



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DO ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO COM A DE
SEU METIL ÉSTER UTILIZANDO-SE A TERAPIA FOTODINÂMICA NO
TRATAMENTO DE CARCINOMA ESPINOCELULAR FELINO**

CLAUDIA RODRIGUES EMILIO

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Materiais.**

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Zezell

SÃO PAULO
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DO ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO COM A DE
SEU METIL ÉSTER UTILIZANDO-SE A TERAPIA FOTODINÂMICA NO
TRATAMENTO DE CARCINOMA ESPINOCELULAR FELINO**

CLAUDIA RODRIGUES EMILIO

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Materiais.**

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Zezell

SÃO PAULO
2008

Dedicatória

Aos meus pais **Claudio** e **Jandira**, que batalharam para que eu chegasse até aqui, exemplos que vou sempre seguir e que sonho um dia me tornar;

A minha irmã e melhor amiga **Riana** e meu cunhado-irmão **Rodrigo**, pessoas que iluminam, alegram e completam minha vida;

Às vovós **Philomena e Laura** e aos vovôs **José e Jorge**, pois não há família de bons princípios e tão unida sem amor;

Ao **Aldo**, meu companheiro de jornada, junção divertida de amor, amizade, determinação e caráter.

Agradecimentos Especiais

À **Prof^a. Dra. Denise Maria Zezell**, que me acolheu e me incentivou em todos os momentos. Obrigada pela paciência, pelas palavras amigas, por transmitir conhecimento e principalmente por enfatizar que a ética deve estar em primeiro lugar.

Ao **Prof. Dr. Marco Antônio Gioso**, por abrir as portas do LOC, pela oportunidade de fazer um concorrido estágio e por me ensinar não somente sobre a Odontologia Veterinária, mas sobre a vida profissional.

Ao **Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara**, cuja paixão pelo conhecimento foi a base para a elaboração de uma patente. Obrigada pela ajuda constante e por permitir que eu usufrísse de seu laboratório.

À **Prof^a. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli**, por me receber em seu laboratório tão gentilmente e de forma tão interessada, por ter sido parte da banca de meu seminário de área e por me ajudar, me ensinar e me empolgar com a Oncologia Veterinária.

Ao **Prof. Dr. Fernando Dutra**, pela atenção e ajuda na elaboração da pomada e por estar sempre à disposição para esclarecer minhas dúvidas.

Ao **Prof. Dr. Marcos Pinotti Barbosa**, por fornecer o equipamento essencial para a realização desse trabalho, pelas dicas importantes em minha qualificação e por nos ensinar com tanto entusiasmo sobre a elaboração de patentes.

Aos proprietários e tratadores dos animais utilizados nesse trabalho: **Stella, Patrícia, Vilma, Carlos, Silvana, Everaldo, Kênia, Elizabeth (e irmão), Ester, Ilka, Bruna, Marly, Aparecido, Geni, Célia, Leda e Laura** por confiarem a mim esses membros da família tão queridos, que me ensinaram muito durante esses anos e pelos quais meu respeito e meu carinho serão eternos.

Agradecimentos

Ao meu **tio Alfredo**, minha **tia Alzira** e minha prima **Laura**, pelo apoio, incentivo e carinho de sempre;

Ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson**, por toda a ajuda com meu plano de trabalho e pelos ensinamentos sobre dermatologia veterinária;

Ao **Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini**, por me ensinar sobre a arte de fotografar e por sempre me receber com muito carinho;

À **Profa. Martha Simões Ribeiro**, pela alegre amizade, por ter participado em minhas bancas de exame de capacidade e de qualificação e pela ajuda carinhosa de sempre;

À **Profa. Sílvia Nuñez**, pela amizade e pelas importantes sugestões em minha banca de seminário de área;

À médica veterinária **Luciana Neves Torres**, pela ajuda com a análise histopatológica e pela paciência em me ensinar;

À **Fernanda Vituri**, que acompanhou e ajudou em parte desse experimento, realizando seu projeto de iniciação científica;

Ao pessoal do Laboratório de Odontologia Comparada (LOC) e Odontovet: **Jonathan Ferreira, Fernanda Lopes, Fernanda Hofmann, Mariana Lage-Marques, Juliana Kowalesky, Vanessa Carvalho, Marco Antonio León-Roman, Léslie Falqueiro, João Luiz Rossi Jr., Lenin Arturo Martinez, Roberto Fecchio, José Miron Oliveira da Silva, Herbert Correa, Daniel Ferro, Michèle Venturini** e **estagiários**, pela sempre ótima recepção, pela ajuda com o experimento e pelos ensinamentos em meu estágio no LOC;

Ao **Cláudio** e **Luciano** do laboratório de Patologia da FMVZ-USP, pela confecção de lâminas e pela ajuda sempre que necessário;

Às médicas veterinárias **Juliana Ferreira, Christiane Thomeo, Luciana, Ellen** e **Melissa**, por me encaminharem ou me ajudarem com alguns casos e por serem tão atenciosas;

Aos médicos veterinários do serviço de cirurgia de pequenos animais da FMVZ-USP: **Carolina Scarpa Carneiro, Genilson Queiroz, Thais Andrade Costa, Sandra Rosner, Andressa Campos** e **Tatiana Soares da Silva**, pelo encaminhamento e ajuda com alguns animais atendidos;

Ao pessoal do Laboratório de Radicais Livres e Bioluminescência: **Rita, Crislaine, Douglas, Adriano, Anderson, Vanessa, Adriana** e **Dóris**, por me receberem tão bem, pela ajuda com meu experimento e pela companhia tão divertida em viagens para congressos;

Ao pessoal do Laboratório de Oncologia Experimental: **Heidge Fukumasu, Kátia Pinello, Kátia Kimura, Patrícia Matsuzaki, Bruno Cogliati, Tereza Cristina da Silva, Lucas Chaible e Márcia Nagamine**, pela sempre ótima recepção e pela ajuda com a utilização do microscópio óptico;

À **Marguite**, técnica do Laboratório de Oncologia Experimental, pela ajuda com a imunistoquímica;

À **Cleide** do laboratório clínico da FMVZ-USP, pela ajuda com os esfregaços sanguíneos;

Ao pessoal do **Laboratório de Bioengenharia (LABBIO)** da UFMG, pelo desenvolvimento do protótipo de LEDs utilizados nesse trabalho;

Aos enfermeiros do hospital veterinário da FMVZ-USP, **Lélis e Gilberto**, pela ajuda com o manejo e colheita de sangue dos animais;

Ao meu padrinho, **Dr. Ivaldo Clementi**, por ter conseguido gratuitamente a dosagem de ferro e ferritina realizada nesse estudo;

À **Dra. Romilda**, pela realização das dosagens de ferro e ferritina;

Aos amigos de pós-graduação do Centro de Lasers e Aplicações: **Carol, Moisés, Thiago, Felipe, Juca (e Andrezza), Vivi, Cacau Zamataro, Adriana, José Quinto, Cassius, China, Aécio, Aguinaldo, Cris, Dani, Alessandro, Eliane, Ani e Claudia Streffeza**, pela maravilhosa convivência, pelos momentos de trabalho e de descontração;

Ao técnico **Valdir**, pela amizade, pela ajuda com diversas intercorrências e tentativa de ajuda com os gatos desse experimento;

As minhas amigas **Patty, Renata e Marcella**, pelo companheirismo, pelas boas conversas, gargalhadas e pela amizade que durará para sempre;

Aos amigos **Melissa (e André), Ilka e Renato**, pelo apoio, pela amizade, pela ótima convivência e pelos momentos de diversão;

A minha amiga **Stella**, pelo companheirismo nas aulas de pós-graduação e pelas boas risadas;

Às queridas amigas de faculdade: **Youko, Luciana, Andrea K., Cristiane, Daniela, Laura, Roberta e Ellen**, pela forte amizade, pelo incentivo e por estarem sempre presentes quando eu precisei;

À **Ilze, Verinha, Rose, Ana, Magali, Renata, Gislene e Fernando** pelo auxílio em vários momentos no decorrer desses anos;

Ao **Sr. Tito, Elsa e Andréa**, pela gentil ajuda em tudo o que foi necessário;

Ao **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares** (IPEN-CNEN/SP) e ao **Centro de Lasers e Aplicações** (CLA), pela infra-estrutura oferecida durante todos esses anos de pós-graduação;

À **CAPES (Procad/CAPES 0349/05-4)**, pela verba para compra de materiais e participação em congressos nacionais e internacionais e pela bolsa de doutorado concedida;

À **FAPESP (CEPID 05/51689-2)** e **CNPq**, pela verba para compra de reagentes para formulação das pomadas;

A todos os que fizeram parte de forma direta e/ou indireta do processo de desenvolvimento desse trabalho, desde as primeiras idéias até a conclusão dessa tese.

“O grande problema da Humanidade não está no domínio da Ciência, mas no domínio dos corações e das mentes humanas.”

Albert Einstein

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DO ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO COM A DE SEU METIL ÉSTER UTILIZANDO-SE A TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DE CARCINOMA ESPINOCELULAR FELINO

Claudia Rodrigues Emilio

RESUMO

A comparação dos resultados obtidos utilizando-se uma única sessão de terapia fotodinâmica (PDT) com diodos emissores de luz (LEDs) de 630 nm no tratamento de carcinoma espinocelular (CEC) de gatos foi o objetivo principal do presente estudo, onde duas diferentes composições de precursores da protoporfirina IX (PPIX), o metil aminolevulinato (MEALA) e o ácido aminolevulínico (ALA) foram testados. Dezenove animais com um total de 24 lesões de CEC cutâneo confirmadas pelo estudo histopatológico foram distribuídos em dois grupos; o primeiro foi tratado com MEALA e o segundo com ALA. Pelos resultados negativos em testes sorológicos para detecção dos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV), não foi possível correlacionar a ocorrência dessas doenças virais com a incidência de CEC cutâneo nos gatos estudados. A temperatura da superfície cutânea, monitorada durante a PDT não apresentou aumento significativo ($\Delta t < 3^{\circ}\text{C}$) nos dois grupos. Todos os animais foram submetidos a exame clínico e sanguíneo (hemograma e função hepato-renal) antes e após o tratamento, não havendo nenhuma alteração que inviabilizasse a inclusão dos mesmos no protocolo experimental e nem alterações atribuídas ao tratamento. A quantificação imunoistoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi realizada como um fator prognóstico do tratamento, porém, os resultados obtidos foram inconclusivos para esse fim. No grupo MEALA, de 10 lesões tratadas, 30% apresentaram respostas completas, 30% apresentaram respostas parciais, 20% apresentaram resposta mínima e em 20% dos casos não houve resposta ao tratamento. Já no grupo ALA foram tratadas 14 lesões, com 28,6% de resposta parcial, 50% de resposta mínima e 21,4% sem resposta. A PDT mostrou-se promissora no tratamento de CEC cutâneo de gatos dentro das condições estudadas, com melhores resultados quando realizada com o MEALA.

**COMPARISON OF EFFICACIES OF ALA-PDT AND METHYL
AMINOLEVULINATE-PDT IN THE TREATMENT OF FELINE SQUAMOUS CELL
CARCINOMA**

Claudia Rodrigues Emilio

ABSTRACT

The comparison of the results obtained with a single photodynamic therapy (PDT) session using 630 nm light emitting diodes (LEDs) in the treatment of feline cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) was the main objective of this study, where two different protoporphyrin IX precursors, methyl aminolevulinate (ALAME) and aminolevulinic acid (ALA) were tested. Nineteen animals comprising 24 SCC of the skin histologically confirmed were distributed into two groups, the first one was treated with ALAME and the second one was treated with ALA. Because of the negative results in tests for feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) it could not be found any correlation between these diseases and skin SCC in the studied cats. The temperature of the skin during the procedure was monitored showing no significative variation. All animals were submitted to clinical exams and blood tests before and after treatment and there were no alterations that could contraindicate PDT or could be attributed to treatment. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry was performed as a prognostic factor of PDT, however, the results were inconclusive and no correlation could be established. Ten SCC skin lesions were treated with ALAME-PDT in the first group, 30% had complete response, 30% had partial response, 20% had minimum response and 20% had no response. In ALA group, 14 SCC lesions were treated and there was no complete response at all - 28,6% of the lesions showed partial response, 50% had minimum response and 21,4% had no response. PDT is a promising treatment for feline SCC under the studied conditions, with better results when performed with ALAME.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1. Terapia Fotodinâmica.....	20
3.1.1. Histórico.....	20
3.1.2. Mecanismo de ação.....	22
3.1.3. Fotossensibilizadores.....	25
3.1.4. Ácido 5-aminolevulínico (ALA).....	28
3.1.5. Metil aminolevulinato (MEALA).....	30
3.1.6. Fonte de irradiação – diodos emissores de luz (LEDs).....	32
3.2. Carcinoma espinocelular felino (CEC).....	33
3.3. Vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV).....	35
3.4. Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. Seleção dos animais.....	38
4.1.1. Avaliação clínica dos animais selecionados.....	39
4.1.2. Diagnóstico clínico e histopatológico.....	39
4.1.3. Exames complementares realizados antes da PDT.....	40
4.2. Preparação da pomada.....	41
4.2.1. Síntese de metil aminolevulinato a partir do ácido 5-aminolevulínico.....	41
4.2.2. Aplicação da pomada.....	42
4.3. Condutas pré-anestésicas.....	43
4.4. Condutas anestésicas.....	43
4.5. Primeira colheita de sangue para dosagem sérica de ferro e ferritina e sorologia para FIV e FeLV.....	44
4.6. Procedimento de iluminação.....	44
4.6.1. Monitoração de temperatura de superfície.....	45
4.7. Segunda colheita de sangue para dosagem sérica de ferro e ferritina.....	46
4.8. Condutas após o procedimento.....	46
4.8.1. Retorno após 30 dias – repetição dos exames complementares.....	47
4.8.2. Retorno após 90 dias.....	47
4.8.3. Retorno após 150 dias – repetição do exame histopatológico.....	47

4.9. Quantificação imunohistoquímica para marcadores de proliferação celular (PCNA)	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1. Avaliação clínica dos animais selecionados	50
5.2. Diagnóstico histopatológico e classificação clínica das lesões de CEC	53
5.3. Exames complementares realizados antes da PDT	55
5.3.1. Hemograma Completo	55
5.3.2. Função Renal.....	58
5.3.3. Função Hepática	59
5.4. Sorologia para FIV e FeLV	60
5.5. Ferro e Ferritina - Grupo MEALA.....	61
5.6. Ferro e Ferritina - Grupo ALA.....	64
5.7. Monitoração de temperatura de superfície	65
5.8. Condutas após o procedimento	66
5.8.1. Retorno após 30 dias – repetição dos exames complementares.....	66
5.8.1.1. Hemograma Completo	67
5.8.1.2. Função Renal.....	68
5.8.1.3. Função Hepática	68
5.9. Retorno após 90 dias - resultados do tratamento do GRUPO MEALA.....	70
5.9.1. Avaliação da resposta clínica geral e acompanhamento dos animais após a PDT	70
5.10. Retorno após 150 dias - avaliação da resposta pela análise histopatológica pós-tratamento do GRUPO MEALA	72
5.11. Retorno após 90 dias - resultados do tratamento do GRUPO ALA	79
5.11.1. Avaliação da resposta clínica geral e acompanhamento dos animais após a PDT	79
5.12. Retorno após 150 dias - avaliação da resposta pela análise histopatológica pós-tratamento do GRUPO ALA.....	81
5.13. Correlação da quantificação de células em fase S marcadas para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) com o prognóstico das lesões de CEC tratadas	88
5.14. Comparação das respostas dos grupos MEALA e ALA	93
6. CONCLUSÕES.....	101
7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	102

8. APÊNDICES	103
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA – Ácido Aminolevulínico
ALAME – Methyl Aminolevulinate
ALT – Alanina Aminotransferase
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AlPcS₄ - Aluminium Phthalocyanine Tetrasulfonate
AST – Aspartato-Transaminase
CBC – Carcinoma de Células Basais
CEC – Carcinoma Espinocelular
CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular
DMBA – 9,10-Dimetil-1,2-Benzantraceno
ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FA – Fosfatase Alcalina
FC – Frequência Cardíaca
FDA – Food and Drug Administration
FeLV – Vírus da Leucemia Felina
FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina
FPC – Fração de Proliferação Celular
FR – Frequência Respiratória
GGT - Gama-Glutamil Transferase
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média
HpD – Derivado de Hematoporfirina
LED – Light Emitting Diode (Diodo Emissor de Luz)
LSAB – Labeled Streptavidin Biotin
MEALA – Metil Aminolevulinato ou Metil Éster do Ácido Aminolevulínico
OMS – Organização Mundial de Saúde
PBS – Phosphate-Buffered Saline
PCNA – Antígeno Tumoral de Proliferação Celular
PDT – Photodynamic Therapy (Terapia Fotodinâmica)
PPIX – Protoporfirina IX
PT – Proteína Total
QWIP – Quantum Well Infrared Photodetector
VCM – Volume Corpuscular Médio

WHO – *World Health Organization*

1. INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (*Photodynamic Therapy* - PDT, do inglês) é um método de tratamento de neoplasias que utiliza a interação entre um agente fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular^{1,2,3,4,5}. A administração do fotossensibilizador pode ser realizada por via intravenosa, oral ou tópica. Após algum tempo, a iluminação da lesão com luz visível leva à geração de espécies citotóxicas (espécies reativas do oxigênio) e, conseqüentemente, à morte celular e destruição tecidual⁶.

A ação fotodinâmica consiste em reações denominadas de tipo I e tipo II, dependendo da natureza dos acontecimentos primários, ou seja, do envolvimento inicial dos radicais intermediários que são subseqüentemente seqüestrados pelo oxigênio, ou a geração de oxigênio singleto altamente citotóxico (1O_2) através da transferência de energia do sensibilizador fotoexcitado⁷.

A efetividade da PDT depende do fotossensibilizador utilizado, sua penetração preferencial no tecido tumoral e um tempo de *clearance* maior nesse tecido, além da duração da aplicação dessa substância; da fonte de irradiação, da habilidade da luz em penetrar no tecido alvo e da duração da exposição a essa luz; do tipo de células-alvo e da presença de oxigênio no tecido⁸.

O objetivo da PDT é a destruição seletiva das células-alvo anormais, através de sua fotossensibilização, tanto pela administração de moléculas fotossensibilizadoras exógenas (porfirinas, clorinas, ftalocianinas, entre outras) quanto pelo uso de vias biossintéticas endógenas, administrando-se precursores como o ácido 5-aminolevulínico (ALA) ou seus derivados⁹. A aplicação tópica desses agentes representa a técnica mais popular de PDT na Dermatologia atual⁴.

A PDT com ALA apresenta uma série de benefícios, dentre eles: fácil administração, menor fotossensibilidade da pele e a opção de repetição do tratamento, se necessário. Entretanto, devido à sua propriedade hidrofílica, o ALA não penetra na membrana celular facilmente e, portanto, altas concentrações e um longo tempo de aplicação devem ser empregados para se atingir um nível

terapêutico de porfirinas¹⁰. Com o objetivo de superar esse problema, um número de ésteres de ALA, que são mais lipofílicos e penetram melhor pela membrana biológica, tem sido sintetizado e testado em sistemas biológicos^{10,11}. Porém, o mecanismo de ação dos danos celulares mediados por eles ainda não é totalmente compreendido¹⁰.

Estudos prévios mostraram que vários ésteres de ALA produziram mais protoporfirina IX (PPIX) do que o ALA sozinho em modelos *in vitro* e *in vivo*¹⁰. O metil éster, também conhecido como metil aminolevulinato (MEALA), é um novo fotossensibilizador tópico que pode oferecer vantagens em relação ao ALA, pois além de apresentar maior penetração na pele, é também mais seletivo por células neoplásicas em comparação ao ALA¹².

Durante os últimos anos, a PDT tem sido clinicamente estudada como uma modalidade local de tratamento de uma variedade de alterações cutâneas, como a queratose actínica, considerada uma lesão pré-neoplásica, a doença de Bowen, o carcinoma espinocelular (CEC) e o carcinoma de células basais (CBC)^{4,13}.

O carcinoma espinocelular é uma neoplasia cutânea comum em gatos e geralmente decorre da exposição crônica do animal à radiação ultravioleta¹⁴. Aparece freqüentemente como lesões não-cicatrizáveis, erosivas ou ulcerativas. As lesões proliferativas podem variar de uma placa firme, eritematosa, a uma lesão de forma semelhante a uma couve-flor, que freqüentemente se ulcera. Geralmente essas lesões são localmente invasivas, e o tempo para ocorrência de metástase é longo. Ocorrem em uma idade média de nove anos, sem predileção por raça ou sexo¹⁵.

Os gatos brancos apresentam o carcinoma espinocelular cerca de treze vezes mais freqüentemente que outros gatos, devido à susceptibilidade aumentada à lesão actínica¹⁶, pois apresentam áreas hipopigmentadas habitualmente expostas à luz solar, como as pontas das orelhas e região nasal. Os locais mais comuns de acometimento nos felinos incluem pavilhões auriculares, lábios, plano nasal e pálpebras¹⁴.

Com o aumento da expectativa de vida dos cães e gatos devido ao avanço da medicina veterinária nas duas últimas décadas, houve também um crescimento do número de casos de animais com câncer. Dessa forma, o clínico veterinário deve ser capaz de diagnosticar, tratar e prevenir o câncer nos animais de estimação¹⁷.

Atualmente, a viabilidade do uso da PDT em Medicina Veterinária ainda está sob investigação^{1,2,14,15,18}, entretanto, há um potencial considerável para sua aplicação clínica¹. Com o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores e tipos de luz, com custos viáveis, a terapia fotodinâmica certamente se tornará uma importante ferramenta para os veterinários dermatologistas e oncologistas.

2. OBJETIVOS

Esse estudo tem como objetivo geral avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica utilizando-se o ácido 5-aminolevulínico e seu metil éster em carcinoma espinocelular felino, irradiado por um sistema emissor de luz com LEDs de comprimento de onda de 630 nm.

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Correlacionar a ocorrência do carcinoma espinocelular com a ocorrência dos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e da leucemia felina (FeLV);
- Realizar a monitoração da temperatura durante a irradiação;
- Monitorar possíveis efeitos colaterais por exames de sangue;
- Avaliar o prognóstico do tumor por meio de exames imunoistoquímicos para marcadores de proliferação celular (PCNA);
- Comparar a eficácia do ALA com a do MEALA, ambos em formulação a 5%.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Terapia Fotodinâmica

3.1.1. Histórico

Uma das mais antigas referências à terapia utilizando a luz é proveniente da Índia, por volta de 1.400 a.C. Ali se referia ao emprego de distintas sementes de plantas e da luz do sol para o tratamento de vitiligo. Da mesma forma, os egípcios antigos também utilizaram sementes de plantas e luz solar para tratar leucodermias^{1,18}.

O primeiro relato científico de uma reação fotodinâmica biológica surgiu no século XIX, quando se descreveu a acentuação da toxicidade da quinina pela luz sobre os ovos de sapo e de várias plantas. O potencial medicinal dessas reações, mediadas pela luz, não foi bem compreendido até o início do século XX, quando a PDT começou a emergir como uma “ciência”¹⁸. Nesse período, Oscar Raab, trabalhando no laboratório de Hereon Herman von Tappeiner, na Alemanha, descobriu que a iluminação de culturas microbianas na presença da acridina e derivados resultava na morte celular^{3,19}. Esses achados provaram a existência de uma conexão entre a ativação de corantes pela luz e o resultado terapêutico⁵.

Em 1903, o Prêmio Nobel foi dado ao cientista dinamarquês Niels Finsen, pelo uso da eosina e da luz no tratamento de *lupus vulgaris*. No mesmo ano, Hereon Herman von Tappeiner descobriu que o oxigênio era necessário para se desenvolver uma boa resposta nas reações mediadas pela luz, assim criando o termo “terapia fotodinâmica” para descrever essa terapia oxigênio-dependente^{1,3,5}. Ainda em 1903, Von Tappeiner e Jesionek usaram a eosina e a luz para tratar tumores de pele^{19,20}.

Um grande avanço ocorreu em 1908, quando foi descoberto que as porfirinas eram agentes fotodinâmicos ativos contra o *Plasmodium falciparum in vitro*. Três anos depois, descobriu-se que a hematoporfirina possui propriedades fotossensibilizadoras¹. Mais tarde, no final da década de 40 e início da década de

50, os pesquisadores da PDT descobriram que a hematoporfirina se acumulava preferencialmente em tumores¹⁸. Em uma série de estudos, Schwartz, Winkelman e Lipson descobriram que a fluorescência dos fotossensibilizadores, especificamente dos derivados da hematoporfirina (HpD) poderia ser utilizada na detecção desses tumores¹.

O uso da terapia fotodinâmica na Oncologia data dos anos 70, quando o Dr. Thomas J. Dougherty começou a investigar os mecanismos e usos clínicos dos derivados da hematoporfirina^{5,21}. Juntamente com outros colegas, ele demonstrou a eficácia clínica do HpD no tratamento de tumores metastáticos na pele¹. Dougherty estabeleceu um procedimento para o preparo de HpD e, por fim, desenvolveu um método que seguiu as normas estabelecidas pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o preparo do fotossensibilizador em larga escala^{19,20}.

Ainda nos anos 70, determinou-se que a citotoxicidade mediada pela PDT era parcialmente provocada pela formação de oxigênio singlete. Também durante esse tempo, a introdução de um sistema de fibra óptica, conectado a um laser de argônio, facilitou a pesquisa da terapia fotodinâmica por promover grandes quantidades de luz monocromática em variados comprimentos de onda²¹.

A PDT foi utilizada em muitos estudos para o tratamento de diversos tipos de tumor, além de serem testados também vários tipos de fotossensibilizadores. Depois do primeiro trabalho desenvolvido em humanos no Instituto do Câncer Roswell Park e publicado por Dougherty em 1978, milhares de pacientes têm sido tratados por essa técnica^{1,18,22,23}, porém, comparativamente, poucos animais têm sido tratados com PDT^{1,18,24}.

Os relatos mais antigos do emprego da PDT em animais domésticos com tumores surgidos naturalmente ocorreram no início dos anos 80, quando a hematoporfirina administrada por via intravenosa em cães e gatos era submetida na seqüência à irradiação com laser. Embora esses estudos incluíssem cães e gatos com uma grande variedade de tipos tumorais, a maioria dos tumores foi considerada responsiva, demonstrando assim o potencial clínico da PDT no tratamento de tumores sólidos¹⁸.

A eficiência da terapia no tratamento de distintos tipos de tumores no esôfago^{25,26}, próstata^{27,28,29,30,31,32}, na face^{33,34}, cavidade oral³⁵ e cérebro³⁶ já foi comprovada em animais e pacientes humanos, face aos resultados promissores.

Dos casos publicados incluem-se neoplasias originárias de diferentes órgãos, como carcinoma espinocelular, adenocarcinoma, carcinoma de células basais e transicionais, adenoma cístico, bem como tumores malignos de origem não epitelial, como glioma, melanoma, retinoblastoma, lipossarcoma, condrossarcoma e sarcoma de Kaposi²².

Tanto a quimio quanto a radioterapia apresentam um sistema dose-limitante ou toxicidade sistêmica, sendo que os efeitos colaterais tendem a limitar o tratamento em determinadas doses. A fragilidade de uma população de idade avançada, assim como a condição de debilidade de um paciente podem limitar o uso de métodos cirúrgicos para a exérese tumoral. Os métodos de terapia fotodinâmica tendem a resultar em excelente resposta sem toxicidades cumulativas. Em futuro próximo, a PDT poderá ser aplicada na Medicina Veterinária juntamente a outra modalidade de tratamento, como a cirurgia tradicional, quimioterapia ou radioterapia, pois as toxicidades não são aditivas ou sinérgicas a nenhuma outra modalidade de terapia³⁷.

3.1.2. Mecanismo de ação

O primeiro passo no processo fotodinâmico é a absorção de um fóton pelo fotossensibilizador, que só ocorre quando o comprimento de onda da luz irradiada faz parte do espectro de absorção da substância fotossensível^{38,39}. Após a absorção desse fóton, a molécula do fotossensibilizador passa de seu estado fundamental para o estado singleto excitado, que possui meia-vida extremamente curta. O composto singleto excitado pode tanto decair para seu estado fundamental, emitindo luz na forma de fluorescência, como pode passar a um estado tripleto excitado de meia-vida longa, através de um processo denominado cruzamento entre sistemas, quando pode ocorrer também a emissão de fosforescência^{38,39,40,41}.

O fotossensibilizador no estado tripleto excitado pode então sofrer dois tipos de reação, a reação tipo I e a reação tipo II (FIG. 1). No mecanismo tipo I, ocorre a transferência de um próton ou um elétron entre o fotossensibilizador no estado tripleto excitado e componentes do sistema, como a membrana celular ou uma molécula, gerando íons-radicaís (ânion ou cátion) que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, gerando espécies reativas do oxigênio. No

mecanismo tipo II, ocorre transferência de energia do fotossensibilizador no estado tripleto diretamente ao oxigênio molecular, com a geração de oxigênio singlete, um agente altamente citotóxico^{6,22,41,42}. As reações de tipo I e tipo II da PDT podem ocorrer simultaneamente e a fração de cada uma depende do tipo de fotossensibilizador utilizado, da concentração de substrato e de oxigênio^{6,41}.

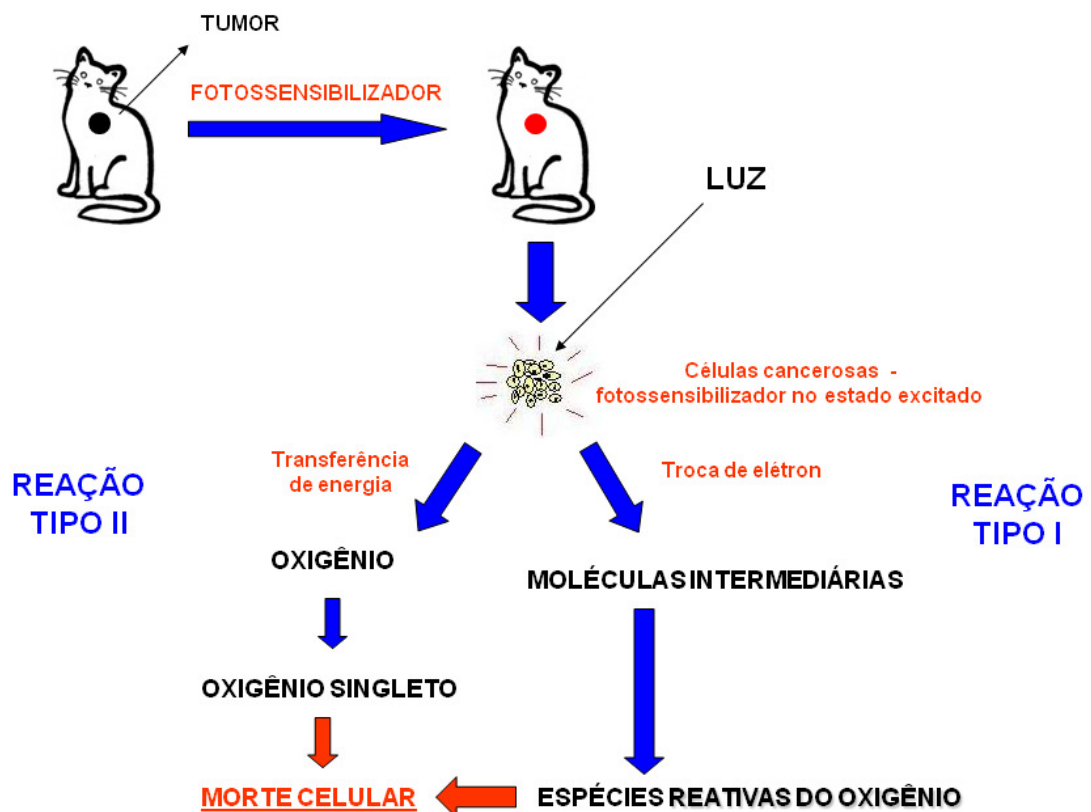


FIGURA 1. Esquema representativo da PDT.

