99815924 para qualquer esclarecimento.

As informações pessoais obtidas a seu respeito durante o estudo permanecerão confidenciais. Se você decidir participar, será necessário um consentimento por escrito.

Li o documento de consentimento livre e esclarecido para este estudo. Recebi as informações necessárias sobre a natureza , proposta do procedimento e o que será esperado de mim. Minhas dúvidas foram devidamente esclarecidas.

1. Concordo em participar deste estudo.
2. Informei ao médico sobre todas as doenças e medicamentos anteriores ou atuais e sobre qualquer consulta com outro médico nos últimos três meses.
3. A minha participação neste estudo é voluntária, podendo recusar em participar ou retirar-me do estudo a qualquer momento, sem penalidade ou perda dos benefícios aos quais tenha direito.
4. Concordo que os resultados do estudo podem ser comunicados à comunidade científica e publicados em revistas médicas, mantendo em sigilo o meu nome e o meu endereço.
5. Autorizo comitês de ética, autoridades regulatórias locais ou estrangeiras, a examinarem, se assim o desejarem, estes registros médicos para confirmação das informações coletadas.

Nome do paciente _____

Assinatura _____ Data _____

Médico _____

Eu confirmo haver pessoalmente explicado, para o indivíduo acima identificado, a natureza e o propósito do estudo.

Assinatura _____ Data _____

Anexo 3 Ficha de Avaliação Clínica

ESTUDO DA REMODELAÇÃO DÉRMICA INDUZIDA PELA TERAPIA FOTODINÂMICA NA PELE FOTODANIFICADA

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

Paciente nº: _____
Primeira consulta data: _____
Nome: _____
Número prontuário: _____
Endereço: _____
Telefone Residencial: _____
Telefone Comercial: _____
Idade: _____ Prof: _____
Cor: _____

HPP:

- Cicatriz queloidiana: _____
- Herpes simples: _____
- Exposição solar: _____
- Protetor solar: FPS () Regularidade da aplicação: _____
- Doenças sistêmicas: _____
 - a- Colagenoses: _____
 - b- Porfiria: _____
 - c- Transplante de órgãos: _____
 - d- Uso de imunossupressores: _____
 - e- Uso crônico de medicamentos: _____ Anticoagulantes: _____

- Tratamento anteriores (ceratoses actínicas ou carcinomas): _____

a- Quando? _____

b- Efeitos colaterais dos tratamentos anteriores: _____

- Tratamento para rejuvenescimento: _____

a- Qual? _____

b- Quando? _____

H Familiar: Câncer de Pele na Família: sim () não () Tipo: _____

H Social:

HDA:

Exame Físico:

Classificação quanto aos tipos de pele (FITZPATRICK)

Tipo I: Queima fácil e nunca bronzeia / pessoa de pele clara e fina, olhos azuis, cabelos vermelhos.

Tipo II: Queima fácil e bronzeia discretamente / pele de pessoas louras com olhos azuis-verdes.

Tipo III: Queima e bronzeia com moderação / pele das pessoas discretamente morenas, com olhos e cabelos levemente castanhos.

Tipo IV: Queima pouco bronzeia bastante / pele de pessoas mais morenas que o tipo anterior com cabelos castanho-escuros.

Tipo V: Queima raramente e bronzeia muito / pele dos mestiços, índios, hindus, e com olhos e cabelos negros.

Tipo VI: Nunca queima e bronzeia intensamente / pele dos negros.

Classificação quanto ao envelhecimento (GLOGAU)

Grupo I: SEM RUGAS

Fotoenvelhecimento leve (28-35 anos)

Discretas alterações pigmentares

Rírides mínimas

Necessidade de pouca ou nenhuma maquiagem

GrupoII: RUGAS COM MOVIMENTO

Fotoenvelhecimento moderado (35 a 50 anos)

Lentigo solar

Ceratoses palpáveis, mas não visíveis

Pouca maquiagem

GrupoIII: RUGAS EM REPOUSO

Fotoenvelhecimento avançado (50-60 anos)

Discromias, telangiectasias

Ceratoses visíveis

Rugas mesmo quando em repouso

Muita maquiagem

GrupoIV: SOMENTE RUGAS

Fotoenvelhecimento grave (acima de 65 anos)

Cor amarela-acinzentado da pele

Ceratoses e câncer de pele

Rugas por toda a parte, sem pele normal

A maquiagem não consegue cobrir as lesões

Ao Exame:

Pele tipo: () Classificação de Glogau: Grupo ()

Pele Fotodanificada

() Melanoses

Número de lesões ()

() Ceratose actínica

Número de lesões visíveis ()

Número de ceratoses palpáveis ()

() Textura

() Firmeza

() Rugas

Exame Dermatológico:

TERAPIA FOTODINÂMICA

SESSÃO 1 () 2 ()

Data: _____

PREPARO DA ÁREA TRATADA

1- Preparo da lesão ou da área:

a- limpeza: () cetaphil loção () álcool

b- curetagem de ceratoses actínicas: () cureta () gaze

2- Aplicação do medicamento tópico (Metvix):

