

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA

**TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR CLORETO ALUMÍNIO FTALOCIANINA EM
NANOEMULSÕES PARA TRATAMENTO DE PACIENTES COM QUEILITE ACTÍNICA:
ANÁLISE CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA**

ELIZIÁRIO CESAR DE VASCONCELOS LEITÃO

Tese de Doutorado submetido ao Programa de Pós-graduação em Nanociências e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador : Ricardo Bentes de Azevedo

BRASÍLIA, DF 2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

Tese de Doutorado

Eliziário Cesar de Vasconcelos Leitão

Título:

“Terapia Fotodinâmica mediada por Cloreto Alumínio Ftalocianina em nanoemulsão para tratamento de pacientes com queilite actínica: análise clínica e histopatológica.”

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Presidente

Unb/PGnano

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlman

Membro Titular Interno Vinculado Programa Unb/Nano

Prof. Dr. Marcelo Haas Vilas Boas

Membro Titular não Vinculado

Programa Unb/PGNano

Prof. Dr. João Geraldo Bugarin Jr

Membro Titular não vinculado

Programa Unb/PGNano

Com muito amor, dedico este trabalho...

Aos meus pais e alicerces do meu caráter, Deusdedit de Vasconcelos Leitao (In memoriam) e Maria Jose Cesar de Vasconcelos, a qual devo com todas as minhas forças, a minha vida e meu caráter.

Ao minha esposa, Soyama, maior fonte de inspiração em tudo que faço.

Aos meus filhos Mateus Brasileiro Leitao, Lucas Brasileiro Leitao e Marina Brasileiro Leitao, que resumem a força e orgulho do meu viver.

Meus irmão e irmãs consanguíneos Rui, Rita, Fátima, Elza, Nizia, Wilton e Wilson.

Vocês foram a força que precisei para prosseguir nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, por estar sempre presente e me ajudando a superar todas as dificuldades. Foi uma mão estendida nos momentos difíceis nessa caminhada acadêmica

Ao Prof. Dr. João Paulo Longo, amigo e colega de profissão pelo exemplo de entusiasmo e pela confiança.

Ao Prof. Dr. Luis Muhelmann pelo auxílio na confecção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Guilherme Gelfuso da Universidade de Brasília, que propiciou um auxílio indispensável no trabalho de permeação.

À Professora Carol, pela orientação na análise estatística.

À Dra Jussara campos e Dra Themis Lima Diaz que em determinado momento foram minhas chefes na Unidade de Odontologia do Hran, me ajudaram na compreensão deste estudo.

Aos colegas Dr. Alesso Cervantes Sartorelli e Dr. Luis Eduardo de Almeida Prado Franceschi, por abrir as portas do laboratório Diagnose e pela recepção simpática.

Ao Dra Fernanda e Dra Walkiria médicas patologistas, pela colaboração indispensável examinando as lâminas para o exame histopatológico nesse trabalho.

À todos queridos amigos e funcionários da Anatomia Patológica do Hran .

À Dra Isabel (In memorin) médica patologista do Hran, que me incentivou a começar esta jornada acadêmica com o mestrado.

Aos demais odontólogos, técnicos e funcionários da Unidade de Odontologia do HRAN que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

A felicidade aparece para aqueles que choram.

Para aqueles que se machucam.

Para aqueles que buscam e tentam sempre.

E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.

(Clarice Lispector)

RESUMO

A queilite actínica (QA) é uma lesão potencialmente maligna extremamente frequente e considerada precursora da grande maioria dos cânceres de lábio, em pacientes não fumantes. A etiologia da QA permite medidas preventivas de fotoproteção solar, porém, grande parte da população não as utiliza em função do desconhecimento do risco potencial e falta de informação. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade importante não invasiva no tratamento de casos selecionados de queilite actínica, frequente em humanos. A eficácia da TFD no tratamento da QA não está bem estabelecida na literatura. A melhora da ação dos agentes fotossensibilizantes em termos de especificidade, potência e penetração cutânea constitui uma importante perspectiva para o aprimoramento da TFD. O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta terapêutica da Terapia Fotodinâmica com uma nanoemulsão de Cloreto Alumínio Ftalocianina (CIAIFt), incorporado em nanoemulsão/gel polimérica para o tratamento clínico da Queilite Actínica com displasias leves e moderada em lábio inferior. Fragmentos de tecido foram retirados de cada caso, coradas com Hematoxilina e eosina (HE) e analisadas as amostras representativas das lesões, antes e após a TFD. O período de oclusão foi de 15 minutos. Como fonte de luz foi utilizado o Led, comprimento de onda de 660 nm, potência 51.5 mW/cm², fluência 30.92 J/cm², durante 10 minutos, com distância de 10 cm. Foram selecionados pacientes que procuraram a Clínica de Estomatologia do HRAN e apresentavam sinais clínicos sugestivos de QA. Dez pacientes compuseram a casuística do trabalho, 09 homens e 1 mulher, com idade média de 56,8 anos. As análises histopatológicas foram obtidas antes e depois da terapia fotodinâmica. Os principais efeitos adversos foram: ardência, dor e edema de padrão moderado que persistiram por 3 a 4 dias após a aplicação da TFD. Na avaliação final, não houve melhora clínica observada, entretanto, 50 % dos pacientes que relataram ardência antes da terapia, observaram melhora significativa neste quesito. A análise histopatológica não mostrou diminuição significativa da displasia. Não houve correlação significativa entre o nível de displasia com a impressão subjetiva de melhora clínica. Concluimos que a utilização da Nanoemulsão de Cloreto Alumínio Ftalocianina produz parcial melhora dos sintomas da ardência, sem contudo, melhora clínica e histopatológica.

Palavras-chave: Queilite actínica. Terapia Fotodinâmica. Tratamento da queilite actínica. Nanotecnologia

ABSTRACT

Actinic cheilitis (AK) is an extremely frequent potentially malignant lesion and is considered to be the precursor of the vast majority of lip cancers in non-smokers. The etiology of QA allows preventive measures of solar photoprotection, however, a large part of the population does not use them due to lack of knowledge of potential risk and lack of information. Photodynamic therapy (PDT) is an important noninvasive modality in the treatment of selected cases of actinic cheilitis, which is common in humans. The efficacy of PDT in the treatment of AK is not well established in the literature. The improvement of the action of the photosensitizing agents in terms of specificity, potency and skin penetration is an important perspective for the improvement of PDT. The objective of the present study was to evaluate the therapeutic response of Photodynamic Therapy with a nanoemulsion of Aluminum Chloride Phthalocyanine (ClAlFt), incorporated in nanoemulsion / polymer gel for the clinical treatment of Actinic Cheilitis with mild and moderate lower lip dysplasia. Tissue fragments were removed from each case stained with hematoxylin and eosin (HE) and the representative samples of the lesions were analyzed before and after PDT. The occlusion period was 15 minutes. As light source, the LED was used, wavelength 660 nm, power 51.5 mW / cm², creep 30.92 J / cm², for 10 minutes, with a distance of 10 cm. Patients were selected who sought the HRAN Stomatology Clinic and presented clinical signs suggestive of QA. Ten patients comprised the casuistry of the work, 09 men and 1 woman, with average age of 56.8 years. Histopathological analyzes were obtained before and after photodynamic therapy. The main adverse effects were mild burning, pain and pattern swelling that persisted for 3 to 4 days after the application of the therapy. In the final evaluation, there was no clinical improvement observed, however, 50% of patients who reported burning prior to therapy observed improvement in this regard. Anatomopathological analysis did not show a significant decrease in dysplasia. There was no significant correlation between the level of dysplasia and the subjective impression of clinical improvement. We conclude that the use of the Aluminum Chloride Nanoemulsion Phthalocyanine produces a partial improvement of the burning symptoms, without, however, clinical and histopathological improvement.

Keywords: Actinic cheilitis. Photodynamic Therapy. Treatment of actinic cheilitis. Nanotechnology

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---------------------------------------|
| EC | Etrato Córneo |
| QA | Queilite Actínica |
| CEC | Carcinoma Espino-celular |
| UV | Ultra-violeta |
| AK | Queratose Actínica |
| PDT | Photodynamic Therapy |
| CIAIFt | Cloreto Alumínio Ftalocianina |
| UV | Ultra-violeta |
| μm | Micrômetro |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| FU | Fluorouracil |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| Er:YAG | Erbium-doped yttrium aluminium garnet |
| Nm | Nanômetro |
| AINE | Antiinflamatório Não Esteróide |
| COX | Cicloxigenase |
| 5-ALA | Ácido 5-aminolevulínico |
| MAL | Metilaminolevulinato |
| TFD | Terapia Fotodinâmica |
| ERO | Espécie Reativa de Oxigênio |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |

| | |
|--------|--|
| FS | Fotossensibilizador |
| EPR | Enhanced permeability and retention effect |
| mTHPC | meta-tetrahydroxyphenyl clorina |
| ZnPc | Zinco Ftalocianina |
| PVM/MA | ácido maléico e polivinilmetil-éter |
| NCNM | Neoplasias cutâneas não melanocíticas |
| PDL | Pulsed dye laser |
| PpIX | Protoporfirina 9 |
| DPM | Doença potencialmente maligna |
| Ph | potencial Hidrogeniônico |
| RPM | Rotações por minute |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| EP | Epiderme viável |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| LED | Luz emitida por diodo |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da pele. Fonte: Adaptado de MENON, 2002.

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura e componentes funcionais do estrato córneo. Adaptado de HARDING, 2004.

Figura 3 - Camadas da epiderme e os diferentes tipos celulares. Imagem de fundo obtida em <https://www.todamateria.com.br/pele-humana/>

Figura 4 - Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias através do estrato córneo. Fonte: adaptado de BARRY, 2001.

Figura 5 - Superfície externa do lábio. Maior aumento. Imagem de fundo obtida em <http://histoufjf.blogspot.com.br/2013/06/labio-lamina-02.html>

Figura 6 - Critérios arquiteturais e citológicos preconizados pela OMS (BARNES et al., 2005) para o diagnóstico de displasia epitelial.

Figura 7 - Critérios preconizados pela OMS (BARNES et al., 2005) para a classificar o grau de displasia epitelial oral.

Figura 8 - Classificação das displasias epiteliais segundo a OMS. A- Ausências de displasia ; B- Displasia leve, C- Displasia moderada , D- Displasia intensa. (BARNES et al, 2005).

Figura 9 - Estrutura molecular das Ftalocianinas

Figura 10- Célula de Franz modificada com mucosa de porco separando o compartimento doador do compartimento receptor.

Figura 11- Curva padrão do CIAIFt

Figura 12A, 12B E 12C - Fotos ilustrativas da apresentação clínica da QA em três participantes da pesquisa. Em momentos prévios a aplicação do fotosensibilizante. Destaca-se a atrofia labial e o eritema das lesões observadas nas fotos (Fotografias de autoria do pesquisador).

Figura 13A E 13B - Fotos ilustrativas do processo de CIAIFt TFD em dois participantes da pesquisa. Na foto, presença do fotosensibilizante, em região labial inferior, anteriormente a aplicação da luz. Observa-se a presença do Top Dam, um protetor de barreira gengival

fotopolimerizável, evitando a inclinação do fotosensibilizante para a mucosa bucal, retendo-o exclusivamente sobre o epitélio labial (Fotografias de autoria do pesquisador).

Figura 14A E 14B- Fotos ilustrativas do processo de CIAIFt TFD em dois participantes da pesquisa. Na foto, 15 dias após a aplicação da luz (Fotografias de autoria do pesquisador).

Figura 15- Fotos ilustrativas do processo de TFD com aparelho LED. (Fotografias de autoria do pesquisador).

Figura 16- Fotos ilustrativas de lâmina histológica de um participante da pesquisa. Na foto, presença do epitélio lábio inferior, anteriormente a aplicação da luz. (Fotografias de autoria do pesquisador).

Figura 17- Fotos ilustrativas de lâmina histológica de um participante da pesquisa. Na foto, em maior aumento presença do epitélio do lábio inferior, anteriormente a aplicação da luz. (Fotografias de autoria do pesquisador).

Figura 18- Fotos ilustrativas de lâmina histológica de um participantes da pesquisa. Na foto, presença do epitélio do lábio inferior, posteriormente a aplicação da luz. (Fotografias de autoria do pesquisador).

Figura 19- Fotos ilustrativas de lâmina histológica de um participante da pesquisa. Na foto, presença do epitélio lábio do inferior, posteriormente a aplicação da luz. (Fotografias de autoria do pesquisador).

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Demonstração dos limites de detecção e quantificação pela CLAE

Tabela 2- Demonstração da retenção do CIAIFt em mucosa suína após o teste permeação da nanoemulsão

Tabela 3- Características dos sujeitos da pesquisa quanto ao sexo, idade (media, mediana, mínimo e máximo) no grupo de tratamento.

Tabela 4- Distribuição das lesões quanto à localização, tamanho e sintomatologia no grupo de tratamento.

Tabela 5- Distribuição na evolução do tratamento nas lesões investigadas.

Tabela 6- Escala de avaliação antes aplicação TFD com CIAIFt

Tabela 7- Escala de avaliação 7 e 30 dias após TFD com CIAIFt

Tabela 8- Graus de displasia segundo análise histopatológica antes e após TFD

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1.INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Queilite Actínica | 15 |
| 1.1.1 Estrutura da pele | 15 |
| 1.1.1.1 Estrato Córneo..... | 16 |
| 1.1.1.2 Epiderme viável | 17 |
| 1.1.1.3 Derme | 18 |
| 1.1.2 Anatomia labial | 18 |
| 1.1.3 Conceitos..... | 19 |
| 1.1.4 Epidemiologia | 20 |
| 1.1.5 Etiologia | 21 |
| 1.1.6 Aspectos histológicos | 22 |
| 1.1.7 Aspectos clínicos..... | 26 |
| 1.1.8 Modalidades terapêuticas..... | 27 |
| 1.2 Terapia Fotodinâmica..... | 32 |
| 1.2.1 Terapia Fotodinâmica com Cloreto Alumínio Ftalocianina..... | 34 |
| 1.3 Uso das Nanopartículas em Nanoemulsão..... | 35 |
| 1.4 Situação da TFD no tratamento da Queilite Actínica | 38 |
| 1.5 Justificativa | 41 |
| 2. OBJETIVOS | 42 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 42 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 42 |
| 3. MATERIAL E MÉTODO | 43 |

| | |
|---|----|
| 3.1 Nanoemulsão | 43 |
| 3.2 Permeação Mucocutânea suína in vitro Ftalocianina..... | 43 |
| 3.2.1 Obtenção e preparo da mucosa..... | 43 |
| 3.2.2 Protocolo de ensaio ex vivo de permeação através da mucosa..... | 43 |
| 3.3 Caracterização do estudo clínico..... | 45 |
| 3.3.1 População e indivíduos do estudo..... | 45 |
| 3.3.2 Critérios de inclusão e exclusão do estudo clínico..... | 45 |
| 3.3.3 Avaliação clínica pré- tratamento..... | 46 |
| 3.3.3.1 Avaliação histológica pré-tratamento..... | 46 |
| 3.3.4 Aplicação da TFD com Cloreto Alumínio Ftalocianina..... | 46 |
| 3.3.5 Análise da resposta terapêutica ao tratamento..... | 47 |
| 3.3.6 Proservação dos pacientes pós TFD..... | 47 |
| 3.3.7 Análise de dados..... | 47 |
| 3.3.8 Implicações éticas..... | 48 |
| 4. Resultados | 49 |
| 4.1 Permeação mucocutânea..... | 49 |
| 4.2 Caracterização clínica da queilite actínica..... | 50 |
| 4.3 Caracterização do processo da TFD..... | 51 |
| 4.4 Caracterização da população amostral investigada..... | 52 |
| 4.5 Caracterização da lesão investigada..... | 52 |
| 4.6 Avaliação da eficácia..... | 53 |
| 5. Discussão..... | 58 |
| 6. Conclusão..... | 64 |

| | |
|---------------------|----|
| 7. Referências..... | 65 |
| 8. Anexos..... | 81 |

1.Introdução

1.1Queilite Actínica

1.1.1 Estrutura da pele

A pele é o maior órgão do nosso corpo, reveste e assegura grande parte das relações entre o meio interno e o externo, sendo considerado o maior e mais pesado sistema dos órgãos. Além disso, atua na defesa e colabora com outros órgãos para o bom funcionamento do organismo, como no controle da temperatura corporal e na elaboração de metabólitos. A pele é um órgão que se caracteriza por apresentar diversas funções como regulação térmica, hídrica, da pressão arterial, percepção sensorial, sendo a sua principal função, a proteção. Se diversifica por envolver diversas proteções, como contra antígenos, radicais livres, além da UV A e B. Sua espessura média é em torno de 0,5 mm (SIMÕES SI, 2004; HANDMAN JG, LIMBIRD LE, GILMAN AG, 2003).

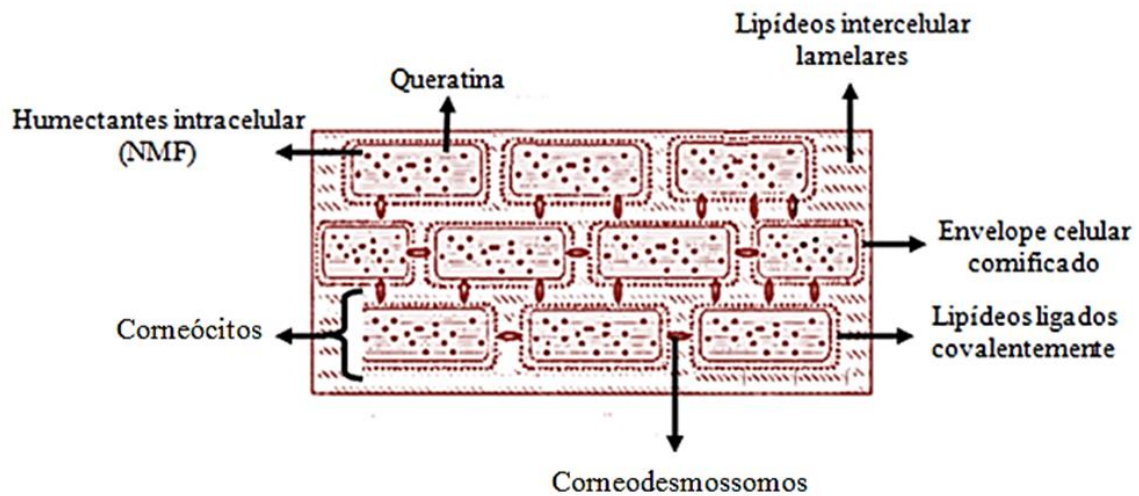


Figura 1- Estrutura da pele.

Fonte: Adaptado de MENON, 2002.

1.1.1.1 Estrato Córneo

O Estrato córneo (Figura 2) é a camada mais externa, e constitui a principal barreira à passagem de substâncias através da pele. É constituída por 15 a 20 camadas de corneócitos, chegando a atingir cerca de 100 camadas em algumas localidades anatômicas como palma das mãos e pés. É a camada mais externa da epiderme e composta principalmente por queratina insolúvel, humectantes intracelulares e revestidas por um envelope celular estabilizado por lipídeos covalentemente ligados e proteínas “cross-linked”. A sua espessura varia de 10-20 μm e sua estrutura pode ser comparada à estrutura de um muro de tijolos. Estas células são achatadas e encontram-se densamente compactadas formando de 10 a 20 camadas. (ASBILL; MICHNIAK, 2000).