Os efeitos da PDT nas células cancerosas dependem da localização do fotossensibilizador, da eficiência dessa substância no meio, da fluência entregue às células e da cinética do dano vascular e do suprimento de oxigênio⁴¹. Somente áreas próximas à localização do fotossensibilizador são diretamente afetadas pela PDT devido à alta reatividade e à meia-vida curta do oxigênio singlete e do radical hidroxila. A meia-vida do oxigênio singlete em sistemas biológicos é menor que 40 ns e seu raio de ação é da ordem de 20 nm⁶.

As espécies reativas do oxigênio são causadoras de uma série de eventos

intracelulares complexos, como danos às membranas celulares (membranas mitocondriais, retículo endoplasmático e lisossomal, membranas plasmática e nuclear), culminando na morte celular. Três eventos interdependentes resultam nos efeitos antitumorais da PDT: a morte direta da célula cancerosa, o dano vascular e a ativação de resposta imune não específica³⁹. A liberação de mediadores da inflamação e mediadores imunológicos causa alterações na vascularização local, que podem ser observadas em estudos experimentais logo nos primeiros segundos de exposição à luz, com formação de agregados plaquetários, vasoconstrição transitória, vasodilatação e, eventualmente, estase sanguínea completa e hemorragia^{38,41}. O dano tecidual pode acontecer tanto por necrose quanto por apoptose^{24,43,44}.

Juntamente com a vascularização, a mitocôndria, os lisossomos, a membrana plasmática e o núcleo das células tumorais têm sido avaliados como potenciais alvos para a PDT⁷. Os fotossensibilizadores, que possuem como alvo a mitocôndria ou são nela produzidos, mais provavelmente induzem à apoptose e aqueles que possuem como alvo a membrana plasmática da célula induzem à necrose^{7,39}.

A redução do número de células cancerosas em um tumor por meio do dano direto provocado pela PDT não é suficiente para se atingir a cura após o tratamento. Além da distribuição do fotossensibilizador no tecido irradiado, os efeitos diretos da terapia dependem do aporte de oxigênio presente na lesão. Esse último fator está relacionado ao consumo de oxigênio durante o processo fotodinâmico e aos efeitos da PDT na microvasculatura tumoral^{6,7}.

A apoptose é o mecanismo pelo qual os organismos iniciam a morte celular, processo que geralmente faz parte do aparato genético. Esse processo leva à fragmentação do DNA nuclear e degradação das estruturas intracelulares^{7,39}. As células neoplásicas apresentam falhas na capacidade de entrar em apoptose, fato que garante sua sobrevivência após tratamentos como a quimioterapia. A PDT é efetiva contra tipos celulares resistentes a drogas⁷.

As células cancerosas e as células normais apresentam reação inflamatória de diferentes natureza e intensidade, fato que pode contribuir para a seletividade dos danos mediados pela PDT. A liberação de uma variedade de mediadores potentes é uma característica importante do processo inflamatório, que apresenta variações de acordo com o tipo de tumor tratado^{6,7}.

A resposta imune tumoral é importante para o controle do tumor a longo prazo. Os linfócitos sensibilizados no tumor podem eliminar pequenos focos de células cancerosas viáveis que escaparam dos efeitos antitumorais da PDT. Como primeiro passo da resposta imune tumoral, macrófagos associados ao tumor e/ou células dendríticas funcionam como apresentadores de antígeno, fagocitando grande quantidade de células cancerosas mortas ou danificadas. Os antígenos são então reconhecidos por linfócitos T *helper*, que se tornam ativados, sintetizando células T citotóxicas que se expandem e são ativadas, levando ao desenvolvimento de imunidade tumoral⁷.

Em geral, acredita-se que fluências mais baixas levam principalmente à apoptose, enquanto fluências mais altas levam principalmente à necrose⁴⁵. Apesar do conhecimento dos efeitos imunológicos da PDT em modelos animais ser bem estabelecido, não há muitos estudos clínicos sobre o assunto. A PDT poderia ser um tipo de tratamento oncológico bastante vantajoso, já que não leva à supressão do sistema imune como alguns tratamentos de câncer, como a quimioterapia e indiretamente a radioterapia⁴⁶.

3.1.3. Fotossensibilizadores

Muitas substâncias podem ser utilizadas como fotossensibilizadores, porém poucas são utilizadas em testes clínicos e muito poucas estão disponíveis comercialmente⁷. A maior parte dos fotossensibilizadores utilizados na prática clínica e experimental são derivados do núcleo aromático tetrapirrólico encontrado em vários pigmentos naturais. Eles geralmente possuem uma banda de absorção na região de comprimento de onda de 400 nm, também conhecida como banda de *Soret* e pequenas bandas de absorção na região vermelha do espectro eletromagnético, conhecidas como bandas-Q⁶ (FIG. 2).

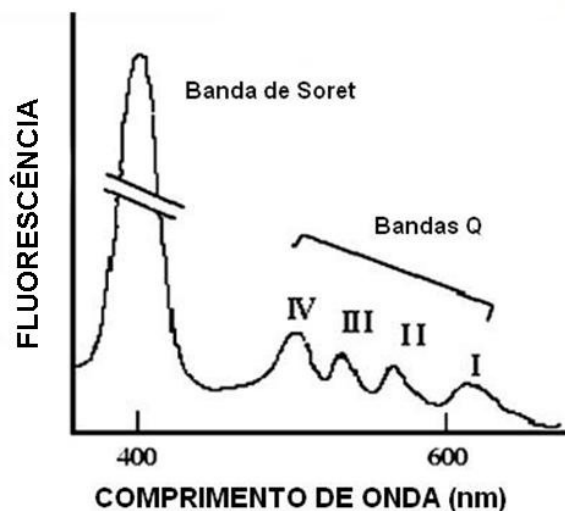


FIGURA 2. Espectro de absorção da protoporfirina IX.

Os fotossensibilizadores podem ser classificados baseando-se em suas estruturas químicas, podendo pertencer a várias famílias, como a família das porfirinas, das clorofilas e dos corantes. A família das porfirinas baseia-se na hematoporfirina e seus derivados, que podem ser diferenciados em suas composições pelas frações de monômeros de porfirinas, dímeros e oligômeros⁷.

As porfirinas geralmente são chamadas de fotossensibilizadores de primeira geração. Alguns autores consideram como primeira geração as porfirinas desenvolvidas nos anos 70 e início dos anos 80. Os fotossensibilizadores de segunda geração são os derivados de porfirina ou sintéticos desenvolvidos no final dos anos 80. Já os fotossensibilizadores de terceira geração são as substâncias sintetizadas a partir de outras já existentes, modificadas com conjugados de anticorpos, conjugados biológicos e outros.

Na família das clorofilas estão presentes as substâncias similares à clorofila, denominadas clorinas. Como estudado nos primórdios da utilização da PDT, os corantes apresentam potencial para utilização como fotossensibilizadores, constituindo a família dos corantes⁷.

Os fotossensibilizadores são incorporados tanto pelas células normais quanto pelas células malignas, porém permanecem por mais tempo em tecidos neoplásicos ou de rápida proliferação. Isso acontece por causa do número aumentado de vasos, da alta permeabilidade vascular e de uma drenagem

linfática deficiente nesses tecidos⁴³, além das propriedades químicas de grande parte dos fotossensibilizadores, como maior afinidade por colágeno recém-sintetizado e habilidade para se ligar a receptores de lipoproteínas, ambos presentes nos tumores^{2,7,43,43}.

O fotossensibilizador ideal para o uso em PDT deve apresentar as seguintes características^{2,5,6,7}:

- Ausência de toxicidade e de subprodutos tóxicos;
- Não ser carcinogênico ou mutagênico;
- Ser de rápida eliminação (ou possuir meia-vida mais longa para que um segundo tratamento seja realizado sem necessidade de reaplicação da substância);
- Apresentar seletividade pelas células-alvo;
- Ativação por comprimento de onda específico;
- Curta duração da fotossensibilidade cutânea;
- Versatilidade e facilidade na administração (via oral, tópica, injetável ou inalatória);
- Não causar dor durante a terapia;
- Apresentar disponibilidade comercial;
- Apresentar custo acessível;
- Segurança na utilização, sem causar efeitos colaterais;
- Não causar efeitos colaterais quando utilizado concomitantemente a outras modalidades de terapia;
- Não causar efeitos deletérios no tecido normal.

Dependendo da localização do fotossensibilizador, podem ocorrer tanto alterações funcionais na célula quanto indução da morte celular, seja por necrose ou por apoptose^{3,19,47}. Como mencionado anteriormente, é provável que os fotossensibilizadores produzidos ou localizados na mitocôndria induzam à morte celular por apoptose, enquanto aqueles localizados na membrana plasmática induzam à necrose^{7,39}. Isso pode ser melhor observado em estudos *in vitro*, pois *in vivo* a situação é mais complexa, sendo que a destruição tumoral é mais provavelmente o resultado de uma mistura de apoptose e necrose³⁹. A maioria dos fotossensibilizadores utilizados para a PDT não se acumula no núcleo celular e, portanto, há um baixo potencial de ocorrer mutações no DNA e carcinogênese⁷.

Nos últimos anos, vários fotossensibilizadores têm sido testados para uso na

PDT de diversos tipos tumorais. Entretanto, para utilização na área dermatológica, o uso de derivados da hematoporfirina ou dos precursores da protoporfirina IX, como o ácido 5-aminolevulínico e o metil aminolevulinato tem sido o principal enfoque^{3,48}.

3.1.4. Ácido 5-aminolevulínico (ALA)

Em 1990, Kennedy e colaboradores introduziram o uso do ácido 5-aminolevulínico na PDT^{3,8,49,50, 51,52}. O ALA pode ser administrado por via tópica, através da aplicação direta no tumor ou de inalação e por via sistêmica, através da injeção intravenosa, intradérmica ou administração oral⁵³.

O ALA é um precursor da protoporfirina IX (PPIX) na via biossintética do grupo heme, uma fração da hemoglobina envolvida no transporte de oxigênio⁵⁴. A PPIX é um eficiente fotossensibilizador e é também precursora do heme, sendo que as enzimas que o contém são essenciais para o metabolismo de energia. Dessa forma, toda célula nucleada deve possuir uma mínima capacidade de sintetizar a PPIX^{6,43,50}. A FIG. 3 apresenta a estrutura do ALA.

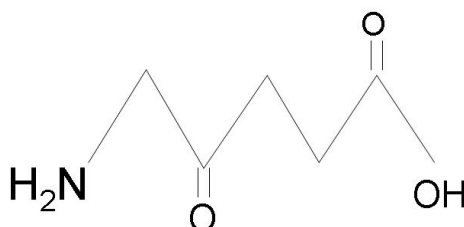


FIGURA 3. Estrutura do ácido 5-aminolevulínico.

O ALA é absorvido através da queratina danificada que recobre o tumor, havendo, no entanto, pouca penetração no epitélio normal intacto^{24,43}. Na membrana plasmática das células, o ALA é captado por transporte ativo⁹. Uma vez difundido dentro das células, ele é convertido em protoporfirina IX (PPIX) através da via biossintética do grupo heme^{3,9,43,50,55}, como esquematizado na FIG. 4. No primeiro passo dessa via, o ALA é formado a partir da glicina e da succinil coenzima A. O último passo é a incorporação do ferro à PPIX, sob a ação da enzima ferroquelatase⁵⁶.

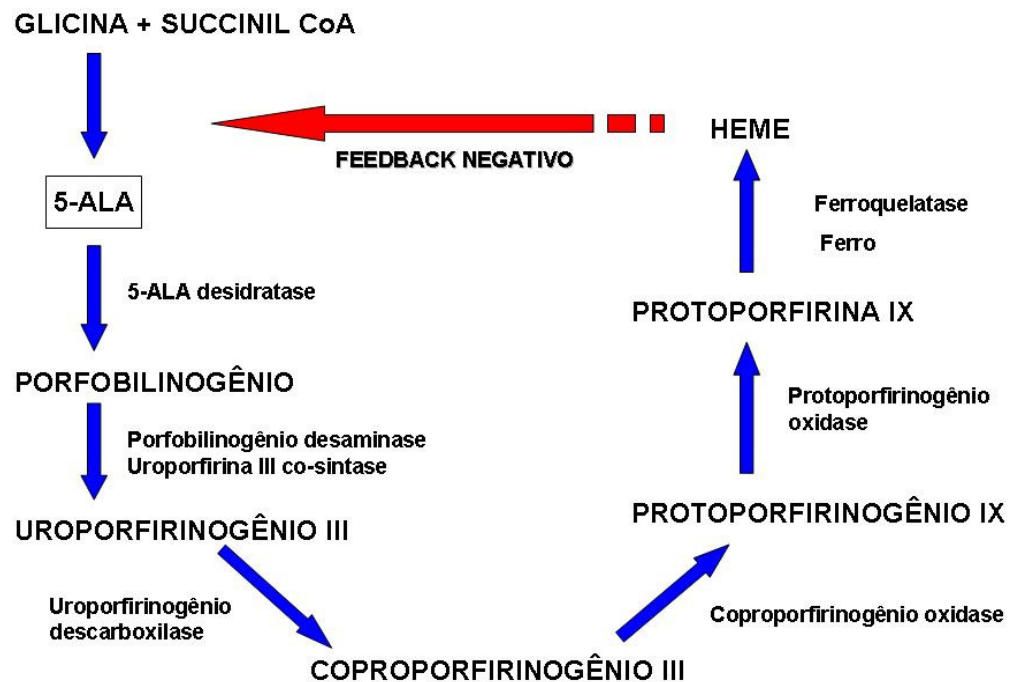


FIGURA 4. Mecanismo de indução da protoporfirina IX pelo ácido aminolevulínico através da via biossintética do grupo heme^{9,13,43}.

A síntese da PPIX é normalmente regulada por um mecanismo de *feed-back* negativo^{50,56}. Porém, na presença de excesso de ALA, a protoporfirina IX se acumula, devido à lenta atividade da enzima ferroquelatase. Além disso, a atividade da enzima porfobilinogênio desaminase, que catalisa a formação do uroporfirinogênio a partir do porfobilinogênio, é maior em alguns tumores, enquanto a da ferroquelatase é menor, resultando em um maior acúmulo da PPIX nas células neoplásicas⁵⁶.

Outros fatores que podem levar ao acúmulo da PPIX no interior das células neoplásicas, por causarem alterações na produção do heme, são a maior captação do ALA, disponibilidade limitada do íon ferroso, ciclo celular, atividade proliferativa, densidade mitocondrial, temperatura elevada e baixo pH¹³. A via biossintética do heme normalmente ocorre em nível mitocondrial, portanto, a PPIX ali se acumula. Os efeitos iniciais da PDT são provavelmente devido ao dano mitocondrial e à inibição da fosforilação oxidativa⁴³.

O acúmulo da PPIX ocorre nas células em que sua taxa de síntese é maior do que sua taxa de conversão em heme, sua taxa de catabolismo e/ou sua taxa

de perda por difusão extracelular⁵⁷. Na ausência de iluminação da lesão tratada com o ALA, a PPIX é metabolizada em heme dentro de 24 a 48 horas, não havendo, dessa forma, ação fotodinâmica³. A FIG.5 mostra a estrutura da PPIX.

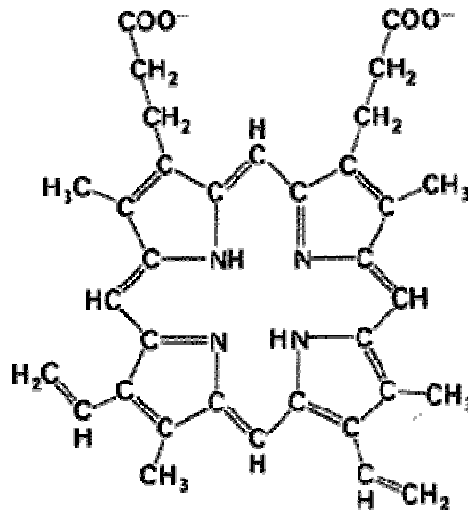


FIGURA 5. Estrutura molecular da protoporfirina IX.

A utilização tópica do ALA na PDT tem demonstrado eficácia significativa em uma série de doenças cutâneas, como carcinoma de células basais superficial, queratose actínica, doença de Bowen, carcinoma espinocelular, psoríase, verrugas, papiloma e micose fungóide¹³.

A formulação comercial do ALA para utilização em pacientes humanos apresenta aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos para uso em lesões de queratose actínica⁵⁸. No Brasil, há registro dessa mesma formulação na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁵⁹, que regulamenta o uso de medicamentos em pessoas, porém, não há ainda registro do ALA no Ministério da Agricultura para utilização em animais⁶⁰.

3.1.5. Metil aminolevulinato (MEALA)

A penetração do ALA pelo estrato córneo da pele é limitada devido a sua natureza hidrofílica. Além disso, a formação da PPIX é geralmente restrita às camadas superficiais do tecido por causa da falta de homogeneidade e de sua distribuição parcial por lesões profundas ou nodulares⁶¹, permitindo uma penetração de até três milímetros no tecido tumoral⁵¹.

Estudos realizados com ésteres de ALA, dentre eles o metil éster do ácido aminolevulínico (FIG. 6), também conhecido como metil aminolevulinato (MEALA), demonstraram maior penetração desses compostos na lesão cancerosa devido a suas propriedades lipofílicas, além de sintetizarem maior quantidade de PPIX quando comparados ao ALA^{9,24,51,62,63}. A redução da concentração do MEALA também demonstra ser mais efetiva na produção de PPIX¹³.

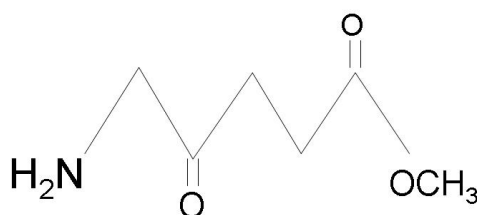


FIGURA 6. Estrutura do metil aminolevulinato.

O MEALA apresenta maior seletividade por células neoplásicas provocando, dessa forma, menor quantidade de efeitos colaterais em tecido normal^{56,64}. Além disso, a PDT com esse precursor tem sido considerada bastante eficaz na prática clínica tanto em tumores nodulares quanto em tumores superficiais, com ótimos resultados estéticos^{65,66}.

Ésteres de cadeia curta induzem à formação de menor quantidade de PPIX no interior das células cancerosas *in vitro*. Na aplicação clínica, a inibição do crescimento tumoral é maior com o uso de MEALA do que com o ALA. As diferenças encontradas em estudos *in vitro* e *in vivo* são devido à penetração dos precursores pelo extrato córneo e às interações entre a droga e o veículo utilizado^{6,13}.

Assim como o ALA, o MEALA apresenta aprovação do FDA nos Estados Unidos para uso em lesões de queratose actínica⁵⁸, assim como é aprovado na Europa para uso nesse mesmo tipo de lesão e para carcinoma de células basais^{3,23}. Porém, no Brasil, não há registros do MEALA na ANVISA ou no Ministério da Agricultura^{59,60}.

3.1.6. Fonte de irradiação – diodos emissores de luz (LEDs)

Atualmente, a maior parte dos fotossensibilizadores utilizados na PDT antitumoral apresenta uma banda de absorção da luz entre 400 e 430 nm e uma banda menor de absorção em comprimentos de onda acima de 550 nm. As bandas acima de 600nm são geralmente as utilizadas para PDT, pois apresentam alto rendimento quântico para as reações do tipo I e II e ao mesmo tempo possuem maior penetração no tecido irradiado^{3,19,24,67}. A FIG. 7 representa a penetração da luz no tecido em diferentes comprimentos de onda²².

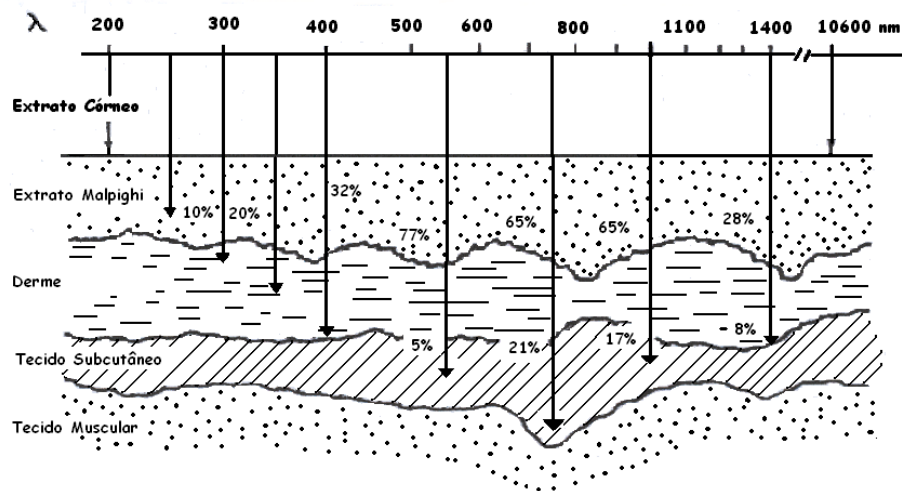


FIGURA 7. Representação esquemática de um corte de tecido e a penetração de diferentes comprimentos de onda²².

Pelo fato da maior penetração tecidual da luz localizar-se no comprimento de onda vermelho, o desenvolvimento de fontes de luz para uso em PDT foi focalizado principalmente nessa região do espectro eletromagnético⁶⁷. Além disso, a utilização desse comprimento de onda, juntamente com uma baixa densidade de potência torna o procedimento mais vantajoso em comparação à utilização de outras energias de fator ultravioleta, que seriam menos seletivas, provocando mais danos às células normais.

Os *lasers* foram as primeiras fontes de luz utilizadas na PDT, entretanto, a coerência da luz *laser* não é necessária para a realização dessa terapia, já que após penetração tecidual há perda parcial da coerência já nos primeiros décimos de milímetro, de forma que esta não é relevante para a PDT⁶⁸. Assim, com o tempo, fontes de irradiação não coerentes foram desenvolvidas, dentre elas os

diodos emissores de luz (LEDs – do Inglês, *light emitting diodes*), que apresentam como vantagens a versatilidade (podem ser arranjados de várias formas e em grande quantidade para irradiação de grandes áreas) e o custo mais baixo em comparação a uma fonte *laser*^{24,67,68}.

A comparação de duas fontes de irradiação para a realização da PDT com ALA ou seus derivados, uma lâmpada halógena de amplo espectro de emissão (560-740 nm) e um LED de comprimento de onda igual a 631 ± 2 nm demonstrou que o LED apresenta características mais favoráveis para a realização do procedimento, já que a penetração da luz no tecido foi maior⁶⁸.

A eficácia e toxicidade equivalentes entre uma fonte laser e um sistema LED utilizando-se a mesma dosimetria de luz já foi demonstrada em cães. O uso de LEDs na PDT em gatos também apresentou bons resultados, tornando essa fonte de irradiação uma boa opção para a PDT na prática veterinária^{43,69}.

3.2. Carcinoma espinocelular felino (CEC)

As neoplasias cutâneas felinas são na maioria das vezes malignas e apresentam baixo potencial metastático. Dessa forma, é possível realizar tratamentos efetivos quando as lesões são diagnosticadas precocemente⁷⁰.

A queratose actínica é uma lesão epitelial pré-maligna causada pela radiação ultravioleta, podendo evoluir para carcinoma espinocelular⁷¹. Em pacientes humanos, é comprovado que 1-10% das lesões de queratose actínica resultam em CEC⁷².

A seqüência de eventos que precede o surgimento do CEC inicia-se com a radiação ultravioleta, que atinge as células epidérmicas e é absorvida pelo DNA, induzindo alterações genéticas^{72,73}. Em experimentos realizados *in vitro*, as mutações dependem de um comprimento de onda entre 290 e 330 nm. *In vivo*, o pico ocorre ao redor de 300 nm devido à absorção da radiação ultravioleta pela epiderme⁷².

O primeiro sinal de dano causado pela exposição solar é o eritema persistente que com o tempo progride para descamação, formação de crostas e úlceras. Quando ocorre em pavilhões auriculares, as pontas podem se curvar. Quando ocorre em plano nasal, o CEC pode atingir cartilagens e tornar-se inacessível para o procedimento cirúrgico, fazendo com que seu prognóstico seja

ruim⁷⁰.

Os CECs variam de milímetros a centímetros de diâmetro e podem aparecer na forma de placas, cratera, papilas ou massas fungiformes. As lesões de CEC podem ser únicas ou múltiplas e geralmente apresentam alopecia, eritema, ulceração e formação de crostas^{74,75}. As lesões em forma de pequenas placas comumente progridem para placas maiores e ulcerativas ou lesões exofíticas⁷⁵.

A maior parte dos CECs cutâneos é bem diferenciada histologicamente e o risco de metástase é baixo, limitando-se aos linfonodos regionais^{74,75,76,77}. O CEC bem diferenciado apresenta ilhas e trabéculas de células escamosas que se originam na epiderme e se estendem para a derme. É possível observar o acúmulo de pérolas de queratina em números variados^{74,75,78}. Os centros queratinizados dos lóbulos freqüentemente sofrem necrose e apresentam infiltrados de neutrófilos. Os núcleos celulares são grandes e apresentam nucléolos evidentes, além de baixa a moderada atividade mitótica. A produção de colágeno estromal está sempre presente em algum grau e o estroma comumente apresenta pequenos aglomerados de células neoplásicas parcialmente queratinizadas^{74,75,76}.

Nos CECs, focos de infiltração perineural de pequenos agregados de células neoplásicas podem ser identificados no interior ou adjacente à neoplasia. Esse fenômeno é relativamente comum em gatos e geralmente é mais observado em CEC nasal e de pavilhões auriculares, podendo ser o responsável pela recidiva local do carcinoma após sua excisão cirúrgica^{74,75}.

O CEC pouco diferenciado é menos comum e sua arquitetura é similar ao tipo bem diferenciado, mas com estruturas epiteliais menores, com predomínio de cordões e ninhos de células espinhosas e com menos produção de colágeno no estroma. Apresenta células em alta atividade mitótica e atipia. Geralmente não são observadas pérolas de queratina⁷⁵. A metástase em linfonodos e pulmões pode ocorrer nesse tipo de CEC⁷⁷.

Nos CECs cutâneos em humanos, estudos demonstraram que lesões menores que 2mm de espessura geralmente não metastatizam e lesões maiores que 5 a 6mm em profundidade, ou com invasão muscular, cartilaginosa ou óssea possuem, em média, um potencial metastático de 20%⁷⁴.

Além da radiação ultravioleta, outras causas são relacionadas ao CEC de

felinos, como a herança genética e o estresse⁷⁶.

Os CECs em gatos aparecem mais freqüentemente em animais claros, com regiões de poucos pêlos, mais expostas à luz solar, como pavilhões auriculares, plano nasal, pálpebras e região periocular, podendo haver grande perda tecidual quando a neoplasia é mais agressiva^{70,74,75,77,79,80}. As lesões aparecem geralmente em animais com idade mais avançada, superior a 9 anos de idade^{77,78}.

As opções de tratamento para o CEC de pele incluem a cirurgia, a crioterapia, a radioterapia, a eletrocirurgia, a quimioterapia, a PDT, a terapia com laser e a hipertermia^{52,70,76,77,78,79,81}. Se não tratado, o CEC torna-se agressivo localmente, podendo levar à perda tecidual e funcional da região acometida^{81,82}.

A prevenção do CEC é realizada limitando-se a exposição dos animais à radiação ultravioleta. O uso de protetor solar é uma opção⁷⁶, porém é muito comum a remoção do produto pelos gatos devido aos seus hábitos de higiene. O uso de tatuagem é outro método que não se comprovou eficaz, pois a tinta se deposita na derme e a lesão de CEC surge na epiderme⁷⁷.

3.3. Vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV)

Ambos os vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina pertencem ao grupo dos retrovírus e são geralmente associados à incidência de neoplasias linfóides e mieloproliferativas na espécie felina¹⁴.

O FIV é morfológicamente similar ao vírus da imunodeficiência humana e possui tropismo por linfócitos, macrófagos, glândulas salivares e sistema nervoso central. Esse vírus infecta e destrói linfócitos T de forma gradativa. Sua transmissão ocorre através da saliva, provavelmente por meio de mordedura decorrente do comportamento agressivo dos felinos^{14,83}. A transmissão para filhotes pelo leite de fêmeas contaminadas também já foi documentada⁸³. O período de latência do FIV pode chegar, em média, a 7 anos e devido à imunodeficiência, os animais podem apresentar infecções oportunistas recorrentes crônicas, com sinais clínicos variáveis. Em gatos infectados somente por esse vírus, já foi relatada a ocorrência de diversos carcinomas e sarcomas^{14,83,84}.

O FeLV é transmitido através da saliva e secreções nasais dos gatos infectados. Também pode ser transmitido por via placentária e pelo aleitamento materno. As manifestações clínicas da doença estão relacionadas aos efeitos

oncogênicos, citopáticos e imunossupressivos do FeLV, o que torna também os animais susceptíveis a infecções oportunistas^{14,83}.

3.4. Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

O PCNA é uma proteína presente no núcleo de todas as células e é essencial para a síntese e reparo do DNA e para a proliferação celular, pois é um co-fator da polimerase delta^{85,86,87,88}. Sua ativação ocorre durante o final da fase G₁ do ciclo celular, sendo expresso durante a fase S, diminuindo durante a fase G₂ para a fase M^{85,87,89,90}. Dessa forma, o PCNA é conhecido como um promotor do ciclo celular e pode ser um marcador de sua proliferação^{85,87}.

O PCNA está presente em certa quantidade nas células normais, mas seu aumento está relacionado a neoplasias devido à ocorrência descontrolada da síntese de DNA e do ciclo celular em células cancerosas^{85,89}.

Motiwale et al. (2005) estudaram a expressão de PCNA durante a promoção de tumor de pele em ratos através do uso tópico de 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) e administração de arseneto de sódio na água dos animais. Em comparação a animais que receberam somente o DMBA, os ratos tratados com a combinação supracitada desenvolveram múltiplos carcinomas espinocelulares bem diferenciados, enquanto os demais desenvolveram mais papilomas. Os animais com CEC mostraram aumento significativo na expressão de PCNA devido ao crescimento tumoral, o que não foi observado nos ratos com papilomas⁹¹.

Em estudo realizado por Kawahira et al. (1999), realizou-se o procedimento imunistoquímico de PCNA em pacientes com doenças de pele malignas e não malignas. A porcentagem de células positivas para PCNA foi maior nas afecções malignas. Os autores concluíram também que a extensão da marcação de PCNA pode ser correlacionada com a resistência da doença cutânea ao tratamento, já que sua expressão era significativamente maior em algumas doenças não cancerosas resistentes ao tratamento⁸⁵.