() tempo de aplicação 2 horas

3- Local da aplicação: face

4- Reação da pele após a aplicação do creme: Sim () qual _____ Não ()

5- Remoção do medicamento: () soro fisiológico 0,9% () gaze seca

EXPOSIÇÃO DA LUZ – EQUIPAMENTO: LED – AKTILITE

Fluência: 37 J/cm²

Tempo de exposição: 8 min Distância da pele: () 8 cm outro () _____

PÓS-PROCEDIMENTO:

1- Alterações da pele tratada no pós-imediato / Intensidade: leve (1 a 3), moderado (4 a 6) e intenso (maior que 7)

() eritema

() edema

() bolha

() crosta

() outro _____

2- Queixa do paciente:

() dor _____ Intensidade: _____ Duração: _____

() ardência _____ Intensidade: _____ Duração: _____

() queimação _____ Intensidade: _____ Duração: _____

() prurido _____ Intensidade: _____ Duração: _____

PÓS PROCEDIMENTO

Sessão 1 () Sessão 2 ()

Após 24 – 48 horas () Após 7 dias () Após 15 dias ()

Data: _____

1- Alterações da pele tratada / Intensidade: leve (1 a 3), moderado (4 a 6) e intenso (maior que 7

() eritema

() edema

() crosta

2- Queixa do paciente:

() dor _____ Intensidade: _____ Duração: _____

() ardência _____ Intensidade: _____ Duração: _____

() queimação _____ Intensidade: _____ Duração: _____

() prurido _____ Intensidade: _____ Duração: _____

AVALIAÇÃO CLÍNICA APÓS TRATAMENTO (2 sessões)

Após: 15 dias () 30 dias () 2 meses () 3 meses () 4 meses () 5 meses ()
6 meses () 7 meses ()

DATA: _____

1- Escala de melhora (textura/ firmeza/ rugas)

() melhora mínima (< 25%)

() moderada (25%-50%)

() significativa (51-75%)

() excelente (>75%)

2- Melanoses: número ()

melhora () piora () sem modificação ()

3- Ceratoses actínicas visíveis: número ()

melhora () piora () sem modificação ()

Anexo 4 Ficha de Avaliação Histopatológica

ESTUDO DA REMODELAÇÃO DÉRMICA INDUZIDA PELA TERAPIA FOTODINÂMICA NA PELE FOTODANIFICADA

FICHA DE AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Pré-tratamento

Data: _____

Biópsia de pele (punch 5 mm)

Região: _____

A- Hematoxilina-Eosina:

- 1- Descrição da lâmina:
- 2- Retificação dos cones interpapilares
- 3- Despolarização das células epidérmicas
- 4- Presença e tipo de infiltrado inflamatório
- 5- Distribuição da degeneração basofílica do colágeno
 - . elastose difusa ()
 - . elastose com formação de massas isoladas ()
 - . elastose em faixa compacta ()

B-Colorações Especiais:

- 1- Estudo de fibras elásticas –

Orceína :

- 2- Estudo de fibras colágenas –

Picro sirius

MORFOMETRIA FIBRAS COLÁGENAS

PACIENTES	<i>PRÉ</i>	<i>PÓS 3 MESES</i>	<i>PÓS 6 MESES</i>
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			

MORFOMETRIA FIBRAS ELÁSTICAS

PACIENTES	<i>PRÉ</i>	<i>PÓS 3 MESES</i>	<i>PÓS 6 MESES</i>
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			

IMUNO-HISTOQUÍMICA – COLÁGENO TIPO I E III

PACIENTES	COLÁGENO I			COLÁGENO III		
	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						

Φ Ausência de marcação ou marcação ocasional.

+ Marcação do substrato de forma pontual, com coloração de leve intensidade.

++ Marcação de forma multifocal ou descontínua, com coloração de moderada intensidade

+++ Marcação de forma contínua com coloração moderada à intensa.

IMUNO-HISTOQUÍMICA – MMP-1, -3, -7, -9, -12 TIMP-1 (DERME)

PACIENTES	MMP-1			MMP-3			MMP-7			MMP-9			MMP12			TIMP1		
	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7																		
8																		
9																		
10																		
11																		
12																		
13																		
14																		

Φ Ausência de marcação ou marcação ocasional.

+ Marcação do substrato de forma pontual, com coloração de leve intensidade.

++ Marcação de forma multifocal ou descontínua, com coloração de moderada intensidade

+++ Marcação de forma contínua com coloração moderada à intensa.

IMUNO-HISTOQUÍMICA – MMP-1, -3, -7, -9, -12 TIMP-1 (EPIDERME)

PACIENTES	MMP-1			MMP-3			MMP-7			MMP-9			MMP12			TIMP1		
	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES	PRÉ	PÓS 3 MESES	PÓS 6 MESES
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7																		
8																		
9																		
10																		
11																		
12																		
13																		
14																		

Φ Ausência de marcação ou marcação ocasional.

+ Marcação do substrato de forma pontual, com coloração de leve intensidade.

++ Marcação de forma multifocal ou descontínua, com coloração de moderada intensidade

+++ Marcação de forma contínua com coloração moderada à intensa.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)