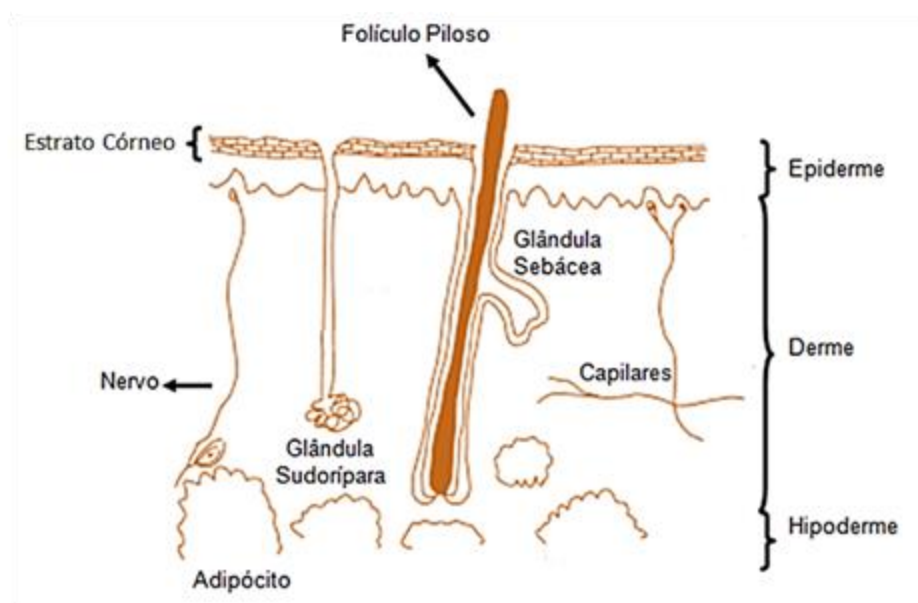


Figura 2- Representação esquemática da estrutura e componentes funcionais do estrato córneo.
Fonte: Adaptado de HARDING, 2004.

Efetivamente os lipídios da matriz intercelular estão organizados em compostos multilamelares, com alternância dos meios hidrofílicos e lipofílicos, o que dificulta a passagem de fármacos por esta camada (SIMÕES SI, 2004). A velocidade e extensão da absorção de fármacos nesta camada dependem da capacidade que estes possuem em interagir com os lipídeos da matriz lipídica (FOLDVARI, 2000). É considerada fundamental para a função proteção da pele, e é amplamente encontrada em todas as espécies. (SUHONEN; BOUWSTRA; URTTI, 1999).

1.1.1.2 Epiderme viável

A composição desta camada se dá pelos queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação, desde a camada basal, mais internamente, até a superfície da pele. A epiderme estratificada, é dividida em quatro camadas distintas: o estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo. O estrato basal é uma camada única de células basais colunares que permanecem aderidas à membrana basal através de hemidesmossomos. Ele é composto por células tronco epidermais que originam as demais. O estrato espinhoso é abundante em desmossomos, sendo caracterizado histologicamente por células de aparência espinhosa. O estrato granuloso é a camada onde estão presentes os grânulos de queratohialina responsáveis pela síntese de queratina (MENON, 2002).

As seguintes células constituem a epiderme: melanócitos, células de Langerhans, células T dendríticas, linfócitos epidermotróficos e células de Merkel (figura 3). (FOLDVARI, 2000).

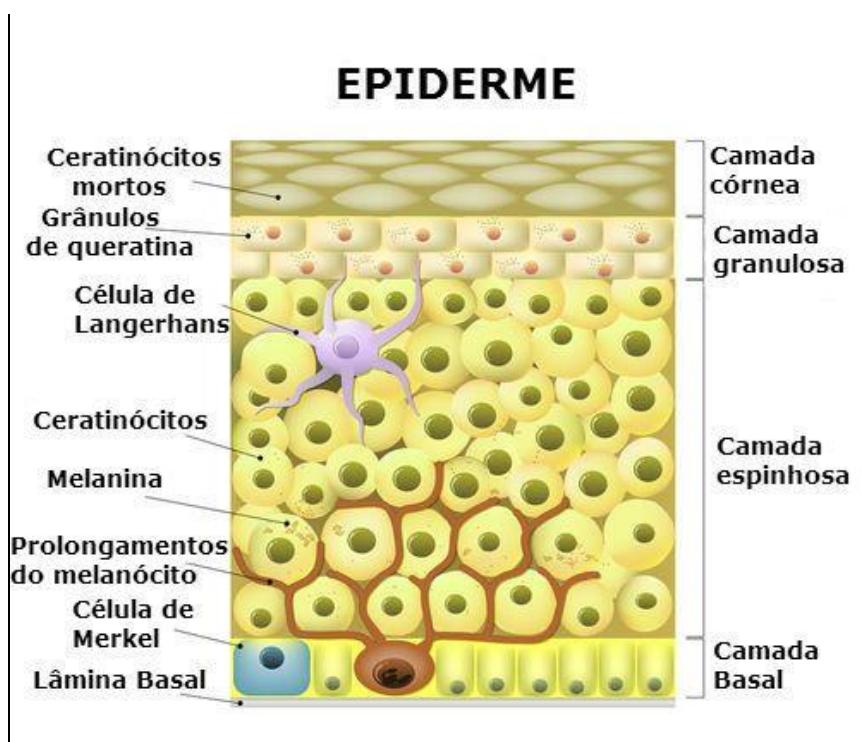


Figura 3- Camadas da epiderme e os diferentes tipos celulares

Fonte: <https://www.todamateria.com.br/pele-humana/>

1.1.1.3 Derme

A derme se constitui basicamente em uma rica rede de capilares, nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. A sua elasticidade está relacionada à presença de uma rede de fibras proteicas que incluem o colágeno I e II, e a elastina, embebidos em uma substância amorfa denominada glicosaminoglicana. Apresenta importantes células na sua constituição como fibroblastos, leucócitos, macrófagos e mastócitos (FOLDVARI, 2000).

De maneira geral, a absorção de fármacos através da pele ocorre passivamente. A absorção transepidérmica envolve a difusão do fármaco através do EC e camadas (figura 4).

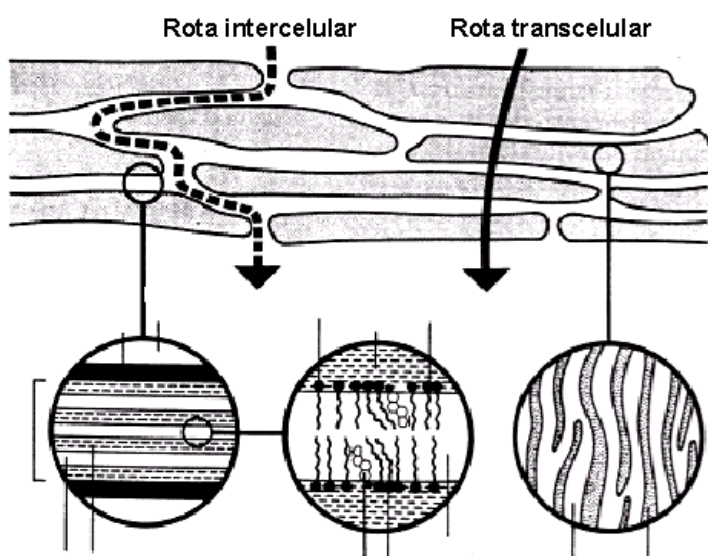


Figura 4- Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias através do estrato córneo.

Fonte: adaptado de BARRY, 2001.

1.1.2 Anatomia Labial

O lábio é dividido anatomicamente em três regiões: a pele da área externa, a zona do vermelhão ou semimucosa, e a mucosa. O lábio superior se estende de sua junção com a columela do nariz até o fórnice superior da boca. O lábio inferior se estende do fórnice inferior da boca até a junção com o mento, no sulco mento labial. A comissura bucal é a zona de encontro dos ângulos da zona superior e inferior do vermelhão do lábio. No vermelhão, possui um rico

suprimento de capilares produzindo a coloração vermelha (figura 5). A zona do vermelhão não contém pêlos ou glândulas sudoríparas e as glândulas sebáceas existem em pequeno número, sendo a membrana mucosa do lábio coberta por um epitélio escamoso estratificado não cornificado (HECHT SS, 2003; CAMPISI G, MARGIOTTA V, 2002).

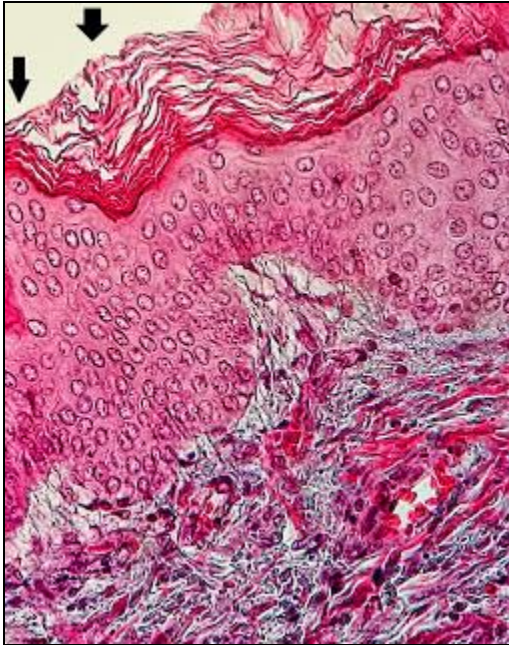


Figura 5- Superfície externa do lábio. Maior aumento

Fonte: <http://histoufjf.blogspot.com.br/2013/06/labio-lamina-02.html>

A disposição antômica do lábio faz com que vermelhão seja frequentemente afetado pela radiação solar, especialmente o lábio inferior, por ser geralmente mais protuso (CAMPISI G, MARGIOTTA V, 2002).

1.1.3 Conceito

Em 1923, Ayres descreveu primeiramente a queilite actínica (QA), como sendo uma desordem inflamatória crônica dos lábios, aparentemente devido aos raios actínicos ou raios ativos quimicamente da luz solar.

A QA é uma condição patológica potencialmente maligna que afeta principalmente o lábio inferior de indivíduos leucodermas, e é causada por exposição à radiação solar crônica e excessiva (CASTINEIRAS I, 2010).

É uma neoplasia intra-epitelial do lábio cujas células apresentam alterações histopatológicas, moleculares e genéticas semelhantes aquelas apresentadas pelos carcinomas espinocelulares (CEC) invasores, conseqüente, principalmente à exposição solar crônica. (MARKOPOULOS A, ALBANIDOU-FARMAKI E, KAYAVIS I, 2004; NICO M, RIVITTI E, LOURENÇO S, 2007).

O lábio inferior é mais afetado que o superior devido à sua localização anatômica naturalmente mais exposta, recebendo diretamente os raios ultravioleta (UV). Afeta mais homens que mulheres, provavelmente devido à aplicação de batons que acabam por proteger os lábios dos raios UV (WOOD NH, 2011; MELROSE RJ, 2001).

A palavra queilite refere-se a uma inflamação dos lábios que pode relacionar-se a muitas causas. A inflamação não está presente necessariamente em todas as análises histológicas. Alguns termos não adequados são utilizados para descrever ou caracterizar as QA, como queratose actínica (AK) ou queratose solar, que são nomenclaturas utilizadas em lesões de pele. Este termo é errôneo, pois queratose é o espessamento da camada de queratina do epitélio, que também nem sempre está presente nos fragmentos de biópsia. Recomenda-se utilizar o termo queilite actínica (QA) para lesões em lábio com alterações clínicas e histológicas no epitélio causadas pela radiação UV podendo levar a transformações malignas (JADOTTE YT, SCHWARTZ RA, 2012a; KAUGARS GE, 1999).

1.1.4 Epidemiologia

A prevalência desta lesão é de 2,4% na população geral e quando o público alvo é composto por pessoas que trabalham expostas ao sol, essa prevalência varia de 15,5% a 16,7%. (HO MW, RISK JM, WOOLGAR JA , 2012; LUCENA EES et al, 2012; MARTINS - FILHO PRS, SILVA LCF, PIVA MR, 2011).

A maior prevalência se situa em trabalhadores mais expostos a irradiação actínica como em trabalhadores rurais, pescadores ou em pacientes com exposição solar intensa, como motoristas, pedreiros, pintores, topógrafos, engenheiros etc; acima dos 40 anos de idade (CAVALCANTE AS, ANBINDER AL, CARVALHO YR, 2008). Por constituir na grande maioria dos casos uma doença assintomática, os pacientes geralmente procuram tratamento em estágio avançado,

quando se manifesta dor, geralmente associada à ulceração, o que muitas vezes já é indicativo da presença do CEC (CAVALCANTE AS, ANBINDER AL, CARVALHO YR, 2008).

Há necessidade de maior exposição à radiação e de intensidade alta para desenvolver das lesões. Por essa razão, a queilite actínica é diagnosticada, na maioria das vezes após os 50 anos de idade, atingindo mais pacientes de cor de pele clara (MARKOPOULOS A, ALBANIDOU-FARMAKI E, KAYAVIS I, 2004; PUKKALA E, MARTINSEN JL, LYNGE E, 2009).

Acomete predominantemente gênero masculino, embora, venha crescendo a incidência em mulheres de forma global, tanto da QA quanto do CEC de lábio. Isso se deve ao fato de mulheres estarem trabalhando mais ao ar livre, em ocupações anteriormente exercidas apenas por homens. A influência do bronzamento que muitas mulheres procuram por vontade própria, em função do tipo de beleza que se encaixa nos padrões estéticos atuais de vários países, também tem sido fator determinante (JADOTTE YT, SCHWARTZ RA, 2012a).

A porcentagem de casos de QA em que se desenvolve lesão carcinomatosa e o tempo decorrido até essa transformação varia muito nas descrições dos autores; 2,5% (DUFRESNE RG, Jr., CURLIM UM, 1997), 11% (SHAH AY, DOHERTY SD, ROSEN T, 2010), ou 16,9% (LEVI A, WULF HC, ENK CD, 2013), mas ainda não existem estatísticas confiáveis para estimar a probabilidade de malignização de uma determinada queilite actínica (ULRICH C et al, 2007). A possibilidade de malignização pode ser maior se forem associados outros fatores carcinogênicos, como o cigarro por exemplo (MARTINS - FILHO PRS, SILVA LCF, PIVA MR. , 2011).

1.1.5 Etiologia

A etiologia da QA está diretamente relacionada à exposição crônica aos raios UV sem barreiras protetoras, principalmente em indivíduos leucodermas, do sexo masculino, acima de 45 anos (JADOTTE YT, SCHWARTZ RA, 2012a). A susceptibilidade à radiação devido à espessura epitelial ser muito fina, e não dispor da proteção de queratina que a pele apresenta, contar com menos melanina e quase nenhuma secreção de proteção por parte das glândulas sebáceas e sudoríparas, pode ser um fator determinante nestes pacientes de etnia branca.

Indivíduos brancos apresentam melanócitos com atividade reduzida, pequenos melanossomas e pouca melanina, o que resulta em maior absorção da radiação pela pele. Sendo assim, indivíduos de pele clara são mais propensos a desenvolver QA (LUCENA EES et al, 2012).

O curto efeito da exposição à luz ultravioleta é transitório, mas seu efeito cumulativo e prolongado produz danos irreversíveis para o lábio das pessoas (MACFARLANE& TEREZHALMY, 1982).

1.1.6 Aspectos histológicos

Os aspectos histopatológicos da QA podem variar, desde hiperkeratose, variados graus de displasias epiteliais até carcinoma in situ do lábio. Desta forma, atipias em células epiteliais relacionadas com displasia epitelial são frequentes, como demonstrado no estudo de Xavier et al. (2009) cujos 40 casos de QA analisados apresentaram pelo menos 3 alterações relativas à displasia epitelial. O epitélio também pode demonstrar microscopicamente hiperplasia, acantose ou atrofia. (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012a).

No interior do tecido conjuntivo, os achados histopatológicos compreendem infiltrado inflamatório de intensidade variada, vasodilatação e elastose solar (degeneração basofílica do tecido colágeno e elástico, causada pela luz solar), sendo esta última uma característica proeminente em tecidos que sofreram danos pela radiação ultravioleta (NICO, M; RIVITTI, EA; LOURENÇO, SV 2007; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008; FREITAS et al, 2011; VIEIRA et al., 2012; ROJAS et al., 2012).

A elastose solar é o traço mais marcante que acomete o tecido conjuntivo próximo ao epitélio, induzido pela luz ultravioleta. Considerando que apenas 5 a 10% da radiação UV é refletida pela pele e mais de 70% é absorvida, a elastose solar talvez promova algum tipo de proteção para os tecidos mais profundos (SAVAGE NW, MCKAY C, FAULKNER C,2010). Os tipos mais afetados pela degradação são os colágenos I e III (MARKOPOULOS A, ALBANIDOU-FARMAKI E, KAYAVIS I,2004)

O estudo de Piñera-Marques et al. (2010), examinou microscopicamente 16 casos diagnosticados clinicamente como QA, dentre os quais 7 casos revelaram displasia moderada à severa, 5 casos mostraram displasia leve e 4 casos já tinham adquirido fenótipo maligno (2 carcinomas in situ e 2 CEC superficialmente invasivos). O características clínicas malignas

também estava estabelecido em 2 das 20 biópsias de QAs analisadas por Martins-Filho. Da Silva e Piva (2011), referem a importância de um exame clínico criterioso, considerando que casos com diagnóstico clínico de QAs podem exibir diagnóstico histopatológico de carcinoma de células escamosas.

Embora a interpretação histopatológica da displasia ainda seja considerada um campo subjetivo, em 2005 a Organização Mundial da Saúde (OMS), usando como base determinados critérios morfológicos (figura 6), classifica a displasia epitelial em leve, moderada e severa (figura 7) (BARNES et al., 2005).

A severidade da displasia epitelial está diretamente relacionada com a progressão para malignidade (WARNAKULASURIYA et al., 2008). De alguma forma, o estabelecimento do grau de severidade em displasias epiteliais se faz necessário para estabelecer um tratamento e prognóstico apropriado.

Figura 6- Critérios arquiteturais e citológicos preconizados pela OMS (BARNES et al., 2005) para o diagnóstico de displasia epitelial.

| CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DE DISPLASIA EPITELIAL | |
|--|--|
| Alterações arquiteturais | Alterações celulares |
| Estratificação epitelial irregular; | Anisonucleose (tamanho anormal do núcleo); |
| Hiperplasia da camada basal; | Pleomorfismo (forma anormal) nuclear; |
| Projeções epiteliais em gotas; | Anisocitose (tamanho anormal da célula); |
| Número aumentado de figuras de mitose; | Pleomorfismo (forma anormal) celular; |
| Mitoses Superficiais; | Hipercromatismo nuclear; |
| Pérolas de ceratina. | Aumento do número e ou tamanhos dos nucléolos. |

Fonte: Adaptado de Warnakulasuriya et al. (2008)

Figura 7- Critérios preconizados pela OMS (BARNES et al., 2005) para classificar o grau de displasia epitelial oral.

| GRAU DE DISPLASIA EPITELIAL | CRITÉRIOS |
|------------------------------------|---|
| LEVE | Alterações na arquitetura epitelial limitada ao terço inferior do epitélio e poucas atipias citológicas. |
| MODERADA | Alterações na arquitetura epitelial estendem-se até o terço médio do epitélio e atipias citológicas em quantidade moderada. |
| SEVERA | Alterações na arquitetura epitelial observadas com quantidade considerada de atipias celular e nuclear. |

Fonte: Adaptado de Warnakulasuriya et al. (2008)

Embora a classificação da displasia epitelial pelo sistema da OMS seja satisfatoriamente utilizada em várias pesquisas, tem sido observada uma variabilidade considerável na interpretação inter e intra-examinadores, sobretudo, nas displasias moderadas cuja conduta clínica normalmente envolve apenas o acompanhamento da lesão (WARNAKULASURIYA et al., 2008).

Kujan et al. (2006) relataram que grande parte das displasias epiteliais moderadas tem um potencial relativo de transformação maligna.