Mutações no gene supressor tumoral p53 geralmente ocorrem na pele cronicamente exposta à radiação ultravioleta, na queratose actínica e no CEC, o que demonstra a importância desse gene na carcinogênese induzida por essa radiação^{77,92}. No CEC de humanos, mutações no gene supressor tumoral p53 já

foram documentadas em 54% a 75% desses tumores, enquanto que em CEC de gatos, a média percentual de mutação relatada é de 53%⁷⁴. O PCNA pode ser usado como um marcador substituto do p53 nos CECs, já que o aumento de sua expressão também é significativa nessas lesões cancerosas⁸⁵.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi considerado dentro dos princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), sendo aprovado sob protocolo número 606/2005.

4.1. Seleção dos animais

Foram selecionados 19 gatos, todos sem raça definida, castrados e apresentando idades que variaram entre 6 e 13 anos (idade média igual a 9,3 anos). Os gatos, trazidos para atendimento no Laboratório de Odontologia Comparada do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), apresentavam lesões de carcinoma espinocelular cutâneo, totalizando 24 lesões (FIG.8), todas menores que 5 cm de diâmetro. Os proprietários assinaram um termo de consentimento e receberam um folheto contendo todos os detalhes do procedimento fotodinâmico, incluindo os possíveis efeitos colaterais.



FIGURA 8. Animais com lesões de CEC atendidos no Laboratório de Odontologia Comparada do hospital veterinário da FMVZ-USP.

4.1.1. Avaliação clínica dos animais selecionados

Os animais foram submetidos ao exame físico, levando-se em consideração os seguintes parâmetros: auscultação cardíaco-respiratória, frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), coloração de mucosas e palpação de linfonodos mandibulares.

4.1.2. Diagnóstico clínico e histopatológico

A biópsia para obtenção dos fragmentos das lesões de CEC foi realizada com *punches* que variaram de 3 a 5 mm de diâmetro e eram escolhidos de acordo com o tamanho e localização da lesão. O material colhido foi fixado em formol a 10% e enviado para confecção de lâminas no laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina para a análise histopatológica, realizada em conjunto com patologista do serviço. O estadiamento tumoral foi executado segundo o preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS)¹⁵, tal como o representado na TAB.1 a seguir disposta.

TABELA 1. Estágios clínicos dos tumores de origem epidérmica, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*).

Localização	Estágio	Definição
Tumor Primário	T _{is}	Carcinoma pré-invasivo (carcinoma "in situ")
	T ₀	Sem evidência do tumor
	T ₁	Tumor de diâmetro máximo <2 cm, plano ou exófitico
	T ₂	Tumor de diâmetro máximo entre 2 e 5 cm, ou sem acometer a hipoderme, independente do tamanho
	T ₃	Tumor de diâmetro máximo > 5 cm, ou com invasão de subcutâneo, independente do tamanho
Linfonodos regionais	T ₄	Tumor invadindo outras estruturas como fáscia, músculos, ossos ou cartilagem
	N ₀	Sem evidência de envolvimento do linfonodo regional
Metástase distante	M ₀	Sem evidência de metástase à distância

Levando-se em consideração a classificação acima, o grupamento por estádios foi realizado da seguinte maneira:

- Estádio 0: T_{is} N₀ M₀
- Estádio I: T₁ N₀ M₀
- Estádio II: T₂ N₀ M₀
T₃ N₀ M₀
- Estádio III: T₄ N₀ M₀
Qualquer T N₁ M₀
- Estádio IV: Qualquer T N₁ M₁

Foi realizada também a determinação do grau histológico de cada lesão.

4.1.3. Exames complementares realizados antes da PDT

Até dez dias antes da realização do procedimento fotodinâmico, foi colhido sangue para a realização de hemograma e exames de função hepática (determinação de proteína total, albumina, aspartato-transaminase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase) e função renal (uréia e creatinina). Verificou-se, dessa forma, o estado geral de saúde de cada

animal, bem como a viabilidade do procedimento anestésico.

Todos os exames sanguíneos apresentados no presente trabalho foram realizados no laboratório clínico do hospital veterinário da FMVZ-USP.

4.2. Preparação da pomada

4.2.1. Síntese de metil aminolevulinato a partir do ácido 5-aminolevulínico

O preparo do metil aminolevulinato foi realizado no Laboratório de Radicais Livres e Bioluminescência do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Para a síntese do MEALA, o ALA foi acrescentado em 100 ml de diazometano, substância que foi cuidadosamente manuseada devido ao seu potencial explosivo. A solução foi agitada em baixa temperatura (banho-maria em gelo seco com álcool) durante 20 minutos. Após esse tempo, trocou-se o gelo seco com álcool por água com gelo por mais uma hora. Em seguida, a solução foi agitada à temperatura ambiente por mais uma hora (FIG.9). Desligou-se a agitação e a solução foi bombeada com nitrogênio até perder a coloração amarelada. Como mostrado na FIG.10, utilizando-se o rotaevaporador (BÜCHI ROTAVAPOR R-114) e o banho-maria com água quente (WATERBATH B-481), todo o éter restante foi evaporado sobrando somente o éster metil do ácido 5-aminolevulínico.



FIGURA 9. Agitação da solução à temperatura ambiente.



FIGURA 10. Evaporação do éter para obtenção do MEALA.

4.2.2. Aplicação da pomada

Em agosto de 2007 foi realizado o depósito de patente da pomada formulada com o MEALA (depósito número PI0705591-9), a qual foi utilizada no presente experimento. Por esse motivo, a composição detalhada não será relacionada nesse texto, uma vez que a data de apresentação dessa tese ainda encontra-se no período de sigilo de patente. Como o mesmo veículo foi utilizado no preparo da pomada à base de ALA, a composição dessa também não será descrita.

Os animais foram distribuídos em dois grupos, de forma seqüencial não randomizada, sendo que cada um recebeu uma formulação diferente da pomada precursora da protoporfirina IX. No grupo MEALA, que compreende os animais de 1 a 10, utilizou-se de pomada a base de éster metil de ácido 5-aminolevulínico a 5%, enquanto que os animais do grupo ALA, de 11 a 19, receberam a pomada a base de ácido 5-aminolevulínico a 5%.

A aplicação da pomada foi feita mediante o uso de luvas de procedimento (suficientes para proteção do operador durante o manuseio do produto), sendo realizada por sobre as lesões de CEC com uma margem adicional de, aproximadamente, cinco milímetros de tecido aparentemente normal, como pode ser observado na FIG. 11. Todos os animais foram mantidos dentro de caixas de

transporte cobertas para manter o local escuro durante a aplicação da pomada, que era repetida a cada 30 minutos, totalizando 4 horas antes da irradiação. Os animais portaram colar elisabetano e foram monitorados para evitar que removesses, por lambedura ou coçadura, o produto aplicado na área. Quando necessário, foi realizada sedação com acepromazina na dose de 0,2 mg/kg, por via intramuscular (IM), associada com 5 mg/kg/IM de meperidina e 4 mg/kg/IM de quetamina. As pomadas utilizadas no experimento apresentavam baixa toxicidade e, portanto, não representavam risco aos animais caso houvesse ingestão acidental do produto.

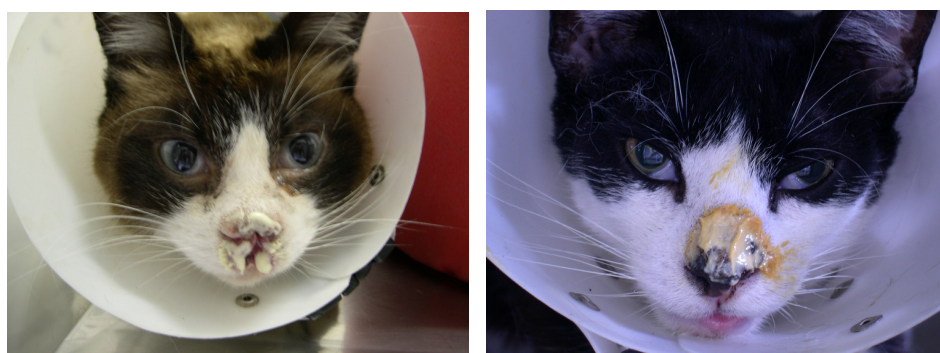


FIGURA 11. Aplicação da pomada nas lesões de CEC em plano nasal.

4.3. Condutas pré-anestésicas

Após o término do período de aplicação da pomada, os animais receberam como medicação pré-anestésica a acepromazina na dose de 0,1 mg/kg/IM, associada à meperidina na dose de 5 mg/kg/IM.

4.4. Condutas anestésicas

Foi realizada a anestesia geral inalatória com isoflurano para a realização do procedimento fotodinâmico. A indução anestésica foi feita com propofol na dose de 5 mg/kg, por via intravenosa (IV). Para facilitar a entubação endotraqueal, quando necessário, foi aplicada lidocaína (dose empírica) na epiglote do animal.

4.5. Primeira colheita de sangue para dosagem sérica de ferro e ferritina e sorologia para FIV e FeLV

Imediatamente antes do início da irradiação da lesão, foi realizada a colheita de sangue para dosagem de ferro e ferritina e realização da sorologia para vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e Leucemia Felina (FeLV).

A detecção de antígenos do vírus da leucemia e de anticorpos do vírus da imunodeficiência felina foi realizada no soro dos animais através de um kit de imunoenensaio rápido (SNAP *Combo – IDEXX Laboratories®), demonstrado na FIG.12. O kit detecta antígenos FeLV p27, cuja presença representa o diagnóstico de infecção por FeLV, e anticorpos específicos do FIV, cuja presença indica que o gato foi exposto a ele, podendo assim possuir infecção ativa.

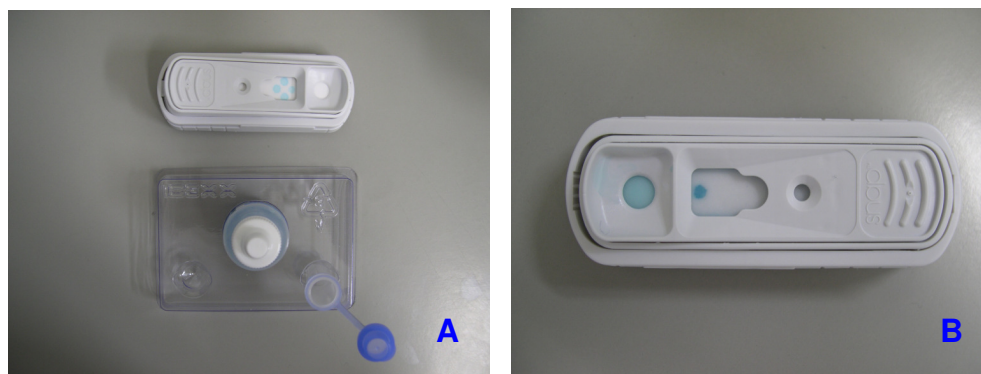


FIGURA 12. A) Kit de sorologia para teste de vírus da Imunodeficiência Felina e vírus da Leucemia Felina. B) Resultado negativo da sorologia - o ponto azul observado é o controle positivo.

4.6. Procedimento de iluminação

Antes do procedimento de iluminação da área a ser tratada, a pomada excedente nas lesões foi removida com o auxílio de uma gaze. Para a realização da terapia fotodinâmica foi utilizado um protótipo composto por um *cluster* de 30 LEDs, cedido pelo Prof. Dr. Marcos Pinotti Barbosa do Departamento de Engenharia Mecânica (Laboratório de Bioengenharia) da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, e desenvolvido para uso em Medicina Veterinária. Esse protótipo contém as seguintes especificações: potência de 180 mW, densidade de potência de 5 mW/cm² e comprimento de onda de 630nm. Esta fonte está em fase de patenteamento. Os olhos dos animais foram protegidos com superfícies metálicas (papel alumínio) e compressas de gaze

durante toda a exposição à terapia, assim como o operador e pessoas presentes no laboratório durante o procedimento utilizaram óculos de proteção adequados ao comprimento de onda da luz emitidas pelos LEDs. A densidade de energia utilizada foi de 12 J/cm^2 , sendo o tempo de irradiação calculado para essa fluência de 40 minutos (FIG. 13).

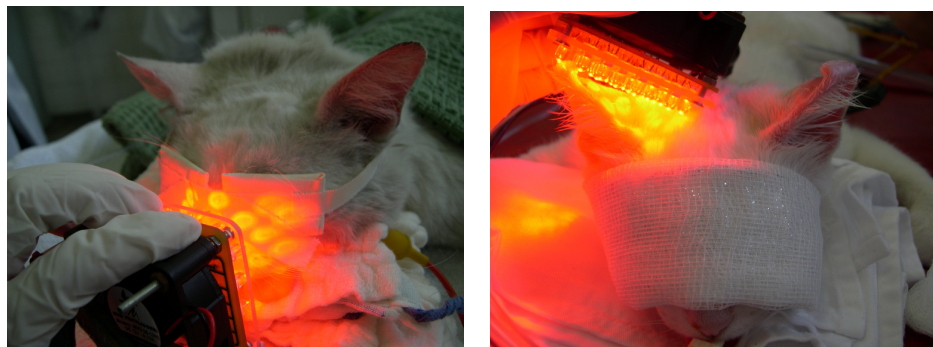


FIGURA 13. Irradiação das lesões com protótipo de LEDs de comprimento de onda de 630 nm.

4.6.1. Monitoração de temperatura de superfície

As alterações de temperatura de superfície cutânea, ocorridas durante a irradiação, foram monitoradas por termografia no infravermelho em um animal de cada grupo tratado. Foi utilizada uma câmera termográfica de resposta rápida ThermaCAM® (SC3000HS FLIR, Boston, MA, USA) dotada de um detector do tipo *Quantum Well Infrared Photodetector* (QWIP), com sensibilidade de $0,01^\circ \text{C}$ e tempo de resposta de 0,01 segundo, como demonstrado na FIG. 14. A câmera foi calibrada considerando-se a emissividade de 0,98 para a pele, dentro de uma variação de temperatura de 20 a 100°C , com aquisição de dados em frequência de 60Hz utilizando-se lentes com distância focal de 0,1 metro entre a lesão no animal e a câmera. A umidade do ambiente foi mantida em aproximadamente 71% e a temperatura da sala foi estabilizada em 20°C duas horas antes e durante o procedimento.

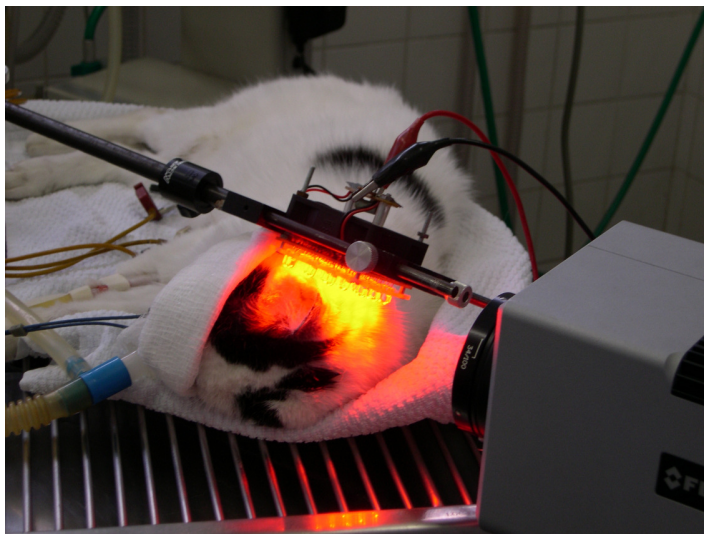


FIGURA 14. Monitoração da temperatura da superfície cutânea durante a irradiação.

Para que a distância entre os LEDs e a lesão de CEC irradiada fosse mantida durante todo o procedimento, o protótipo de irradiação foi fixado em um suporte óptico (OPTRON-Campinas-SP). As imagens térmicas, em 256 tons, foram armazenadas em uma *workstation* e processadas em tempo real para registro gráfico da evolução térmica em pontos escolhidos.

4.7. Segunda colheita de sangue para dosagem sérica de ferro e ferritina

Imediatamente após a irradiação da lesão, foi realizada nova colheita de sangue para dosagem sérica de ferro e ferritina, visando verificar eventual excesso de ferro na circulação sangüínea devido ao acúmulo regional de protoporfirina IX .

4.8. Conduas após o procedimento

Após a PDT, os gatos foram entregues novamente a seus donos, sendo solicitada a observação domiciliar pelos mesmos, que foram periodicamente contatados para se obterem informações sobre a evolução do tratamento. Não foi recomendada a administração de nenhum medicamento como antibióticos ou antiinflamatórios, nem a realização de limpeza e remoção de crostas no local tratado. Após 15 dias da PDT, alguns animais foram reavaliados no laboratório ou

era realizado o contato telefônico com os proprietários. Os retornos para acompanhamento dos resultados da PDT foram marcados 30, 90 e 150 dias após a terapia para observação das conseqüências do procedimento, como eventuais efeitos colaterais tardios ou remissão do tumor.

4.8.1. Retorno após 30 dias – repetição dos exames complementares

Foram repetidos após 30 dias o exame físico e os exames complementares (hemograma e exames de funções renal e hepática).

4.8.2. Retorno após 90 dias

Após o período de três meses, o resultado do tratamento foi avaliado pela observação clínica, sendo classificado em⁹³:

- Resposta completa (desaparecimento total da lesão crostosa, reepitelização, caracterizando pele saudável);
- Resposta parcial (redução tumoral em mais de 50%);
- Resposta mínima (redução tumoral em menos de 50%);
- Ausência de resposta (nenhuma alteração das características e tamanho do tumor).

4.8.3. Retorno após 150 dias – repetição do exame histopatológico

Os animais foram acompanhados por cinco meses e a repetição da biópsia foi realizada após esse período. Contato telefônico foi posteriormente mantido com os proprietários dos animais para se obter informações sobre o estado de saúde dos gatos até a finalização do presente trabalho.

4.9. Quantificação imunoistoquímica para marcadores de proliferação celular (PCNA)

Assim como o estadiamento clínico e o grau de diferenciação celular, a quantificação imunoistoquímica para PCNA foi realizada como uma variável prognóstica do GEC. Para realização da quantificação de células marcadas para

PCNA, o material em parafina foi processado da seguinte maneira:

- Desparafinização através de banhos em xilol I (15 minutos), xilol II (10 minutos) e xilol/álcool (5 minutos);
- Hidratação através de banhos em álcool absoluto (5 minutos), álcool 95% (5 minutos), álcool 70% (5 minutos), água destilada (5 minutos) e solução tampão fosfato/salina - PBS (5 minutos);
- Como o material de biópsia foi fixado em formol 10%, foi necessária a realização do processo de desmascaramento, onde as amostras foram colocadas em solução de tampão citrato + água destilada e em seguida fervidas no microondas, em potência máxima, por 15 minutos (a cada 5 minutos, completava-se o recipiente para evitar o ressecamento);
- O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 20ml de peróxido de hidrogênio e 80 ml de álcool metílico. As amostras foram protegidas da luz e mantidas dessa forma por 30 minutos. Após esse período, foram lavadas por três vezes com solução de PBS 10%;
- Incubação por 5 minutos com leite 5% para bloqueio de reações inespecíficas;
- Incubação com anticorpo primário do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) na diluição de 1:1000 μ l (diluição conforme especificações do fabricante). Em cada lâmina foram utilizados 30 μ l do anticorpo. A incubação foi realizada em câmara úmida, a 4°C, *overnight*. O material foi lavado com PBS por três vezes;
- Incubação com anticorpo secundário através do kit LSAB, onde foram utilizadas duas gotas do *link* em cada lâmina, em câmara úmida a 37°C. Após uma hora, foi realizada a lavagem do material com PBS por três vezes. Em seguida as amostras foram incubadas com estreptavidina por uma hora em câmara úmida a 37°C. Após esse período, processou-se novamente a lavagem com PBS por três vezes;
- Revelação das amostras com solução de 2,5 mg de diaminobenzina (DAB) em 5 ml de PBS e 7,5 μ l de peróxido de hidrogênio a 30%. A revelação foi monitorada por microscópio e as lâminas foram então lavadas com solução de PBS e água destilada;

- Contracoloração realizada com hematoxilina de Harrys ou Mayer por um minuto e lavagem em água corrente e destilada;
- Desidratação com álcool 70% (5 minutos), álcool 95% (5 minutos), álcool absoluto (5 minutos), xilol/álcool (5 minutos), xilol (5 minutos) e xilol (5 minutos);
- Montagem em bálsamo do Canadá.

A contagem imunoistoquímica foi realizada por meio de um microscópio óptico Nikon Eclipse E800®, em aumento de objetiva de 40X. As imagens foram registradas por uma câmera fotográfica Nikon FDX-35® acoplada ao microscópio e foram transferidas para um computador para serem processadas pelo programa Image Pro-Plus®, onde a contagem de células marcadas foi realizada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação clínica dos animais selecionados

A ocorrência de CEC cutâneo em gatos geralmente é observada em animais com média de idade de aproximadamente 9 anos¹⁵, embora outros relatos na literatura indiquem uma média de idade ao redor de 11-12 anos^{74,78,81,94}. É importante lembrar que a incidência do CEC cutâneo varia muito com a localização geográfica dos animais⁷⁴ e, portanto, a média de idade também varia. Em locais com climas mais quentes, com maior índice de radiação ultravioleta, o CEC cutâneo torna-se a neoplasia mais comum em gatos⁹⁵. No Brasil, devido ao clima tropical e aos índices de radiação ultravioleta elevados na maior parte do ano, o risco do surgimento de lesões de pele malignas são maiores.

Dentre os riscos relatados para o CEC cutâneo, a herança genética também é citada^{76,96,97}, já que as mesmas chances de ocorrência desse tipo de neoplasia foram observadas tanto na pele exposta ao sol quanto em regiões cobertas do corpo em pacientes humanos com histórico familiar de CEC^{96,97}. Dos 19 animais tratados no presente estudo, oito apresentavam parentesco entre si ou histórico de CEC em parentes (FIG.15).

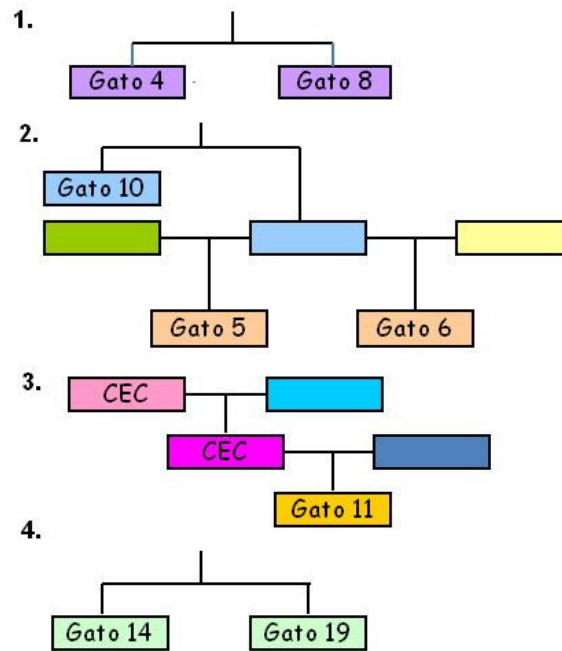


FIGURA 15. Grau de parentesco entre si de alguns dos animais tratados ou com outros animais que apresentaram CEC.

O estresse, associado à radiação ultravioleta, é relatado como um fator de predisposição ao CEC em felinos⁷⁶. A maior parte dos animais tratados com os protocolos testados nesse trabalho provinha de locais com uma alta população de animais e, muitas vezes, de populações que apresentavam ecto ou endoparasitas.

Das 24 lesões tratadas no presente estudo, treze (54,1%) localizavam-se em pavilhões auriculares, nove (37,5%) localizavam-se em plano nasal, uma (4,2%) estava situada em região temporal esquerda e uma (4,2%) localizava-se em pálpebra inferior direita. Os locais mais comuns de localização do CEC cutâneo em gatos, de acordo com estudos passados, situam-se na cabeça, como os pavilhões auriculares, nariz, pálpebras^{74,78}, lábios¹⁴, face⁹⁵ e região periorcular⁸¹. A TAB. 2 apresenta as características das lesões selecionadas, incluindo sua localização e tempo de evolução.

Apesar das neoplasias cutâneas em felinos serem mais comuns em machos⁹⁸, a incidência de CEC não apresenta predisposição racial ou por gênero^{15,78,95}. No presente estudo foram submetidos ao procedimento fotodinâmico dez machos (52,6%) e nove fêmeas (47,4%), sendo que todos os animais não possuíam raça definida. Miller et al. (1991) examinaram 340 gatos

com neoplasias cutâneas. Desse total, 52 animais apresentavam CEC, não havendo predisposição significativa por gênero. Quanto à raça, apenas observou-se que dentre os gatos siameses, que corresponderam a 7,4% da população de gatos estudada, somente 1,9% apresentavam CEC⁹⁴.

TABELA 2. Características do carcinoma espinocelular quanto à localização e tempo de evolução.

Animal	Lesão	Localização	Tempo de evolução
1	1	Nariz	1 mês
2	2	Nariz	4 meses
3	3	Pavilhão auricular esquerdo	1 ano
4	4	Nariz	1 ano
5	5	Nariz	10 meses
6	6	Pavilhão auricular esquerdo	2 meses
7	7	Pavilhão auricular esquerdo	1 ano
8	8	Nariz	1 ano
9	9	Nariz	6-8 meses
10	10	Região temporal esquerda	1 ano
11	11	Pavilhão auricular esquerdo	8 meses
12	12	Nariz	3 anos
13	13	Pavilhão auricular esquerdo	2 anos
	14	Pavilhão auricular direito	2 anos
14	15	Pavilhão auricular esquerdo	9-10 meses
	16	Pavilhão auricular direito	9-10 meses
15	17	Pavilhão auricular esquerdo	3 anos
	18	Pavilhão auricular direito	3 anos
16	19	Nariz	6-7 meses
17	20	Pavilhão auricular esquerdo	6 meses
	21	Pavilhão auricular direito	6 meses
18	22	Pálpebra direita	2 meses
19	23	Nariz	4 meses
	24	Pavilhão auricular esquerdo	4 meses

Ao exame físico, dois animais (10,5%) apresentaram aumento de linfonodos mandibulares: o animal 1 apresentava ambos os linfonodos aumentados e o animal 9 apresentava o linfonodo mandibular direito aumentado. Sabe-se que o CEC cutâneo é geralmente agressivo localmente e raramente causa metástase^{95,99}. A rota metastática inicia-se mais comumente nos linfonodos regionais, atingindo mais tardiamente os pulmões⁸⁴. Apesar de ser palpado aumento de linfonodos nos dois animais citados anteriormente, não foi realizada a punção aspirativa para a detecção de metástase em nenhum deles.

Os animais 11, 13, 15 e 18 apresentavam mucosas pálidas, sendo que vários fatores podem interferir nesse parâmetro. Os proprietários dos animais 11 e 13 referiam ocorrência de verminose em seus animais no momento do exame físico. O gato 15, encaminhado por colega veterinária, no momento de sua primeira avaliação estava sob tratamento devido a outras alterações. O animal 18 era proveniente de um local com alta população felina, onde é provável a ocorrência de vermes e pulgas. Além disso, a palidez de mucosas também pode ser evidenciada em casos de desidratação.

O gato 1 apresentava, à auscultação, sopro sistólico de grau II em foco de válvula mitral. Ambos os animais 14 e 18 apresentavam sopro sistólico de grau V/VI também em foco de válvula mitral. O animal 14 foi encaminhado ao serviço de Cardiologia para avaliação ecocardiográfica sendo diagnosticada cardiomiopatia hipertrófica de grau discreto. Após tratamento adequado, o gato foi liberado para a realização de procedimento anestésico e tratamento fotodinâmico.

5.2. Diagnóstico histopatológico e classificação clínica das lesões de CEC

Das 24 lesões de CEC estudadas, seis (25%) eram estágio 0, seis (25%) eram estágio I, cinco (20,8%) eram estágio II e sete (29,2%) eram estágio III. Quanto ao grau de diferenciação das lesões, dentre o total analisado, oito lesões (33,3%) eram bem diferenciadas, nove (37,5%) eram moderadamente diferenciadas e uma (4,2%) era pouco diferenciada. As seis lesões classificadas como CEC *in situ* (25%) não são classificadas por diferenciação. Na TAB.3 são apresentadas as classificações citadas.

TABELA 3. Características das lesões quanto à classificação clínica e grau de diferenciação.

Lesão	Classificação Clínica	Grau de diferenciação
1	Estádio III	Bem diferenciado
2	Estádio III	Moderadamente diferenciado
3	Estádio III	Pouco diferenciado
4	Estádio I	Moderadamente diferenciado
5	Estádio I	Moderadamente diferenciado
6	Estádio 0	CEC <i>in situ</i>
7	Estádio 0	CEC <i>in situ</i>
8	Estádio 0	CEC <i>in situ</i>
9	Estádio III	Moderadamente diferenciado
10	Estádio I	Bem diferenciado (inicial)
11	Estádio III	Moderadamente diferenciado (invasivo)
12	Estádio III	Moderadamente diferenciado
13	Estádio II	Bem diferenciado
14	Estádio I	Bem diferenciado (inicial)
15	Estádio 0	CEC <i>in situ</i>
16	Estádio II	Bem diferenciado
17	Estádio II	Moderadamente diferenciado
18	Estádio II	Bem diferenciado
19	Estádio III	Moderadamente diferenciado (invasivo)
20	Estádio II	Bem diferenciado
21	Estádio 0	CEC <i>in situ</i>
22	Estádio I	Bem diferenciado
23	Estádio 0	CEC <i>in situ</i>
24	Estádio I	Moderadamente diferenciado (invasivo)

5.3. Exames complementares realizados antes da PDT

5.3.1. Hemograma Completo

Cinco animais apresentaram alterações no eritrograma, caracterizando anemia normocítica normocrômica de grau leve, com exceção do animal 4, que apresentava anemia em grau moderado. A anemia caracteriza-se por uma redução no número de hemáceas ou na taxa de hemoglobina ou em ambos, não sendo caracterizada como um distúrbio primário^{14,84,83}. As causas relacionadas a essa alteração podem ser divididas em três categorias gerais: perda sangüínea, hemólise e redução da produção de hemáceas¹⁴. Na TAB. 4 estão apresentadas as alterações observadas no eritrograma dos animais estudados.

Apesar de serem vários os fatores que podem levar à anemia (traumatismos, parasitismo, tumores do sistema gastrointestinal e urinário, drogas e toxinas^{14,83}) pode-se dizer, pela avaliação clínica e anamnese, que o animal 3 apresentava grande perda tecidual em pavilhão auricular esquerdo devido ao CEC, apresentando sangramento local freqüente. O animal 4 apresentava massa palpável em região de fígado (descoberta somente em retorno após PDT), o que pode ter levado à condição anêmica. Já os animais 13 e 16 apresentavam histórico de verminose no momento do exame de sangue. O gato 14 era proveniente de local com alta população de gatos e com ocorrência de pulgas.

É importante lembrar que os valores de referência indicados para cada parâmetro nos exames refletem a real condição em 95% da população felina. Ocasionalmente, um valor considerado “anormal” é, de fato, normal para um determinado indivíduo⁸³. Já que a PDT é um método pouco invasivo, não havendo preocupação com possível sangramento ou qualquer fator que pudesse agravar o quadro anêmico dos gatos citados anteriormente, não houve exclusão dos mesmos do estudo.

TABELA 4. Eritrograma dos animais antes do tratamento.

Animal	Hemácias	Hematócrito	Hemoglobina	V.C.M.	H.C.M.	C.H.C.M.
1	N	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N	N
3	N	↓	↓	N	N	N
4	N	↓↓	↓	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N
8	N	N	N	N	N	N
9	N	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N	N
11	N	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N	N
13	↓	↓	↓	N	N	N
14	↓	↓	↓	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N
16	N	↓	↓	N	N	N
17	N	N	N	N	N	N
18	N	N	N	N	N	N
19	N	N	N	N	N	N

N (normal), + (pequeno aumento), ++ (aumento moderado), +++ (aumento acentuado), ↓ (pequena diminuição), ↓↓ (diminuição moderada), ↓↓↓ (diminuição acentuada), V.C.M.(volume corpuscular médio); H.C.M. (hemoglobina corpuscular média); C.H.C.M. (concentração de hemoglobina corpuscular média).

O leucograma, avaliado como parte do hemograma completo, inclui a quantificação do número total de leucócitos e sua contagem diferencial⁸³. Alterações nesse exame foram observadas em 16 (84,2%) dos felinos tratados (TAB. 5).

TABELA 5. Leucograma dos animais antes do tratamento.

Animal	Leucócitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos
1	N	N	++	N	N	N
2	+	N	+	N	N	+
3	↓↓	N	N	N	↓↓	N
4	N	N	N	N	↓↓	N
5	N	N	N	N	↓↓	N
6	N	N	N	+	↓	N
7	+	N	+++	N	N	N
8	N	N	N	N	N	N
9	N	N	N	N	↓	N
10	N	N	N	+	↓	N
11	+	+	+	N	N	+
12	+	+	N	++	N	N
13	N	N	N	N	↓	N
14	↓	N	N	N	N	N
15	+	N	++	N	↓	N
16	N	N	N	N	N	N
17	N	N	+	N	N	N
18	N	N	N	N	↓	N
19	N	N	+	++	↓	N

N (normal), + (pequeno aumento), ++ (aumento moderado), +++ (aumento acentuado), ↓ (pequena diminuição), ↓↓ (diminuição moderada), ↓↓↓ (diminuição acentuada).

O aumento do número de neutrófilos (neutrofilia) pode estar relacionado a uma série de fatores como estresse, medo, inflamação, entre outros. Já o aumento do número de eosinófilos (eosinofilia), como apresentado por sete animais (36,8%), pode ter causa parasitária (por exemplo, *Ancylostoma* spp e *Trichuris vulpis*), alérgica ou inflamatória, e também pode ocorrer por síndrome paraneoplásica (geralmente por linfoma ou mastocitoma)^{14,83}.

O número elevado de basófilos (basofilia), encontrado em quatro animais (21%), pode refletir infecção parasitária por vermes cardíacos, dermatite por inalante, alergia, entre outras causas¹⁴. A linfopenia, ou diminuição do número de linfócitos em 10 gatos (52,6%) pode ter sido induzida por estresse. É possível que o aumento do número de monócitos (monocitose) ocorra por estímulo

inflamatório, neoplásico ou degenerativo^{14,83}.

Um distúrbio específico é raramente diagnosticado com base em um leucograma, porém, a informação obtida pode ser útil para limitar o número de diagnósticos diferenciais ou para prever a gravidade da doença e o prognóstico⁸³. Nenhuma alteração foi considerada relevante para exclusão de animais do procedimento.

5.3.2. Função Renal

Todos os gatos apresentaram aumento na taxa de uréia, enquanto a taxa de creatinina manteve-se dentro dos padrões de normalidade. A produção de uréia aumenta em condições de ingestão protéica elevada na dieta, hemorragia do trato gastrointestinal superior e estados catabólicos que resultem na degradação de proteínas do corpo⁸³.

É incomum não haver anormalidades na avaliação de um perfil bioquímico de um gato geriátrico. Acredita-se que a nefropatia e insuficiência renal crônica sejam conseqüências inevitáveis do envelhecimento¹⁰⁰. Embora haja muita variação individual entre os animais, mesmo naqueles de mesma raça, um gato é considerado idoso a partir dos sete anos de idade¹⁰¹.

Os animais idosos passam por uma série de transformações corpóreas que resultam em alterações no uso de certos nutrientes, assim como em redução da tolerância ao excesso e deficiência nutricional, além de mudanças bruscas na dieta^{101,102}.

Vários estudos mostraram que eliminando o excesso de captação de proteína, fósforo e sódio pelo organismo há uma desaceleração ou prevenção da deterioração progressiva da função renal¹⁰¹. Como o gato necessita de uma quantidade maior de proteína na dieta do que outras espécies animais¹⁰³, as formulações de rações comerciais devem suprir essa necessidade.

Os felinos incluídos no presente estudo tinham como alimentação principal a ração seca comercial, balanceada sem especificações para animais geriátricos. Por esse motivo, o excesso de proteína pode ter sido responsável pelo aumento na taxa de uréia.

5.3.3. Função Hepática

A avaliação da atividade das enzimas hepáticas no soro é como um teste de triagem para se detectar hepatopatias. Aumentos nessa atividade são inespecíficos quanto ao distúrbio hepático subjacente¹⁴. Treze animais (68,4%) apresentaram alterações pequenas a moderadas no perfil hepático, sendo que apenas um gato (5,3%) apresentou aumento acentuado em uma das enzimas hepáticas determinadas, como ilustrado na TAB. 6.

TABELA 6. Perfil hepático dos animais antes do tratamento.

Animal	PT	Albumina	AST	ALT	FA	GGT
1	+	N	N	N	N	N
2	N	N	N	+	N	N
3	N	N	+	N	+	N
4	N	N	++	+++	N	N
5	N	N	+	++	N	N
6	N	N	+	+	N	N
7	N	↓	N	N	N	N
8	N	N	+	++	N	N
9	N	N	+	+	N	N
10	N	N	N	+	+	N
11	+	↓	N	N	+	N
12	N	N	N	N	N	N
13	N	N	N	N	N	N
14	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N
16	N	N	N	N	N	N
17	+	N	N	N	N	N
18	N	N	N	N	N	N
19	+	N	N	N	N	N

N (normal), + (pequeno aumento), ++ (aumento moderado), +++ (aumento acentuado), ↓ (pequena diminuição), ↓↓ (diminuição moderada), ↓↓↓ (diminuição acentuada); PT (proteína total), AST (aspartato-transaminase), ALT (alanina aminotransferase), FA (fosfatase alcalina) e GGT (gama-glutamil transferase).

O fígado sintetiza muitas proteínas plasmáticas, sendo as principais a albumina e os fatores de coagulação¹⁰⁴. O aumento da proteína total encontrado

nos gatos 1, 11, 17 e 19 pode ter ocorrido, por exemplo, por desidratação.

A albumina é sintetizada exclusivamente no fígado. Dessa forma, a diminuição da concentração sérica dessa proteína, como observado nos animais 7 e 11, poderia ser uma manifestação da incapacidade hepática de sintetizá-la. Porém, outras causas também devem ser consideradas, como perdas maciças glomerulares ou gastrointestinais e hemorragia^{14,83}.

Os animais 3, 5, 6, 8 e 9 apresentaram pequeno aumento na atividade da enzima aspartato-aminotransferase (AST), enquanto o animal 4 apresentou aumento moderado dessa mesma enzima. A AST não é hepatoespecífica, pois além de existir nos hepatócitos, também está presente no tecido muscular esquelético¹⁴ e cardíaco, rins e cérebro⁸⁴. Pouco se sabe sobre o comportamento dessa enzima em várias doenças hepatobiliares, apesar de alguns estudos indicarem que a AST é um dos marcadores mais confiáveis de doença hepática em felinos⁸³.

A enzima alanino-aminotransferase (ALT), encontrada aumentada nos gatos 2, 4, 5, 6, 8, 9 e 10, é considerada específica em relação ao fígado, pois o aumento significativo na sua atividade sérica é geralmente observado em degeneração hepatocelular e necrose¹⁰⁵. Apenas o animal 4 apresentou aumento acentuado na atividade da ALT. Assim, é importante associar esse fato ao aumento moderado também na AST. Provavelmente esse animal apresenta uma hepatopatia, apesar de não apresentar sinais clínicos evidentes.

As enzimas gama-glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA) estão presentes no hepatócito, além de serem localizadas também no epitélio da vesícula biliar. Elevações na FA, como observado de forma leve nos animais 3, 10 e 11, são consideradas marcadores de colestase, mas também podem ocorrer em animais expostos a corticóides, drogas e agentes tóxicos¹⁰⁴.

5.4. Sorologia para FIV e FeLV

Em estudos com pacientes humanos transplantados, sabe-se que a imunossupressão aumenta a chance de prevalência de CEC cutâneo em aproximadamente 65 vezes. Indivíduos de pele clara, infectados com o vírus HIV e com grande exposição à luz solar apresentam maior risco de CEC cutâneo,

além de apresentarem tumores mais agressivos, de crescimento rápido e com maiores chances de recidiva e metástase¹⁰⁶.

Todos os dezenove animais do presente estudo apresentaram resultados negativos na sorologia para o vírus da imunodeficiência felina (FIV), também conhecida como AIDS felina, e para o vírus da leucemia felina (FeLV). Os resultados dessa tese discordam dos dados obtidos por Lana et al. (1997), no qual 61 arquivos médicos de gatos com confirmação histopatológica de CEC cutâneo foram analisados, constatando-se que seis (9,8%) dentre o total de gatos eram positivos para FeLV ou FIV. A correlação entre essas doenças virais e a incidência de CEC apresentada por alguns estudos se deve ao fato de que geralmente os gatos que apresentam essas duas doenças vivem fora de casa, sendo assim expostos tanto ao sol quanto à possibilidade de contraírem FIV ou FeLV⁸¹.

Hutson et al. (1991) fizeram um levantamento de 1.160 gatos atendidos no sul da Califórnia entre julho de 1988 e janeiro de 1991. Todos foram submetidos ao teste de ELISA para FIV e FeLV. Vinte e nove gatos (2,5%) obtiveram resultados positivos para FIV. Desse total, 18 (62%) apresentavam neoplasia como doença primária, sendo que três processos neoplásicos foram observados: carcinoma espinocelular (40%), doença mieloproliferativa (30%) e linfoma (30%). Um gato apresentou concomitantemente linfoma e CEC¹⁰⁷.

O FIV já foi associado ao aumento da incidência de neoplasias como linfoma e tumores mielóides (leucemia mielógena, doença mieloproliferativa e desordens mielodisplásicas). Cerca de 1 a 21% dos gatos positivos para FIV apresentam neoplasia como doença única. Ambos os vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina agem sinergicamente causando maior incidência de linfoma e tumores mielóides¹⁰⁷.

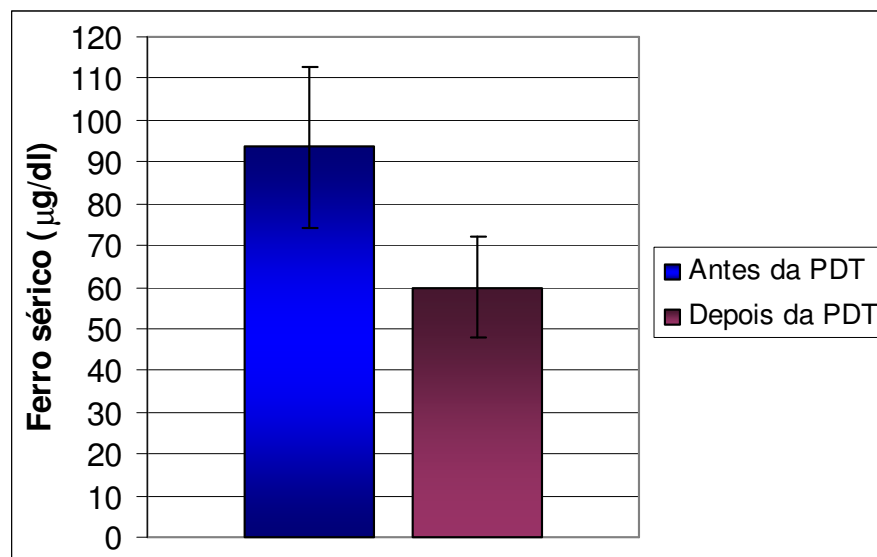
5.5. Ferro e Ferritina - Grupo MEALA

Na análise de ferro e ferritina séricos antes e após o tratamento, os seguintes resultados foram obtidos (TAB.7).

TABELA7. Ferro sérico ($\mu\text{g}/\text{dl}$) no grupo MEALA.

Animal	Antes	Depois
1	45,0	48,0
2	78,0	33,0
3	66,0	63,0
4	91,0	amostra hemolisada
5	amostra hemolisada	51,0
6	122,0	49,0
7	62,0	20,0
8	45,0	45,0
9	125,0	108,0
10	205,1	114,0

Segundo análise estatística (FIG.16), o nível sérico de ferro antes da PDT foi significativamente maior do que após a PDT (teste-t, com valor de $p < 0,05$). As amostras hemolisadas foram excluídas da análise.

**FIGURA 16.** Histograma dos valores de ferro antes e após a PDT no grupo MEALA. As barras referem-se ao erro padrão.

Quanto à ferritina, não foi possível estabelecer diferenças em seus valores, já que os resultados não são precisos, como mostra a TAB. 8.

TABELA 8. Ferritina sérica (ng/ml) no grupo MEALA.

Animal	Antes	Depois
1	<0,50	0,50
2	<0,50	<0,50
3	<0,50	<0,50
4	<0,50	<0,50
5	<0,50	<0,50
6	1,50	<1,50
7	<1,50	<1,50
8	<1,50	<1,50
9	<1,50	<1,50
10	<1,50	<1,50

*Valores normais:

Ferro: felinos – 34 a 122µg/dl

Ferritina: não estabelecido

A proteína que armazena o ferro, a ferritina, contribui para a proteção celular contra a toxicidade envolvendo oxirradicais formados pelo ferro e peróxidos¹⁰⁸. Sabe-se que o ALA pode liberar Fe^{II} da ferritina em condições aeróbicas *in vitro*. Em ratos, o aumento dos níveis séricos de ALA causa a mobilização do ferro e a elevação da ferritina no cérebro e no fígado. A apoproteína da ferritina é um possível alvo para o dano oxidativo catalisado pelo ALA, podendo diminuir sua habilidade de seqüestrar o ferro¹⁰⁹. Como no presente estudo não foi possível estabelecer alterações no nível de ferritina antes e após a PDT, não é possível afirmar que o MEALA provocou danos à ferritina.

In vitro, sabe-se que quando a ferritina e outros metais estão presentes, a oxidação catalisada do ALA produz espécies reativas do oxigênio que podem provocar danos ao DNA celular e alterações em fígado, baço e rins⁴⁵. As variações no nível de ferro sérico foram significativas, havendo um maior nível desse metal antes do que após a PDT. Porém, seria esperado que esse nível fosse maior após o tratamento, já que haveria descarga de ferro nos tecidos. A diferença no nível sérico de ferro observada pode ter ocorrido devido ao fato da aplicação do MEALA ter sido realizada topicamente, havendo pouca interferência sistêmica.

5.6. Ferro e Ferritina - Grupo ALA

Na análise de ferro e ferritina séricos antes e após o tratamento, os seguintes resultados foram obtidos (TAB.9 e 10):

TABELA 9. Ferro sérico ($\mu\text{g/dl}$) no grupo ALA.

Animal	Antes	Depois
11	53,0	59,0
12	56,0	72,0
13	68,0	45,0
14	49,0	48,0
15	98,0	69,0
16	86,0	65,0
17	amostra hemolisada	amostra hemolisada
18	amostra hemolisada	amostra hemolisada
19	amostra hemolisada	amostra hemolisada

Segundo análise estatística (FIG.17), o nível sérico de ferro não apresentou diferenças significativas antes e após a PDT (teste-t, com valor de $p < 0,05$). As amostras hemolisadas foram excluídas da análise.

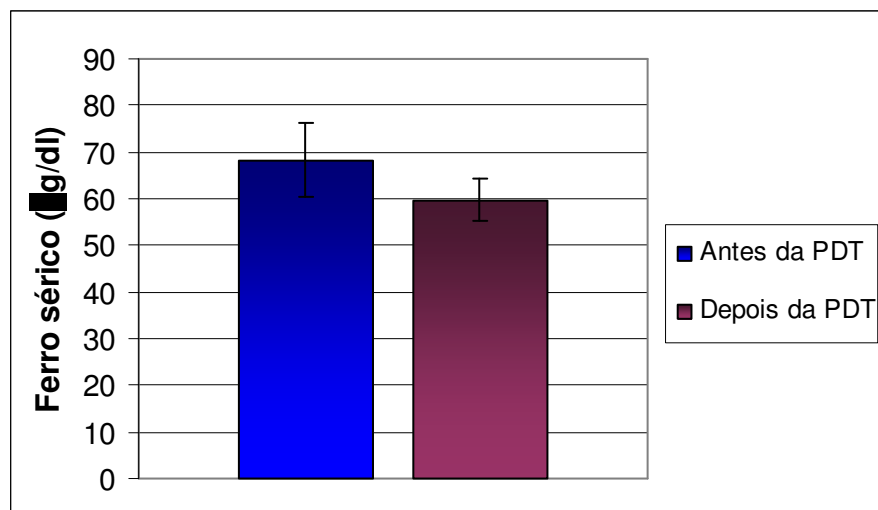


FIGURA 17. Histograma dos valores de ferro antes e após a PDT no grupo ALA. As barras referem-se ao erro padrão.

TABELA 10. Ferritina sérica (ng/ml) no grupo ALA.

Animal	Antes	Depois
11	<1,50	<1,50
12	<1,50	<1,50
13	<1,50	<1,50
14	<1,50	<1,50
15	<1,50	<1,50
16	<1,50	<1,50
17	amostra hemolisada	amostra hemolisada
18	amostra hemolisada	amostra hemolisada
19	amostra hemolisada	amostra hemolisada

*Valores normais:

Ferro: felinos – 34 a 122 μ g/dl

Ferritina: não estabelecido

Assim como no grupo anterior, não foi possível correlacionar danos à ferritina causados pelo ALA nas dosagens realizadas no soro dos animais.

5.7. Monitoração de temperatura de superfície

A temperatura da superfície cutânea irradiada durante a PDT não sofreu aumentos que fossem significativos para causar danos celulares, apresentando variação de $3,0 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ (FIG. 18).

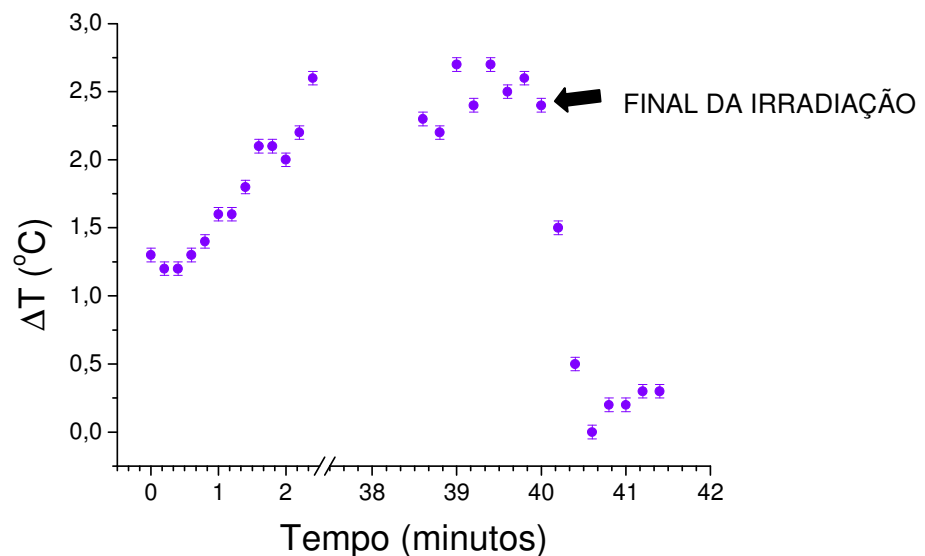


FIGURA 18. Variações de temperatura durante a irradiação da lesão cutânea (as barras representam a incerteza do programa utilizado).

Yanase et al. (2005), em estudo realizado *in vitro*, demonstraram que a hipertermia aumenta o efeito antitumoral da PDT com ALA em células tumorais malignas. Os autores mantiveram a temperatura em $43,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante todo o procedimento¹¹⁰.

A membrana plasmática sofre modificações ocorrendo danos ao DNA em temperaturas ao redor de 44°C , sendo que a destruição da membrana ocorre em temperaturas iguais ou superiores a 46°C , resultando em morte celular¹¹⁰.

No presente estudo, o aquecimento da pele do animal pelo uso dos LEDs não atingiu temperaturas que pudessem causar danos às células normais ao redor das lesões neoplásicas. Assim, o equipamento utilizado foi considerado seguro para o procedimento.

5.8. Condutas após o procedimento

5.8.1. Retorno após 30 dias – repetição dos exames complementares

Ao exame físico, três animais (15,8%) apresentavam aumento de linfonodos mandibulares, sendo que dois já apresentavam essa alteração ao exame físico antes do tratamento (animais 1 e 9) e um (animal 10) passou a apresentar aumento de linfonodo mandibular esquerdo depois da PDT. Apesar de esse aumento ser observado em linfonodo do mesmo lado da lesão de CEC tratada, o referido animal apresentou resposta completa ao tratamento, sem recidiva até o presente momento (30 meses). Essa alteração inespecífica pode indicar metástase da lesão sem detecção clínica ou mesmo outras causas não relacionadas.

Os animais 11, 13, 15 e 18, que apresentavam mucosas pálidas ao exame físico antes da PDT, não apresentavam mais essa alteração após 30 dias. Muitos dos animais estudados foram submetidos a tratamento para ecto e endoparasitas ou outras alterações clínicas, o que pode ter resultado em sua melhora clínica. Entretanto, a coloração de mucosas em si é uma avaliação um tanto inespecífica, tornando difícil a discussão de alterações em sua coloração isoladamente.

No retorno de 30 dias após o procedimento fotodinâmico, os animais foram novamente submetidos a exame físico completo e foram repetidos os exames de sangue (hemograma, função hepática e renal).

5.8.1.1. Hemograma Completo

Apenas um animal apresentava pequenas alterações no eritrograma no retorno de 30 dias após o tratamento pela PDT, como demonstrado na TAB.11. O fato de cinco animais apresentarem alterações antes do tratamento e somente um apresentar alterações após o mesmo não significa necessariamente que a PDT provocou melhoras nos parâmetros do eritrograma desses animais. Como mencionado anteriormente, muitos gatos passaram por tratamentos para verminose e pulgas, tiveram mudanças de dieta ou tomaram vitaminas e medicações a critério de veterinários ou de seus proprietários.

TABELA 11. Eritrograma dos animais após o tratamento.

Animal	Hemácias	Hematócrito	Hemoglobina	V.C.M.	H.C.M.	C.H.C.M.
1	N	↓	N	↓	N	N
2	N	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N
8	N	N	N	N	N	N
9	N	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N	N
11	N	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N	N
13	N	N	N	N	N	N
14	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N
16	N	N	N	N	N	N
17	N	N	N	N	N	N
18	N	N	N	N	N	N
19	N	N	N	N	N	N

N (normal), + (pequeno aumento), ++ (aumento moderado), +++ (aumento acentuado), ↓ (pequena diminuição), ↓↓ (diminuição moderada), ↓↓↓ (diminuição acentuada), V.C.M.(volume corpuscular médio); H.C.M. (hemoglobina corpuscular média); C.H.C.M. (concentração de hemoglobina corpuscular média).

Doze animais apresentaram alterações no leucograma realizado 30 dias após a PDT (TAB. 12). Assim como no eritograma, não é possível associar as alterações entre os exames realizados antes e depois do procedimento à terapia.

TABELA 12. Leucograma dos animais após o tratamento.

Animal	Leucócitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos
1	+	+	++	N	N	+
2	++	N	+++	++	N	N
3	N	N	+	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N
5	N	N	N	++	↓	N
6	N	N	N	N	N	N
7	N	N	+++	N	N	N
8	N	N	N	N	N	+
9	N	N	N	N	N	N
10	+	N	+	+++	N	N
11	N	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N	N
13	N	N	N	++	N	N
14	N	N	N	N	N	N
15	+	+	++	++	N	N
16	N	N	N	N	N	N
17	N	N	+	++	N	N
18	N	N	N	N	↓	N
19	+	+	N	N	N	N

N (normal), + (pequeno aumento), ++ (aumento moderado), +++ (aumento acentuado), ↓ (pequena diminuição), ↓↓ (diminuição moderada), ↓↓↓ (diminuição acentuada).

5.8.1.2. Função Renal

Todos os animais ainda apresentaram aumento na taxa de uréia. A taxa de creatinina manteve-se dentro dos padrões de normalidade, assim como observado no exame antes da PDT.

5.8.1.3. Função Hepática

Onze animais apresentaram alterações no perfil hepático (TAB. 13). O gato

4, que também apresentava aumento acentuado em duas das enzimas hepáticas (AST e ALT) determinadas antes do tratamento, continuou com grande aumento dessas enzimas, além de passar a apresentar alterações também em FA e GGT. Para um melhor controle, os exames foram repetidos para esse animal após 45 dias. Os resultados demonstraram que os valores das referidas enzimas continuavam a subir acentuadamente. Ao exame físico, determinou-se a presença de uma massa palpável, em região de fígado, de aproximadamente 5 cm de diâmetro. Apesar de não terem sido realizados exames de imagem, provavelmente o aumento observado nas enzimas hepáticas deveu-se a presença de neoplasia hepática.

TABELA 13. Perfil hepático dos animais após o tratamento.

Animal	PT	Albumina	AST	ALT	ALP	GGT
1	+	↓	N	N	N	N
2	+	N	N	+	N	N
3	N	N	N	N	N	N
4	N	N	+++	+++	+	+
5	N	N	N	+	N	N
6	N	N	N	+	N	N
7	N	↓	N	+	N	N
8	N	N	N	+	N	N
9	+	N	+	+	N	N
10	N	N	N	++	+	N
11	N	↓	N	N	+	N
12	N	N	N	N	N	N
13	N	N	N	N	N	N
14	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N
16	N	N	N	N	N	N
17	N	N	N	N	N	N
18	N	N	N	N	N	N
19	+	N	N	N	N	N

N (normal), + (pequeno aumento), ++ (aumento moderado), +++ (aumento acentuado), ↓ (pequena diminuição), ↓↓ (diminuição moderada), ↓↓↓ (diminuição acentuada); PT (proteína total), AST (aspartato-transaminase), ALT (alanina aminotransferase), FA (fosfatase alcalina) e GGT (gama-glutamil transferase).

Alguns animais passaram a apresentar alterações após o tratamento. O gato 1 apresentou pequena diminuição na taxa de albumina, os gatos 2, 9 e 19 apresentaram leve aumento da proteína total e o gato 7 apresentou também um pequeno aumento da atividade da enzima ALT. Entretanto, é importante salientar que alguns animais, como o 3, 5, 6, 8, 9 e 11 apresentavam alterações no exame antes da PDT e não apresentam mais no presente perfil hepático. Apesar de não ser possível afirmar que tais alterações se devem ao tratamento fotodinâmico, pode-se afirmar que a PDT não é contra-indicada para animais com tais anormalidades nos exames, nem agrava a situação dos mesmos.

Efeitos sistêmicos do ALA não são observados com a administração tópica da substância, como é geralmente observado no caso de administração sistêmica. As enzimas hepáticas podem permanecer elevadas por várias semanas após a administração sistêmica do ALA, o que não foi observado ou não pôde ser correlacionado no presente estudo⁵³.

5.9. Retorno após 90 dias - resultados do tratamento do GRUPO MEALA

5.9.1. Avaliação da resposta clínica geral e acompanhamento dos animais após a PDT

A avaliação da resposta de cada animal ao tratamento foi realizada 3 meses após a PDT, como demonstrado na TAB. 14.

TABELA 14. Classificação da resposta pela observação macroscópica da lesão 90 dias após a PDT e acompanhamento dos animais no grupo MEALA.

Animal	Lesão	Resposta clínica	Acompanhamento
1	1	Resposta mínima	Morte por causa desconhecida (após 6 meses)
2	2	Sem resposta	Submetido a outro tratamento (após 3 meses)
3	3	Sem resposta	Animal eutanasiado (após 16 meses)
4	4	Resposta parcial	Morte por causa desconhecida (após 9 meses)
5	5	Resposta completa	Sem recidiva até o momento (após 34 meses)
6	6	Resposta parcial	Submetido a outro tratamento (após 15 meses)
7	7	Resposta parcial	Submetido a outro tratamento (após 6 meses)
8	8	Resposta mínima	Submetido a outro tratamento (após 11 meses)
9	9	Resposta completa	Sem recidiva até o momento (após 32 meses)
10	10	Resposta completa	Sem recidiva até o momento (após 30 meses)

Os animais que morreram por causa desconhecida não foram submetidos à necropsia para determinação da causa *mortis*.

Três animais apresentaram respostas completas (30%), três respostas parciais (30%), dois apresentaram resposta mínima (20%) e dois (20%) não responderam ao tratamento. A FIG. 19 apresenta o histograma das respostas clínicas ao tratamento com a PDT com MEALA.

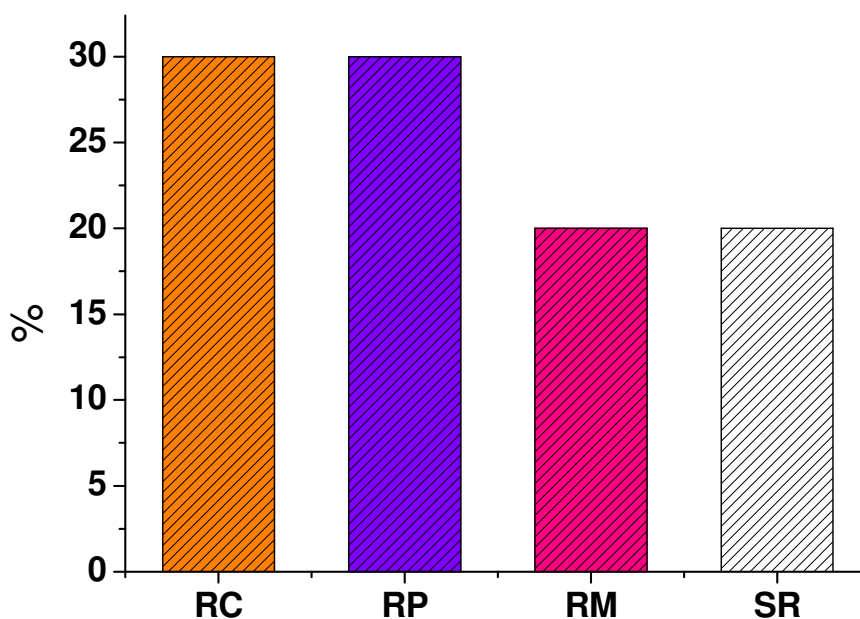


FIGURA 19. Respostas clínicas nos animais submetidos ao tratamento com MEALA (RC = resposta completa; RP = resposta parcial; RM = resposta mínima; SR = sem resposta).