Para atenuar estas discordâncias, tem-se sugerido a redução das categorias na gradação das displasias epiteliais com apenas duas categorias: baixo risco e alto risco de transformação maligna. Em uma oficina coordenada pela OMS no Reino Unido para tratar questões relacionadas com as desordens potencialmente malignas, foi proposta a união dos casos diagnosticados segundo critérios morfológicos preconizados pela OMS (BARNES et al., 2005) gradados como sem displasia/com displasia questionável/displasia leve, em um grupo denominado de baixo risco; e em outro grupo, seriam agrupados os casos com displasia epitelial moderada/severa, sendo denominado de alto risco de transformação maligna (WARNAKULASURIYA et al., 2008). Assim, o sistema binário de gradação das displasias epiteliais orais foi inicialmente publicado e testado por Kujan et al. (2006), seguido por outros

estudos (LIU et al., 2010; CARVALHO et al., 2012; CALDEIRA et al., 2012; NANKVELL et al., 2013).

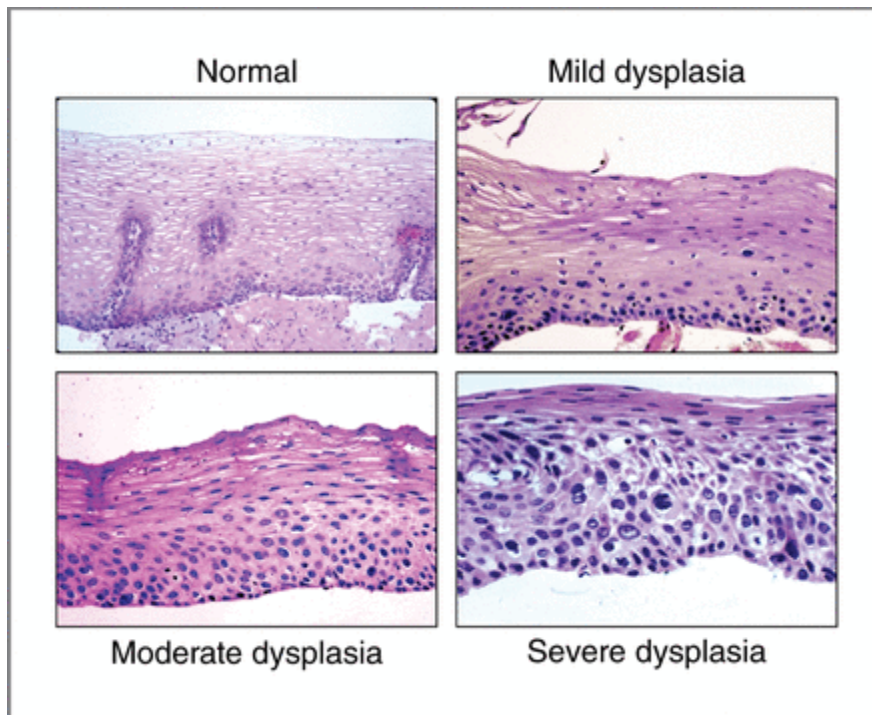


Figura 8- Classificação das displasias epiteliais segundo a OMS. A- Ausências de displasia; B- Displasia leve; C- Displasia moderada; D- Displasia intensa.

Fonte: <http://cebp.aacrjournals.org/content/22/4/540.figures-only>

Nankvell et al. (2013) compararam a reprodutibilidade e valor prognóstico entre o sistema binário proposto por Kujan et al. (2006) e o sistema da OMS (BARNES et al., 2005) em 141 casos de displasias epiteliais orais (figura 8).

Liu et al. (2010) analisaram 138 pacientes com desordens potencialmente malignas orais com displasia epitelial, acompanhando estes casos por cerca de 5 anos. Nesse período, 26,8% dos casos se transformaram em câncer oral, sendo os casos diagnosticados com displasias epiteliais de alto risco associados com risco 2,78 vezes maior de transformação, quando comparados aos casos de baixo risco.

Essas cinco características histopatológicas presentes nos quadros de QA (acantose, degeneração basofílica do tecido conjuntivo, inflamação no tecido conjuntivo, inflamação perivascular, espessura da camada de queratina) mostram associação significativa com

severidade de transformações no epitélio. À medida que a severidade desses fatores histopatológicos aumenta a severidade da transformação epitelial também muda. A acantose e o espessamento da camada de queratina epitelial podem representar que a radiação UV causou dano inicial à camada de células basais (KAUGARS GE et al, 1999).

Na QA os queratinócitos passam por uma transformação molecular e genética induzida pelos raios UV e tornam-se queratinócitos neoplásicos; a QA é na verdade o resultado da expansão clonal dos queratinócitos transformados (WOOD NH, 2011).

Apesar de ser praticamente um consenso o fato de se basear no diagnóstico histopatológico com a graduação da displasia epitelial para realizar o tratamento da QA, alguns estudos sugerem que a evolução do carcinoma não está associada com nenhum tipo particular de displasia (NETO PIMENTEL DR et al, 2006; WARNAKULASURIYA S, 2001).

1.1.7 Aspecto clínico

A QA em geral manifesta-se em toda a extensão do lábio inferior e pode apresentar sinais diversos como atrofia, perda de elasticidade, edema, manchas, placas brancas e/ou eritematosas, úlceras, erosões, crostas, fissuras, ressecamento, sangramento, descamação, eversão do sulco sublabial e perda do limite de transição entre vermelhão e pele (CASTINEIRAS I et al, 2010; MARKOPOULOS A et al, 2004). Alguns pacientes podem apresentar manchas acinzentadas e/ou acastanhadas. O aspecto do lábio não é, em geral, uniforme, podendo apresentar alguns dos sinais citados em diferentes partes do mesmo (MARKOPOULOS A et al, 2004).

Existem duas formas clínicas de QA: aguda e crônica. A forma aguda é mais comum em indivíduos jovens e ocorre após exposição excessiva à luz ultravioleta, enquanto a forma crônica é uma alteração cumulativa e irreversível. Em QA crônica, o lábio clinicamente apresenta atrofia, placas brancas ou cinzentas e erosões recorrentes. A lesão é geralmente assintomática, mas pode, em alguns casos, ser acompanhada por uma sensação de queimação, dormência e dor (MARKOPOULOS A, ALBANIDOU-FARMAKI E, KAYAVIS I, 2004; WRIGHT K, DUFRESNE R, 1998).

O quadro inicial pode ser muito sutil e assintomático. O paciente relaciona com o processo normal do envelhecimento (MAIN JH, PAVONE M, 1994).

Quando há a presença de úlcera, o desenvolvimento do CEC pode ser considerado, principalmente se há endurecimento nas bordas e infiltração à palpação (MARKOPOULOS A et al, 2004).

As alterações clínicas mesmo discretas acabam por ter períodos de melhora e piora, mas nunca há regressão total. A atrofia é mencionada em quase todos os casos, sendo ela mais leve ou mais agressiva (JADOTTE YT, SCHWARTZ RA, 2012).

A atrofia é o aspecto estreito da semimucosa do vermelhão, deixando a superfície do lábio lisa e brilhante. O ressecamento está presente em quase todos os quadros e as manchas eritematosas são produzidas por vasodilatação. As placas quando presentes não são removíveis mecanicamente e são discretamente elevadas.

Nem sempre todos os sinais citados se fazem presentes, mas a biópsia incisional é fundamental para a confirmação do diagnóstico e a gradação da displasia epitelial, além de constituir a única forma de excluir totalmente a possibilidade de carcinoma (HUBER MA, 2010).

1.1.8 Modalidades terapêuticas

A escolha do tratamento da QA normalmente é baseada no resultado do exame histopatológico com a referência do grau de displasia epitelial em que se encontra a lesão. Em geral, para lesões em que não há displasia ou a displasia discreta, e alguns autores relatam também para displasia moderada (MARTINS - FILHO PRS, SILVA LCF, PIVA MR, 2011), a conduta é orientação do paciente com relação ao uso do fotoprotetor labial, a fim de evitar danos adicionais e acompanhamento clínico por longo período. Não existe maneira confiável de determinar clinicamente o grau de alteração epitelial histológico, portanto não se deve tratar as lesões de QA apenas com base em seu aspecto clínico, sendo importante a biópsia incisional para o correto diagnóstico (NEVILLE BDD, ALLEN CM, BOUQUOT JE, 2004).

Para as lesões diagnosticadas com displasias epiteliais moderadas ou intensas há uma série de tratamentos propostos na literatura, alguns já consagrados por sua eficácia, porém bastante invasivos e dolorosos, e outros ainda em avaliação quanto à sua eficácia e conforto para o paciente. O tratamento da QA visa a prevenção do desenvolvimento do carcinoma (DUFRESNE RG, Jr., CURLIN UM, 1997).

Desde que não existem provas laboratoriais ou procedimentos clínicos que permitam o discernimento acerca de quais lesões têm maior ou menor possibilidade de evolução maligna, o manejo dos casos de QA ainda apresenta falta de consenso no meio científico (ZIDE MF, 2008).

As opções terapêuticas mais aceitas pela literatura são: vermelhnectomia, aplicação tópica de fluorouracil (FU), imiquimod, ablação a laser (CO₂ e Er:YAG), terapia fotodinâmica, criocirurgia, peeling químico com ácido tricloracético, eletrocirurgia, diclofenaco (CASTINEIRAS I, 2010; de GODOY PERES FF, 2009). Há outros tratamentos pouquíssimos relatados na literatura, como ácido retinóico e dermabrasão (GHASRI P, 2012; DUFRESNE RG, 2008).

A vermelhnectomia é o tratamento maior escolha e tradicional para os casos de QA avançada. Corresponde a remoção total do vermelhão do lábio ou remoção cirúrgica de natureza horizontal da área comprometida de todo o lábio. Embora haja relatos na literatura de boa resposta biológica, normalmente deixa sequelas, como parestesia, disestesia, discência, hematoma, sensação de formigamento da área afetada, além de dor e tensão tecidual na área da cicatriz. É o único tratamento que permite a análise histopatológica de todo o tecido. Traz inevitavelmente um trauma psicológico ao paciente. (SHAY AY, DOHERTY SD, ROSEN T, 2010). Apesar de agressivo e desconfortável, ainda é o único método que permite a análise histológica de todo o tecido e é considerado o “padrão ouro” em termos de eficácia quando comparado aos outros recursos (SHAY AY, DOHERTY SD, ROSEN T, 2010). É indicada preferencialmente em lesões difusas com displasia intensa (JADOTTE YT, SCHWARTZ RA, 2012).

Imiquimod se dá com ação de um imunomodulador, com ação antitumoral estimulando o sistema imune para produzir interferon, um agente químico que destrói além das lesões pré-cancerosas através da ação da apoptose celular. Utilizado alguns cânceres de pele superficiais. Apesar de ser bem tolerado, os efeitos adversos são similares aos do 5 FU, com relatos de lesões ulceradas após a aplicação da medicação (SHAY AY, DOHERTY SD, ROSEN T, 2010). Alguns estudos sugerem que as citocinas produzidas pela ação do imiquimod promovem a restauração do padrão celular genético normal, invertendo a base genética na qual o ciclo celular anormal é organizado. É utilizado em tumores cutâneos (BURNS CA, BROWN MD, 2005) e aplicado em base cremosa a 5% durante várias semanas (CASTINEIRAS I et al, 2010; WOOD NH, 2011; de SOUZA LUCENA EE et al, 2012. Os efeitos colaterais são os mesmos

do fluorouracil. (MCDONALDS C et al, 2012) e há relatos de pacientes que apresentam úlceras aftosas próximas à região de aplicação do medicamento (CHAKRAPARTY AK, 2005). É indicado para casos iniciais e displasias moderadas (JADOTTE YT, SCHWARTZ RA, 2012).

Outra modalidade de tratamento é o quimioterápico 5- Fluorouracil tópico. A sua ação se dá pela absorção da medicação nas células em estado de maior atividade metabólica que são susceptíveis aos efeitos inibitórios do 5 FU, gerando a partir de daí a apoptose celular. Os maiores transtornos deste tratamento se dão pelos seus efeitos adversos como ulcerações e erosões pela ação da medicação. A cicatrização se dará até em 21 dias após a conclusão do tratamento. O 5-fluorouracil tópico é usado no tratamento de lesões cancerizáveis de pele e inibe a enzima timidilato sintetase agindo como um antimetabólico na biossíntese de ácido desoxirribonucleico (SHAY AY, DOHERTY SD, ROSEN T, 2010; BAGATIN E, 2010). O tratamento dura em torno de 15 dias. O efeito colateral está no desconforto devido à erosão e ulceração provocada pela substância até a completa cicatrização da região que ocorre em 2 a 3 semanas após o término do tratamento. Muitos pacientes não conseguem suportar toda a terapia e há índices consideráveis de recorrências entre 10% e 60% segundo alguns autores (de GODOY PERES FF et al, 2009), havendo recomendações na literatura para que seja utilizado apenas em casos iniciais e displasias moderadas (JADOTTE YT, SCHWARTZ RA, 2012).

O Laser de dióxido de carbono (CO₂) age sobre todo o lábio. A sua ação é parecido com o da crioterapia, separando a derme da epiderme (SHAY AY, DOHERTY SD, ROSEN T, 2010). Os efeitos adversos são mínimos, embora possa apresentar dor e edema pós operatório, sem relatos de cicatrizes. É usado para displasia moderadas e intensas (SHAY AY, DOHERTY SD, ROSEN T, 2010; GODOY PERES FF, 2009). Na maioria dos casos não há parestesia, embora possa ocorrer dor e edema pós-operatório; a cicatrização é bastante satisfatória e o contorno normal do lábio é preservado (ZELICKSON BD, ROENIGK RK, 1990).

Alguns autores consideram este o método de maior sucesso sob os aspectos terapêutico e cosmético, além de apresentar menor número de complicações (CASTINEIRAS I et al, 2010). Há estudos que avaliam apenas clinicamente antes e após o procedimento, sem a confirmação histológica, o que também dificulta a avaliação científica da eficácia do método (SHAY AY, DOHERTY SD, ROSEN T, 2010). É indicado para displasias moderadas e intensas (JADOTTE YT, SCHWARTZ RA, 2012).

O laser Er:YAG (laser de ítrio, alumínio e granada) é um laser cuja forma activa é o érbio dopado com ítrio, alumínio e granada. Propõe-se a ser tão eficaz quanto o laser de CO₂, porém

com menores efeitos colaterais e melhores resultados cosméticos para o paciente, desde que é absorvido pela água (o que potencialmente causa menores danos aos tecidos adjacentes) (ORENSTEIN A, 2007). Faltam estudos com maior número de pacientes, maior tempo de follow up e com biópsias realizadas neste período avaliação histológica (ARMENORES P, 2010; JADOTTE YT, SCHWARTZ RA, 2012).

A crioterapia é um método terapêutico bastante aceito pelos pacientes. Normalmente, usa-se a aplicação de nitrogênio líquido como agente terapêutico para tal modalidade de tratamento. A partir da aplicação da crioterapia há uma cristalização, com a separação da derme com a epiderme. A crioterapia é mais utilizada em pele do que em lábio (SHAY AY, DOHERTY SD, ROSEN T, 2010). Não necessita de anestesia local, é mais utilizada em pequenas áreas, pois seu uso em toda a extensão do lábio causa pós-operatório muito dolorido e não há um protocolo definido para o tempo de aplicação ou equipamento específico para essa modalidade de utilização (JADOTTE YT, SCHWARTZ RA, 2012).

O Peeling químico é a aplicação do ácido tricloroacético 50% sobre a pele. As camadas superiores se desprendem e, em geral, se regeneram em sete dias. Alguns estudos relatam que não há ação seletiva entre as células normais e alteradas (SHAY AY, DOHERTY SD, ROSEN T, 2010). A cicatrização se dá normalmente em 7 a 10 dias. Não ocorrem muitos efeitos colaterais graves, mas o índice de recidivas bastante alto, próximo aos 70% (CASTINEIRAS I et al, 2010).

Diclofenaco é um anti-inflamatório não esteroide (AINES) em forma de gel a 3%. Alguns estudos sugerem que a ação se dá bloqueando a prostaglandina com a inibição consequente da Cox 1 e COX 2, gerando apoptoses (LIMA Gda S, 2010). Seu mecanismo de ação ainda não está completamente claro. Estudos sugerem que ele age na apoptose celular através da inibição das cicloxigenases (COX) 1 e 2 (especialmente COX 2), bloqueando desta forma os passos iniciais da produção de prostaglandinas (SHAY AY, DOHERTY SD, ROSEN T, 2010; ULRICH C, 2007). Os efeitos adversos são bem menores que outras modalidades terapêuticas. (SHAY AY, DOHERTY SD, ROSEN T, 2010; LIMA Gda S, 2010).

Na eletrocirurgia a dissecação destrói o epitélio do vermelhão, retardando o reparo do tecido e formando cicatriz aparente. Assim como a crioterapia, é realizada em regiões específicas do lábio, porém necessita de anestesia local (JADOTTE YT, SCHWARTZ RA, 2012). Não há estudos suficientes para comprovar sua eficácia (SHAY AY, DOHERTY SD, ROSEN T, 2010).

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido uma das formas de tratamento de QA mais estudadas ultimamente. É um método relativamente novo que começou sendo utilizado para tratar outras doenças dermatológicas (BABILAS P et al., 2010). Envolve o uso de um agente fotossensibilizante (FS) e uma fonte de luz ativadora entre 400nm e 700nm (BERKING C, 2007) para induzir a produção focal de radicais de oxigênio, que afetam a membrana celular e suas organelas resultando em morte celular por necrose ou apoptose (BABILAS P et al. 2006; ALEXIADES-ARMENAKAS M, 2007). O agente fotossensibilizante mais utilizado é o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seu metil ester (metilaminolevulinato – MAL) (CALZAVARA-PINTON PG, ROSSI MT, SALA R, 2013) que é convertido a fotoporfirina IX dentro das células-alvo, o que permite a absorção seletiva de luz.

1.2 Terapia Fotodinâmica (TFD)

A Terapia Fotodinâmica consiste na aplicação sistêmica ou localizada de uma substância fotossensibilizante seguida por sua excitação por uma luz de comprimento de onda específico. Desta forma, há o desencadeamento de uma reação fotoquímica entre o fotossensibilizante e o oxigênio molecular, sendo o resultado dessa reação a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que causam danos às células (TRESSCHEIJN et al, 2007).

Essa terapia é mais seletiva ao tecido tumoral por induzir menores efeitos colaterais em outras estruturas do organismo. Essa seletividade pode se dar tanto pelo acúmulo preferencial do fármaco fotossensibilizante no tecido tumoral (BHUVANESWARI et al 2009), quanto pelo fato de a irradiação ser direcionada à área específica da neoplasia.

Novas modalidades terapêuticas não cirúrgica, como a terapia fotodinâmica, tem sido propostas para as lesões bucais potencialmente malignas por ser pouco invasiva, fácil execução, além de ser capaz de erradicar a doença obtendo um excelente resultado estético. (VAN DONGEN, VISSER, VROUENRAETS, 2004).

Esse efeito fotodinâmico ocorre por meio de duas reações, denominadas de reação do Tipo I e do Tipo II. Na reação do Tipo I, o fotossensibilizante excitado transfere energia para o oxigênio ou biomoléculas, produzindo radicais livres ou outras espécies reativas de oxigênio.

Na reação do Tipo II, o fotossensibilizante excitado transfere energia diretamente ao oxigênio tripleto para formar seu estado excitado, denominado oxigênio singlete (1O_2). As ERO tendem a interagir com estruturas próximas para atingir a estabilidade energética, comportando-se como receptores ou como doadores de elétrons. Assim, essas moléculas podem ligar-se a constituintes celulares tais como lipídios de membranas, proteínas e DNA, ocasionando, a morte celular de forma direta e/ou rompendo os vasos sanguíneos responsáveis pela nutrição tumoral. Existe ainda a possibilidade da morte celular induzida pela TFD levar a indução de uma resposta imunológica do organismo (DOLMANS et al 2003; TRIESSCHEIJN et al 2006).

O sucesso da TFD está relacionado, entre outros fatores, a escolha do fármaco fotossensibilizante. Para ser considerado ideal, o fármaco fotossensibilizante deve apresentar alguns pré-requisitos tais quais: estabilidade físico-química, acumulação preferencial na área tumoral, pureza química, rápida excreção pelo organismo e alto rendimento de geração de ERO (ALLISON et al, 2004; ALLISON et al, 2010).

Vários fotossensibilizantes já foram desenvolvidos e a classificação deles tem como base o período em que foram sintetizados e suas características específicas (VAN STRATEN et al, 2017). Os fármacos fotossensibilizantes de primeira geração são compostos derivados da porfirina e estão associados a diversos fatores que limitam suas aplicações clínicas como pouca seletividade, necessidade de grandes quantidades para obtenção de uma adequada eficiência e fototoxicidade cutânea elevada (NOWIS et al, 2005, VAN STRATEN et al, 2017).

A segunda geração de fotossensibilizantes foi desenvolvida com o objetivo de aprimorar os resultados obtidos com os fármacos de primeira geração. Esses novos fotossensibilizantes constituem principalmente porfirinas, derivados de clorinas e corantes (CHATTERJEE et al 2008). Entre as diversas classes de fotossensibilizantes de segunda geração destacam-se as ftalocianinas, um grupo de compostos que absorve luz fortemente na faixa do vermelho visível, ou seja, entre 650-680 nm. Por absorverem luz em um comprimento de onda mais elevado do que os fotossensibilizantes de primeira geração, as ftalocianinas conseguem ser excitadas além da superfície tumoral, ou seja, em planos mais profundos do tecido. Além disso, associação da ftalocianina a metais como o zinco, o alumínio, o cloro e o silício, aumentam a sua eficácia durante a fotossensibilização (TOMAZINI et al 2007).

A grande maioria dos fotossensibilizantes, em especial os derivados de ftalocianinas, é altamente hidrofóbica, ou seja, pouco solúvel em soluções aquosas. Desta maneira, os fotossensibilizantes hidrofóbicos devem ser associados a uma estrutura que facilite o seu transporte no ambiente fisiológico (KIESSLICH et al 2006).

Assim começaram a ser desenvolvidos os denominados fotossensibilizantes de terceira geração, que são os fármacos da primeira e da segunda geração conjugados com modificadores, como anticorpos ou nanopartículas (ALLISON et al 2010).

A fonte de luz é outro fator importante para a TFD, por estar envolvida tanto com o sucesso do tratamento quanto com sua toxicidade (ALLISON et al 2008). O primeiro pré-requisito é que a luz seja emitida no comprimento de onda de absorção do fotossensibilizante, como citado anteriormente entre 650-680 nm para as ftalocianinas. A fonte de luz deve ser aplicada em potência adequada e dose total de energia suficiente para induzir a destruição do tumoral (MANG et al 2008).

Dentre as diversas fontes de luz que podem ser utilizadas para irradiar tecidos tumorais destacam-se os laser, pois emitem fótons com mesmo comprimento de onda e se propagam em uma única direção o que possibilita que a radiação seja focalizada em regiões diminutas. (HUANG et al 2008; SINGH et al, 2010).

A TFD utiliza um fotossensibilizador (FS), que no presente trabalho é o Cloreto alumínio ftalocianina (CIAIFt) de uso exógeno no tecido lesado (in vivo), que foi exposto à luz, resultando na ocorrência de reações orgânicas que originam radicais livres, capazes de danificar componentes da célula-alvo (ESCOBAR, 2006).

1.2.1 Terapia fotodinâmica com Cloreto Alumino Ftalocianina

As ftalocianinas vêm sendo utilizadas na TFD para o tratamento dos mais diversos tipos de câncer, obtendo resultados promissores como tratamento complementar em quadros de melanoma e glioblastoma (ÇAKIR et al., 2015; DIXIT et al., 2015; EL-KHATIB et al 2015).

Como fármacos fotossensibilizantes de segunda geração, as ftalocianinas possuem propriedades fotofísicas vantajosas e diversos estudos mostram seu potencial para a TFD (CAMUR, AHSEN

e DURMUS, 2011; LONGO et al., 2013; MACHADO et al., 2010). As ftalocianinas são pigmentos tetraazoindólicas análogas às porfirinas com forte absorção na região do vermelho do espectro eletromagnético (670 nm 780 nm), cuja estrutura molecular pode ser modificada inserindo-se ligantes periféricos e/ou axiais, bem como metais entre quatro nitrogênios centrais (Figura 7), com extensa aplicação, industrial, tecnológica e médica (CAMUR, AHSEN e DURMUS, 2011; KULBACKA, 2015; ZEBALLOS et al., 2012). Entretanto, por apresentarem baixa solubilidade em água o seu uso em TFD é limitado, uma vez que agrega facilmente em meio fisiológico.

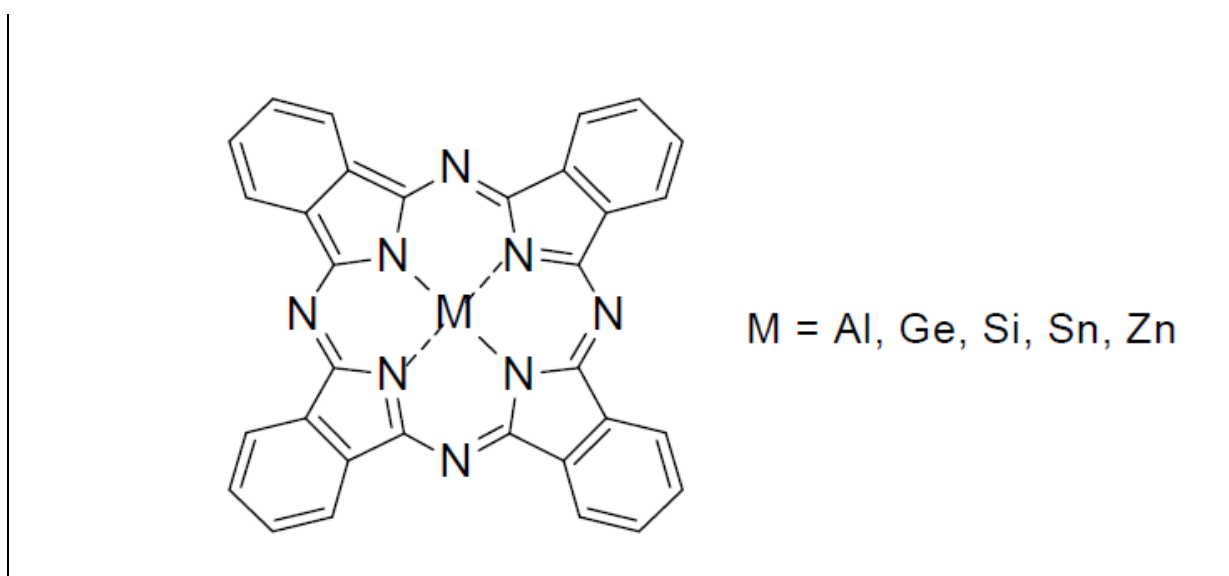


Figura 9- Estrutura molecular das Ftalocianinas

Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>

A eficiência da TFD depende fundamentalmente da quantidade de EROs produzida no local a ser tratado. Como as ftalocianinas dos complexos Al(III), Ge(IV), Si(IV), Sn(IV) e Zn(II) possuem íons diamagnéticos espera-se um aumento significativo do tempo de meia vida de seu estado tripleto excitado, aumentando a produção de 1O_2 , tornando-as boas candidatas a fármacos fotossensibilizantes (OGUNSIPE e NYOKONG, 2005).

A eficiência da TFD também depende da capacidade do fármaco fotossensibilizante de se acumular seletivamente nos tecidos tumorais, influenciada pelas propriedades físico-químicas e pelo modo de liberação do fármaco, sendo que sua incorporação em membranas biológicas é bastante favorecida quando se utiliza um sistema de liberação adequado utilizando várias

tecnologias, dentre elas os nanocarreadores (ANDRADE et al, 2015; ARIAS et al, 2011; BARBUGLI et al., 2010; TIBBITT , DAHLMAN e LANGER, 2016)

1.3 Uso da Nanopartículas em Nanoemulsão

Para uma terapia fotodinâmica eficaz e segura, é fundamental que o FS seja liberado em concentrações ideais para as células alvo, sendo simultaneamente absorvidos em pequenas quantidades por células não alvo, minimizando assim os efeitos adversos em tecidos saudáveis. Existem alguns obstáculos para se alcançar este objetivo: a maioria dos FS tem uma conformação planar e tendem a ser altamente hidrofóbicos, e, portanto, a maioria forma agregados em ambientes aquosos. Esta agregação diminui a eficácia do FS, que deve estar em sua forma monomérica para ser fotoativo. Em segundo lugar, os FS em geral não tem afinidade específica por células tumorais, o que permite que sejam também difundidos por outros tecidos não afetados (HUANG Y-Y, 2012).

O emprego de nanocarreadores também permite que os fármacos FS atravessem barreiras biológicas, como as membranas plasmáticas, facilitando a liberação dos fármacos para o interior das células. Essas nanoformulações garantem estabilidade do fármaco e evitando desta forma a sua degradação precoce (BHASKAR S, 2010).

Esforços consideráveis têm sido dirigidos à concepção de sistemas de liberação que possam incorporar o FS em sua forma monomérica, sem diminuir a sua atividade e, sem causar quaisquer efeitos nocivos in vivo. A nanotecnologia pode superar esses obstáculos promovendo a liberação específica de fármacos ao tecido-alvo. Muitos desses sistemas de liberação são nanoestruturas, como por exemplo, nanoestruturas lipídicas (lipossomas e micelas) que têm sido rotineiramente utilizadas em TFD como veículos carreadores de FS hidrofóbicos antes mesmo da nanotecnologia se tornar uma área especializada (HUANG Y-Y, 2012).

Os mecanismos pelos quais essa liberação é realizada são bastante estudados e podem ocorrer de duas maneiras: ativa e passiva. O direcionamento passivo, também conhecido como efeito EPR (do inglês, Enhanced permeability and retention effect) se baseia na exploração das características anormais da vasculatura tumoral, como a hipervascularização, arquitetura aberrante, produção extensa de fatores vasculares de permeabilização e drenagem linfática pouco eficaz (GREISH K, 2010). A necessidade de uma rápida vascularização para nutrir o

rápido crescimento do tecido canceroso, por exemplo, leva a formação de uma arquitetura fraca e defeituosa, com a presença de fenestrações o que, por sua vez, pode ser facilmente acessível aos fármacos quimioterápicos. Alguns fármacos podem ser administrados como pro-fármacos ou fármacos inativos, que, uma vez expostos ao microambiente tumoral, tornam-se ativos. Já o direcionamento ativo, pode ser realizado de duas formas: com aplicação local do FS permitindo que o fármaco seja administrado diretamente no tecido do tumor, evitando a circulação sistêmica e metabolização por outros sistemas antes de chegar ao alvo pretendido (SINHA R, 2006) ou na funcionalização de nanoestruturas acopladas a anticorpos contra receptores que sejam específicos ou mais expressados em células tumorais (TORCHILIN VP, 2007).

Dentre as nanoestruturas utilizadas em TFD, as nanoemulsões poliméricas são promissoras como uma opção terapêutica de liberação de fármacos, pois são fáceis de preparar e termodinamicamente estáveis. A biocompatibilidade das matérias-primas empregadas para a sua obtenção (óleos de origem natural ou semissintética e fosfolipídeos) torna estes sistemas uma alternativa promissora para a administração de diversos tipos de moléculas.

Nanoemulsões podem ser definidas como sistemas heterogêneos nos quais um líquido (a fase interna) é disperso em outro (a fase externa) na forma de gotículas, na presença de um agente emulsificante e estabilizado por polímeros. Suas propriedades físico-químicas, influenciadas pela composição qualitativa e quantitativa, e pelas condições de preparação, devem ser estritamente controladas, visando à administração por via parenteral e a estabilidade do sistema (BRUXEL F, 2012). Geralmente as nanogotículas em suspensões estáveis exibem tamanhos entre 50 e 500 nm, são opticamente transparentes mesmo em concentrações altas, apresentam bom transporte por difusão, boa elasticidade e estabilidade e podem ser armazenados sem a ocorrência de sedimentação ou coalescência de gotículas. (JUMPING W, 2003). Essas características são favoráveis para que essas nanoestruturas sejam utilizadas na indústria farmacêutica (MASON TG, 2006).

O emprego de nanoemulsões poliméricas em TFD é geralmente usado em aplicações tópicas do FS na pele ou em outras superfícies mucosas. Vários métodos para aumentar a absorção e penetração através da pele têm sido intensivamente investigados. Primo, Bentley (PRIMO FL, BENTLEY MV, TEDESCO AC, 2008) avaliaram o FOSCAN (meta-tetrahydroxyphenyl clorina, mTHPC) (Scotia Pharmaceuticals Ltd., Guilford, Surrey, Reino Unido) em uma nanoemulsão composta de fosfatidilcolina de soja Epikuron 170/Tween 80 e surfactantes não

iônicos 188/Span Poloxamer ® 80 e demonstraram que essa formulação possui um excelente transporte transdérmico após 6 h da aplicação. O mesmo grupo também investigou uma nanoemulsão magnética constituída por tensoativos biodegradáveis e fluidos magnéticos biocompatíveis de cobalto-ferrita cobertos com citrato para encapsular ZnPc com a intenção de combinar TFD e magnetohipertermia para produzir a morte celular sinérgica. Outros estudos usaram nanoemulsão composta de partículas de lecitina de ovo de 30 nm para aumentar a liberação de ALA através de um modelo ex vivo de pele de espessura total (HUANG Y-Y, 2012).

Estudos têm demonstrado que nanoemulsões poliméricas podem aumentar a liberação preferencial de FS a células tumorais e, conseqüentemente, diminuir os efeitos secundários tóxicos da TFD por diferentes vias de administração (BRUXEL F, 2012; JUNPIMG W, 2003). A adição de polímeros hidrofílicos as nanoemulsões pode resultar no prolongamento do tempo de circulação das emulsões na corrente sanguínea e menor biodistribuição, o que pode ser atribuído à barreira estérica formada pelos polímeros em relação às proteínas (JING X, 2013; WANG J, MAITANI Y, TAKAYAMA K, 2002), além de reduzir a tensão interfacial e/ou aumentar a repulsão entre as gotículas (TALMIVANAN S, 2013). Nanoestruturas compostas de polímeros como o Poli (metil vinil eter co-anidrido maleico) ou PVM/MA têm demonstrado biocompatibilidade, biodegradabilidade e segurança (YONCHEVA K, LIZARRAGA E, IRACHE JM, 2005).

1.4 Situação atual da TFD no tratamento da Queilite Actínica

A terapia fotodinâmica tópica no tratamento de cancer de pele não-melanoma foi descrita em 1990 por Kennedy , Pottier e Pross, e tem sido utilizado em todo o mundo para o tratamento de lesões cancerizáveis, sendo muito eficaz para a ceratose actínica, empregando (AK) o ácido 5 - aminolevulínico (ALA) ou um seu derivado aminolevulinato de metilo (MAL) como fotossensibilizador precursor (TSCHEN, 2006; BRAATHEN,2012).

A segurança e eficácia do ALA e MAL tópico por TFD tem sido amplamente demonstrado no tratamento da queratose actínica (DE BERKER, MCGREGOR, HUGHES, 2007; ANGEL-PETERSEN , SORENSEN, WARLOE et al, 2006; MORTON, BROWN, COLLINS et al, 2002, PARISER et al, 2003). No entanto, a instabilidade do ALA na formulação aquosa e sua baixa solubilidade lipídica, que limitam a capacidade de penetrar através da pele ou membranas

celulares, foram identificados como o principal inconveniente deste fotossensibilizador, restringindo, assim, o seu uso em TFD para lesão superficial (DI VENOSA, HERMIDA, BATTLE et al, 2008).

MAL foi aprovado para TFD, não apenas para as lesões superficiais, mas também para o tratamento de carcinomas pequenos nodulares, devido à sua penetração na pele superior, em comparação com ALA (BRAATHEN, 2007; BABILAS, 2010). Também o protocolo de tratamento com MAL é mais padronizado que o do 5-ALA, o qual utiliza diversas fontes de luz ou tratamentos adjuvantes (5-fluorouracil e dermoabrasão antes das sessões, por exemplo). Além disso, MAL utiliza luz vermelha com comprimento de onda maior, permitindo uma penetração mais efetiva da luz (KUZELOVA et al 2005; GAD et al 2002).

Existem poucos trabalhos comparando 5-ALA e MAL, entretanto, o MAL por ser mais lipofílico, tem penetração maior, podendo ser usado também em neoplasias cutâneas não melanocíticas (NCNM). Nenhuma diferença clara foi observada no tratamento de queratose actínica entre ALA + PDT e MAL + PDT em um estudo comparativo (MOLONEY, COLLINS, 2007).

Os estudos com terapia fotodinâmica iniciaram-se em 1995, usado especificamente para queilite actínica. Três pacientes foram tratados com ácido 5-aminolevulínico e uma luz não coerente. Houve clareamento completo das lesões e por um período de 12 meses não houve recidiva. Posteriormente um estudo maior, com 19 pacientes (11 deles com comprovação por biópsia pré-tratamento), foi usado TFD com pulsed dye laser (PDL) (595nm) (ALEXIADES-ARMENAKAS MR, GERONEMUS, 2004). O agente fotossensibilizante foi o ALA. Houve resposta clínica completa em 68% dos pacientes, que foi mantida após um período médio de acompanhamento de 4,1 meses. Em outro estudo, foram selecionados três pacientes com queilite actínica, que declinavam o tratamento cirúrgico, para serem tratados com TFD usando metil-aminolevulinato e luz vermelha. Um deles já havia se submetido ao tratamento com 5-flouracil tópico e imiquimod 5% tópico sem sucesso. Em avaliação feita até 13 meses após tratamento, boa melhora clínica e excelente resultado cosmético foram observados. (ALEXIADES-ARMENAKAS MR, GERONEMUS, 2004).

O estudo com maior tempo de seguimento, selecionou 5 pacientes que haviam rejeitado intervenção cirúrgica e já tinham sido submetidos a outros tratamentos não-invasivos sem

sucesso, (ROSSI R. et al, 2008). Esses pacientes tinham queilite actínica comprovada por biópsia e foram tratados com duas sessões de TFD usando metil-aminolevulinato e luz vermelha e em seguida acompanhados por 30 meses. Resposta clínica completa e excelentes resultados cosméticos foram mantidos ao longo dos 30 meses sem sinais de recidiva. Berking et al (2007) tratou 15 pacientes com queilite actínica com duas sessões de TFD usando metil-aminolevulinato e luz vermelha. Após 3 meses esses pacientes foram reavaliados clinicamente e submetidos a uma nova biópsia para análise histopatológica pós-tratamento. Resposta clínica completa foi observada em 47% (7/15) e parcial em 47% (7/15). Doença residual na histopatologia foi observada em 62% (8/13) dos pacientes. Esse estudo concluiu que a TFD pode ser um método efetivo e não invasivo para tratamento da queilite actínica (BERKING et al, 2007). Essa conclusão pode ser melhor entendida ao se comparar com o percentual de cura histopatológica observado em métodos terapêuticos consagrados. Há relato em que, de 20 pacientes com QA tratados com esse método, observou-se melhora histopatológica em apenas 7 (35%) (OLIVEIRA FILHO J, 2008).