Todos os animais que não obtiveram resposta satisfatória ao tratamento foram encaminhados para a realização de outro procedimento, como cirurgia e crioterapia.

5.10. Retorno após 150 dias - avaliação da resposta pela análise histopatológica pós-tratamento do GRUPO MEALA

Foram tratadas com MEALA 10 lesões de CEC felino. Desse total, três eram CEC *in situ* (30%), dois eram lesões de CEC bem diferenciado (20%), quatro eram CEC moderadamente diferenciado (40%) e um era CEC pouco diferenciado (10%), como demonstrado na TAB.15.

Os CECs mais comuns podem ser divididos em bem diferenciados, moderadamente diferenciados e indiferenciados⁷⁴. Tumores bem diferenciados geralmente respondem melhor a maioria dos tratamentos quando comparados aos tumores com pouca ou nenhuma diferenciação. Pela análise clínica das lesões após o tratamento foi possível observar que as respostas completas, obtidas em 30% dos carcinomas, ocorreram em duas lesões moderadamente diferenciadas e em uma bem diferenciada.

TABELA 15. Análise histopatológica antes e 150 dias após a PDT e resposta clínica das lesões 90 dias após o tratamento no grupo MEALA.

Lesão	Antes da PDT	Após a PDT	Resposta clínica
1	CEC bem diferenciado	Sem repetição da biópsia	Resposta mínima
2	CEC moderadamente diferenciado	Sem repetição da biópsia	Sem resposta
3	CEC pouco diferenciado	CEC moderadamente diferenciado	Sem resposta
4	CEC moderadamente diferenciado	CEC bem diferenciado (inicial)	Resposta parcial
5	CEC moderadamente diferenciado	Queratose inicial	Resposta completa
6	CEC <i>in situ</i>	CEC bem diferenciado (inicial)	Resposta parcial
7	CEC <i>in situ</i>	CEC bem diferenciado (inicial)	Resposta parcial
8	CEC <i>in situ</i>	CEC bem diferenciado (inicial)	Resposta mínima
9	CEC moderadamente diferenciado	Pele normal	Resposta completa
10	CEC bem diferenciado (inicial)	Queratose moderada	Resposta completa

Já na avaliação microscópica, houve melhora das características de cinco lesões tratadas (26,3%). A lesão 3, que era pouco diferenciada, passou a ser moderadamente diferenciada. As lesões 4, 5 e 9 eram moderadamente diferenciadas e passaram para bem diferenciada, queratose actínica e pele normal, respectivamente. Já a lesão 10, bem diferenciada, passou para queratose moderada. Em contrapartida, as lesões *in situ* (6,7 e 8) progrediram para carcinoma bem diferenciado. As FIG. 20, 21 e 22 mostram animais que responderam completamente ao tratamento. Na FIG. 23 mostra-se um animal que respondeu parcialmente à PDT e a FIG. 24 apresenta um animal que não respondeu ao tratamento.

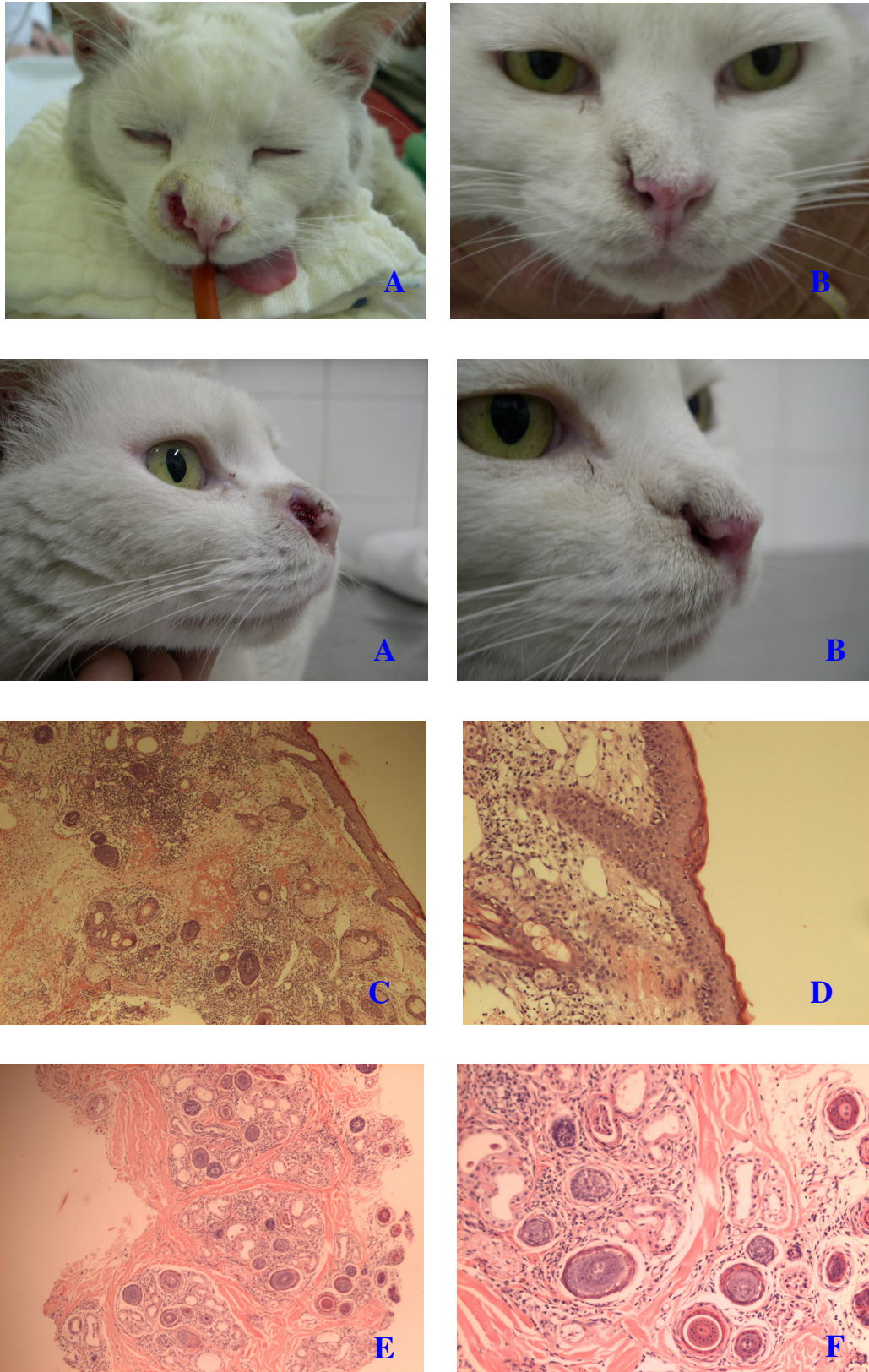


FIGURA 20. Animal número 9. A) Lesão de CEC antes da PDT com MEALA – perda tecidual. B) Três meses após o tratamento – reparação tecidual e crescimento de pêlos. C e D) Aspecto microscópico da lesão de CEC moderadamente diferenciado antes do tratamento – perda de polaridade celular e focos de queratinização (objetivas 4X e 10X, respectivamente). E e F) Lesão 150 dias após o tratamento – ausência de CEC (objetivas 4X e 10X, respectivamente).

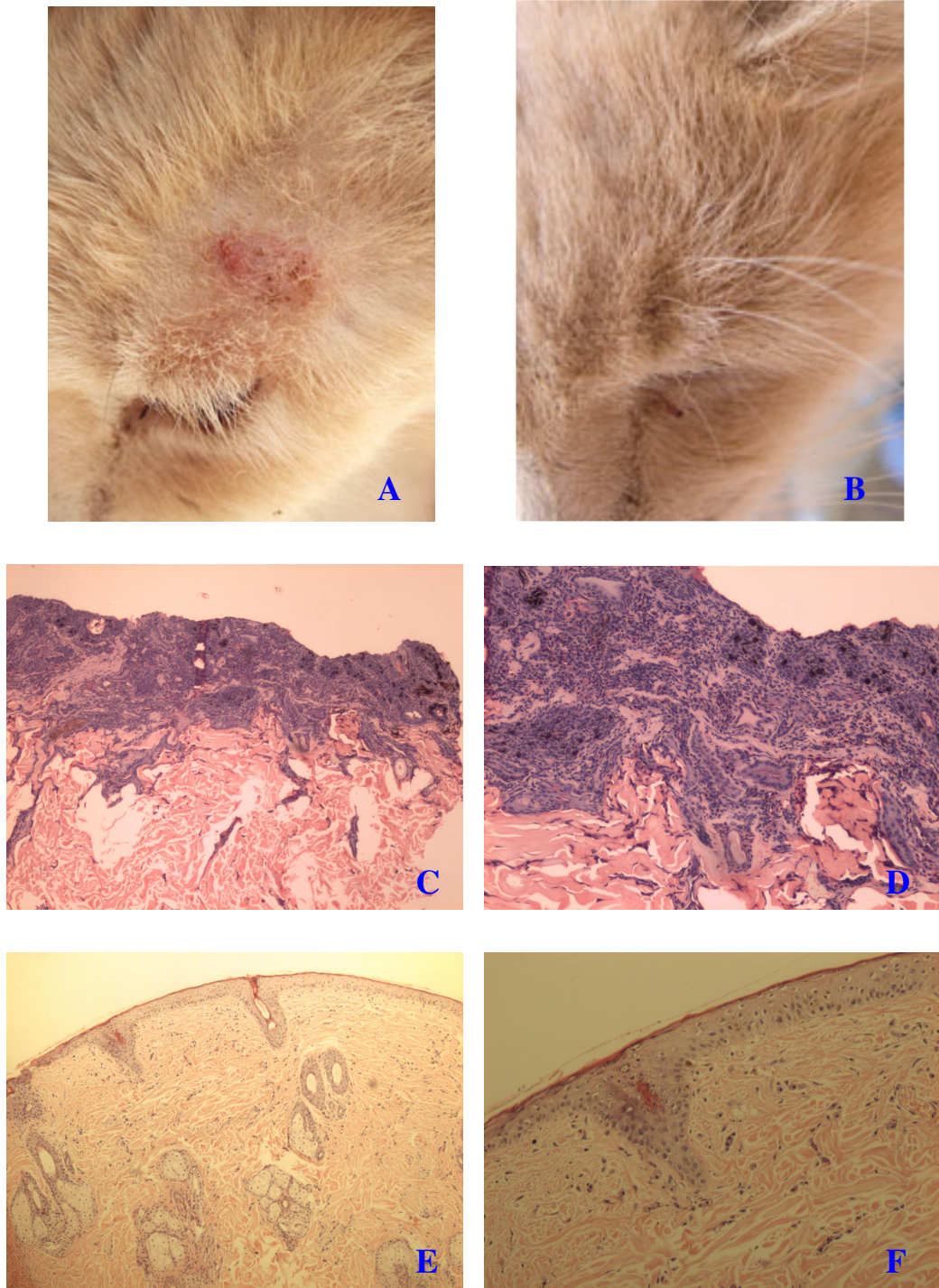


FIGURA 21. Animal número 10. A) Lesão em região temporal esquerda antes da PDT com MEALA – eritema, alopecia e crostas. B) Três meses após o tratamento – desaparecimento da lesão e crescimento de pêlos. C e D) Aspecto microscópico da lesão de CEC bem diferenciado antes da PDT– hiperqueratose, hiperpigmentação e perda de polaridade celular (objetivas 4X e 10X, respectivamente). E e F) Lesão 150 dias após o tratamento – queratose moderada, com hiperplasia epidérmica discreta, hiperqueratose e perda de polaridade celular (objetivas 4X e 10X, respectivamente).

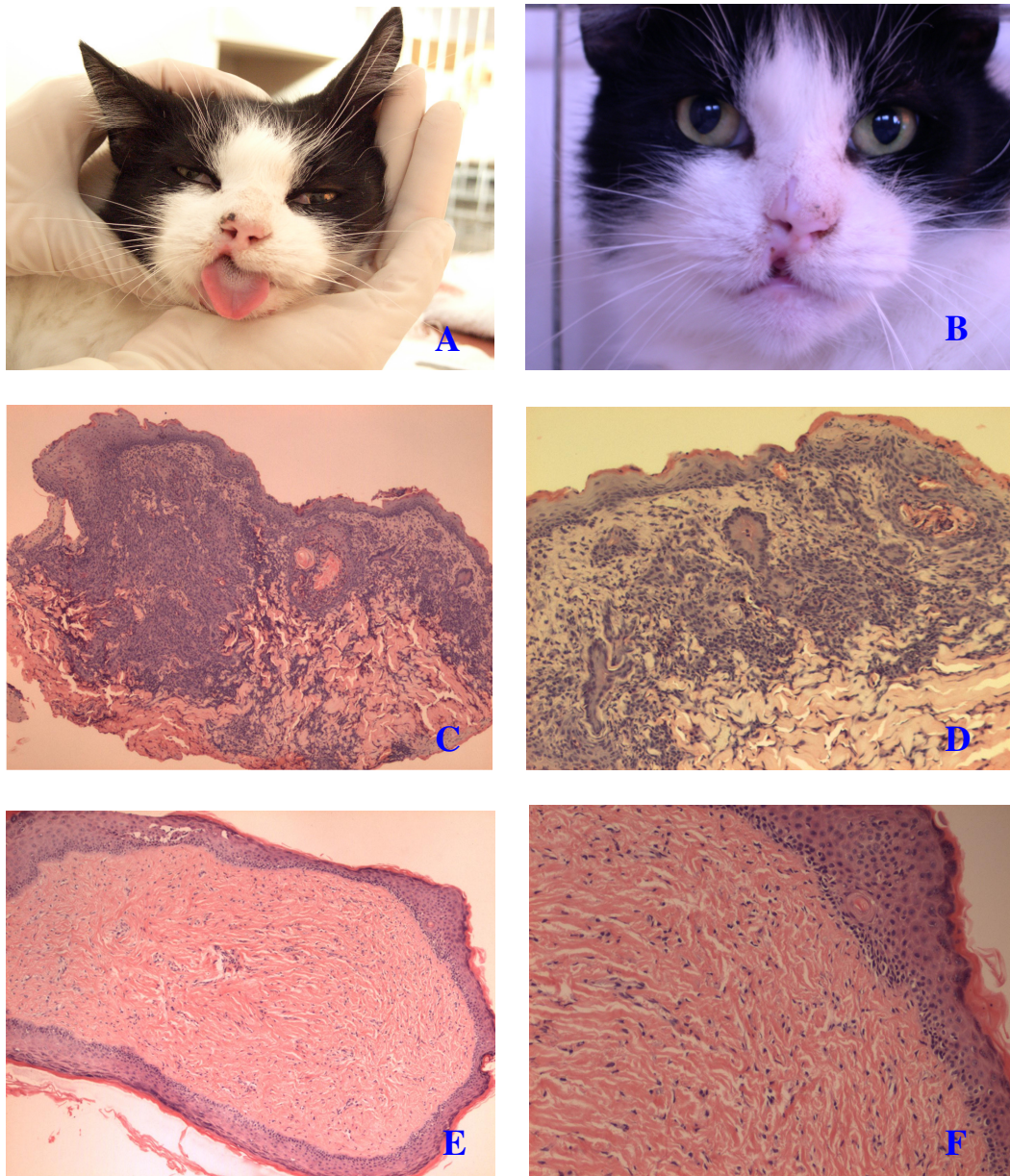


FIGURA 22. Animal número 5. A) Lesão em plano nasal antes da PDT com MEALA – presença de alopecia e crostas. B) Três meses após o tratamento – desaparecimento da lesão crostosa. C e D) Aspecto microscópico da lesão de CEC moderadamente diferenciado antes da PDT – hiperplasia epidérmica irregular e perda de polaridade celular (objetivas 4X e 10X, respectivamente). E e F) Lesão 150 dias após o tratamento – queratose inicial, com hiperplasia de epiderme, hiperqueratose e perda de polaridade celular (objetivas 4X e 10X, respectivamente).

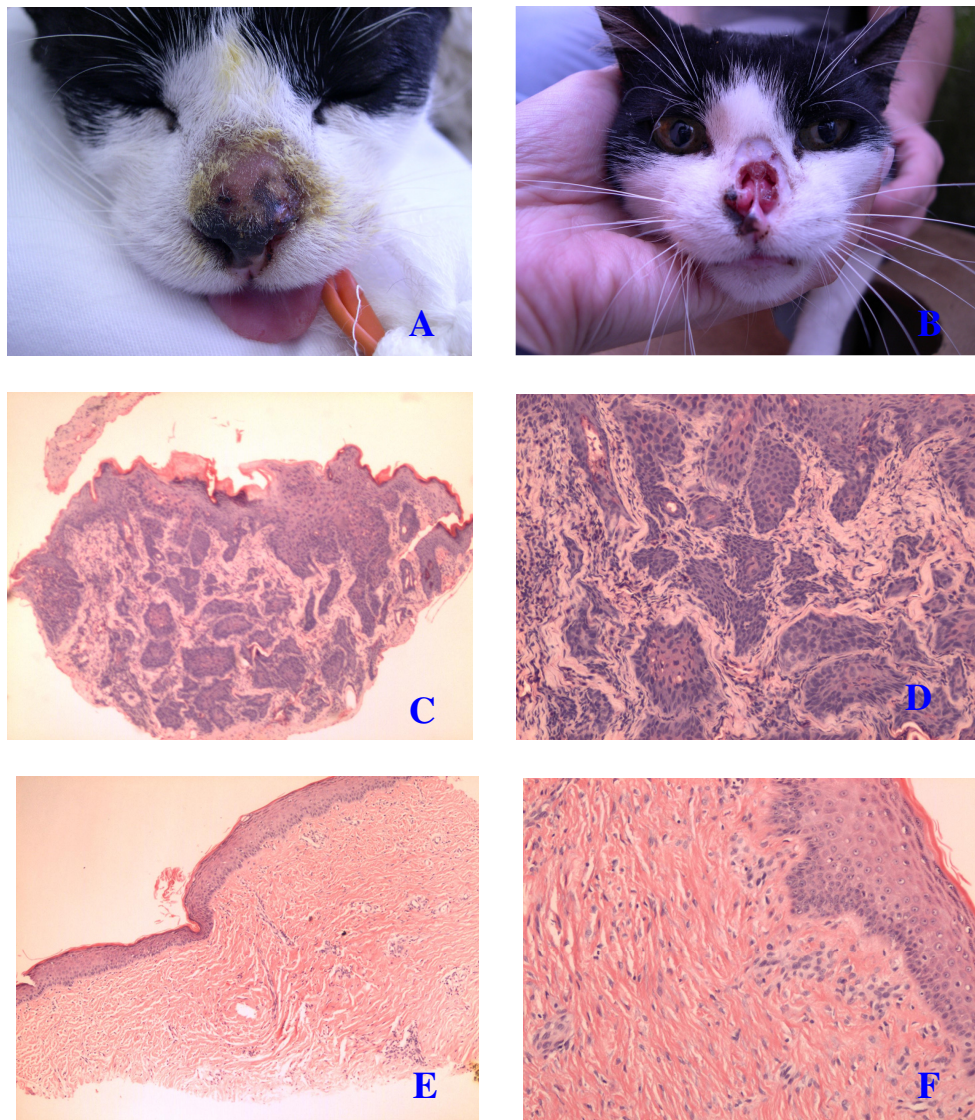


FIGURA 23. Animal número 4. A) Lesão em plano nasal antes da PDT com MEALA – presença de alopecia, eritema e crostas. B) Três meses após o tratamento – perda de tecido necrótico. C e D) Aspecto microscópico da lesão de CEC moderadamente diferenciado antes da PDT – hiperplasia epidérmica irregular, hiperqueratose e perda de polaridade celular (objetivas 4X e 10x, respectivamente). E e F) Lesão 150 dias após o tratamento – CEC bem diferenciado, com hiperplasia da epiderme, hiperqueratose e perda de polaridade celular (objetivas 4X e 10x, respectivamente).

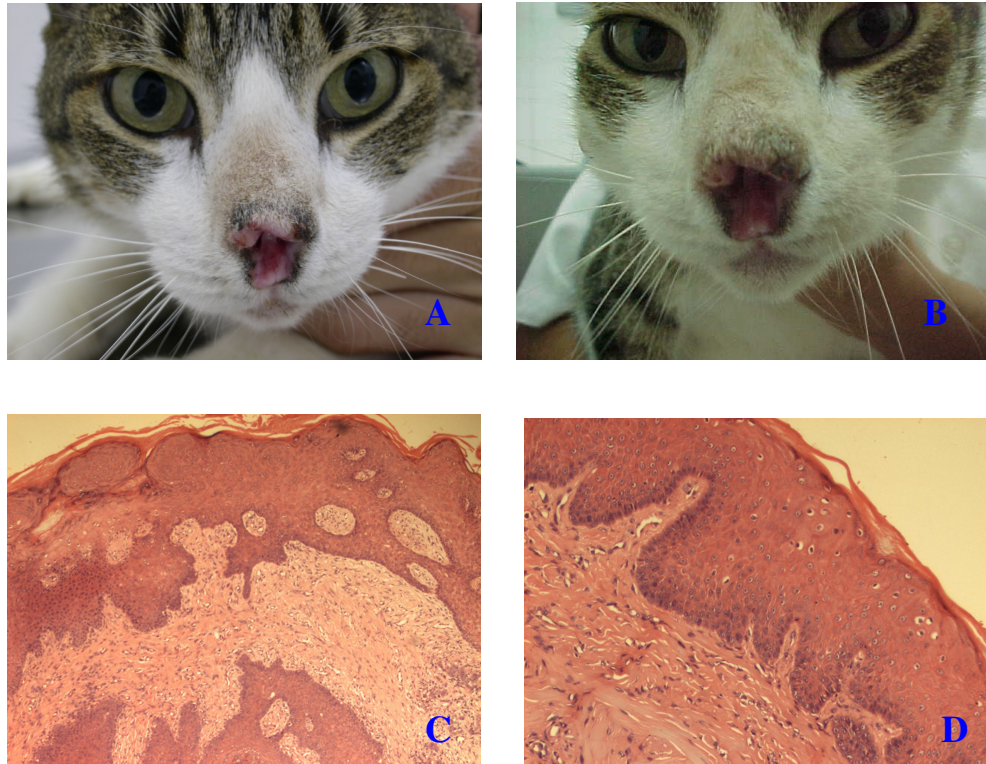


FIGURA 24. Animal número 2. A) Antes da PDT com MEALA – perda tecidual e ulceração. B) Trinta dias após o tratamento – sem melhora das características da lesão. C e D) Aspecto microscópico da lesão de CEC moderadamente diferenciado antes da PDT – hiperplasia epidérmica irregular, hiperqueratose e perda de polaridade celular (objetivas 4X e 10X, respectivamente). O animal não foi submetido à repetição de biópsia, pois foi encaminhado a outro tratamento.

Não são encontrados na literatura atual estudos utilizando o metil éster de ALA na terapia fotodinâmica de CEC de felinos. Trabalhos realizados com pacientes humanos utilizam a PDT com MEALA em carcinoma de células basais, doença de Bowen e queratose actínica^{12,111,112,113}.

Dragieva et al. (2004) utilizaram a formulação comercial do MEALA, o Metvix® (MEALA a 16%), no tratamento de lesões de queratose actínica em pacientes transplantados. Respostas completas foram obtidas em 13 de 17 pacientes (76,5%) em quatro meses após duas sessões de PDT com intervalo de uma semana. Três (17,6%) apresentaram resposta parcial e um (5,9%) paciente não apresentou resposta. Efeitos adversos observados foram edema, eritema e formação de crostas de forma leve a moderada¹¹¹.

A queratose actínica também foi a alteração cutânea escolhida para tratamento em trabalho realizado por Pariser et al. (2003). Em comparação com placebo, a taxa de resposta completa em lesões tratadas por duas sessões de

PDT com Metvix® em intervalo de uma semana foi de 89% contra 38%. A PDT foi considerada segura e efetiva no tratamento das lesões de queratose actínica¹².

Um estudo envolvendo grande número de pacientes com carcinoma de células basais de difícil tratamento foi realizado por Vinciullo et al. (2005). Cento e quarenta e oito lesões foram acompanhadas após tratamento pela PDT com MEALA. A porcentagem de resposta completa após 3 meses foi de 89%. Após 24 meses, esse índice caiu para 78%. O tratamento foi considerado boa opção para carcinoma de células basais, com excelentes resultados cosméticos¹¹³.

Não foram observados efeitos colaterais da PDT com MEALA nos animais do grupo MEALA no presente estudo. Após o tratamento das lesões, observou-se formação de crostas que caíam e voltavam a se formar. Essa formação diminuía com o tempo, sendo que algumas perduraram por cerca de 30 dias.

A sensibilidade dolorosa após o tratamento não foi observada nos gatos tratados com MEALA. Estudos comparativos da dor causada pela PDT com ALA e com MEALA observaram que o segundo tratamento é menos doloroso do que o primeiro^{12,114,115}. Isso pode ser explicado pelas diferenças nos mecanismos de captação do metil éster^{13,116}. Reação alérgica ao metil aminolevulinato também não foi observada em nenhum paciente felino, como já foi observado em pacientes humanos tratados com a formulação comercial do MEALA, o Metvix®^{117,118,119,120}.

5.11. Retorno após 90 dias - resultados do tratamento do GRUPO ALA

5.11.1. Avaliação da resposta clínica geral e acompanhamento dos animais após a PDT

Na TAB. 16 são classificadas as respostas obtidas em cada uma das 14 lesões de CEC dos animais tratados pela PDT com ALA. Nenhum animal apresentou resposta completa ao tratamento. Foram obtidas quatro respostas parciais (28,6%), sete respostas mínimas (50%) e em três lesões (21,4%) não houve resposta.

TABELA 16. Classificação da resposta pela observação macroscópica da lesão 90 dias após a PDT e acompanhamento dos animais no grupo ALA. A PDT foi considerada o período inicial.

Animal	Lesão	Resposta clínica	Acompanhamento
11	11	Sem resposta	Submetido a outro tratamento (após 25 dias)
12	12	Sem resposta	Animal eutanasiado (após 13 meses)
13	13	Resposta parcial	Submetido a outro tratamento (após 8 meses)
13	14	Resposta mínima	Submetido a outro tratamento (após 8 meses)
14	15	Resposta mínima	Sem realização da segunda biópsia
14	16	Resposta mínima	Sem realização da segunda biópsia
15	17	Resposta mínima	Sem progressão das lesões (após 23 meses)
15	18	Resposta mínima	Sem progressão das lesões (após 23 meses)
16	19	Sem resposta	Animal eutanasiado (após 5 meses)
17	20	Resposta mínima	Submetido a outro tratamento (após 9 meses)
17	21	Resposta parcial	Submetido a outro tratamento (após 9 meses)
18	22	Resposta parcial	Submetido a outro tratamento (após 12 meses)
19	23	Resposta mínima	Submetido a outro tratamento (após 3 meses)
19	24	Resposta parcial	Submetido a outro tratamento (após 3 meses)

A FIG.25 apresenta o histograma das respostas clínicas obtidas após a PDT com ALA.

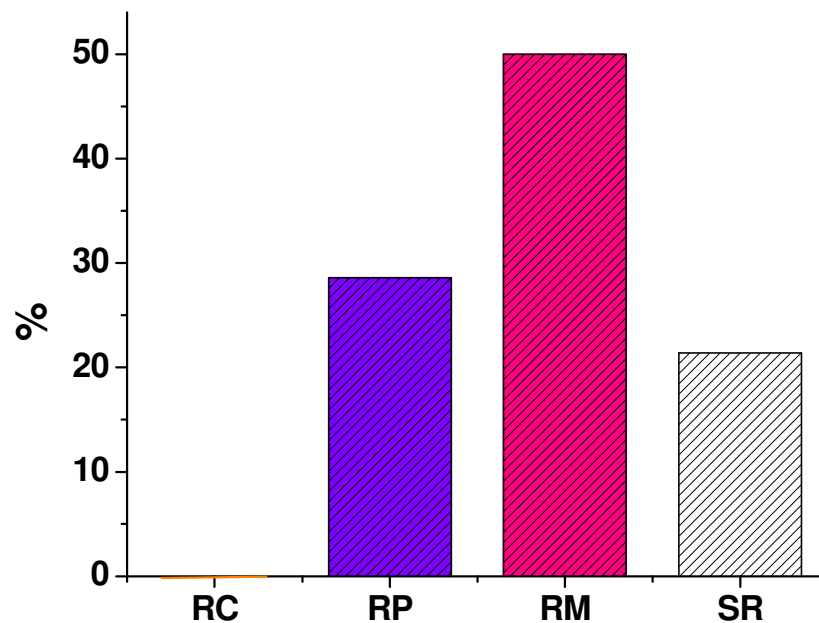


FIGURA 25. Respostas clínicas obtidas nas lesões tratadas com ALA (RC = resposta completa; RP = resposta parcial; RM = resposta mínima; SR = sem resposta).

5.12. Retorno após 150 dias - avaliação da resposta pela análise histopatológica pós-tratamento do GRUPO ALA

Foram tratadas com ALA 14 lesões de CEC felino. Desse total, três eram CEC *in situ* (21,4%), seis eram lesões de CEC bem diferenciado (42,9%) e cinco eram CEC moderadamente diferenciado (35,7%) A comparação da análise histopatológica das lesões antes e depois do tratamento é apresentada na TAB. 17.

TABELA 17. Análise histopatológica antes e 150 dias após a PDT e resposta clínica das lesões 90 dias após o tratamento no grupo ALA.

Lesão	Antes da PDT	Após a PDT	Resposta clínica
11	CEC moderadamente diferenciado (invasivo)	CEC moderadamente diferenciado (invasivo)	Sem resposta
12	CEC moderadamente diferenciado	CEC bem diferenciado	Sem resposta
13	CEC bem diferenciado	Linfangioma	Resposta parcial
14	CEC bem diferenciado (inicial)	CEC bem diferenciado	Resposta mínima
15	CEC <i>in situ</i>	Sem repetição de biópsia	Resposta mínima
16	CEC bem diferenciado	Sem repetição de biópsia	Resposta mínima
17	CEC moderadamente diferenciado	CEC <i>in situ</i>	Resposta mínima
18	CEC bem diferenciado	CEC bem diferenciado	Resposta mínima
19	CEC moderadamente diferenciado (invasivo)	Sem repetição de biópsia	Sem resposta
20	CEC bem diferenciado	CEC bem diferenciado (invasivo)	Resposta mínima
21	CEC <i>in situ</i>	CEC bem diferenciado	Resposta parcial
22	CEC bem diferenciado	CEC bem diferenciado	Resposta parcial
23	CEC <i>in situ</i>	CEC bem diferenciado	Resposta mínima
24	CEC moderadamente diferenciado (invasivo)	CEC bem diferenciado	Resposta parcial

Das sete respostas mínimas obtidas nesse grupo, duas eram CEC *in situ* (28,6%), quatro lesões (57,1%) eram bem diferenciadas e uma era CEC moderadamente diferenciado (14,3%). As quatro respostas parciais foram obtidas em um CEC moderadamente diferenciado (25%), dois CECs bem diferenciados (50%) e em um CECs *in situ* (25%). Os três animais que não apresentaram resposta apresentavam tumor moderadamente diferenciado.