Em 2007 foi publicado um caso no Japão tratado com 5-ALA e excimer-dye laser (630nm), com boa melhora clínica e desaparecimento da displasia celular observado na biópsia pós-tratamento (KODAMA M et al., 2007). Em 2008, foi publicado estudo em que 10 pacientes com queilite actínica comprovada por biópsia foram tratados com duas sessões de ALA-TFD utilizando luz vermelha incoerente (570- 670nm) (SOTIRIOU et al, 2008). Houve resposta clínica completa após duas sessões em 90% dos pacientes e resposta parcial em 10%, após 3 meses. Os pacientes com resposta clínica completa foram submetidos a uma nova biópsia, constatando-se doença residual em um caso. Levando em consideração a clínica e a histopatologia, 80% dos pacientes obtiveram resposta completa.

Sotirou et al (2010) tratou 38 pacientes com duas sessões de ALA-TFD usando luz vermelha não coerente e acompanhou esses pacientes por 18 meses, fazendo biópsias pós tratamento para confirmar cura vista na análise histopatológica. Dos 38 pacientes, apenas 22 (57,8%) permaneceram com cura clínica após 18 meses. Desses 22, 5 pacientes tinham evidência de QA na histopatologia. Ou seja, após 18 meses apenas 17 (44,7%) pacientes tiveram cura clínica e visualizadas na análise histopatológica.

Outro estudo em 2012, tratou 19 pacientes com uma sessão de MAL-TFD, e observou que apesar do bom nível de satisfação dos pacientes com o tratamento, 16 pacientes ainda

mantinham sinais de QA na análise histopatológica realizada na biópsia após 2 meses do tratamento (RIBEIRO et al, 2012).

Nesta análise vemos a evolução e seus efeitos colaterais com os diversos fotosensibilizantes ao longo dos anos, avaliando suas aplicações, bem como suas respostas terapêuticas parciais e totais.

1.5 Justificativa

Para aumentar a eficácia do tratamento com a TFD, pesquisas têm sido feitas na procura por novos fármacos, fontes de luz mais específicas, e novos protocolos clínicos experimentais. Estas pesquisas têm encontrado um grande impulso nas abordagens da nanobiotecnologia que possibilita o desenvolvimento de novas formulações de fármacos fotossensíveis em veículos nanoestruturados, que visam especificidade e aumento da penetração do pró-fármaco e assim melhoria dos resultados obtidos com a TFD, sobretudo, com relação ao ALA que na pele sofre interferência de fatores como concentração, tipo de veículo utilizado na sua preparação, tempo de aplicação e uso de coadjuvantes que favoreçam o acúmulo de Pp IX no tecido alvo.

Até o momento, nenhum tratamento definitivo para as DPM de mucosa bucal foi estabelecido. Desta forma utilizando a CIAIFt como agente fotossensibilizante, o presente projeto de pesquisa é a primeira proposta de aplicação clínica em humanos para o tratamento das queilites actínicas, sendo sua execução determinante para a comprovação da eficácia e segurança dessa proposta terapêutica como uma modalidade de tratamento inovadora.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta terapêutica da Terapia Fotodinâmica com uma nanoemulsão gel de Cloreto Alumínio Ftalocianina (CIAIFt) para o tratamento clínico da Queilite Actínica.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a segurança de uso clínico da nanoemulsão de Cloreto Alumínio Ftalocianina (CIAIFt), estabelecendo os principais efeitos colaterais quando utilizado na Terapia Fotodinâmica para o tratamento da Queilite Actínica da mucosa bucal;

Avaliar a eficácia do tratamento clínico da Queilite Actínica na mucosa bucal após o tratamento com Terapia Fotodinâmica mediada pela nanoemulsão de Cloreto Alumínio Ftalocianina (CIAIFt);

Avaliar o grau de permeação mucocutâneas in vitro da nanoemulsão do Cloreto Alumínio Ftalocianina em animais (CIAIFt);

3. Material e Métodos

3.1 Nanoemulsão

As nanoemulsões foram desenvolvidas no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília – UnB pelo Professor Doutor Luis Alexandre Muehlman.

O Cremophor ELP (9 g), o óleo de rícino (3 g) e 5 mL de solução etanólica de CIAIFt (260 µM) foram misturados com agitação magnética, sob temperatura ambiente, até a formação de uma solução homogênea. Na sequência, o etanol foi destilado da mistura a 80°C, sob agitação magnética em capela de exaustão, por 30 minutos. Então, foi adicionada uma quantidade de água destilada suficiente para completar 20 mL (cerca de 11 mL), e a mistura manualmente com um bastão de vidro, até a formação de um gel homogêneo. A concentração final de AICIFt nesta formulação foi de 65 µM. Esta formulação foi acondicionada em geladeira (7°C), em frascos de acrílico recobertos com folha de alumínio.

A preparação e caracterização da Nanoemulsão Gel contendo CIAIFt foram descritas e publicadas na *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, Jun 2017, pelo Professor Luciano Ferreira Morgado, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

3.2 Permeação Mucocutânea Suína *in vitro* do Cloreto Alumínio Ftalocianina

3.2.1 Obtenção e preparo da mucosa

Fragmentos da mucosa bucal de suínos foram retirados imediatamente após o processo de abate dos animais no Frigorífico Bonasa localizado em São Sebastião - Distrito Federal, que gentilmente cedeu o material. Eles foram transportados para o laboratório sob refrigeração, sendo constantemente umedecidos com tampão fosfato pH 7,4. Esses pedaços foram mantidos hidratados até a realização dos experimentos, que ocorreu no mesmo dia do abate.

3.2.2 Protocolo de ensaio *ex vivo* de permeação através da mucosa

Célula de difusão tipo “Franz” (figura 10) foi montada com mucosa oral suína separando os compartimentos doador e receptor. Este último compartimento foi preenchido com 15 mL de uma solução receptora, mantida sob agitação a 300 rpm. Ao compartimento doador, na metade superior da célula, foi adicionado 1 mL da formulação.

O experimento foi inicialmente realizado por um período máximo de 2h, o que garantiu a viabilidade da mucosa recém-retirada. Durante esse período as células de difusão foram mantidas em banho a $32 \pm 2^\circ\text{C}$. As concentrações de fármaco permeadas através da mucosa foram determinadas pela análise da solução receptora após sucessivas coletas.

Após o ensaio de permeação, a mucosa foi retirada da célula de difusão, picotada e colocada a um tubo contendo 5 mL de solvente extrator. Depois do período de extração, a solução extratora foi coletada, filtrada e analisada em CLAE para determinação do fármaco retido na mucosa.

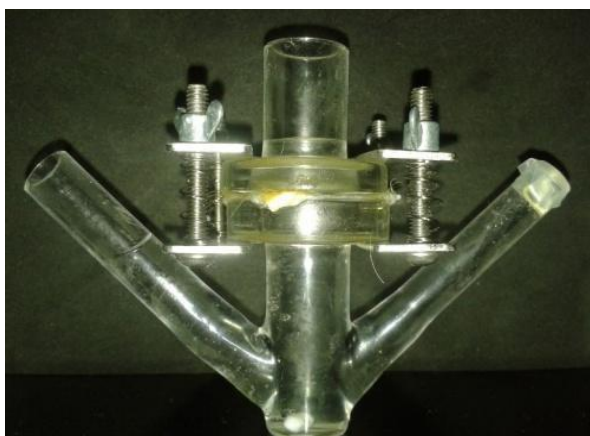


Figura 10- Célula de Franz modificada com mucosa de porco separando o compartimento doador do compartimento receptor.

Protocolo elaborado pelo professor Guilherme Gelfuso e do aluno Breno Noronha Matos do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos Cosméticos e Alimentos da Universidade de Brasília.

3.3 Caracterização do estudo clínico

O estudo realizado foi do tipo ensaio clínico não controlado para determinar a segurança e eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada pela nanemulsão contendo CIAIf_t em pacientes portadores de queilite actínica.

3.3.1. População e Indivíduos do Estudo

A população referente ao presente estudo foi constituída por pacientes que procuraram atendimento na Unidade de Odontologia do Hospital Regional da Asa Norte (HRAN). A população amostral constou de 10 pacientes com diagnóstico clínico de queilite actínica.

3. 3. 2. Critérios de inclusão e exclusão do estudo clínico

Foram selecionados os casos de: pacientes que concordaram em participar da pesquisa e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (anexo A); pacientes com diagnóstico histológico de displasia leve e moderada nos casos de queilite actínica; homens e mulheres acima dos 18 anos, pacientes do sexo feminino que não estavam grávidas e que executaram um eficiente controle de natalidade, seja estéril ou estivesse mesmo na pós-menopausa; e pacientes que apresentaram lesões recorrentes.

Foram excluídos os grupos de maior risco (hipertensos, por exemplo) e os portadores de outro tipo de câncer. Para isso, alguns critérios de exclusão foram estabelecidos: pacientes com hipersensibilidade à Cloreto alumínio ftalocianina; pacientes com diagnóstico histológico de displasia acentuada; taxa leucocitária menor que 4000/ μ L ou contagem plaquetária menor que 100x10³/ μ L; pacientes com disfunção hepática (níveis de bilirrubina sérica >2.0mg/dL); pacientes com disfunção renal (níveis de creatinina sérica >2.0mg/dL); níveis. Os exames complementares foram realizados para a exclusão de outras patologias que pudessem interferir no estudo.

3. 3. 3. Avaliação Clínica pré-tratamento

Os dados dos pacientes foram coletados por meio de uma ficha clínica (anexo B), a avaliação pré-tratamento constou de anamnese completa, solicitação de exames laboratoriais, mensuração e classificação do tipo de lesão, agendamento de biópsia incisional, para confirmação de diagnóstico, e documentação fotográfica. O tratamento com TFD foi realizado 15 dias após a avaliação inicial nos pacientes que obedecerem aos critérios previamente estabelecidos.

3. 3. 3. 1. Avaliação Histopatológica pré-tratamento

Os espécimes coletados na biópsia inicial foram processados para análise histológica, e examinados para confirmação do diagnóstico por médicos patologistas do Hospital Regional da Asa norte (HRAN).

Fragments de tecido foram retirados de cada caso, coradas com Hematoxilina e eosina (HE), e analisadas as amostras representativas das lesões. Os critérios histológicos definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2005 foram usados para determinar a presença e grau de displasia epitelial. A análise histológica para a classificação da displasia epitelial foi definida como: displasia leve, quando as alterações das disposições

celulares foram limitados ao terço inferior do epitélio, acompanhado de atipia citológica; displasia moderada, quando as alterações celulares envolveram também terço médio do epitélio, com atipia citológica associada; displasia grave, quando mais de dois terços do epitélio apresenta alterações epiteliais, associada a atipia celular e carcinoma in situ, quando as alterações celulares afetam toda a espessura do epitélio, acompanhadas também das atípias celulares.

3.3.4. Aplicação da TFD com Cloreto alumínio Ftalocianina

Previamente à aplicação do tratamento, a área de aplicação do fármaco no lábio foi isolada com um rolo de algodão posicionado em região interna do lábio, para projeção do mesmo, seguido da colocação do Top Dam, um protetor de barreira gengival fotopolimerizável (TOP DAM, Dentscare, FGM, Joinville, Brasil), usado frequentemente nos clareamento dentários, evitando desta forma a inclinação do fotosensibilizante para a mucosa bucal e pele, retendo-o exclusivamente sobre o epitélio labial, recebendo a irradiação da terapia fotodinâmica no local desejado. Posteriormente, o nanoemulgel foi aplicado no lábio inferior, com oclusão realizada com papel de alumínio, com diminuição da incidência da luz ambiente, com subsequente oclusão por 15 min à formulação na região labial.

Como fonte de luz foi utilizado um LED, usado no presente ensaio clínico é um protótipo desenvolvido na Universidade de Brasília. Usamos um modelo LED GP-100Wr6-G42M-Z3GL, energia elétrica de 100W, comprimento de onda e tensão de operação direta de 20-24V da Green Powertech Solutions Limited, com emissão de luz com comprimento de onda de 660 nm, potência 51.5 mW/cm², fluência 30.92 J/cm², durante 10 minutos, com distância de 10 cm.

A terapêutica compreendeu de 1 a 2 sessões por paciente, com intervalo de 7 dias, dependendo da resposta ao tratamento. Durante o tratamento foi avaliada a segurança de aplicação da TFD por monitoramento da presença sinais e sintomas adversos durante e após a aplicação da TFD.

3.3.5. Análise da resposta terapêutica aos tratamentos

A resposta terapêutica foi avaliada 7 e 30 dias após a realização do procedimento por meio de exame físico, histopatológico e tomada fotográfica, adotando os mesmos procedimentos da avaliação pré-tratamento.

3.3.6. Proservação dos pacientes pós TFD

Após a última aplicação de TFD nas lesões) de todos os pacientes, os mesmos foram submetidos ao protocolo de preservação e acompanhamento clínicos das lesões por 7, 30 dias de avaliação após o término do protocolo terapêutico.

3.3.7. Análise dos dados

Os dados colhidos foram tabulados no programa SpSS versão 17.0 for Windows. Foi realizada Teste t - amostras pareadas dos mesmos indivíduos antes e depois do experimento, relacionando as alterações clínicas e histológicas.

3.3.8. Implicações éticas

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS) da Secretaria de Saúde do Governo do Distrito Federal com parecer número 027/2012, com data 02 de fevereiro de 2012 e uso do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

4. Resultados

4.1 Permeação Mucocutânea

Os resultados preliminares da permeação mucocutânea foram obtidos através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Na figura 11, ilustra as concentrações de 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2 e 5 µg/mL foram utilizadas para a obtenção de curva padrão de CIAIFt. A equação de reta e coeficiente de determinação também estão demonstrados na figura. Este resultado nos mostra a importância da concentração para a permeação mucocutânea apresentada.

Na tabela 2 apresenta os limites de detecção e quantificação obtidos também pela CLAE e que dentro da margem estabelecida entre 0,01 e 5 µg/ml, o limite de detecção da quantificação veio se observar na concentração mínima de 0,016 µg/ml e foi determinado pela fórmula $LD = 3.3 * (\text{desvio padrão}) / (\text{angulação da reta})$ e o limite de quantificação (LQ) foi obtido pela equação $LQ = 10 * (\text{desvio padrão}) / (\text{angulação da reta})$,²⁶ e podem ser observados na Tabela 2.

26. Miller, J. C.; Miller, J. N.; Statistics for Analytical Chemistry, 2nd ed.; Wiley: New York, USA, 1988.

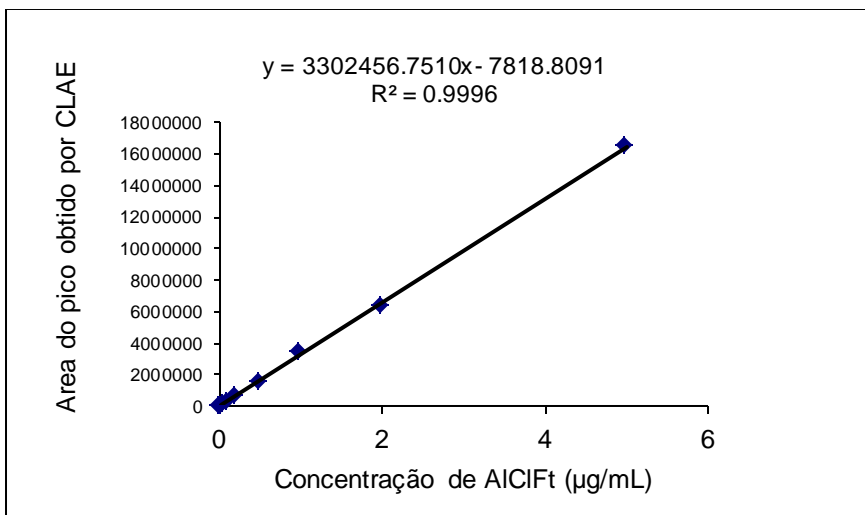


Figura 11 - Curva padrão do CIAIFt

Cálculo de limite de detecção e de limite de quantificação

| | | |
|----------------|--------------------|-------------------------|
| | Limite de detecção | Limite de quantificação |
| 0,01 - 5 µg/ml | 0,005 µg/ml | 0,016 µg/ml |

Tabela 1- Demonstração dos limites de detecção e quantificação pela CLAE

Retenção de AICIFt na Mucosa

| Formulação | Quant. 1 | Quant. 2 | Quant. 3 | Quant. 4 | Quant (µ/cm2) | % retenção |
|---------------|----------|----------|----------|----------|---------------|------------|
| NE 65 | 0,020 | 0,033 | 0,023 | 0,35 | 0,028 | 0,048 |
| Sol. Controle | 0,069 | 0,074 | 0,074 | – | 0,052 | 0,104 |

Tabela 2- Demonstração da retenção da CIAIFt em mucosa suína, após a permeação da nanoemulsão

4.2 Caracterização clínica da Queilite Actínica

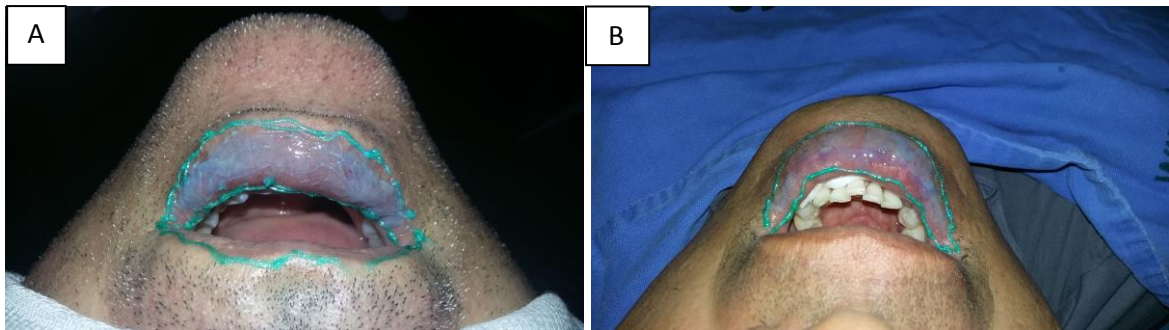
Os participantes do estudo apresentavam lesões clínicas suspeitas de Queilite Actínica e tiveram confirmação histopatológica após biópsia por biópsia incisional. As figuras abaixo ilustram a apresentação clínica de tumores de 3 sujeitos da pesquisa.



Figuras 12A, 12B e 12C- Fotos Ilustrativas da apresentação clínica da QA em três participantes da pesquisa em momentos prévios a aplicação da fotosensibilizante. Destaca-se a atrofia labial e o eritema das lesões observadas nas fotos (Fotografias de autoria do pesquisador).

4.3 Caracterização do processo de TFD

As figuras abaixo ilustram a terapia fotodinâmica de dois participantes da pesquisa tratados com Nanoemulsão de CIAIFL, com imagens do pré, trans e pós com aplicação nanoemulsão de CIAIFt.



Figuras 13A e 13B - Fotos ilustrativas do processo de CIAIFt TFD em dois participantes da pesquisa. Nas fotos, presença do fotosensibilizante, em região labial inferior, anteriormente a aplicação da luz. Observa-se a presença do Top Dam, um protetor de barreira gengival fotopolimerizável, evitando a inclinação do fotosensibilizante para a mucosa bucal, retendo-o exclusivamente sobre o epitélio labial (Fotografias de autoria do pesquisador).



Figuras 14A e 14B - Fotos ilustrativas do processo de AICIFt TFD em dois participantes da pesquisa. Nas fotos, 15 dias após a aplicação da luz (Fotografias de autoria do pesquisador).



Figura 15- Foto ilustrativa do processo de TFD com aparelho LED. (Fotografias de autoria do pesquisador).

4.4 Caracterização da população amostral investigada

Foram tratadas 10 lesões de QA em 10 pacientes, 09 dos quais gênero masculino e 1 gênero feminino. A idade média dos participantes da pesquisa era de 56,8 anos.

Tabela 3 – Características dos sujeitos da pesquisa quanto ao sexo, idade (média, mediana e mínimo e máximo) no grupo de tratamento.

| Características | | N = 10 |
|-----------------|----------------|----------|
| Gênero | Masculino N(%) | 09 (90%) |
| | Feminino N(%) | 01 (10%) |
| Idade (em anos) | Média | 56,8 |
| | Mediana | 46 |
| | Mínimo-máximo | 40-74 |

4.5 Caracterização das lesões investigadas

Quanto à localização, do total de 10 lesões de QA, 10 localizavam-se em lábio inferior. Em relação ao tamanho da lesão no total de 10 lesões, todos apresentaram maior que 2 cm no seu maior diâmetro.

Com relação a sintomatologia, do total de 10 pacientes, 04 apresentavam-se com sintomas de ardência, 1 dor e 5 assintomáticos.

Tabela 4 – Distribuição das lesões quanto à localização, tamanho e sintomatologia no grupo de tratamento.

| Características | | N | % |
|-----------------------|----------------|----|-----|
| Localização anatômica | Lábio inferior | 10 | 100 |
| | + 2 cm | 10 | 100 |
| Sintomatologia | Ardência | 04 | 40 |
| | Dor | 01 | 10 |
| | Sem sintomas | 05 | 50 |

4.6 Avaliação de eficácia

Tabela 5- Distribuição na evolução do tratamento nas lesões investigadas

| | Evolução do tratamento | | |
|---------------------|------------------------|-----|-----|
| | Total | Sim | Não |
| Cura clínica | 10 | 00 | 10 |
| Cura histológica | 10 | 00 | 10 |
| Melhora na ardência | 04 | 02 | 02 |
| Melhora na dor | 01 | 01 | 00 |
| Melhora no eritema | 10 | 01 | 09 |

Após a intervenção com terapia fotodinâmica, a avaliação clínica indicava a ausência da lesão em 0% das lesões. Entre as 10 lesões não curadas, 8 (80%) mantinham o padrão histopatológico de QA, e 2 (20%) foi observado uma mudança no padrão da displasia moderada para displasia leve. Houve uma melhora do sintoma da ardência em 2 dos 4 observados anteriormente e melhora da dor no único paciente que relatou anteriormente tal sintoma, dentre os pacientes submetidos a TFD com Nano CIAIFt.

Um questionário padronizado aplicado aos pacientes avaliou a impressão subjetiva de cada um deles em termos de dor, melhora da lesão, e eventuais queixas. Para avaliar a dor, utilizou-se uma escala analógica, que variou desde o grau 0 (ausência de dor) até o grau 03 (dor mais severa).

Tabela 6- Escala de avaliação antes aplicação da TFD com CIAIFt

| Sintomas | Total pacientes | Ausência | Leve | Moderada | Severa |
|-----------------|------------------------|-----------------|-------------|-----------------|---------------|
| Dor | 01 | 00 | 00 | 01 | 00 |
| Picadas | 00 | – | – | – | – |
| Ardor | 04 | 00 | 01 | 02 | 01 |
| Eritema | 10 | 00 | 00 | 09 | 01 |
| Bolhas | 00 | – | – | – | – |

Tabela 7- Escala de avaliação 7 e 30 dias após

| Sintomas | Total pacientes | Ausencia | Leve | Moderada | Severa |
|-----------------|------------------------|-----------------|-------------|-----------------|---------------|
| Dor | 01 | 00 | 01 | 00 | 00 |
| Picadas | 00 | – | – | – | – |
| Ardor | 02 | 02 | 01 | 00 | 01 |
| Eritema | 10 | 00 | 01 | 08 | 01 |
| Bolhas | 00 | – | – | – | – |

Tabela 8 - Graus de displasias segundo análise histopatológica antes e após TFD

| Análises histopatológicas | Displasias Leves | Displasias Moderadas | Displasias acentuadas |
|----------------------------------|-------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Exames histopatológicos antes | 08 | 02 | 00 |
| Exames histopatológicos depois | 09 | 01 | 00 |

Quanto à análise histopatológica, das 10 biópsias iniciais, 10 apresentaram a variante comum de queilite actínica. O nível de displasia pré-tratamento foi leve em 8 lesões e moderada em 2. Apesar de não ter sido observado uma melhora clínica nos pacientes após o tratamento, a análise histopatológica revelou uma diminuição moderada no nível de displasia pós-tratamento, inicialmente 2 pacientes que apresentaram displasia moderada, após a experimento, observou-se o grau de displasia leve, entretanto, não houve melhora na correlação significativa entre o nível de displasia e a impressão subjetiva de melhora clínica.

A figura 16 ilustra a imagem histológica de mucosa oral revestida por tecido epitelial pavimentoso estratificado sem atúpias. Na lâmina própria observa-se alteração basofílica das fibras colágenas indicando quadro de elastose solar. H&E . 40x

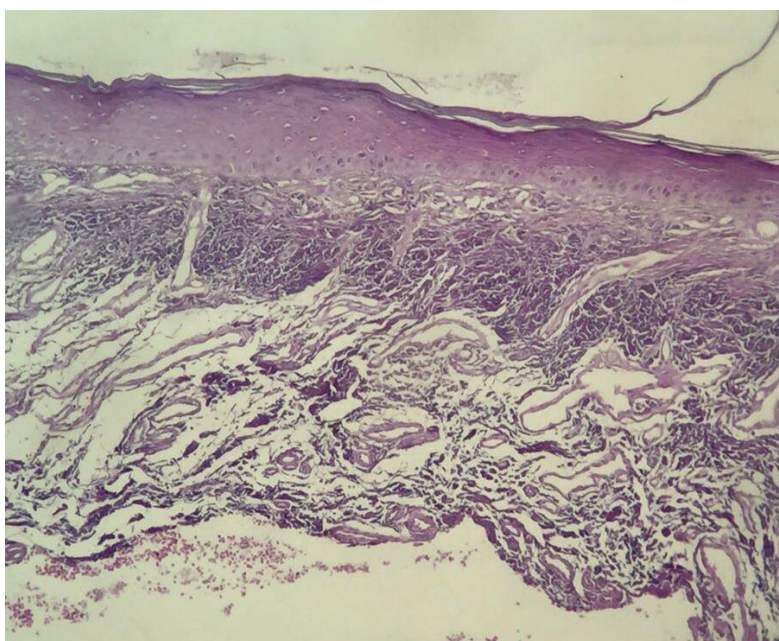


Figura 16- Fotos ilustrativas de lâmina histológica de um participante da pesquisa, antes aplicação da TFD. (Fotografias de autoria do pesquisador).

A figura 17 ilustra a imagem histológica de mucosa oral com maior aumento demonstrando hipercromatismo nuclear em áreas focais na camada basal epitelial. A lâmina própria demonstra ampla degeneração basofílica das fibras colágenas sem maiores alterações tissulares. H&E . 400x

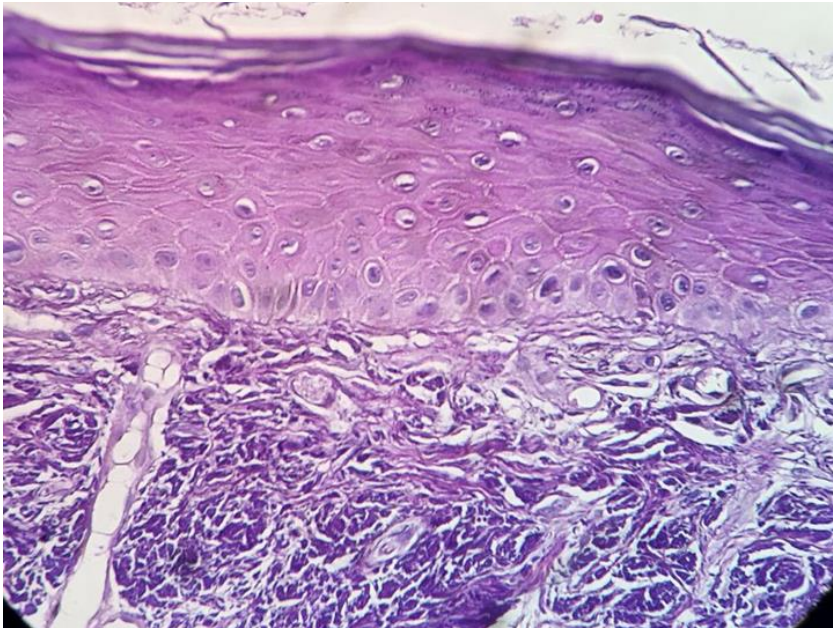


Figura 17- Fotos ilustrativas da lâmina histológica de um participante da pesquisa, antes aplicação TFD. (Fotografias de autoria do pesquisador)

A figura 18 ilustra o epitélio labial demonstrando evidente hiperqueratinização. Verifica-se no tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório mononuclear ao longo dos planos teciduais com maior concentração de celulares inflamatórias em posição sub-epitelial. Pode-se perceber ainda, regiões de intensa deposição colagênica com os feixes fibrosos dispostos de forma desordenada. H&E. 40x

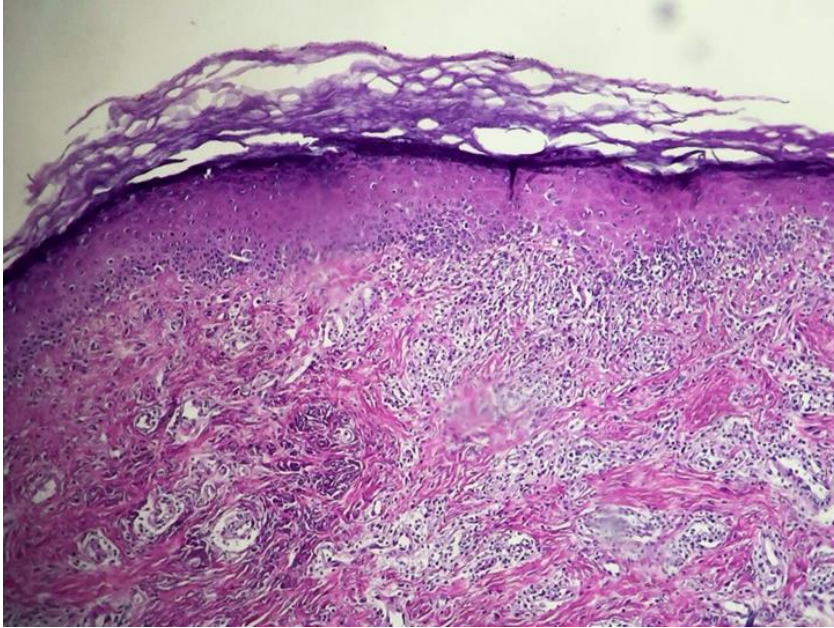


Figura 18 - Foto ilustrativa de lâmina histológica de um participante da pesquisa, após aplicação TFD. (Fotografias de autoria do pesquisador).

Na figura 19 observa-se em maior aumento presença de revestimento epitelial com presença de exocitose e perda da nitidez da membrana basal epitelial. Tecido conjuntivo exibindo intenso infiltrado inflamatório linfocítico na lâmina própria papilar. H&E. 400x

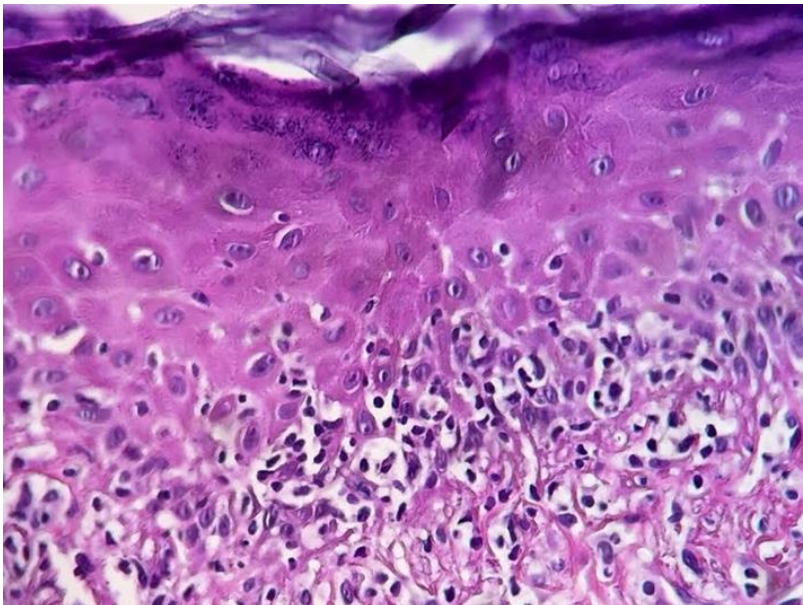


Figura 19- Fotos ilustrativas de lâmina histológica de um participantes da pesquisa, após TFD. (Fotografias de autoria do pesquisador).

5. Discussão

O presente estudo é um ensaio clínico não controlado de terapia fotodinâmica, usando Cloreto de alumínio Ftalocianina como fotosensibilizador, incorporado em nanoemulsão/gel polimérica em lábio inferior, cujo escopo é avaliar a resposta clínica e histopatológica no tratamento da queilite actínica. Foram tratadas dez lesões de QA em 10 pacientes com idade média de 56,8 anos, predominantemente leucodermas, variando entre 40 e 74 anos, com predominância do sexo masculino (90 % de homens). A casuística acompanhada nesta pesquisa clínica foi pequena e o tempo de controle desenvolvido também bastante curto para um desenho de pesquisa prospectivo. Entretanto, a escassez de trabalhos com tal propósito é grande o suficiente para justificar a sua divulgação. Cabe lembrar que os pacientes aqui avaliados seguem sob controle na Clínica de Estomatologia do HRAN e que novos pacientes vem sendo progressivamente incorporados. O perfil demográfico da lesão estudada é semelhante aos descritos para QA na literatura (CASTINEIRAS I et al, 2010; de SOUZA LUCENA EE et al, 2012).

Os casos de QA estudados acometiam predominantemente pacientes do gênero masculino e as lesões estavam situadas em lábio inferior que, devido à sua anatomia, está mais exposto à radiação UV (ABREU et al., 2006). Tal perfil é semelhante ao relatado pela literatura para os pacientes portadores desta enfermidade (SANTOS et al., 2003; MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI; KAYAVIS, 2004; ABREU et al., 2006, CASTINEIRAS I et al, 2010). A análise da média de idade dos pacientes no momento do diagnóstico da QA revelou que a maioria apresentava-se abaixo da sétima década de vida, fato estatisticamente significativo nos pacientes portadores da QA, ou seja, a grande maioria dos pacientes portadores de QA encontrava-se em idade menor que 60 anos. Esses dados condizem com a literatura estudada, que cita faixa etária para QA entre a sexta e sétima décadas de vida, e faixa etária para o Carcinoma de Lábio (CEL) entre a sexta e a oitava década de vida e também condiz com a hipótese de evolução da QA em CEL (KAUGARS et al., 1999; SANTOS et al., 2003; MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI; KAYAVIS, 2004).

Do ponto de vista da análise clínica o presente estudo considerou os resultados como cura completa, quando havia ausência de sinais clínicos de QA, e ausência de cura, quando permaneciam sinais clínicos de QA. Sendo assim, observou-se a ausência de cura em 10 (100,0%) dos pacientes, com permanência de sinais clínicos de QA em todos pacientes. Em nenhum dos casos houve piora clínica. À vista da histopatologia não houve nenhum caso de

cura. Em um caso houve diminuição do grau de displasia e em 8 casos houve manutenção no grau de displasia. Aqui devemos levar em consideração sempre a subjetividade da análise laboratorial, mesmo com a calibração dos 2 patologistas encarregados desta avaliação nos exames histopatológicos.

Apesar da ausência de cura, alguns sinais como eritema, ardência, e dor apresentaram melhoras. No eritema labial, uma impressão clínica forte nos pacientes com quelite actínica, em que 10 (100%) pacientes apresentaram este relato anteriormente ao tratamento com TFD (sendo 9 grau moderado e 1 com grau acentuado), dos 9 pacientes com grau moderada, um passou para o grau leve, permanecendo o paciente com grau severo, 30 dias após a aplicação da TFD. No quesito ardência labial havia relatos em 4 pacientes (40%) antes da aplicação da TFD, mas que após a avaliação de 7 e 30 dias, 2 relataram uma ausência neste sintoma, uma melhora em 50% dos pacientes. Como será abordado adiante, é provável que a baixa permeação da CIAIFt seja a principal causa do insucesso de nossos resultados clínicos, e portanto, seria contraditório com a melhora principalmente da sensação da ardência. Uma explicação então para esses resultados poderia estar associada a penetração da luz (LED), nas terminações nervosas livres do tecido conjuntivo imediato, como ocorre frequentemente nos tratamentos com neoplasia maligna para mucosite de cavidade oral e outros estudos com ardência bucal isoladamente (NERY et al., 2004; CORAZZA et al., 2007; SACONO et al., 2008, MIZIARA et al., 2009; NEVILLE et al., 2009). O único paciente com relato de dor de grau moderada anterior ao tratamento relatou uma diminuição para o grau leve. Vale ressaltar que todos esses critérios são subjetivos e, portanto, sujeitos a percepção de cada paciente.

Os primeiros relatos de casos ou pequenas séries usando TFD no tratamento de QA mostravam resultados promissores. Esses estudos preliminares analisavam os resultados apenas do ponto de vista clínico, sem análise histopatológica, e sem um seguimento em longo prazo (HAUSCHILD et al, 2005; ALEXIADES-ARMENAKAS MR, GERONEMUS, 2004; ROSSI et al, 2008). Em 2008 Sotiriou et al publicaram trabalho com 10 pacientes mostrando cura clínica para QA em 9 pacientes após 2 sessões de ALA-TFD. No entanto, esse mesmo grupo de pesquisadores, publicou um ano mais tarde outro trabalho com mesmo tema incluindo um número bem maior de pacientes mostrando resultados bem diferentes. Esse trabalho, publicado em 2009, incluiu 40 pacientes com displasia graus leve e moderada mostrando taxa de cura clínica completa de 68% após 3 meses. Berking et al, 2007 tratou 15 pacientes com QA com 2 sessões de TFD usando metilaminolevulinato (MAL) (Aktilite® - PhotoCure, Oslo - Noruega), e após 3 meses a resposta clínica completa foi observada em 47% (7/15) e parcial em 47%

(7/15). Essa diferença pode ser explicada pelo tamanho da amostra, menor em relação ao citado anteriormente e/ou pela subjetividade da análise dos resultados na melhora clínica. Ambos os trabalhos obedeceram aos protocolos de aplicação destes diferentes fármacos com múltiplas aplicações de TFD. Aqui vale chamar atenção que o número de aplicações da TFD pode ser um fator importante para o sucesso da terapia. De fato, quando Alexiades-Armenakas e Geronemus (2004) aplicaram TFD para tratamento de QA em pacientes submetidos a 1 ou 2 aplicações, uma melhora clínica completa foi observada em 47% dos casos e no grupo submetido a 3 sessões, em 68%. Chama atenção que em nenhum dos estudos citados anteriormente foram realizados exames histopatológicos para comprovação dos resultados clínicos. Ribeiro et al (2012) publicaram um trabalho em que melhora clínica da QA foi analisada em um estudo com 19 pacientes submetidos a uma única sessão de TFD. Neste trabalho em apenas 16% dos casos a melhora clínica teve correspondência com o histopatológico. Os resultados de Ribeiro e colaboradores reforçam a importância de múltiplas aplicações para o alcance de melhora clínica e terapêutica. Chama a atenção que em nosso trabalho, mesmo para pacientes (n=2) que foram submetidos a 2 sessões da TFD, a resposta terapêutica, clínica, não se alterou.