Assim como no grupo de animais que foram tratados com a PDT utilizando-se o MEALA, algumas lesões apresentaram melhora das características microscópicas após o tratamento, como as lesões número 12 e 24, que passaram de moderadamente diferenciadas para bem diferenciadas e a lesão 17, que

passou de moderadamente diferenciada para CEC *in situ*. O animal que apresentava a lesão número 13 foi encaminhado para a ressecção cirúrgica do pavilhão auricular acometido, e este foi encaminhado posteriormente pelo cirurgião para avaliação histopatológica. Porém, nessa análise foi encontrado linfagioma, um tipo de tumor benigno. Isso pode ter ocorrido devido ao fato do fragmento analisado não ter sido exatamente o da região tratada, o que torna complicado afirmar que esse animal não apresentava mais CEC cutâneo. Macroscopicamente a lesão ainda encontrava-se alopecica, crostosa e eritematosa.

Assim como houve melhora microscópica da lesão de CEC em alguns casos, em outros houve progressão do tumor, como nos casos das lesões 21 e 23. As FIG. 26, 27 e 28 mostram exemplos de respostas parcial, mínima e ausência de resposta ao tratamento, respectivamente.

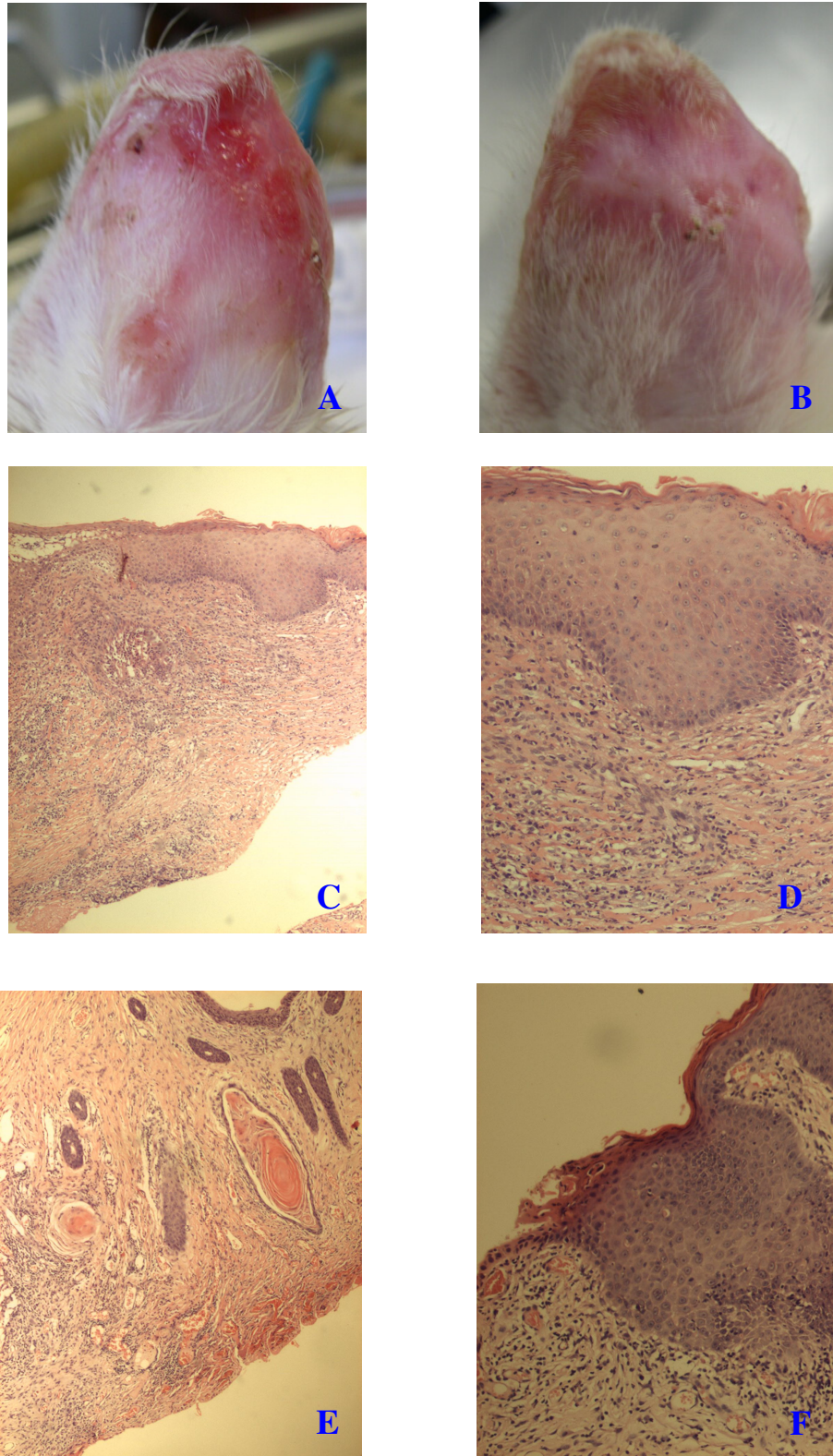


FIGURA 26. Animal número 13. A) Lesão ulcerada em pavilhão auricular direito antes da PDT com ALA – ulceração, eritema e alopecia. B) Três meses após o tratamento – cicatrização das úlceras. C e D) Aspecto microscópico da lesão de CEC bem diferenciado antes da PDT – hiperplasia de epiderme, hiperqueratose e perda de polaridade celular (objetivas 4X e 10X, respectivamente). E e F) Lesão 150 dias após o tratamento – CEC bem diferenciado apresentando perda de polaridade celular e pérolas córneas (objetivas 4X e 10X, respectivamente).

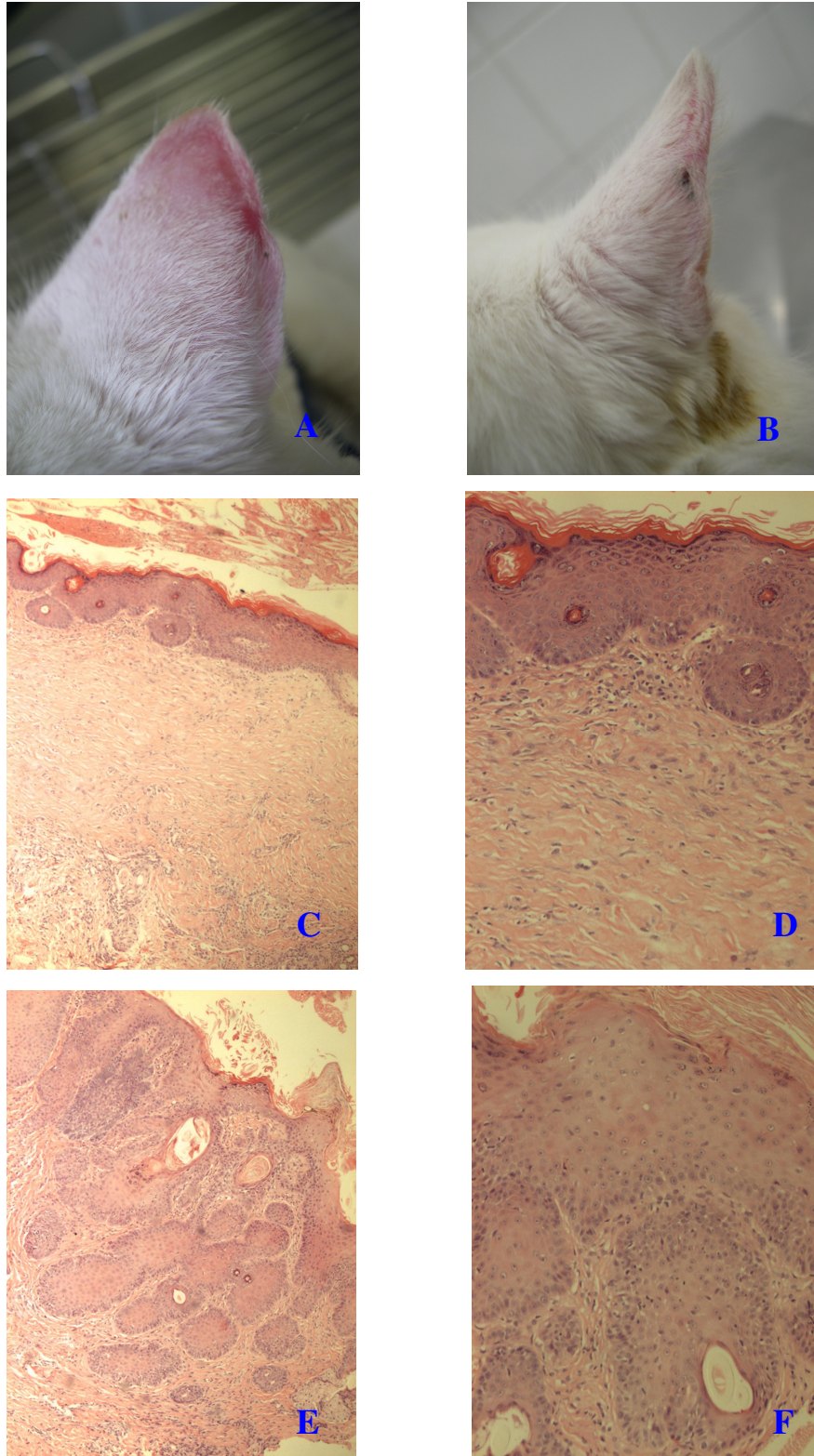


FIGURA 27. Animal número 14. A) Lesão em pavilhão auricular direito antes da PDT com ALA – alopecia e eritema. B) Três meses após a PDT - melhora do eritema, presença de crostas. C e D) Aspecto microscópico da lesão de CEC bem diferenciado antes da PDT – hiperplasia irregular da epiderme, hiperqueratose e perda de polaridade celular (objetivas 4X e 10X, respectivamente). E e F) Lesão 150 dias após o tratamento – CEC bem diferenciado com hiperqueratose e hiperplasia epidérmica (objetivas 4X e 10X, respectivamente).

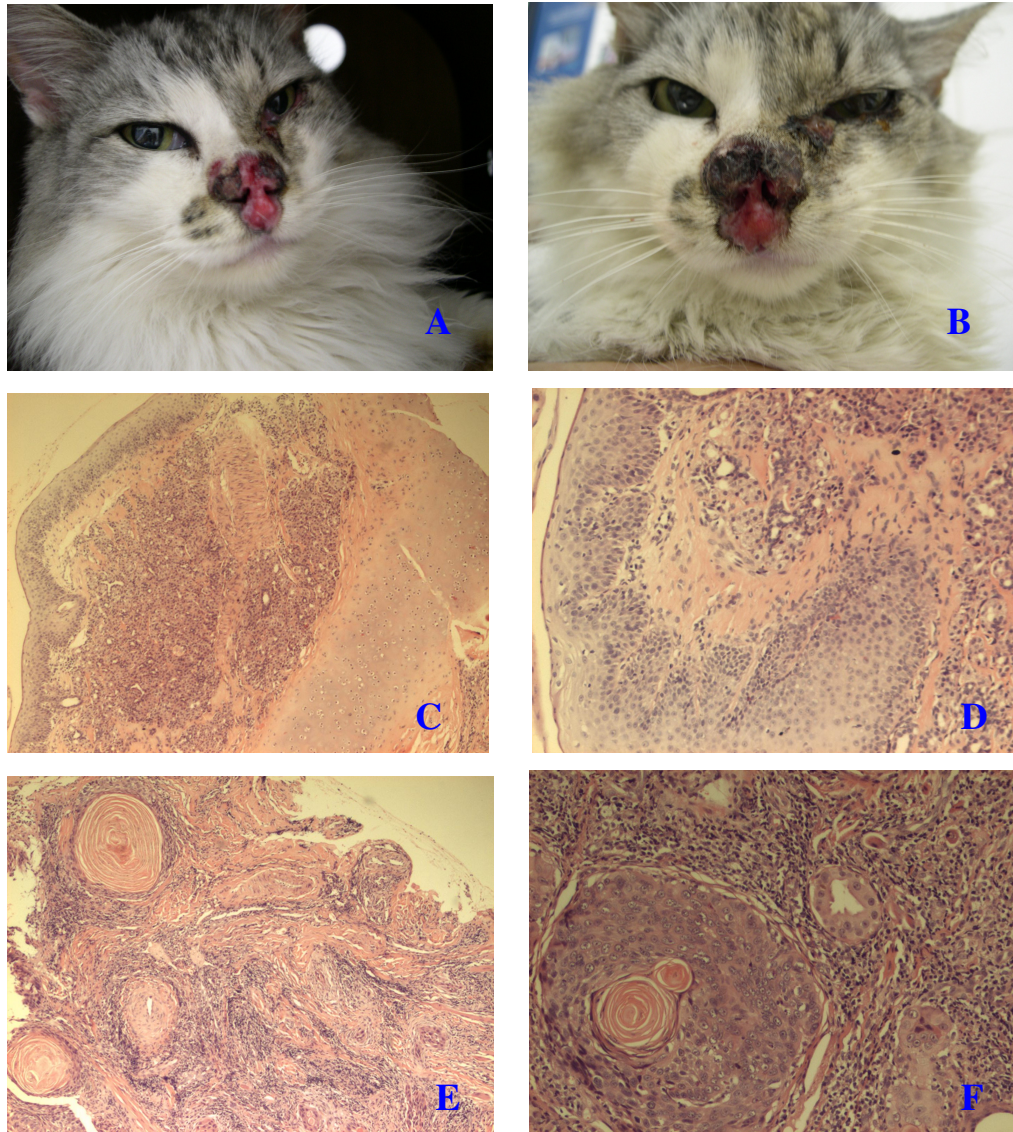


FIGURA 28. Animal número 12. A) Lesão de CEC em plano nasal antes da PDT com ALA – presença de ulceração e crostas. B) Três meses após o tratamento – sem redução tumoral. C e D) Aspecto microscópico da lesão de CEC moderadamente diferenciado antes da PDT – hiperplasia discreta da epiderme e perda de polaridade celular (objetivas 4X e 10X, respectivamente). E e F) Lesão 150 dias após o tratamento – CEC bem diferenciado com perda de polaridade celular e presença de pérolas córneas (objetivas 4X e 10X, respectivamente).

Há um número escasso de trabalhos encontrados atualmente na literatura envolvendo a utilização do ALA na PDT em CEC superficial de felinos. Os poucos relatos obtiveram altas taxas de resposta completa em um único tratamento utilizando concentração maior de ALA. Em estudo realizado por Stell et al. (2001), foram tratadas 13 lesões superficiais de CEC localizadas em plano nasal, pálpebra e pavilhões auriculares, com ALA tópico a 20%. A fonte de luz utilizada foi um *cluster* de LEDs de 635 nm de comprimento de onda. A taxa de resposta

completa após um único tratamento foi de 85%. Após um período de seis meses, em média, 63,6% desses animais apresentaram recidiva da neoplasia⁴³.

Vinck et al. (2004) também utilizaram LEDs, mas de comprimento de onda de 660 nm, e ALA a 20% em um caso de CEC superficial felino localizado em plano nasal. A recuperação do epitélio normal da pele ocorreu dois meses após o tratamento. Não houve recidiva do tumor após um período de dois anos de acompanhamento¹²¹.

A PDT com ALA no tratamento de lesões cutâneas em pacientes humanos vem sendo amplamente utilizada na prática clínica dermatológica, com bons resultados. Haddad et al. (2004) trataram 43 lesões de CEC em 18 pacientes e obtiveram resposta completa em 74% com até três aplicações de PDT com ALA a 20% e fonte de irradiação não coerente¹²².

Clark et al. (2003) fizeram um levantamento dos resultados de três anos de experiência utilizando a PDT com diversos tipos de fontes de irradiação em vários tipos de alterações de pele. A utilização do ALA a 20% em 483 lesões levou a resposta completas em 91% de 129 lesões de doença de Bowen, 97% de 23 lesões de carcinoma de células basais superficial e 91% de 23 lesões de queratose actínica. O número de tratamentos variou de acordo com a lesão, compreendendo um total de até 4 aplicações da PDT¹²³.

É difícil estabelecer uma comparação entre o presente estudo e os estudos encontrados na literatura utilizando-se a PDT com ALA no tratamento de CEC cutâneo, já que em todos são utilizados diferentes parâmetros, como diferentes fontes de irradiação, diferentes fluências e diferentes concentrações do precursor.

No presente estudo, o único efeito colateral observado em alguns animais logo após o tratamento foi a tentativa de coçar as lesões irradiadas no momento do retorno da anestesia. Possivelmente isso aconteceu devido à sensibilidade dolorosa no local tratado. Apenas em um caso a proprietária do animal utilizou pomada anestésica para minimizar com sucesso esse efeito. Nos outros animais não foi necessário, pois o desconforto demonstrado ocorreu durante pouco tempo. Possivelmente a dor não foi muito percebida devido à baixa concentração de ALA utilizada.

A dor durante a PDT é consequência de estimulação nervosa possivelmente pelas espécies reativas de oxigênio^{68,124}. Outra teoria aceita é a de que o ALA é captado por transportadores do ácido gama-aminobutírico (GABA)

nas terminações nervosas periféricas¹²⁴. A interação da PPIX com os nervos poderia ser a causa da sensação dolorosa durante a irradiação. A liberação de histaminas também poderia contribuir para a dor durante e após a PDT⁵³.

Alguns trabalhos focaram-se em minimizar efeitos colaterais como a dor de pacientes humanos tratados pela PDT com ALA. Tais efeitos foram classificados em agudos, subagudos e efeitos tardios. Além de eritema, inchaço ou edema, a sensação de dor na área tratada começa após alguns segundos de irradiação com uma leve queimação, geralmente aumentada nos próximos 30-90 segundos para queimação forte, pontadas ou dor intolerável.

Algermissen et al. (2003) testaram diferentes métodos para minimizar esse efeito. Os autores concluíram que o vapor de ar frio durante a PDT seria a primeira escolha para diminuir a dor, pois é capaz de reduzi-la em mais de 70%⁴⁹. O estudo de Pagliaro et al. (2004) corrobora esse resultado. O uso de ar frio durante o tratamento de pacientes com doença de Bowen, carcinoma de células basais e queratose actínica aumentou a tolerabilidade durante o tratamento, bem como diminuiu a duração do eritema e da sensibilidade dolorosa pós PDT¹²⁵.

Holmes et al. (2004) utilizaram a tetracaína em gel para aliviar a dor durante e após a terapia fotodinâmica com ALA. Esse anestésico não foi capaz de diminuí-la significativamente em pequenas lesões superficiais de carcinoma de células basais, doença de Bowen e queratose actínica¹²⁶.

O uso tópico de preparação analgésica à base de lidocaína associada à prilocaína antes da PDT, durante o período de incubação do ALA, é contra-indicado na literatura devido ao seu alto pH, o que pode inativar quimicamente o fotossensibilizador³, embora também haja relato de que não há influência significativa da lidocaína na degradação da PPIX e na fotossensibilidade celular¹²⁷.

5.13. Correlação da quantificação de células em fase S marcadas para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) com o prognóstico das lesões de CEC tratadas

A quantificação imunoistoquímica para PCNA foi realizada como uma variável prognóstica do CEC, assim como o estadiamento clínico e o grau de diferenciação celular. Na TAB. 18 observam-se as características das lesões e os

resultados da PDT. Não foram todas as lâminas confeccionadas que sofreram marcação para a contagem imunoistoquímica, apesar de mais de uma tentativa de processamento ter sido realizada. Como exemplo, Théon et al. (1995) perderam dados em um terço de suas amostras de CEC cutâneo por falhas de preservação do tecido e limitações na técnica¹²⁸. Os métodos de conservação, processamento e armazenamento de amostras influenciam na preservação de antígenos e dos epítomos de imunorreatividade; essa última pode ser reduzida por um período longo de fixação do material^{87,128}. Além disso, variações intrínsecas ao ciclo celular e a meia-vida do antígeno também são fatores que contribuem para a intensidade da coloração imunoistoquímica¹²⁸.

A quantificação de células em fase S marcadas para PCNA foi realizada apenas nas lâminas em que foi possível fazer a contagem de células marcadas (FIG. 29) e os resultados são apresentados na TAB.18, lembrando que as lesões de 1 a 10 foram tratadas pela PDT com MEALA e as lesões de 11 a 24 foram tratadas pela PDT com ALA (TAB.18).

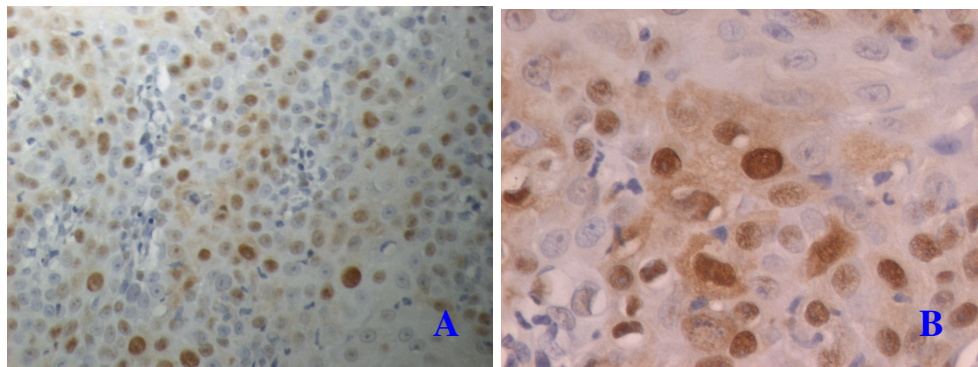


FIGURA 29. Marcação imunoistoquímica para PCNA – os núcleos marcados em marrom são positivos para o antígeno (A. Objetiva 20X; B. Objetiva 40X).

TABELA 18. Estadiamento da lesão de CEC, grau de diferenciação tumoral, fração de proliferação celular (FPC) e resposta clínica 90 dias após a PDT.

Estádio	Lesão	Grau de Diferenciação	FPC	Resposta clínica
0	8	CEC <i>in situ</i>	82,5%	Resposta mínima
0	15	CEC <i>in situ</i>	48,2%	Resposta mínima
0	21	CEC <i>in situ</i>	72,7%	Resposta parcial
I	10	Bem diferenciado	60,5%	Resposta completa
I	14	Bem diferenciado	20,4%	Resposta mínima
I	22	Bem diferenciado	88,4%	Resposta parcial
II	13	Bem diferenciado	62,2%	Resposta parcial
II	16	Bem diferenciado	77,5%	Resposta mínima
II	18	Bem diferenciado	47,4%	Resposta mínima
II	20	Bem diferenciado	87%	Resposta mínima
III	1	Bem diferenciado	69,0%	Resposta mínima
I	4	Moderadamente diferenciado	54,1%	Resposta parcial
I	5	Moderadamente diferenciado	48,8%	Resposta completa
I	24	Moderadamente diferenciado	32,6%	Resposta parcial
II	17	Moderadamente diferenciado	23,6%	Resposta mínima
III	2	Moderadamente diferenciado	86,3%	Sem resposta
III	11	Moderadamente diferenciado	65,2%	Sem resposta
III	12	Moderadamente diferenciado	60,0%	Sem resposta
III	19	Moderadamente diferenciado	45,3%	Sem resposta

Na FIG. 30 mostra-se o gráfico de porcentagem de células marcadas na imunohistoquímica para PCNA. As amostras analisadas nos dois grupos não apresentam diferença estatística significativa, sendo consideradas homogêneas pelo teste-t, com $p < 0,05$.

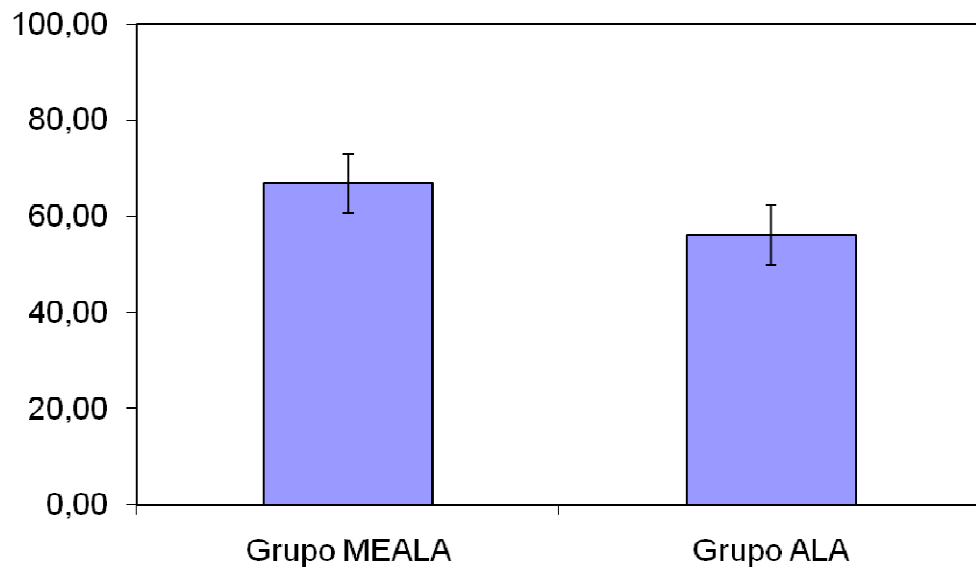


FIGURA 30. Média da porcentagem de células marcadas. O valor de p foi calculado pelo teste-t. As barras representam o erro padrão.

Na FIG. 31, o gráfico mostra a fração de proliferação celular (FPC) nos diferentes graus de diferenciação celular. Os carcinomas *in situ* e os bem diferenciados apresentaram maior contagem de células marcadas para PCNA em comparação aos carcinomas moderadamente diferenciados.

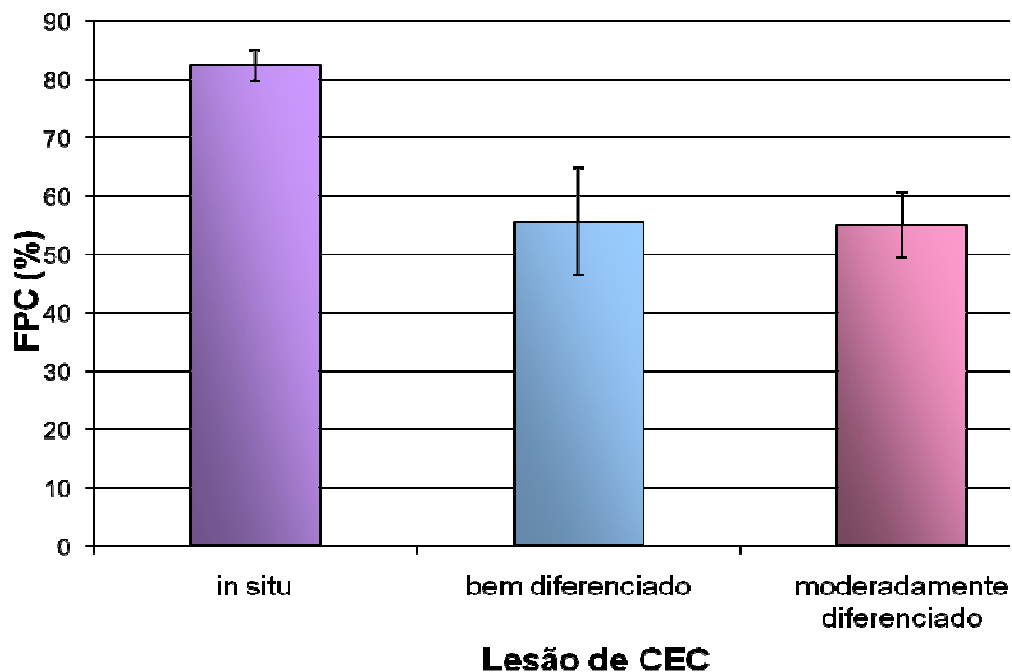


FIGURA 31. Fração de proliferação celular obtida em três casos de CEC *in situ*, oito casos de CEC bem diferenciado e oito casos de CEC moderadamente diferenciado (as barras indicam o erro padrão).

As respostas macroscópicas finais ao tratamento apresentaram grande variação. Das lesões onde foi possível realizar a contagem imunoistoquímica, três eram CEC *in situ*. Todos obtiveram alta fração de proliferação celular e a resposta clínica final desses tumores ao tratamento foi mínima em dois casos. No terceiro caso, apesar da resposta ter sido considerada parcial, microscopicamente o tumor progrediu de CEC *in situ* para CEC bem diferenciado, o que significa, dessa forma, que houve piora da lesão.

Quanto às oito lesões bem diferenciadas avaliadas, uma apresentou resposta completa, entretanto, apresentava 60,5% de marcação para PCNA. Em contrapartida, as duas lesões que apresentaram resposta parcial ao tratamento, apresentaram marcação de 62,2% e 88,4%. As respostas mínimas obtidas em cinco casos apresentaram frações de proliferação celular que variaram de 48,2% a 87%. Já as oito lesões moderadamente diferenciadas avaliadas não apresentaram resposta em quatro casos (50%), onde a porcentagem de marcação de PCNA variou de 45,3% a 86,3%. Uma lesão que respondeu completamente ao tratamento apresentou fração de proliferação de 48,8%, enquanto uma lesão com resposta parcial apresentou 32,6% e uma lesão com resposta mínima apresentou 47,7%. Nesse último caso, na avaliação microscópica, houve melhora da lesão de CEC. Devido à ampla variação de respostas em relação à quantificação de células marcadas para PCNA, não é possível correlacionar a contagem imunoistoquímica do presente trabalho com o prognóstico das lesões tratadas. Além disso, a quantidade de amostras analisadas foi pequena.

Théon et al. (1995) utilizaram a análise imunoistoquímica do PCNA, o estadiamento clínico do tumor, o grau histológico da lesão tumoral, a coloração de pelagem e o número de lesões como fatores prognósticos em 91 gatos com CEC em plano nasal submetidos ao tratamento com radioterapia. Os autores observaram que a fração de proliferação celular e o estadiamento clínico da lesão foram os únicos fatores que apresentam valor prognóstico significativo. Gatos com tumores em estágio T₁ responderam melhor ao tratamento radioterápico, enquanto os animais com lesões maiores e mais invasivas, de T₃ a T₄, obtiveram resultados menos satisfatórios. O grau histológico, a coloração de pelagem dos animais, a presença de múltiplas lesões, assim como a infecção por FIV não apresentaram importância prognóstica na resposta à radioterapia¹²⁸.

Kinugasa et al. (1996) também observaram correlação positiva entre o prognóstico de carcinoma espinocelular esofágico e o índice de proliferação celular determinado pela contagem imunohistoquímica para PCNA. O grau de coloração de PCNA foi relacionado ao tamanho do tumor e à profundidade da invasão e não foi considerado, dessa forma, um fator prognóstico isolado⁸⁷.

Em estudo realizado por Kawahira (1999), células positivas para PCNA foram encontradas em grande quantidade, sendo encontradas pela camada celular basal e pela derme. O autor concluiu pelo estudo que uma elevada contagem de células marcadas para PCNA (maior que 50%) é sugestiva de lesão maligna⁸⁵.

5.14. Comparação das respostas dos grupos MEALA e ALA

Devido ao fato da radiação ultravioleta ser a principal causa relacionada ao carcinoma espinocelular dos felinos claros, recomendou-se aos proprietários de todos os animais desse estudo a utilização de filtro solar diariamente nas regiões do corpo do animal mais expostas à luz do sol, além de limitar a exposição dos mesmos à radiação ultravioleta. Pelo fato da grande maioria desses animais viverem em ambientes amplos, como chácaras, assim como por apresentarem hábito de permanecerem fora de casa, as recomendações não foram seguidas adequadamente. Isso pode explicar a progressão do carcinoma após a PDT em vários gatos desse experimento.