Uma segunda hipótese para os nossos resultados clínicos é que pode ter ocorrido uma permeação deficiente, com retenção da fotossensibilizante no estrato córneo. Nesse caso, o melhor desempenho clínico dos protocolos de TFD empregando ALA ou MAL pode ser devido a maior permeação destes fármacos no epitélio labial em comparação à CIAIFt. Além do trabalho de Ribeiro e colaboradores (2012), outros trabalhos como o de Sotiriou et al, 2010, mostraram que 5 dos 22 pacientes com cura clínica aos 18 meses, apresentavam ainda sinais de QA na histopatologia. No trabalho de Berking et al, 2007, 3 pacientes dos 7 que tinham cura clínica completa após 3 meses, apresentavam sinais de QA na histopatologia. Tal fato é relevante, pois levanta a possibilidade de estar com a TFD tratando as camadas mais superficiais da epiderme e deixando células alteradas nas camadas mais profundas camufladas. De fato, nossos resultados utilizando célula de Franz mostraram que houve baixíssima permeação da CIAIFt, indicando uma forte explicação para os resultados clínicos e histopatológicos obtidos em nosso trabalho. Trabalho de Leal (2016) mostrou que em um sistema composto de nanoemulsão contendo CIAIFt e paramomicina, esta última foi capaz de permear a pele de camundongos Balb/c, mas o mesmo não aconteceu com a CIAIFt. Num estudo de Ospina VE, 2011 com uso de nanoemulsão de ALCIFt em tratamento para Leishmaniose cutânea, a permeação da nanoemulsão também apresentou retenção importante no estrato córneo. A permeação através do estrato córneo é o passo limitante da velocidade para

a absorção cutânea, na qual depende de uma série de fatores como peso molecular do fármaco e a formulação do veículo no qual o composto está incorporado.

A proposição do emprego de sistemas de liberação de fármacos que proporcionem um aumento na penetração e, conseqüentemente, na concentração de pró-fármacos e FS nos tecidos tumorais, constitui uma maneira de otimizar a terapia, uma vez que a atividade do FS é dependente da sua concentração no tecido alvo (JUZENAS et.al., 1999). No entanto, o sistema empregado em nosso estudo não foi eficiente para o transporte adequado através da camada córnea do fotossensibilizador empregado. Vale ressaltar que as ftalocininas são compostos de alta massa molecular (BOEHNCKE, 2001), o que pode ter contribuído para sua baixa permeação. De fato mesmo em solução alcóolica nossos estudos de permeação demonstraram baixa presença de CIAIFt nos extratos abaixo do extrato córneo.

Outra possibilidade associada a baixa permeabilidade na camada córnea é a retenção nas camadas inferiores da epiderme. No entanto, dados ainda não publicados de nosso grupo, mostram que uma nanoemulsão de AICIFt é capaz de permear a mucosa do colo uterino. Estes resultados em conjunto indicam que provavelmente o extrato córneo é a principal barreira à passagem da CIAIFt, já que o epitélio da mucosa do colo uterino apresenta-se revestida por epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado (ectocérvice) ou epitélio cilíndrico simples (endocérvice). É então provável que em nosso trabalho, a permeação mínima, em função da dificuldade da passagem pelo estrato córneo, não conduziu a incorporação medicamentosa nos queratinócitos, dificultando a resposta clínica e histológica esperada no tratamento da queilite actínica.

Apesar de ser um método seguro a TFD tópica apresenta alguns efeitos adversos como: eritema, edema, prurido, pústulas, hiperpigmentação, ulceração e infecção secundária. No entanto, o mais importante deles é sem dúvida alguma a dor (KOHL E, 2010; BRAATHEN L, 2007; SZEIMIES RM, 2005; LUI H, BISSONNETTE R, 1999; NELSON JS, MC CULLOUGH JL, BERNS MW, 1997; TOREZAN L, 2009; CHAVES YN, 2012). Neste estudo com CIAIFt os efeitos adversos estiveram presente minimamente nos pacientes. Crostas e erosões não foram observadas no período de recuperação das sessões. Nenhuma infecção bacteriana ou efeito adverso sistêmico foi observado. Também não houve cicatriz ou distúrbio de pigmentação. Em relação a dor durante as sessões, os resultados do presente estudo mostraram níveis de dor minimamente apresentados em relação aos demais estudos (SOTIRIOU E, 2008; SOTIRIOU E , 2009; RIBEIRO CF1 et al, 2012). A ausência de efeitos

adversos em nossos estudos podem estar relacionados com o uso de fotossensibilizador de segunda geração, mas muito provavelmente se deve ao fato da baixa penetração do fármaco, em contraposição aos estudos aonde foram aplicados ALA e MAL, com penetração do fármaco gerando seus efeitos adversos.

Os estudos publicados de TFD para tratamento das queratoses actínicas, envolvem ALA e MAL. Todas as evidências mostram que a TFD é eficaz para o tratamento de queratose actínica, ainda que se observem os efeitos colaterais (BRAATHEN L et al , 2007; WEBBER A et al , 2014; MORTON CA, MCKENNA KE, RHODES L, 2008; KUIJPERS DI et al , 2006) . A resposta completa das lesões quando se utilizou MAL como fotossensibilizador, após três meses de seguimento é de cerca de 90%, e com ALA de cerca de 89% a 91%, no mesmo período de seguimento (WEBBER A et al , 2014 ;NESTOR MS , 2006; PARISER E et al, 2003; GALVÃO LEG, 2016). Esses resultados estão bem longes dos mostrados aqui no tratamento da QA não apenas com ALA e MAL, mas também em nosso caso com o CIAIFt. Nesses casos, a explicação para a maior permeação do fotossensibilizante pode estar relacionada a intensa escarificação normalmente empregada antes da aplicação de TFD em pacientes com lesões na pele. Além disso, a diluição do fotossensibilizante com a saliva e o formato côncavo do lábio impedindo uma incidência uniforme da luz já foram citados como explicações possíveis para essa diferença de resultados entre QAs e queratoses actínicas (HURWITZ RM, MONGER LB, 1995). Outro ponto importante é que a correlação clínico-histopatológica na queilite actínica é muito pobre fazendo com que uma biópsia com punch possa facilmente não refletir o grau de displasia mais intenso do lábio (SZEIMIES RM, 2005). Assim basear-se em uma biópsia focal do lábio para aferir o grau de displasia como um todo pode não refletir a realidade. Esse é um fato peculiar na queilite actínica e pode ser o responsável pela diferença nos resultados observados nos estudos sobre esse tema (NICO M, RIVITTI E, LOURENÇO S, 2007). É importante considerar que no presente trabalho a concavidade do lábio não se tornou uma dificuldade na aplicação do fotossensibilizador, pela aplicação do LED envolvendo toda a superfície labial, bem como pela aplicação do Top Dam, um protetor de barreira gengival fotopolimerizável, usado frequentemente nos clareamento dentários, evitando desta forma a inclinação do fotossensibilizante para a mucosa bucal, retendo-o exclusivamente sobre o epitélio labial, recebendo a irradiação da terapia fotodinâmica no local desejado.

Pelo que já foi referido anteriormente, a pele apresenta-se como uma barreira à penetração de fármacos, sendo, por isso, fundamental que novos protocolos de TFD para o tratamento de QA

levem em consideração não só o fotossensibilizador utilizado, como também maneiras de se ultrapassar o extrato córneo de forma mais efetiva.

6. Conclusão

Apesar dos pacientes referirem melhoras de sinais como eritema e dor, a TFD utilizando como fotossensibilizador o Cloreto de alumínio ftalocianina em carreador nanoestruturado, não foi efetiva para o tratamento de queilite actínica. A principal hipótese para os resultados observados foram a incapacidade de permeação da CIAIFt no extrato córneo.

Mesmo com mínima permeação, é importante salientar a melhora significativa da ardência e da dor, considerando a função da luz na TFD como fator de resolatividade destes sintomas.

Observada ausência de efeitos adversos, cicatriz ou distúrbio de pigmentação em contraposição com outros estudos.

O resultado da aplicação do TOP DAM com sua função retentiva e protetora sobre o lábio inferior foi fundamental para evitar a inclinação da nanoemulsão para área adjacente de mucosa e pele.

Importante considerar a necessidade de novos estudos para o desenvolvimento de novas formulações de fármacos fotossensíveis em veículos nanoestruturados, que visam especificidade e aumento da penetração do fotosensibilizante e assim melhoria dos resultados obtidos com a TFD.

7. Referências

ABREU, M. A. et al. Actinic cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 72, n. 6, p. 767-71, Nov-Dec 2006.

ALEXIADES-ARMENAKAS, M.R., GERONEMUS, R.G. Laser-mediated photodynamic therapy of actinic cheilitis. **J Drugs Dermatol**, v.3, p.548-51, 2004.

ALLISON, R.R., DOWNIE, G.H., CUENCA, R., et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 1, p. 27-42, 2004.

ALLISON, R.R., MOTA, H.C., BAGNATO, V.S., et al. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy—State of the art review. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 5, p.19-28, 2008.

ALLISON, R.R., SIBATA, C.H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 7, n.2, p.61-75, 2010.

ANDRADE, B. et al. New Frontiers for Encapsulation in the Chemical Industry. **Acs Applied Materials & Interfaces**. v. 7, p. 6359-6368, 2015.

ANGEL-PETERSEN E., SORENSEN R., WARLOE T, et al. Porphyrin formation in actinic keratosis and basal cell carcinoma after topical application of methyl-5- aminolevulinate. **J Invest Dermatol**, v. 126, p. 265–271, 2006.

ARIAS et al. Lipid-Based Drug Delivery Systems for Cancer Treatment. **Current Drug Targets**, v. 12, p. 1151-1165, 2011.

ARMENORES, P. et al. Treatment of actinic cheilitis with the Er:YAG laser. **J Am Acad Dermatol**, v.63, n.4, p.642-6, oct 2010.

ASBILL, C.S. and MICHNIAK, B.B. **Pharm. Sci. & Tech. Today**, v.3, p. 36–41, 2000

- AYRES, S. Chronic actinic cheilitis. **J Am Med Assoc**, v. 81, n. 14, p. 1183- 6, Oct. 1923.
- BABILAS, P. et al. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v.26, p. 118–132, 2010.
- BAGATIN E. 5-fluorouracil for actinic keratoses. **Expert Review of Dermatology**, v.5, p.131-48, 2010.
- BARBUGLI, P. A. et al. In Vitro Phototoxicity of Liposomes and Nanocapsules Containing Chloroaluminum Phthalocyanine on Human Melanoma Cell Line, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 569-573, 2010.
- BARNES, L. et al. **World Health Organization. Classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours**. IARC Press: Lion, 2005.
- BARRY, B.W. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.14, p.101-14, 2001.
- BERKING, C. et al. The efficacy of photodynamic therapy in actinic cheilitis of the lower lip: a prospective study of 15 patients. **Dermatol Surg**, v.33, p.825-30, 2007.
- BHASKAR, S. et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. **Particle and fibre toxicology**, v.7, p.3, 2010.
- BHUVANESWARI, R.; GAN, Y.Y. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. **Cell Mol Life Sci**, v.66, p. 2275–83, 2009.
- BOEHNCKE, W.H., Topical photodynamic therapy for psoriasis, In: Calvazara- Pinton, P., Szeimies, R.M., Ortel, B., Photodynamic therapy and Fluorescence diagnosis in dermatology, **Elsevier Science**, p. 259-270, 2001.

BRAATHEN, L.R.; MONTON, C.A., BASSET-SEGUIN, N. et al. Photodynamic therapy for skin field cancerization: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 26, p. 1063–66, 2012.

BRENNAN, M. et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.103 Suppl:S19 e1-2, 2007.

BRUXEL, F., et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v.35, p.1827-40, 2012.

BURNS, C.A., BROWN, M.D. Imiquimod for the treatment of skin cancer. **Dermatol Clin**, v.23, n.1, p.151-64, jan 2005.

ÇAKIR, D. et al. Amphiphilic zinc phthalocyanine photosensitizers: synthesis, photophysical properties and in vitro studies for photodynamic therapy. **Dalton Transactions**, v. 44, p. 9646-9658, 2015.

CALDEIRA, P. C.; ABREU, M. H. N. G.; CARMO, A. V. Binary system of grading oral epithelial dysplasia: evidence of a bearing to the scores of an immunohistochemical study. **J. Oral Pathol Med**, v. 41, p. 452–453, 2012.

CALZAVARA-PINTON P.G; ROSSI M.T.; SALA R. A retrospective analysis of real-life practice of off-label photodynamic therapy using methyl aminolevulinate (MAL-PDT) in 20 Italian dermatology departments. Part 2: oncologic and infectious indications. **Photochem Photobiol Sci**, v.12, n.1, p.158-65, jan 2013.

CAMPISI, G.; MARGIOTTA, V. Oral mucosal lesions and risk habits among men in an Italian study population. **J Oral Pathol Med**, v.31, n.8, p.22-8, 2002.

CAMUR, M.; AHSEN, V.; DURMUS, M. The first comparison of photophysical and photochemical properties of non-ionic, ionic and zwitterionic gallium (III) and 100 indium (III) phthalocyanines. **Journal of Photochemistry and Photobiology A Chemistry**, v. 219, p. 217-227, 2011.

CARVALHO, M. et al. Alterations in the immunoexpression of galectins-1, -3 and -7 between different grades of oral epithelial dysplasia. **J. Oral Pathol. Med**, v. 42, n. 2, p. 174-9, 2012.

CASTINEIRAS I. et al. Actinic cheilitis: evolution to squamous cell carcinoma after carbon dioxide laser vaporization. A study of 43 cases. **J Dermatolog Treat**, v.21,p.49-53,2010.

CAVALCANTE A.S., ANBINDER A.L., CARVALHO Y.R. Actinic Cheilitis: Clinical and Histological Features. **J Oral Maxillofac Surg**, v.3, n.66, p. 498-503, 2008.

CHAKRABARTY, A.K.; MRAZ, S.; GEISSE, J.K.; ANDERSON, N.J.; Aphthous ulcers associated with imiquimod and the treatment of actinic cheilitis. **J Am Acad Dermatol**, v.52 (2 Suppl 1), p.35-7, Feb, 2005.

CHATTERJEE D.K., FONG L.S., ZHANG Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. **Adv Drug Deliv Rev**, v.60, p.1627-37, 2008.

CHAVES Y.N. et al. Pain in photodynamic therapy: mechanism of action and management strategies. **An Bras Dermatol**, v.87, n.4, p.521-6, 2012.

CORAZZA, A.V.; JORGE J.; KURACHI, C. et al. Photobiomodulation on the angiogenesis of the skin wounds in rats using different light sources. **Photomed Laser Surg**, v.25, n.2, p.102-5, 2007.

DE BERKER, D.; MCGREGOR, J.M.; HUGHES, B.R. British association of dermatologists therapy guidelines and audit subcommittee, guidelines for the management of actinic keratosis. **Br J Dermatol**, v. 156, p. 222-230, 2007.

de GODOY PERES, F.F., et al. A study of actinic cheilitis treatment by two low-morbidity CO2 laser vaporization one-pass protocols. **Lasers Med Sci**, v.24, n.3,p.375-85, May 2009.

de SOUZA LUCENA, E.E. et al. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. **Oral Dis**, v.18, n. 6, p.575-9, Sep 2012.

DI VENOSA, G.; HERMIDA, L.; BATTLE A, et al. Characterization of liposomes containing aminolevulinic acid and derived esters. **J Photochem Photobiol B Biol**, v.92, p.1–9, 2008.

DIXIT, S. et al. Dual Receptor-Targeted Theranostic Nanoparticles for Localized Delivery and Activation of Photodynamic Therapy Drug in Glioblastomas. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, p. 3250-3260, 2015.

DOLMANS, D.E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, p.380-87, 2003.

DUFRESNE, R.G.; Jr., CRUZ, A.P.; ZEIKUS, P.; PERLIS, C.; JELLINEK, N.J. Dermabrasion for actinic cheilitis. **Dermatol Surg**, v.34, n.6, p.848-50, 2008.

DUFRESNE, R.G. Jr.; CURLIM, M.U. Actinic cheilitis. A treatment review. **Dermatol Surg**, v.23, n.1, p. 15-21, 1997.

EL-KHATIB, M. et al. Aminolevulinic Acid¹⁰⁶ Mediated Photodynamic Therapy of Human Meningioma: An in Vitro Study on Primary Cell Lines. **Int J Mol Sci**, v. 16, n.5, p. 9936-48, 2015.

ESCOBAR, P. et al. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in leishmania promastigotas. **Biomédica**, v.26, p.49-56, 2006.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **PSTT**, v.3,p.12, 2000.

FREDDO, A.L.; VOGT B.F.; TORRIANI, M.A.; HOSNI, E.S. Vermelionectomy: a treatment alternative for actinic cheilitis. **Rev. Odonto Ciênc**, v. 24, n.3, p. 319-322, Apr 2009.

FREITAS, V. et al. Mast cells and matrix metalloproteinase 9 expression in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod**, v. 112, n. 3, p. 342-8, 2011.

GAD, F. et al. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induces apoptosis and caspase activation in malignant T cells. **J Cutan Med Surg**, v. 5, n.1, p.8-13, 2001.

GALVÃO, L.E.G. et al. Daylight photodynamic therapy: pharmacoeconomics of methyl aminolevulinate cream use for facial actinic keratosis. **Surg Cosmet Dermatol**, v.8, n.3, p.246-9, 2016.

GHASRI, P. et al. Treatment of actinic cheilitis using a 1,927-nm thulium fractional laser. **Dermatol Surg**, v.38, p.3, p.504-7, Mar 2012.

GREISH, K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. **Methods Mol Biol**, v.624, p.25-37, 2010.

HANDMAN J.G., LIMBIRD L.E., GILMANA.G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10° edição, Mc Grawtil. p. 1349-1351, 2003.

HARDING, C.R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatol. Ther**, v.17, p. 6-15, 2004.

HAUSCHILD A. et al. Treatment of actinic cheilitis using photodynamic therapy with methylaminolevulinate: report of three cases. **Dermatol Surg**, v.31, p.1344-8, 2005.

HECHT, S.S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco induced cancer. **Nature**, v.3, p.733-44, 2003.

Ho M.W., RISK J.M., WOOLGAR J.A., et al. The clinical determinants of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. **Oral Oncol**, v.48, p.969-976, 2012.

HUANG, N.; CHENG, G.; LI, X. et al. Influence of drug-light-interval on photodynamic therapy of port wine stains - simulation and validation of mathematic models. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 5, p.120-6, 2008.

HUANG, Y-Y. et al. Can nanotechnology potentiate photodynamic therapy ? **Nanotechnol Rev**, v.1, p.111–46, 2012.

HURWITZ, R.M.; MONGER, L.B. Solar keratosis: an evolving squamous cell carcinoma: benign or malignant? **Dermatol Surg**, V.21, p.184, 1995.

HUBER, M.A. White oral lesions, actinic cheilitis, and leukoplakia: confusions in terminology and definition: facts and controversies. **Clin Dermatol**, v. 28, n.3, p.262-8, May-Jun 2010.

JADOTTE, Y. T., SCHWARTZ, R. A. Solar cheilosis: an ominous precursor: part I. Diagnostic insights. **J. Am. Acad. Dermatol**, v. 66, n. 2, p. 173-84, 2012a.

JING, X. et al. A novel polyethylene glycol mediated lipid nanoemulsion as drug delivery carrier for paclitaxel. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 13,n.5,p. 1597-1605, 2013.

JUMPING, W. et al. Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of PEGlipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol. **International journal of pharmaceutics**, v.251,p.13-21, 2003.

JUZENAS, P. et al. Uptake of topically applied 5 aminolevulinic acid and production of protoporphyrin IX in normal mouse skin: dependence on skin temperature. **Photochem. Photobiol**, v. 69, p. 478-481, 1999.

KAUGARS, G.E. et al. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.88, n2, p.181-6,1999.