Os animais 3, 6, e 7, no momento da primeira biópsia realizada, apresentaram queratose actínica em pavilhão auricular direito. Nos casos dos animais 3 e 6, essa queratose era inicial, enquanto que no animal 7 ela era moderada. Após cinco meses, as lesões haviam evoluído para carcinoma *in situ*, queratose actínica moderada e CEC inicial bem diferenciado, respectivamente.

Lesões semelhantes histologicamente responderam diferentemente ao tratamento. Quanto à avaliação clínica, das 24 lesões tratadas, seis (25%) eram estágio 0, seis (25%) eram estágio I, cinco (20,8%) eram estágio II e sete (29,2%) eram estágio III. No grupo MEALA, foram tratados três (30%) CECs estágio 0, três (30%) CECs estágio I e quatro (40%) CECs estágio III. No grupo ALA, foram tratados três (21,4%) CECs estágio 0, três (21,4%) CECs estágio I, cinco (35,8%) CECs estágio II e três (21,4%) CECs estágio III.

Dos CECs classificados em estágio 0, três (50%) apresentaram resposta parcial e três (50%) apresentaram resposta mínima ao tratamento. Das lesões estágio I, duas apresentaram respostas completas (33,3%), três respostas parciais (50%) e uma resposta mínima (16,7%). Já nas lesões estágio II, uma lesão (25%) apresentou resposta parcial e quatro lesões (75%) apresentaram resposta mínima. Das três lesões estágio III, uma (14,3%) obteve resposta completa ao tratamento, uma obteve resposta parcial (14,3%) e cinco (71,4%) obteve resposta mínima. Os resultados indicam que 100% das lesões estágio I apresentaram algum tipo de resposta positiva contra 28,6% das lesões classificadas em estágio III. A TAB.19 apresenta as respostas clínicas observadas de acordo com o estadiamento de cada lesão e com o precursor utilizado.

Tabela 19. Respostas clínicas das lesões 90 dias após o tratamento de acordo com o precursor utilizado, o estadiamento e o grau de diferenciação do CEC.

Animal	Lesão	Precursor	Estádio	Grau de diferenciação	Resposta
6	6	MEALA	0	CEC <i>in situ</i>	Parcial
7	7	MEALA	0	CEC <i>in situ</i>	Parcial
8	8	MEALA	0	CEC <i>in situ</i>	Mínima
4	4	MEALA	I	Moderadamente diferenciado	Parcial
5	5	MEALA	I	Moderadamente diferenciado	Completa
10	10	MEALA	I	Bem diferenciado	Completa
1	1	MEALA	III	Bem diferenciado	Mínima
2	2	MEALA	III	Moderadamente diferenciado	Sem resposta
3	3	MEALA	III	Pouco diferenciado	Sem resposta
9	9	MEALA	III	Moderadamente diferenciado	Completa
14	15	ALA	0	CEC <i>in situ</i>	Mínima
17	21	ALA	0	CEC <i>in situ</i>	Parcial

Tabela 19. Respostas clínicas das lesões 90 dias após o tratamento de acordo com o precursor utilizado, o estadiamento e o grau de diferenciação do CEC.

19	23	ALA	0	CEC <i>in situ</i>	Mínima
13	14	ALA	I	Bem diferenciado	Mínima
18	22	ALA	I	Bem diferenciado	Parcial
19	24	ALA	I	Moderadamente diferenciado	Parcial
13	13	ALA	II	Bem diferenciado	Parcial
14	16	ALA	II	Bem diferenciado	Mínima
15	17	ALA	II	Moderadamente diferenciado	Mínima
15	18	ALA	II	Bem diferenciado	Mínima
17	20	ALA	II	Bem diferenciado	Mínima
11	11	ALA	III	Moderadamente diferenciado	Sem resposta
12	12	ALA	III	Moderadamente diferenciado	Sem resposta
16	19	ALA	III	Moderadamente diferenciado	Sem resposta

Após o tratamento da lesão foi possível observar, em alguns casos, eritema local e edema nas primeiras 24 horas. A formação de crostas iniciou-se nos primeiros dias sucessivos à PDT, sendo que essas crostas caíam e se formavam novamente na maioria dos casos, mas cada vez em menor quantidade.

Eritema e edema após a PDT são geralmente vistos na área tratada, seguidos por necrose seca limitada à região do tumor nos dias subseqüentes. Após 10-21 dias, a crostas caem e a reepitelização completa é observada^{3,24,43}. No presente trabalho, a recuperação da pele após o tratamento foi observada de forma gradativa e, nos locais onde ainda existiam células cancerosas, o eritema geralmente persistia.

Os efeitos da PDT foram avaliados após três meses do tratamento. Porém, alguns proprietários relataram a progressão da melhora das lesões ainda após

esse período avaliado e também após a realização da segunda biópsia, com cinco meses da PDT. Ao mesmo tempo em que a PDT promove a morte imediata das células cancerosas, ocorrem também alterações na neovascularização e ainda há a promoção de uma resposta imune ao tumor residual após o tratamento^{19,129}. O sucesso da PDT com ALA também depende de fatores imunológicos, pois pacientes com supressão do sistema imune respondem mais pobremente ao tratamento⁵³.

De acordo com o estudo de Kujipers et al. (2001), que compararam dois ciclos de PDT com MEALA a 16% e ALA a 20% no tratamento de carcinoma nodular de células basais, não há diferenças entre os tratamentos. Os autores trataram 22 tumores com ALA e 22 com MEALA, sendo que no primeiro grupo 50% dos tumores foram parcialmente removidos antes da PDT e, no segundo grupo, 48% passaram por esse procedimento. O segundo tratamento foi realizado com um intervalo de sete dias e a resposta final foi avaliada oito semanas depois. Dos tumores parcialmente removidos, 18,2% e 20% não apresentaram resposta completa após a PDT com ALA e MEALA, respectivamente. Dos tumores não removidos, 27,3% no grupo tratado com ALA e 28,6% no grupo tratado com MEALA obtiveram resposta incompleta. Os autores concluíram que não há diferença significativa na eficácia a curto prazo da PDT com ALA e com MEALA no tratamento de carcinoma nodular de células basais¹³⁰. Entretanto, a utilização das formulações comerciais no referido estudo, com diferentes composições e concentrações dos precursores comprometeu a comparação dos efeitos dessas duas substâncias.

Schleier et al. (2007) utilizaram termogéis contendo 10% de ALA ou 10 % de MEALA no tratamento de carcinoma de células basais em pacientes humanos. No grupo tratado com ALA, de um total de 72 lesões, 61% apresentaram resposta completa a uma única aplicação da PDT. No grupo de 40 lesões tratadas com MEALA, 58% responderam completamente ao tratamento. A comparação dos resultados da PDT não mostrou diferenças significativas entre os dois grupos estudados⁵¹. No presente estudo, além da diferença de formulações dos precursores utilizadas, o número de lesões tratadas foi pequeno e, portanto, um estudo com maior número de tumores tratados poderia estabelecer melhor a comparação dos dois precursores.

Ninomiya et al. (2001) realizaram um estudo *in vitro* e *in vivo* com ésteres

de ALA. Os autores comprovaram que, em carcinoma espinocelular de ratos, o metil éster, administrado na dose de 200 mg/kg por via oral, é o melhor indutor da PPIX¹³¹. Em outros estudos comparativos utilizando-se a PDT com ALA e MEALA no tratamento de carcinoma basocelular, porcentagens de cura de 84% com ALA e 94% com o metil éster foram observadas em intervalos de 3-18 meses após o tratamento¹³².

Outros trabalhos envolvendo o tratamento de lesões de CEC pela PDT em felinos utilizaram outros tipos de fotossensibilizadores e fontes de luz. Frimberger et al. (1998) utilizaram o *5-Ethylamino-9-diethylaminobenzol [a] phenothiazinium chloride* aplicado por via intravenosa e laser de diodo de 652 nm no tratamento de vários tipos tumorais em cães e gatos. De seis CECs faciais tratados em felinos, foram obtidas duas respostas parciais e quatro respostas completas que duraram em média 9 meses¹³³. Em outro estudo, Peaston et al. (1993) usaram a ftalocianina tetrassulfonada (AIPcS₄), aplicada por via intravenosa, e laser de 675 nm para tratar 19 lesões de CEC em gatos. Essas lesões localizavam-se em pavilhão auricular e plano nasal. Dez tumores responderam completamente a apenas um tratamento. Respostas completas foram obtidas em duas lesões após um ou dois tratamentos adicionais. Cinco lesões responderam parcialmente ao tratamento¹³⁴.

Apesar das boas respostas da terapia, o uso sistêmico da ftalocianina tetrassulfonada pode trazer efeitos colaterais indesejáveis. Os autores relatam que foi possível observar fotossensibilização cutânea em quatro gatos que ficaram expostos à luz do dia na primeira semana após a PDT. Os animais apresentaram inchaço na face, apatia e fotofobia por vários dias. Dois gatos apresentaram eritema severo em áreas cutâneas hipopigmentadas e com pouco pêlo e um animal apresentou mudança na coloração da pele. Além disso, dois felinos vomitaram durante a administração do fotossensibilizador e um animal morreu por necrose hepática¹³⁴.

Dos dezenove animais tratados com ALA ou MEALA no presente estudo, não foi observada fotossensibilização cutânea, mesmo quando eram expostos à luz diurna nos dois primeiros dias pós-tratamento. A principal vantagem da protoporfirina IX em relação a outros fotossensibilizadores é sua meia-vida curta, que não ultrapassa 24-48 horas^{50,52,61}. Isso explica o porquê não foram observados tais efeitos colaterais após a PDT tópica.

Diferenças nas respostas também se devem ao fato de que alguns tipos celulares apresentam uma grande capacidade de sintetizar a PPIX quando expostos a uma concentração adequada de ALA exógeno. Na pele de ratos, as células epidérmicas e as unidades pilosebáceas (apêndices epidérmicos) desenvolvem significativa fluorescência da PPIX e tornam-se fotossensibilizadas após a exposição ao ALA. Entretanto, nas células da derme, nos vasos sanguíneos e na cartilagem da orelha isso não ocorre⁵⁰. A TAB.20 mostra as respostas das lesões à PDT de acordo com sua localização anatômica.

Tabela 20. Localização e resposta clínica das lesões tratadas.

Animal	Lesão	Localização	Resposta clínica
1	1	Nariz	Resposta mínima
2	2	Nariz	Sem resposta
3	3	Pavilhão auricular esquerdo	Sem resposta
4	4	Nariz	Resposta parcial
5	5	Nariz	Resposta completa
6	6	Pavilhão auricular esquerdo	Resposta parcial
7	7	Pavilhão auricular esquerdo	Resposta parcial
8	8	Nariz	Resposta mínima
9	9	Nariz	Resposta completa
10	10	Região temporal esquerda	Resposta completa
11	11	Pavilhão auricular esquerdo	Sem resposta
12	12	Nariz	Sem resposta
13	13	Pavilhão auricular esquerdo	Resposta parcial
	14	Pavilhão auricular direito	Resposta mínima
14	15	Pavilhão auricular esquerdo	Resposta mínima
	16	Pavilhão auricular direito	Resposta mínima
15	17	Pavilhão auricular esquerdo	Resposta mínima
	18	Pavilhão auricular direito	Resposta mínima
16	19	Nariz	Sem resposta
17	20	Pavilhão auricular esquerdo	Resposta mínima
	21	Pavilhão auricular direito	Resposta parcial
18	22	Pálpebra direita	Resposta parcial

Tabela 20. Localização e resposta clínica das lesões tratadas.

	23	Nariz	Resposta mínima
19	24	Pavilhão auricular esquerdo	Resposta parcial

Das três lesões que apresentaram resposta completa ao tratamento, duas localizavam-se em plano nasal e uma localizava-se em região temporal. Treze lesões localizadas em pavilhão auricular foram tratadas, a maior parte delas (46,2%) respondeu minimamente à PDT e nenhuma respondeu completamente ao tratamento. Esse achado pode ter ocorrido devido à vascularização local ser menor em relação à presente no plano nasal ou na região temporal, locais onde se obtiveram respostas completas, assim como ao fato da maior parte das lesões localizadas em pavilhão auricular (69,2%) terem sido tratadas no grupo ALA. Além disso, todos esses CECs tratados nesse último grupo provinham de animais com mais de uma lesão e, provavelmente, com o sistema imunológico comprometido.

A distribuição do ALA aplicado na pele depende de diversos parâmetros, como a permeabilidade da droga no extrato córneo, difusão pela epiderme e derme, formulação, liberação do precursor pelo veículo de administração, *clearance* local da droga, desesterificação dos ésteres de ALA e a taxa de conversão do ALA em PPIX¹³. Todos os parâmetros citados podem ter interferido, portanto, nas respostas ao tratamento.

Outro fator que deve ser considerado é o comportamento dos animais durante a aplicação da pomada fotossensibilizadora. Dois animais que não apresentaram resposta ao tratamento ficavam extremamente agitados durante esse procedimento, dificultando-o. Apesar da realização de sedação para facilitar a aplicação, os animais conseguiam remover parcialmente a pomada por lambedura.

Em nenhum caso tratado no presente estudo houve curetagem da lesão de CEC antes da PDT, apenas remoção de crostas, procedimento considerado importante, pois pode comprometer a eficácia do precursor¹³⁵. No estudo de Moseley et al. (2008), lesões de carcinoma de células basais e doença de Bowen foram submetidas parcialmente à curetagem e tratadas com PDT utilizando-se ALA e irradiadas com laser de 630 nm de comprimento de onda. Através de estudos de fluorescência os autores concluíram que o preparo da lesão antes do tratamento não influencia na captação do ALA¹³⁶.

A oclusão da lesão após a aplicação da pomada também é considerada importante para aumentar a incorporação do fotossensibilizador com o contato constante do precursor e evitar a degradação do mesmo pela luz ambiente¹³⁵. Devido à dificuldade de ocluir os locais da aplicação do composto nos animais tratados no presente estudo, principalmente quando a lesão de CEC localizava-se em plano nasal, todos os animais foram mantidos dentro de caixas de transporte cobertas por panos para manter o local escuro durante a aplicação da pomada, que era repetida a cada 30 minutos.

A utilização de baixa concentração dos precursores da PPIX em ambas as formulações de pomadas utilizadas nesse estudo tem como vantagem provocar menos danos nas células sadias que circundam as lesões cancerosas e menor quantidade de efeitos danosos à microvasculatura local, havendo dessa forma maior aporte de oxigênio para ocorrer o efeito fotodinâmico⁷.

É importante lembrar que nesse trabalho o mesmo protocolo foi utilizado para os animais de cada grupo, com mesma fluência, além de mesmo tempo de aplicação da pomada e mesma concentração. O estabelecimento de um protocolo individual, levando-se em conta as características macro e microscópicas das lesões, poderia trazer melhores resultados. A repetição do tratamento também é outro fator que deve ser considerado para a obtenção de resultados ainda melhores, já que não há contra-indicação para a repetição da PDT e essa não compromete a indicação para outros tipos de tratamento quando necessário, além de poder ser aplicada juntamente a outra modalidade terapêutica, pois não há toxicidade aditiva ou sinérgica a outra modalidade de terapia³⁷.

6. CONCLUSÕES

- A terapia fotodinâmica mostrou-se promissora no tratamento de carcinoma espinocelular cutâneo de gatos.
- Pelos resultados da sorologia para FIV e FeLV obtidos nesse estudo, não estabelecemos correlação entre a ocorrência dessas doenças virais e a incidência de CEC cutâneo felino.
- A temperatura da superfície cutânea não apresenta aumento significativo durante a realização do procedimento fotodinâmico ($\Delta t < 3^{\circ}\text{C}$).
- A PDT realizada tanto com ALA quanto com MEALA tópicos não causa efeitos colaterais tardios.
- A quantificação imunoistoquímica para o PCNA não pôde ser correlacionada como um fator prognóstico do tratamento fotodinâmico.
- A PDT com metil aminolevulinato apresenta melhores resultados do que quando realizada com ALA nas condições estudadas.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Realização de mais de uma sessão de PDT para verificar se ocorrem respostas ainda melhores ao tratamento;
- Realização da PDT utilizando-se pomada com diferente concentração do precursor da protoporfirina IX para se averiguar se aumenta a eficiência do tratamento;
- Realização de punção aspirativa de linfonodos aumentados nos animais com CEC para verificar a ocorrência de metástase ;
- Medida *in vivo* do espectro de absorção da protoporfirina IX para otimizar o momento da irradiação e comparar a formação de PPIX entre MEALA e ALA;
- Realização de exame de sangue em animais sem CEC pertencentes à mesma população para comparar com os animais acometidos pelo tumor;
- Avaliar a influência da anemia nas respostas dos animais submetidos à terapia fotodinâmica, já que a diminuição da taxa de hemoglobina poderia exercer *feedback* positivo na via biossintética do heme, além do fato de haver redução do transporte de O₂, eventualmente diminuindo o rendimento fotodinâmico.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela com as principais características dos tumores no exame histopatológico antes da PDT.

Lesão	Hiperplasia	Hiperqueratose	PPC	AN	Apoptose	Infiltrado Inflamatório
1	X		X	X		X
2	X		X	X	X	X
3	X		X	X	X	X
4	X	X	X	X		
5	X		X	X	X	X
6	X	X	X	X	X	X
7	X		X	X	X	
8	X	X	X	X		
9	X		X	X		X
10	X		X	X		X
11	X		X	X		X
12	X		X	X		X
13	X		X	X		X
14	X		X	X		X
15	X	X	X	X		X
16	X	X	X	X		X
17			X	X	X	X
18	X		X	X	X	
19	X	X	X	X		X
20	X	X	X	X	X	X
21	X	X	X	X	X	X
22	X		X	X		X
23	X	X	X	X		X
24	X	X	X	X		

PPC = perda de polaridade celular; AN = atipia nuclear.

APÊNDICE B – Tabela com as principais características dos tumores no exame histopatológico após a PDT.

Lesão	Hiperplasia	Hiperqueratose	PPC	AN	Apoptose	Infiltrado Inflamatório
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X		
5	X	X	X	X		
6	X	X	X	X		X
7	X	X	X	X		X
8	X	X	X	X	X	
9	-	-	-	-	-	-
10	X	X	X	X		
11	X		X	X	X	X
12	X		X	X	X	X
13	X		X	X		X
14	X		X	X		X
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	X	X	X	X	X	X
18	X	X	X	X	X	X
19	-	-	-	-	-	-
20	X	X	X	X	X	X
21	X	X	X	X	X	X
22	X		X	X	X	X
23	X		X	X	X	X
24	X	X	X	X		

PPC = perda de polaridade celular; AN = atipia nuclear.

APÊNDICE C – Eritrograma dos animais antes do tratamento.

Animal	Hemácias (milhões/mm³)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g%)	V.C.M. (fl)	H.C.M. (pg)	C.H.C.M. (%)
1	7,3	31	9,6	41,3	12,8	31,0
2	8,4	39	13,3	46,4	15,8	34,1
3	5,4	22	6,9	40,7	12,8	31,4
4	4,9	23	7,0	46,9	14,3	30,4
5	6,9	30	9,8	43,5	14,2	32,7
6	5,5	24	7,9	43,6	14,4	32,9
7	5,1	26	8,4	51,0	16,5	32,3
8	8,6	37	12,8	43,0	14,9	34,6
9	5,2	25	8,3	48,1	16,0	33,2
10	5,7	24	7,8	42,1	13,7	32,5
11	8,0	34	10,8	42,5	13,5	31,8
12	9,0	40	13,1	44,4	14,6	32,8
13	4,5	22	7,3	48,9	16,2	33,2
14	3,8	17	5,5	44,7	14,5	32,4
15	6,0	27	9,4	45,0	15,7	34,8
16	5,2	20	7,0	38,5	13,5	35,0
17	7,7	35	12,0	45,4	15,6	34,3
18	7,8	36	12,1	46,2	15,5	33,6
19	9,2	37	12,7	40,2	13,8	34,3

V.C.M.(volume corpuscular médio); H.C.M. (hemoglobina corpuscular média); C.H.C.M. (concentração de hemoglobina corpuscular média).

APÊNDICE D – Leucograma dos animais antes do tratamento.

Animal	Leucócitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos
1	16.000	67	14	0	16	03
2	18.700	58	07	02	25	08
3	3.800	88	02	0	09	01
4	6.300	87	0	0	12	01
5	5.600	76	06	0	10	08
6	7.600	78	12	01	09	RAROS
7	17.500	37	58	0	03	02
8	8.900	69	01	0	25	05
9	6.000	80	04	0	16	RAROS
10	8.300	83	04	03	05	05
11	20.800	79	07	0	10	04
12	19.500	73	04	01	20	02
13	7.500	78	06	0	14	02
14	5.400	59	10	0	31	RAROS
15	17.000	72	20	0	06	02
16	6.800	74	02	0	24	RAROS
17	9.800	52	14	0	27	07
18	7.000	74	13	0	12	01
19	10.800	72	15	01	09	03

APÊNDICE E – Função renal dos animais antes da PDT.

Animal	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
1	77,0	1,7
2	62,6	1,7
3	58,6	1,2
4	51,0	1,2
5	49,0	1,2
6	55,8	1,2
7	43,0	1,3
8	69,9	1,4
9	65,9	1,6
10	45,7	1,1
11	94,4	2,2
12	49,6	1,7
13	43,2	1,4
14	85,5	1,9
15	46,4	1,4
16	42,8	1,2
17	67,4	1,7
18	73,8	1,8
19	60,7	1,7

APÊNDICE F – Perfil hepático dos animais antes do tratamento.

Animal	PT (g/dl)	Albumina (g/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	GGT (U/l)
1	9,3	2,3	32,6	29,8	54,9	0
2	8,0	2,9	30,7	52,0	50,0	0
3	6,4	2,6	44,0	37,6	76,0	0
4	6,8	2,6	57,0	172,9	36,0	2,0
5	7,4	2,7	46,0	68,9	13,9	0,4
6	7,2	2,6	43,0	54,6	49,0	0,4
7	7,0	2,3	36,3	30,5	17,6	0,1
8	8,2	2,8	60,3	92,5	42,7	2,6
9	6,9	2,7	42,9	58,2	47,9	1,8
10	6,6	2,3	39,7	84,7	68,7	0
11	9,5	2,4	17,8	27,0	103,0	0,4
12	8,6	2,5	25,3	23,5	48,9	0
13	7,1	2,7	15,0	20,0	50,6	2,4
14	5,5	2,6	14,9	29,0	32,6	0
15	8,1	3,0	26,0	44,6	21,4	0,5
16	6,2	2,8	10,2	30,4	33,5	0
17	9,3	2,9	13,08	43,0	51,4	0
18	7,7	2,7	11,1	22,3	58,6	0
19	9,5	2,5	17,6	19,4	59,7	0

PT (proteína total), AST (aspartato-transaminase), ALT (alanina aminotransferase), FA (fosfatase alcalina) e GGT (gama-glutamil transferase).

APÊNDICE G – Eritrograma dos animais após o tratamento.

Animal	Hemácias (milhões/mm³)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g%)	V.C.M. (fl)	H.C.M. (pg)	C.H.C.M. (%)
1	6,0	23	7,9	38,3	13,2	34,4
2	9,0	40	13,7	44,4	15,2	34,3
3	7,9	31	10,7	39,2	13,5	34,5
4	6,3	30	10,0	47,6	15,9	33,3
5	8,4	44	13,8	52,4	16,4	31,4
6	8,7	35	11,5	40,2	13,2	32,9
7	8,2	37	12,4	45,1	15,1	33,5
8	8,7	37	11,9	42,5	13,7	32,2
9	8,9	37	12,6	41,6	14,2	34,1
10	7,9	35	11,8	44,3	14,9	33,7
11	5,7	25	8,4	43,9	14,7	33,6
12	10,2	44	13,9	43,1	13,6	31,6
13	8,4	33	11,5	39,3	13,7	34,9
14	5,9	28	9,3	47,5	15,8	33,2
15	6,6	39	11,5	59,1	17,4	29,5
16	8,7	35	12,0	40,2	13,8	34,3
17	8,8	36	12,2	40,9	13,9	33,9
18	7,7	35	11,5	45,5	14,9	32,9
19	7,4	31	10,9	41,9	14,7	35,2

V.C.M.(volume corpuscular médio); H.C.M. (hemoglobina corpuscular média); C.H.C.M. (concentração de hemoglobina corpuscular média).

APÊNDICE H – Leucograma dos animais após o tratamento.

Animal	Leucócitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos
1	21.400	76	11	0	09	04
2	26.200	31	34	04	30	01
3	6.800	45	18	0	35	02
4	12.800	85	01	0	11	03
5	10.200	76	06	02	11	05
6	16.300	56	06	0	38	RAROS
7	14.500	58	24	0	18	RAROS
8	8.200	62	02	0	26	10
9	10.600	72	07	0	19	02
10	17.300	70	11	06	09	04
11	15.000	79	05	0	13	03
12	8.500	72	02	0	23	03
13	9.300	51	09	02	35	03
14	7.100	59	05	0	33	03
15	20.000	70	14	01	01	01
16	9.700	73	03	0	23	01
17	13.000	58	10	01	29	02
18	5.600	65	15	0	19	01
19	18.500	82	04	0	10	04

APÊNDICE I – Função renal dos animais após a PDT.

Animal	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
1	114,0	1,6
2	76,4	1,4
3	63,6	1,3
4	58,0	1,4
5	48,0	1,1
6	42,9	1,2
7	64,0	1,2
8	65,0	1,4
9	57,0	1,6
10	51,6	1,2
11	82,4	1,7
12	45,5	1,8
13	49,5	1,7
14	61,0	1,9
15	61,9	0,98
16	36,9	1,4
17	67,9	1,7
18	67,4	1,8
19	53,7	1,8

APÊNDICE J – Perfil hepático dos animais após o tratamento.

Animal	PT (g/dl)	Albumina (g/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	GGT (U/l)
1	9,1	2,2	36,7	24,7	27,0	0
2	9,1	3,0	35,0	59,0	56,0	0,7
3	7,3	2,7	36,0	45,0	55,9	0
4	7,8	2,8	150,6	530,8	82,0	7,3
5	7,4	2,7	32,5	75,8	36,8	2,7
6	8,0	2,6	34,7	67,6	51,7	0
7	8,6	2,4	40,0	55,0	35,0	0
8	8,3	2,7	25,8	57,0	71,0	0
9	9,0	3,0	49,8	61,4	57,6	0
10	7,4	2,7	41,6	105,9	102,8	0,3
11	7,8	2,4	25,0	46,5	116,0	0
12	8,6	3,2	26,9	23,3	48,9	0
13	8,0	3,1	18,4	35,4	40,9	0
14	7,6	3,1	15,6	27,6	38,3	0
15	7,0	2,7	10,9	21,0	16,4	4,5
16	7,3	2,9	10,9	19,5	29,0	0
17	8,7	2,8	16,3	35,5	39,4	0
18	7,5	2,7	21,2	24,0	60,3	0
19	9,3	2,7	12,2	13,2	21,9	0

PT (proteína total), AST (aspartato-transaminase), ALT (alanina aminotransferase), FA (fosfatase alcalina) e GGT (gama-glutamil transferase).

APÊNDICE L – Modelo do termo de ciência e autorização assinado pelos proprietários dos animais incluídos no estudo.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
HOSPITAL VETERINÁRIO**

TERMO DE CIÊNCIA E AUTORIZAÇÃO

Eu, _____, proprietário do animal da espécie _____, raça _____, sexo _____, idade (____), registrado no Hospital Veterinário da FMVZ sob nº _____, **ESTOU CIENTE** de que o animal de minha propriedade fará parte do protocolo de pesquisa intitulado: " _____", desenvolvido no Departamento de _____, Serviço de _____ desta Faculdade, sob a responsabilidade do (a) _____, Professor (a) _____, do Departamento de _____ e Orientador (a) do (a) _____ que se encontra vinculada ao Projeto na condição de _____ do Departamento de _____, Serviço de _____.

Outrossim, além de **CIENTE, AUTORIZO** por escrito que o animal de minha propriedade, acima indicado, seja incluído no protocolo ora referido e que tomei ciência, por escrito e de forma clara e compreensível, dos procedimentos que serão aplicados ao animal.

São Paulo, ____ de _____ de 2005

NOME LEGÍVEL: _____

ASSINATURA: _____

RG: _____

APÊNDICE M – Modelo do termo de autorização do uso de imagens registradas durante o experimento.

DECLARAÇÃO

Eu, _____, portador
do RG _____, residente à

_____ e proprietário do animal de nome _____, espécie
_____, raça _____,

pelagem _____, sexo _____ e idade

_____, **AUTORIZO** a utilização das imagens deste animal,
oriundas do procedimento a que será submetido, para fins didáticos e
publicação científica.

_____, ____ de _____ de _____.

Assinatura

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹PENG, Q.; MOAN, J.; NESLAND, J.M. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. ***Ultrastructural Pathology***, v. 20, p. 109-129, 1996.
- ²LUCROY M.D., EDWARDS B.F., MADEWELL B.R. Veterinary photodynamic therapy. ***Veterinary Medicine Today: Reference Point***, v. 216, n.11, p.1745-1751, 2000.
- ³BABILAS, P.; KARRER, S.; SIDOROFF, A.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES. Photodynamic therapy in dermatology – an update. ***Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine***, v.21. p.142-149, 2005.
- ⁴DE ROSA, F.S.; TEDESCO, A.C.; LOPEZ, R.F.V.; PIERRE, M.B.R.; LANGE, N.; MARCHETTI, J.M.; ROTTA, J.C.G.; BENTLEY, M.V.L.B. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. ***Journal of Controlled Release***, n.89, p.261-269, 2003.
- ⁵ALLISON, R.R.; DOWNIE, G.H.; CUENCA, R.; HU, X.; CHILDS, C.J.H.; SIBATA, C.H. Photosensitizers in clinical PDT. ***Photodiagnosis and Photodynamic Therapy***, n.1, p.27-42, 2004.
- ⁶CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. ***Photodiagnosis and Photodynamic Therapy***, v.1, p.279-293, 2004.
- ⁷DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C.J.; HENDERSON, B.W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. ***Journal of the National Cancer Institute***, v.90, n.12, p.889-905, 1998.
- ⁸MACCORMACK, M.A. Photodynamic therapy in Dermatology: an update on applications and outcomes. ***Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery***, v.07, p.52-62, 2008.
- ⁹KORMEILI, T.; YAMAUCHI, P.S.; LOWE, N.J. Topical photodynamic therapy in clinical dermatology. ***British Journal of Dermatology***, v.150, p.1061-1069, 2004.

-
- ¹⁰LUKSIENE, Z.; EGGEN, I.; MOAN, J.; NESLAND, J.M.; PENG, Q. Evaluation of protoporphyrin IX, phototoxicity and cell death pathway induced by hexylester of 5-aminolevulinic acid in Reh and HPB-ALL cells. **Cancer Letters**, v.169, p.33-39, 2001.
- ¹¹DONELLY, R.F., JUZENAS, P., McCARRON, P.A., MA L., WOOLFSON, A.D., MOAN, J. Influence of formulation factors on methyl-ALA-induced protoporphyrin IX accumulation in vivo. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, n.3, p.190-201, 2006.
- ¹²PARISER, D.M.; LOWE, N.J.; STEWART, D.M.; JARRAT, M.T.; LUCKY, A.W.; PARISER, R.J.; YAMAUCHI, P.S. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: Results of a prospective randomized multicenter trial. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.48, n.2, p.227-232, 2003.
- ¹³LOPEZ, R.F.V.; LANGE, N.; GUY, R.; BENTLEY, M.V.L.B. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.56, p.77-94, 2004.
- ¹⁴BIRCHARD, S.J., SHERDING R.G. **Manual Saunders – Clínica de Pequenos Animais**. 2^a edição. São Paulo. Editora Roca Ltda., 2003. Cap. 28, p. 251 e 256.
- ¹⁵WITHROW, S.J., MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 2^a edição. Filadélfia. W.B.Saunders Company, 1999. Cap.15, p.173-176.
- ¹⁶SCOTT, D.W., MILLER, W.H.JR., GRIFFIN, C.E. **Dermatologia de Pequenos Animais**. 5^a edição. Rio de Janeiro. Interlivros, 1996. Cap.19, p.935-937.
- ¹⁷RESENDE, B.C.G.; DAGLI, M.L.Z. Retinóides na quimioprevenção e tratamento coadjuvante de neoplasias em cães: revisão. **Revista Clínica Veterinária**, v.45, p.44-50, 2003.
- ¹⁸LUCROY, M.D. Photodynamic therapy for companion animals with cancer. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.32, n.3, p.693-702, 2002.
- ¹⁹KESSEL, D. Photodynamic therapy: from the beginning. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.1, p. 3-7, 2004.

-
- ²⁰DOUGHERTY, T.J.; KAUFMAN, J.E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUP, K.R.; BOYLE, D.; MITTLEMAN, A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. ***Cancer Research***, v.38, p.2628-2635, 1978.
- ²¹MANG, T.S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. ***Photodiagnosis and Photodynamic Therapy***, v.1, p. 43-48, 2004.
- ²²ZEZELL D.M. Processos para monitoração e otimização da terapia fotodinâmica de tumores. Campinas, Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Tese (Doutorado), p. 05-18, 1991.
- ²³ZEITOUNI, N.C.; OSEROFF, A.R.; SHIEH, S. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers – current review and update. ***Molecular Immunology***, v.39, p.1133-1136, 2003.
- ²⁴ZEITOUNI, N.C.; SHIEH, S.; OSEROFF, A.R. Laser and photodynamic therapy in the management of cutaneous malignancies. ***Clinics in Dermatology***, v.19, p.328-339, 2001.
- ²⁵OVERHOLT B.F., PANJEHPOUR M., DENOVO R.C., PETERSON M.G., JENKINS C. Balloon photodynamic therapy of esophageal cancer: effect of increasing balloon size. ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 18 (3), p. 248-252, 1996.
- ²⁶JACOBS T.M., ROSEN G.M. Photodynamic therapy as a treatment for esophageal squamous cell carcinoma in a dog. ***Journal of the American Animal Hospital Association***, v. 36 (3), p. 257-261, 2000.
- ²⁷CHANG S.C., BUONACCORSI G.A., MACROBERT A.J., BOWN S.G. Interstitial and transurethral photodynamic therapy of the canine prostate using meso-tetra-(m-hydroxyphenyl) chlorin. ***International Journal of Cancer***, v.67 (4), p. 555-562, 1996.
- ²⁸SELMAN S.H., KECK R.W., HAMPTON J.A. Transperineal photodynamic ablation of the canine prostate. ***Journal of Urology*** v. 156 (1), p. 258-260, 1996.
- ²⁹CHANG S.C., BUONACCORSI G.A., MACROBERT A.J., BOWN S.G. Interstitial photodynamic therapy in the canine prostate with disulfonated aluminum phthalocyanine and 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. ***Prostate*** v.32 (2), p. 89-98, 1997.
- ³⁰SELMAN S.H., ALBRECHT D., KECK R.W., BRENNAN P., KONDO S. Studies of tin ethyl etiopurpurin photodynamic therapy of canine prostate. ***Journal of Urology***, v.165 (5), p. 1795-1801, 2001.

-
- ³¹CHEN Q., WILSON B.C., SHETTY S.D., PATTERSON M.S., CERNY J.C., HETZEL F.W. Changes in vivo optical properties and light distributions in normal canine prostate during photodynamic therapy. ***Radiation Research***, v. 147 (1), p. 86-91, 1997.
- ³²LEE L.K., WHITEHURST C., CHEN Q., PANTELIDES M.L., HETZEL F.W., MOORE J.V. Interstitial photodynamic therapy in the canine prostate. ***British Journal of Urology***, v. 80 (6), p. 898-902, 1997.
- ³³MAGNE M.L., RODRIGUEZ C.O., AUSTRY S.A., EDWARDS B.F., THEON A.P., MADEWELL B.R. Photodynamic therapy of facial squamous cell carcinoma in cats using a new photosensitizer. ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 20 (2), p. 202-209, 1997.
- ³⁴CHANG C.J., LAI Y.L., WONG C.J. Photodynamic therapy for facial squamous cell carcinoma in cats using photofrin. ***Changgeng Yi Xue Za Zhi*** v. 21 (1), p. 13-19, 1998.
- ³⁵MCCAWE D.L., POPE E.R., PAYNE J.T., WEST M.K., TOMPSON R.V., TATE D. Treatment of canine oral squamous cell carcinoma with photodynamic therapy. ***British Journal of Cancer*** v.82 (7), p. 1297-1299, 2000.
- ³⁶SCHMIDT M.H., REICHERT K.W., OZKER K., MEYER G.A., DONOHOE D.L., BAJIC D.M., WHELAN N.T., WHELAN H.T. Preclinical evaluation of benzoporphyrin derivative combined with a light-emitting diode array for photodynamic therapy of brain tumors. ***Pediatric Neurosurgery***, v. 30 (5), p. 225-231, 1999.
- ³⁷MARCUS S.L., McINTYRE W.R. Photodynamic therapy systems and applications. ***Expert Opinion Emerging Drugs*** v.7 (2), p. 318-331, 2002.
- ³⁸SALVA, K.A. Photodynamic therapy: unapproved uses, dosages and indications. ***Clinics in Dermatology***, v.20, p. 571-581, 2002.
- ³⁹NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKLOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOLAB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. ***Acta Biochimica Polonica***, v.52, n.02, p.339-352, 2005.
- ⁴⁰OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. ***Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology***, v.39, p.1-18, 1997.
- ⁴¹HENDERSON, B.W.; DOUGHERTY, T.J. How does photodynamic therapy work? ***Photochemistry and Photobiology***, v.55, n.01, p.145-157, 1992.
- ⁴²MACHADO A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. ***Química Nova***, v.23, n.2, p.237-243, 2000.

-
- ⁴³STELL A.J., DOBSON J.M., LANGMACK K. Photodynamic therapy of feline superficial squamous cell carcinoma using topical 5-aminolaevulinic acid. ***Journal of Small Animal Practice***, v. 42, n.4, p.164-169, 2001.
- ⁴⁴BROWN, S.B.; BROWN, E.A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. ***The Lancet Oncology***, v.05, p.497-508, 2004.
- ⁴⁵CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. ***Photodiagnosis and Photodynamic Therapy***, v.02, p.21-23, 2005.
- ⁴⁶CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three – photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. ***Photodiagnosis and Photodynamic Therapy***, v.02, p.91-106, 2005.
- ⁴⁷BRAATHEN, L.R.; SZEIMIES, R.M.; BASSET-SEGUIN, N.; BRISSONNETTE, R.; FOLEY, P.; PARISER, D.; ROELANDTS, R.; WENNBERG, A.M.; MORTON, C.A. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. ***Journal of the American Academy of Dermatology***, v.56, p.125-143, 2007.
- ⁴⁸EMILIO, C.R.; DAGLI, M.L.Z.; GIOSO, M.A.; DUTRA, F.; BECHARA, E.J.H.; PINOTTI, M.; ZECELL, D.M. Comparação da eficácia do ácido 5-aminolevulínico com a do metil aminolevulinato na terapia fotodinâmica em carcinoma espinocelular de gatos. In: V ONCOVET – II Simpósio de Oncologia Veterinária, 16-18 maio, 2008, São Paulo. ***Anais do Oncovet***, São Paulo, 2008, p.62-62.
- ⁴⁹ALGERMISSEN, B.; OSTERLOH, D.; PHILIPP, C.M.; BERLIEN, H.P. Management of ALA-PDT induced pain sensations. ***Medical Laser Application***, n.18, p.57-64, 2003.
- ⁵⁰KENNEDY, J.C.; POTTIER, R.H.; PROSS, R.H. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. ***Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology***, n.6, p.143-148, 1990.
- ⁵¹SCHLEIER, P.; BERNDT, A.; KOLOSSA, S.; ZENK, W.; HYCKEL, P.; SHULTZE-MOSGAU, S. Comparison of aminolevulinic acid (ALA)-thermogel-PDT with methyl-ALA-thermogel-PDT in basal cell carcinoma. ***Photodiagnosis and Photodynamic Therapy***, v.4, p.197-201, 2007.
- ⁵²MARMUR, E.S.; SCHMULTS, C.D.; GOLDBERG, D.J. A review of laser and photodynamic therapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer. ***Dermatologic Surgery***, v.30, n.2, p.264-271, 2004.

-
- ⁵³KRAMMER, B.; PLAETZER, K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v.07, p.283-289, 2008.
- ⁵⁴FUKUDA, H.; CASAS, A.; BATTLE, A. Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.37, p.272-276, 2005.
- ⁵⁵EMILIO, C.R.; VITURI, F.; DAGLI, M.L.Z.; DUTRA, .; BECHARA, E.J.H.; GIOSO, M.A.; PINOTTI, M.; BAGNATO, V.S.; ZECELL, D.M. Utilização do ácido 5-aminolevulínico na terapia fotodinâmica em carcinoma espinocelular felino. In: Terapia fotodinâmica: Integração dos Aspectos Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área de Saúde, 03-06 junho, 2007, São Pedro. **PDT 2007 – resumos**, São Pedro, 2007, p.43-44.
- ⁵⁶PENG, Q.; SOLER, A.M.; WARLOE, T.; NESLAND, J.M.; GIERCKSKY, K.E. Selective distribution o porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.62, p.140-145, 2001.
- ⁵⁷KENNEDY, J.C.; MARCUS, S.T.; POTTIER, R.H. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanism and clinical results. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v.14, n.05, p.289-304, 1996.
- ⁵⁸U.S. Food and Drug Administration Approved Drug Products: banco de dados. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>. Acesso em: 16 jun. 2008.
- ⁵⁹Agência Nacional de Vigilância Sanitária: banco de dados. Disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/rconsulta_produto_detalhe.asp. Acesso em: 16 jun. 2008.
- ⁶⁰Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Compêndio de Produtos Veterinários: banco de dados. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 16 jun. 2008.
- ⁶¹CASAS, A.; FUKUDA, H.; DI VENOSA, G.; BATTLE, A. Photosensitization and mechanism of cytotoxicity induced by the use of ALA derivatives in photodynamic therapy. *British Journal of Cancer*, v.85, n.2, p.279-284, 2001.
- ⁶²ANGELL-PETERSEN, E.; SORENSEN, R.; WARLOE, T.; SOLER, A.M.; MOAN, J.; PENG, Q.; GIERCKSKY. Porphyrin formation in actinic keratosis and basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *Journal of Investigative Dermatology*, n.126, p. 265-271, 2005.

-
- ⁶³EMILIO, C.R.; DAGLI, M.L.Z.; DUTRA, F.; BECHRA, E.J.H.; GIOSO, M.A.; LARSSON, C.E.; PINOTTI, M.; ZECELL, D.M. Terapia fotodinâmica no tratamento de carcinoma espinocelular em felinos. In: IV ONCOVET – II Simpósio de Oncologia Veterinária, 05-07 maio, 2006, São Paulo. **Programas e Resumos: IV ONCOVET e Simpósio de Oncologia Veterinária**, São Paulo, 2006, p.22-22.
- ⁶⁴HORN, M.; WOLF, P.; WULF, H.C.; WARLOE, T.; FRITSCH, C.; RHODES, L.E.; KAUFMANN, H.; DE RIE, M.; LEGAT, F.J.; STENDER, I.M.; SOLÉR, A.M.; WENNERBERG, A.M.; WONG, G.A.E.; LARKÖ, O. Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy in patients with basal cell carcinoma prone to complications and poor cosmetic outcome with conventional treatment. **British Journal of Dermatology**, v.149, p.1242-1249, 2003.
- ⁶⁵SOLER, A.M.; WARLOE, T.; BERNER, A.; GIERCKSKY, K.E. 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. **British Journal of Dermatology**, v.145, p. 467-471, 2001.
- ⁶⁶EMILIO, C.R.; BECHARA, E.J.H.; DAGLI, M.L.Z.; DUTRA, F.; GIOSO, M.A.; PINOTTI, M.; ZECELL, D.M. Photodynamic therapy of feline squamous cell carcinoma with methyl 5-aminolevulinate. In: Free Radicals in Montevideo 2007, 02-06 setembro, 2007, Montevideu. **Book of abstracts**, Montevideu, Imprensa Gega, 2007, p.16-16.
- ⁶⁷BRANCALEON, L.; MOSELEY H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v.17, p.173-186, 2002.
- ⁶⁸JUZENIENE, A.; JUZENAS, P.; MA, L.W.; IANI, V.; MOAN, J. Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v.19, p.139-149, 2004.
- ⁶⁹REEDS, K.B.; RIDGWAY, T.D.; HIGBEE, R.G.; LUCROY, M.D. Non-coherent light for photodynamic therapy of superficial tumours in animals. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.02, n.03, p.157-163, 2004.
- ⁷⁰BETTENAY, S. Feline cutaneous neoplasia: a clinician's approach to diagnosis. **Veterinary Medicine**, v.89, p.1133-1140, 1994.
- ⁷¹SCOTT, D.W. Feline Dermatology: 1979-1982: introspective retrospections. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 20, p.537-564, 1984.
- ⁷²ORTONNE, J.P. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. **British Journal of Dermatology**, v.146, n.61, p.20-23, 2002.
- ⁷³TSAO, h. Genetics of nonmelanoma skin cancer. **Archives of Dermatology**, v.137, p.1486-1492, 2001.

-
- ⁷⁴GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K. ***Skin diseases of the dog and cat – clinical and histopathologic diagnosis***. 2^a edição. Oxford. Blackwell Publishing, 2005. p. 581-589.
- ⁷⁵WALDER, E.J. Comparative aspects of nonmelanoma skin cancer. ***Clinics in Dermatology***, v.13, p.569-578, 1995.
- ⁷⁶GOMES, L.A.M.; FERREIRA, A.M.R.; ALMEIDA, L.E.F.; ALMEIDA, E.P. Squamous cell carcinoma associated with actinic dermatitis in seven white cats. ***Feline Practice***, v.28, n.2, p.14-16, 2000.
- ⁷⁷THOMSON, M. Squamous cell carcinoma of the nasal planum in cats and dogs. ***Clinical Techniques in Small Animal Practice***, v.22, p.42-45, 2007.
- ⁷⁸CARPENTER, J.L.; ANDREWS, L.K.; HOLZWORTH, J. ***Diseases of the Cat – Medicine & Surgery***. 1a. edição. Filadélfia. W.B. Saunders Company, 1987. Cap.11, p.406-407.
- ⁷⁹GOODFELLOW, M.; HAYES, A.; MURPHY, S. A retrospective study of ⁹⁰strontium plesiotherapy for feline squamous cell carcinoma of the nasal planum. ***Journal of Feline Medicine and Surgery***, v.8, p.169-176, 2006.
- ⁸⁰MELZER, K.; GUSCETTI, F.; BLEY, C.R.; SUMOVA, A.; ROOS, M.; KASERHOTZ, B. Ki67 reactivity in nasal and periocular squamous cell carcinomas in cats treated with electron beam radiation therapy. ***Journal of Veterinary Internal Medicine***, v.20, p.676-681, 2006.
- ⁸¹LANA, S.E.; OGILVIE, G.K.; WITHROW, S.J.; STRAW, R.C.; ROGERS, K.S. Feline cutaneous squamous cell carcinoma of the nasal planum and the pinnae: 61 cases. ***Journal of the American Animal Hospital Association***, n.33, p.329-332, 1997.
- ⁸²BROWN, P.J.; HOARE, C.M.; ROCHLITZ, I. Multiple squamous cell carcinoma of the digits in two cats. ***Journal of Small Animal Practice***, v.26, p.323-328, 1985.
- ⁸³NELSON, R.W.; COUTO, C.G. ***Medicina Interna de Pequenos Animais***. 2^a edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1998. Cap. 85, p. 910-920.
- ⁸⁴ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. ***Textbook of Veterinary Internal Medicine – Vol. 1***. 5a. edição. Filadélfia. W.B. Saunders Company, 2000. Cap. 99, p.523-528.
- ⁸⁵KAWAHIRA, K. Immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in malignant and nonmalignant skin diseases. ***Archives of Dermatologic Research***, v.291, p.413-418, 1999.

-
- ⁸⁶LEE, J.J.; KUO, M.Y.; CHENG, S.J.; CHIANG, C.P.; JENG, J.H.; CHANG, H.H.; KUO, Y.S.; LAN, W.H.; KOK, S.H. Higher expressions of p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in atrophic oral lichen planus and patients with areca quid chewing. ***Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics***, v. 99, p.471-478, 2005.
- ⁸⁷KINUGASA, S.; TACHIBANA, M.; HISHIKAWA, Y.; ABE, S.; YOSIMURA, H.; MONDEN, N.; DHAR, D.K.; NAGASUE, N. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in squamous cell carcinoma of the esophagus. ***Japanese Journal of Clinical Oncology***, v.26, n.6, p.405-410, 1996.
- ⁸⁸MOLDOVAN, G.L.; PFANDER, B.; JENTSCH, S. PCNA, the maestro of the replication fork. ***Cell***, v.129, p.665-679, 2007.
- ⁸⁹EINSPAHR, J.G.; ALBERTS, D.S.; AICKIN, M.; WELCH, K.; BOZZO, P.; LEVINE, N.; GROGAN, T. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen as a surrogate end point biomarker in actinic keratosis and adjacent, normal-appearing, and non-sun-exposed human skin samples. ***Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention***, v.05, p.343-348, 1996.
- ⁹⁰LEE, J.J.; KUO, M.Y.; CHENG, S.J.; CHIANG, C.P.; JENG, J.H.; CHANG, H.H.; KUO, Y.S.; LAN, W.H.; KOK, S.H. Higher expressions of p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in atrophic oral lichen planus and patients with areca quid chewing. ***Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology***, v.99, n.4, p.471-478, 2005.
- ⁹¹MOTIWALE, L.; INGLE, A.D.; RAO, K.V.K. Mouse skin tumor promotion by sodium arsenate is associated with enhanced PCNA expression. ***Cancer Letters***, v.223, p.27-35, 2005.
- ⁹²EINSPAHR, J.G.; XU, M.J.; WARNEKE, J.; SABODA, K.; RANGER-MOORE, J.; BOZZO, P.; DUCKETT, L.; GOLDMAN, R.; LIN, P.; BUCKMEIER, J.; ALBERTS, D.S. Reproducibility and expression of skin biomarkers in sun-damaged skin and actinic keratoses. ***Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention***, v.15, n.10, p.1841-1848, 2006.
- ⁹³BROWN, N.O.; HAYES, A.A.; MOONEY, S.; PATNAIK, A.K.; HARVEY, H.J.; MACEWEN, E.G. Combined modality therapy in the treatment of solid tumors in cats. ***Journal of the American Animal Hospital Association***, n.16, p.719-722, 1980.
- ⁹⁴MILLER, M.A.; NELSON, S.L.; TURK, J.R.; PACE, L.W.; BROWN, T.P.; SHAW, D.P.; FISCHER, J.R.; GOSSER, H.S. Cutaneous neoplasia in 340 cats. ***Veterinary Pathology***, n.28, p.389-395, 1991.
- ⁹⁵FOX, L.E. Feline cutaneous and subcutaneous neoplasms. ***Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice***, v.25, n.04, p.961-979, 1995.
- ⁹⁶HEMMINKI, K.; DONG, C. Familial relationship in squamous cell carcinoma of the skin. ***Epidemiology***, v.11, n.3, p.309-314, 2000.

-
- ⁹⁷HEMMINKI, K.; ZHANG, H.; CZENE, K. Time trends and familial risks in squamous cell carcinoma of the skin. *Archives of Dermatology*, v.139, p.885-889, 2003.
- ⁹⁸MORIELLO, K.A.; ROSENTHAL, R.C. Clinical approach to tumors of the skin and subcutaneous tissues. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.20, n.04, p.1163-1191, 1990.
- ⁹⁹DHALIWAL, R.S.; KUFUOR-MENSAH, E. Metastatic squamous cell carcinoma in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, n.9, p.61-66, 2007.
- ¹⁰⁰HOSKINS, G. *Geriatrics & Gerontologia – Cão e Gato*. 1^a. edição. São Paulo. Roca, 1999. Cap. 16, p. 365-392.
- ¹⁰¹MARKHAM, R.W.; HODGKINS, E.M. Geriatric nutrition. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.19, n.1, p.165-185, 1989.
- ¹⁰²PUGLIESE, A.; GRUPPILLO, A.; DI PIETRO, S. Clinical nutrition in gerontology: chronic renal disorders of the dog and cat. *Veterinary Research Communications*, v.29, n.2, p.57-63, 2005.
- ¹⁰³RUSSEL, K.; LOBLEY, G.E.; RAWLINGS, J.; MILLWARD, D.J.; HARPER, E.J. Urea Kinetics of a carnivore, *Felis silvestris catus*. *British Journal of Nutrition*, n.84, p.597-604, 2000.
- ¹⁰⁴SUTHERLAND, R.J. Biochemical evaluation of the hepatobiliary system in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.19, n.5, p.899-927, 1989.
- ¹⁰⁵DIAL, S.M. Clinicopathologic evaluation of the liver. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.25, n.2, 1995.
- ¹⁰⁶HAWROT, A.; ALAM, M.; RATNER, D. Squamous Cell Carcinoma. *Current Problems in Dermatology*, v.15, p.85-134, 2003.
- ¹⁰⁷HUTSON, C.A.; RIDEOUT, B.A.; PEDERSEN, N.C. Neoplasia associated with feline immunodeficiency virus infection in cats of Southern California. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.199, n.10, p.1357-1362, 1991.
- ¹⁰⁸ROCHA, M.E.; FERREIRA, A.M.D.C.; BECHARA, E.J.H. Roles of phosphate and enoyl radical in ferritin iron mobilization by 5-aminolevulinic acid. *Free Radical Biology & Medicine*, v.29, n.12, p.1272-1279, 2000.
- ¹⁰⁹ROCHA, M.E.M.; DUTRA, F.; BANDY, B.; BALDINI, R.L.; GOMES, S.L.; FALJONI-ALÁRIO, A.; LIRIA, C.W.; MIRANDA, M.T.; BECHARA, E.J.H. Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid. *Archives of Biochemistry*, n.409, p.349-356, 2003.

-
- ¹¹⁰YANASE, S.; NOMURA, J.; MATSUMURA, Y.; NAGAI, K.; KINOSHITA, M.; NAKANISHI, H.; OHNISHI, Y.; TOKUDA, T.; TAGAWA, T. Enhancement of the effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy by simultaneous hyperthermia. ***International Journal of Oncology***, n.27, p.193-201, 2005.
- ¹¹¹DRAGIEVA, G.; PRINZ, B.M.; HAFNER, J.; DUMMER, R.; BURG, G.; BINSWANGER, U.; KEMPF, W. A randomized controlled clinical trial of topical photodynamic therapy with methyl aminolaevulinate in the treatment of actinic keratoses in transplant recipients. ***British Journal of Dermatology***, n.151, p. 196-200, 2004.
- ¹¹²SZEIMIES, R.M.; KARRER, S.; RADAKOVIC-FIJAN, S.; TANEW, A.; CALZAVARA-PINTON, P.G.; ZANE, C.; SIDOROFF, A.; HEMPEL, M.; ULRICH, J.; PROEBSTLE, T.; MEFFERT, H.; MULDER, M.; SALOMON, D.; DITTMAR, H.C.; BAUER, J.W.; KERNLAND, K.; BRAATHEN, I. Photodynamic therapy using topical methyl-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: a prospective, randomized study. ***Journal of the American Academy of Dermatology***, n.47, p. 258-262, 2002.
- ¹¹³VINCIULLO, C.; ELLIOTT, T.; FRANCIS, D.; GEBAUER, K.; SPELMAN, L.; NGUYEN, R.; WEIGHTMAN, W.; SHERIDAN, A.; REID, C.; CZARNECK, D.; MURRELL, D. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for 'difficult-to-treat' basal cell carcinoma. ***British Journal of Dermatology***, n.152, p.765-772, 2005.
- ¹¹⁴KASCHE, A.; LUDERSCHMIDT, S.; RING, J.; HEIN, R. Photodynamic therapy induces less pain in patients treated with methyl aminolevulinate compared to aminolevulinic acid. ***Journal of Drugs in Dermatology***, v.5, n.4, p. 353-356, 2006.
- ¹¹⁵MWIEGELL, S.R.; STENDER, I.M.; NA, R.; WULF, H.C. Photodynamic therapy with MAL or ALA on tape-stripped normal skin: na evaluation of patient's pain. ***British Journal of Dermatology***, n.153, n.1, p-28-28, 2005.
- ¹¹⁶RUD, E.; GEDERAAS, O.; HOGSET, A.; BERG, K. 5-Aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters. ***Photochemistry and Photobiology***, v.71, n.05, p.640-647, 2000.
- ¹¹⁷WULF, H.C.; PHILIPSEN, P. Allergic contact dermatitis to 5-aminolaevulinic acid methylester but not to 5-aminolaevulinic acid after photodynamic therapy. ***British Journal of Dermatology***, n.150, p.143-145, 2004.
- ¹¹⁸HARRIES, M.J.; STREET, G.; GILMOUR, E.; RHODES, L.E.; BECK, M.H. Allergic contact dermatitis to methyl aminolevulinate (Metvix®) cream used in photodynamic therapy. ***Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine***, n.23, p.35-36, 2007.

-
- ¹¹⁹HOHWY, T.; ANDERSEN, K.E.; SOLVSTEN, H.; SOMMERLUND, M. Allergic contact dermatitis to methyl aminolevulinate after photodynamic therapy in 9 patients. **Contact Dermatitis**, v.57, p.321-323, 2007.
- ¹²⁰JUNGERSTED, J.M.; DAM, T.N.; BRYLD, L.E.; AGNER, T. Allergic reactions to Metvix® (ALA-ME). **Contact Dermatitis**, v.58, p.184-186, 2008.
- ¹²¹VINCK, E.; VINCK, H.; CAGNIE, B.; CAMBIER, D. Photodynamic therapy of feline superficial squamous cell carcinoma. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v.73, p.424-428, 2004.
- ¹²²HADDAD, R.; NESHER, E.; WEISS, J.; SKORNICK, Y.; KASHTAN, H. Photodynamic therapy for Bowen's disease and squamous cell carcinoma of the skin. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.01, p.225-230, 2004.
- ¹²³CLARK, C.; BRYDEN^a; DAWE, R.; MOSELEY, H.; FERGUSON, J.; IBBOTSON, S.H. Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparison of light sources. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v.19, p.134-141, 2003.
- ¹²⁴OOSTEN, E.J.; KUJIPERS, D.I.M.; THISSEN, M.R.T.M. Different pain sensations in photodynamic therapy of nodular basal cell carcinoma – results from a prospective Trial and a review of the literature. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.03, n.61-68, 2006.
- ¹²⁵PAGLIARO, J.; ELLIOTT, T.; BULSARA, M.; KING, C.; VINCIULLO, C. Cold air analgesia in photodynamic therapy of basal cell carcinomas and Bowen's disease: an effective addition to treatment: a pilot study. **Dermatologic Surgery**, n.30, p.63-66, 2004.
- ¹²⁶HOLMES, M.V.; DAWE, R.S.; FERGUSON, J.; IBBOTSON, S.H. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the efficacy of tetracaine gel (Ametop®) for pain relief during topical photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, n.150, p.337-340, 2004.
- ¹²⁷MIKOLAJEWSKA, P.; JUZENIENE, A.; MOAN, J. The effect of lidocaine on PpIX photobleaching and outcome of ALA-PDT in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.04, p.249-253, 2007.
- ¹²⁸THÉON, A.P.; MADEWELL, B.R.; SHEARN, V.I.; MOULTON, J.E. Prognostic factors associated with radiotherapy of squamous cell carcinoma of the nasal plane in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.206, n.7, p.991-996, 1995.
- ¹²⁹ADAMEK, M.; KAWCZYK-KRUPKA, A.; MOSTOWY, A.; CZUBA, Z.; KROL, W.; KASPERCZYK, S.; JAKOBISIAK, M.; GOLAB, J.; SIERON, A. Topical ALA-PDT modifies neutrophils' chemiluminescence, lymphocytes' interleukin-1 beta secretion and serum level of transforming growth factor beta 1 in patients with nonmelanoma skin malignancies – a clinical study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.02, p.65-72, 2005.

-
- ¹³⁰KUIJPERS, D.I.; THISSEN, M.R.; THISSEN, C.A.; NEUMANN, M.H. Similar effectiveness of methyl aminolevulinate and 5-aminolevulinate in topical photodynamic therapy for nodular basal cell carcinoma. ***Journal of Drugs in Dermatology***, v.05, n.07, p.642-645, 2006.
- ¹³¹NINOMIYA, Y.; ITOH, Y.; TAJIMA, S.; ISHIBASHI, A. In vitro and in vivo expression of protoporphyrin IX induced by lipophilic 5-aminolevulinic acid derivatives. ***Journal of Dermatological Science***, n.27, p.114-120, 2001.
- ¹³²MORTON, C.A., FRASER, C.; LEMAN, J.A.; SMITH, B. Effects of protocol variation on response rate of superficial basal cell carcinoma to topical photodynamic therapy. ***British Journal of Dermatology***, v.153, n.1, p.25-25, 2005.
- ¹³³FRIMBERGER, A.E.; MOORE, A.S.; CINCOTTA, L.; COTTER, S.M.; FOLEY, J.W. Photodynamic therapy of naturally occurring tumors in animals using a novel benzophenothiazine photosensitizer. ***Clinical Cancer Research***, n.4, p.2207-2218, 1998.
- ¹³⁴PEASTON, A.E.; LEACH, M.W.; HIGGINS, R.J. Photodynamic therapy for nasal and aural squamous cell carcinoma in cats. ***Journal of the American Veterinary Medical Association***, v.202, n.8, p.1261-1265, 1993.
- ¹³⁵MORTON, C.A. How to optimize topical photodynamic therapy in dermatology. ***Photodiagnosis and Photodynamic Therapy***, v.03, p.112-115, 2006.
- ¹³⁶MOSELEY, H.; BRANCALEON, L.; LESAR, A.E. Does surface preparation alter ALA uptake in superficial non-melanoma skin cancer *in vivo*? ***Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine***, v.24, p.72-75, 2008.
- ¹⁴⁷Igami, M.P.Z.; Zarpelon, L.M.C. (Org). ***Guia para a elaboração de dissertações e teses***: preparado para orientação dos alunos de Pós-graduação do IPEN. São Paulo: IPEN, Divisão de Informação e Documentação Científicas, 2002.

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](#)