KENNEDY, J.C.; POTTIER, R.H.; PROSS, D.C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX. Basic principles and present clinical experience. **J Photochem Photobiol B**, n.6, p.143-8, 1990.

KIESSLICH, T.; BERLANDA, J.; PLAETZER K, et al. Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan and Fosfolip based photodynamic therapy in human biliary tract cancer cell lines. **Photochem Photobiol Sci**, n. 6, p. 619-627, 2007.

KODAMA M. et al. Photodynamic therapy for the treatment of actinic cheilitis. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v.23, p.209-10, 2007.

KOHL, E. et al. Aesthetic effects of topical photodynamic therapy. **J Eur Acad Dermatol**, v. 24, n. 11, p. 1-9, 2010.

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol**, v. 42, n. 10, p. 987-93, 2006.

KUIJPERS, D.I. et al. Similar effectiveness of methyl aminolevulinate and 5-aminolevulinate in topical photodynamic therapy for nodular basal cell carcinoma. **J Drugs Dermatol**, v.5, p.642-5, 2006.

KULBACKA, J. Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) impact and enhanced Photofrin II (R) delivery in photodynamic reaction in cancer and normal cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.12, n.4, p.621-9, 2015.

KUZELOVA, K. et al. Early apoptotic features of K562 cell death induced by 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B**, 2005; n,73, p. 67-78, 2005.

LEAL, S.M.P. **Otimização de uma nanoformulação de Alumínio-Cloro-Ftalocianina associada ao antibiótico Paromomicina para tratamento da Leishmaniose Cutânea por meio de Terapia Fotodinâmica**. 2016. Tese. (Doutorado em Nanociências e Nanobiotecnologia)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

LEVI, A.; WULF, H.C., ENK, C.D. Two cases of actinic cheilitis responsive to daylightactivated photodynamic therapy (DA-PDT). **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v.29, n.5, p. 268-71, 2013.

LIMA, GDA S.; SILVA, GF.; GOMES, A.P.; DE ARAUJO L.M.; SALUM, F.G. Diclofenac in hyaluronic acid gel: an alternative treatment for actinic cheilitis. **J Appl Oral Sci**, v.18, p.533-7, 2010.

LIU, W. et al. Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients. **BMC Cancer**, v. 10, p. 685, 2010.

LONGO, J. P. F. et al. Photodynamic Therapy Mediated by Liposomal Chloroaluminum-Phthalocyanine Induces Necrosis in Oral Cancer Cells. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 3, p. 148- 156, 2013.

LUCENA, E.E.S et al. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. **Oral Dis**, v.18, p.575-579, 2012.

LUI, H., BISSONNETTE, R. Photodynamic therapy. In: Goldman MP, Fitzpatrick RE. **Cutaneous laser surgery**, p. 437-58, 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1999.

LUNA-ORTIZ, K. et al. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. **Oral Oncol**, v. 40, n. 10, p. 992-9, Nov 2004.

MACFARLANE, G. E., TEREZHALMY, G. T. Actinic cheilitis diagnosis, prevention and treatment. **U. S. Navy Med**, v. 73, n. 6, p. 22-4, 1982.

MACHADO, A. H. A. et al. Cellular Changes After Photodynamic Therapy on HEp-2 Cells Using the New ZnPcBr8 Phthalocyanine, **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, p. 143-149, 2010.

MAIN, J. H. P.; PAVONE, M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. **Journal of Canadian Dental Association**, v. 60, n. 2, p. 113-116, Feb 1994.

MANG, T. Dosimetrics concepts for PDT. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 5, p. 217-223, 2008.

MARKOPOULOS, A.; ALBANIDOU-FARMAKI, E.; KAYAVIS, I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Dis**, v. 10, n. 4, p. 212-6, 2004.

MARTINS-FILHO P.R.S., SILVA L.C.F., PIVA M.R. The prevalence of actinic cheilitis in farmers in a semi-arid northeastern region of Brazil. **Int J Dermatol**, v.50, p.1109-1114, 2011.

MASON, T.G. et al. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v.18, p.635–66, 2006.

McDONALDS, C.; LAVERICK, S.; Fleming, C.J.; White, S.J. Treatment of actinic cheilitis with imiquimod 5% and a retractor on the lower lip: clinical and histological outcomes in 5 patients. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.48, n.6, p.473-6, Sep 2010.

MELROSE, R.J., Premalignant oral mucosal diseases. **J Calif Dent Assoc**, v.29 , n.8, p.593-600,2001.

MENON, G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Adv. Drug Del. Rev**, v. 54, p. 3-17, 2002.

MIZIARA I.D. et al. Group psychotherapy: an additional approach to burning mouth syndrome. **J Psychosom Res**, v.67, p.5, p.443-8, 2009.

MOLONEY, F.J., COLLINS, P. Randomized, double-blind, prospective study to compare topical 5- aminolaevulinic acid methylester with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for extensive scalp actinic keratosis. **Br J Dermatol**, v.157, p. 87–9, 2007.

MORTON, C.A.; BROWN, S.B.; COLLINS, S. et al. Guidelines for topical photo dynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. **Br J Dermatol**, n.146, p. 552–567, 2002.

MORTON, C.A.; MCKENNA, K.E.; RHODES L.E. British Association of Dermatologists Therapy Guidelines and Audit Subcommittee and the British Photodermatology Group. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. **Br J Dermatol**. 2008; 159:1245-66, 2008.

NANKIVELL, P. et al. The binary oral dysplasia grading system: validity testing and suggested improvement. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 115, n. 1, p. 87- 94, 2013.

NERY, F.S.; LAURIA R.A.; V.A. S; Oliveira, M.G.A. Avaliação da ansiedade e depressão em pacientes da terceira idade e sua relação com a Síndrome da Ardência Bucal. **R Ci Méd Biol**, v.3, n.1. p.20-9, 2004.

NESTOR, M.S. et al. The use of photodynamic therapy in dermatology: results of a consensus conference. **J Drugs Dermatol**, v.5, n.2, p.140-54, 2006.

NETO PIMENTEL, D.R. et al. Actinic cheilitis: histopathology and p53. **J Cutan Pathol**, v.33, n.8, p.539-44, 2006.

NELSON, J.S.; MC CULLOUGH, J.L.; BERNS, M.W. **Principles and applications of photodynamic therapy in dermatology**. In: Arndt KA, Dover JS, Olbright SM. Lasers in cutaneous and aesthetic surgery. Philadelphia: Lippincot-Raven, p.349-82, 1997

NEVILLE, B.W.; DAM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. **Patologia Oral e Maxilofacial**. Segunda edição ed: Guanabara Koogan; 2004.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. **Patologia Oral Maxilofacial**. Trad.3a Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, p. 972, 2009.

NICO, M.; RIVITTI, E. A.; LOURENCO, S. V. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. **J. Cutan.Pathol**, v. 34, n. 4, p. 309-14, 2007.

NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKTOSA, T. et al. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochim Pol**, n.52,p. 339-352, 2005.

OGUNSIPE, A.; NYOKONG, T. Photophysicochemical consequences of bovine serum albumin binding to non-transition metal phthalocyanine sulfonates. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 4, p. 510-516, 2005.

OLIVEIRA FILHO J. **Queilite actínica – avaliação clínica, histopatológica e histoquímica do tratamento com laser de CO2**. [dissertação]- São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

ORENSTEIN, A. et al. A new modality in the treatment of actinic cheilitis using the Er:YAG laser. **J Cosmet Laser Ther**, v.9, p. 23-5, 2007.

OSPINA, V.E. et al. Permeación en piel humana de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada para la optimización de tratamientos tópicos de leishmaniasis cutánea. **Rev Cienc Salud**, v.12, n.2, p.195-211, 2014.

PARISER, D.M.; LOWE, N.J.; STEWART, D.M. et al. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial. **J Am Acad Dermatol**, v.48, p. 227–232, 2003.

PATEL, G.K.; GOODWIN, R.; CHAWLA, M. et al. Imiquimod 5% creme monoterapia para carcinoma cutâneo de células escamosas in situ (doença de Bowen): um ensaio clínico randomizado, duplo cego, controlado com placebo. **J Am Acad Dermatol**, v. 54, p. 1025-1032, 2006.

PEREIRA, J. O. S. et al. Epidemiology and correlation of the clinicopathological features in oral epithelial dysplasia: analysis of 173 cases. **Ann Diagn Pathol**, v. 15, n. 2, p. 98-102, Apr 2011.

PIÑERA-MARQUES, K. et al. Actinic lesions in fishermen's lower lip: clinical, cytopathological and histopathologic analysis. **Clinics**, v. 65, n. 4, p. 363-7, 2010.

PRAÇA F.S.G. Liberação e permeação in vitro de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais.

PRIMO, F.L.; BENTLEY, M.V.; TEDESCO, A.C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. **J Nanosci Nanotechnol**, v.8, n.1, p. 340-7, 2008

PUKKALA, E.; MARTINSEN, J.L.; LYNAGE, E. et al. Occupation and cancer - follow-up of 15 million people in five Nordic countries. **Acta Oncol**, v.48, p.646-790, 2009.

RIBEIRO C.F. et al. Photodynamic therapy in actinic cheilitis: clinical and anatomopathological evaluation of 19 patients. **An Bras Dermatol**, v.87, n.3, p.418-23, 2012.

ROJAS, I. G. et al. Increased fibroblast density in actinic cheilitis: association with tryptase-positive mast cells, actinic elastosis and epithelial p53 and COX-2 expression. **J Oral Pathol Med**, v. 41, n. 1, p. 27-33, 2012.

ROSSI, R.; ASSAD, G.B.; BUGGIANI, G.; LOTTI T. Photodynamic therapy: treatment of choice for actinic cheilitis? **Dermatol Ther**, v.21, p.412-5, 2008.

SACONO, N. T. **Uso de LED vermelho em mucosite induzida por quimioterapia.** (Dissertação de Mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2007.

SANTOS, J. N. et al. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. **J Cutan Pathol**, v. 30, n. 4, p. 237-41, Apr 2003.

SAVAGE, N.W.; MCKAY, C.; FAULKNER, C. Actinic cheilitis in dental practice. **Aust Dent J**, 2010, v.55 Suppl 1, p.78-84, Jun 2010.

SHAH, A.Y.; DOHERTY, S.D., ROSEN, T. Actinic cheilitis: a treatment review. **Int J Dermatol**, v.49, n.11, p.1225-34, Nov 2010.

SINGH, G.; ALQAWI, O.; ESPIRITU, M. Metromic PDT and the cell death pathways. **Photodynamic therapy: Met Mol Biol**, n. 5, p.65-69, 2010

SINHA, R.; KIM, G.J.; NIE, S.; SHIN, D.M. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Mol Cancer Ther**, n.5, p.1909- 17, 2006.

SIMÕES, S.I., Veiculação Transdérmica de Fármacos: I. A pele humana. II. Liberação Transdérmica. **Moreira JR Editora**, Lisboa; 200- 216, 2004.

SOTIRIOU, E. et al. Actinic cheilitis treated with one cycle of 5-aminolaevulinic acidbased photodynamic therapy: report of 10 cases. **British Journal of Dermatology**, v. 159, p.231–266, 2008.

SOTIRIOU, E et al. Intraindividual, right–left comparison of topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy vs. 5% imiquimod cream for actinic keratoses on the upper extremities. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 9, p.1061–1065, Sep 2009.

SOTIRIOU, E. et al. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in actinic cheilitis: an 18-month clinical and histological follow-up. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.24, n. 8, p. 916–920, August 2010.

SUHONEN, T., BOUWSTRA, J.A., URTTI U. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **J Control Release**, v.59, p.149-61,1999.

SZEIMIES, R.M. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. **Acta Derm Venereol**, V.85, P.483-90, 2005.

TAMILVANAN, S et al. Studies on ocular and parenteral application potentials of azithromycinloaded anionic, cationic and neutral-charged emulsions. **Current drug delivery**, v.10, p. 572-86, 2013.

TIBBITT, M. W.; DAHLMAN, J. E.; LANGER, R. Emerging Frontiers in Drug Delivery. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, p. 704-717, 2016.

TOMAZINI, M.V.; SOUZA, C.S; GARCIA, S.B. et al. Topical photodynamic therapy with zinc phthalocyanine: evaluation of fluorescence intensity, skin absorption, skin histological and immunohistochemical changes in animal model. **An Bras Dermatol**, n. 82, p.535-41, 2007.

TOREZAN, L.; NIWA, A.B.M.; FESTA NETO C. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **A Bras Dermatol**, v.84, p. 445-59, 2009.

TORCHILIN, V, P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **AAPS J**, n.9, p.128-47, 2007.

TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLEN, J.H.M. et al. Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, n.11, p.1034-44, 2006.

TSCHEN, E.H et al. Photodynamic therapy using aminolaevulinic acid for patients with nonhyperkeratotic actinic keratoses of the face and scalp: Phase IV multicentre clinical trial with 12-month follow up. **Br J Dermatol**, v.155, p. 1262–69, 2006.

ULRICH, C. et al. Management of actinic cheilitis using diclofenac 3% gel: a report of six cases. **Br J Dermatol**. v.156, p.43-6, May 2007.

VAN DONGEN, G.A.; VISSER, G.W.; VROUENRAETS, M.B. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, n.1, p. 31-52, 2004.

VAN STRATEN et al. Onphologic Photodynamic Therapy: Princípios básicos, status clínico atual e orientações futuras. **Cancer**, v.9 , p.19,2017.

WEBBER A. et al. Photodynamic therapy versus imiquimod in the treatment of multiple actinic keratoses of the face: a comparative randomized study. **Surg Cosmet Dermatol**, v.6, n.4, p.325-9, 2014.

VIEIRA, R. A. M. A. R. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and imunogenetic aspects. **An. Bras. Dermatol**, v. 87, n. 1, p. 105-14, 2011.

YONCHEVA, K.; LIZARRAGA, E.; IRACHE, J.M. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p.411-9, 2005.

WANG, J.; MAITANI, Y.; TAKAYAMA, K. Antitumor effects and pharmacokinetics of aclacinomycin A carried by injectable emulsions composed of vitamin E, cholesterol, and PEG-lipid. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 91, p.1128- 34, 2002.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J. Oral Pathol. Med**, v. 37, n. 3, p.127-33, 2008.

WARNAKULASURIYA, S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. **J Pathol**, v. 194, n.3, p.294-7, Jun 2001.

WARMAKULASURIVA, S.; JOHNSON, N.W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med**, v. 36, p.575-580, 2008.

WOOD, N.H. et al. Actinic cheilitis: a case report and a review of the literature. **Eur J Dent**, v. 5, p.101-6, 2011.

WRIGHT, K.; DUFRESNE, R. actínica queilite. **Dermatol Surg**, v. 24, p.490-491, 1998.

XAVIER, F.C.A et al. WNT-5A, but not matrix metalloproteinase 3 or β -catenin protein, expression is related to early stages of lip carcinogenesis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, V. 38, n.9, p. 673-736, 2009.

ZEBALLOS, N. C. L. et al. An exhaustive study of a novel sulfur-linked adamantane tetrasubstituted zinc(II) phthalocyanine incorporated into liposomes. **Journal of Photochemistry and Photobiology AChemistry**, v. 235, p. 7-13, 2012.

ZELICKSON, B.D.; ROENIGK, R.K. Actinic cheilitis. Treatment with the carbon dioxide laser. **Cancer**, v.65, n.6, p.1307-11, Mar 1990.

ZIDE, M.F. Actinic keratosis: from the skin to the lip. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n.6, p.1162-76, Jun 2008.

8. ANEXOS

Apêndice I: Termo de consentimento livre esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite para você participar da pesquisa TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR CLORETO ALUMÍNIO FTALOCIANINA ENCAPSULADA EM NANOEMULSÕES EM PACIENTES COM QUEILITE ACTÍNICA: ANÁLISE CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA que é coordenada pelo Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo. Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Este é um estudo experimental para avaliar a eficácia do medicamento alumínio-cloro ftalocianina (AICIF) associado à terapia fotodinâmica em lesões pré-malignas de mucosa oral. Este medicamento é um agente sensibilizador (droga) que será aplicado em seu lábio e posteriormente será realizada aplicação do laser, levando em conta todos os itens de biossegurança necessários. Esta terapia busca novas alternativas para o tratamento desta lesão para assim estabelecer medidas que possam contribuir nos tratamentos empregados até o momento.

Caso decida aceitar o convite, o (a) senhor (a) permitirá a realização de biópsia prévia para diagnóstico definitivo, realização de fotografias e exames complementares, responderá a uma ficha de pré-tratamento, além de receber instruções e orientações sobre a terapia. Posteriormente, será agendado seu atendimento para realização da terapia nas suas lesões. Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Os riscos de sua participação no estudo são mínimos, desde que você cumpra todas as recomendações e orientações fornecidas por nós. Os benefícios desta pesquisa incluem a descoberta de uma terapia eficaz para estas doenças e também para

uma futura utilização desta mesma terapia em pacientes portadores de câncer oral, uma vez que lesões pré-malignas podem sofrer transformação para um câncer oral. Este estudo clínico será importante fonte de informação sobre a eficácia do medicamento em seres humanos e também de seus efeitos colaterais, que denota a segurança do medicamento, especialmente para a indicação clínica à qual se destina. Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito à indenização.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para os pesquisadores responsáveis, no Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília situado no Campus Universitário Darcy Ribeiro – Asa Norte – Brasília – DF. Telefone: (61) 3448 5258. Consentimento Livre e Esclarecido Eu, _____, declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa: TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR CLORETO ALUMINIO FTALOCIANINA ENCAPSULADA EM NANOEMULSÕES EM PACIENTES COM QUEILITE ACTÍNICA: ANÁLISE CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA

Assinatura do Participante _____

Pesquisador (a) responsável _____

Apêndice II: Ficha de coleta de dados

ANEXO A : Avaliação pré-tratamento

FICHA PARA COLETA DE DADOS

Tipo de lesão: () 0 – leucoplasia homogênea; 1 – leucoplasia não-homogênea; 2 - queilite actínica

Localização: () 1 - lábio; 2 - mucosa jugal; 3- palato; 4- língua; 5- assoalho de boca; 6- gengiva inserida

Sintomatologia: () 1- assintomático; 2 – sintomático; 9 - não informado.

Idade: _____ (anos)

Sexo: () 1- masc; 2 - fem; 9 - não info.

Hábito comportamental: () 1- fuma; 2- bebe; 3 - fuma e bebe; 4 - não possui nenhum hábito; 9 - não info.

Mensuração do maior diâmetro da lesão: () antes TFD (1) menor que 1 cm²; (2) maior que 1 cm² e menor que 2 cm²; (3) maior que 2 cm².

História médica:

Tempo de evolução da lesão:

Recorrência ou não: Tratamento prévio:

Medicações em uso: Exames laboratoriais de rotina:

Hemograma completo: _____

Níveis séricos de bilirrubina: _____

Níveis de creatinina sérica: _____

Observações: _____

Informações sobre o estado imunológico, presença ou ausência de gravidez, status da menopausa; utilização de métodos contraceptivos; doenças renais ou hepáticas.

ANEXO B : Avaliação do tratamento e pós-tratamento

Protocolo: Aplicação inicial de um nanoemulgel em aplicação no lábio inferior, com oclusão realizada com, papel de alumínio, com diminuição da incidência da luz ambiente. Como fonte de luz, um LED, um protótipo desenvolvido na Universidade de Brasília, com emissão de luz com comprimento de onda de 660 nm, potência 51.5 mW/cm², fluência 30.92 J/cm², durante 10 minutos, com distância de 10 cm.

Escala de avaliação logo após a TFD: () dor () picadas () ardor () eritema () púrpura () bolhas ou () crostas

(0 = ausência de dor; 1 = leve; 2 = moderada; e 3 = severa)

Análise da resposta terapêutica pós-TFD: ()

(1) resposta completa, ausência de lesões detectáveis confirmada por avaliação clínica;

(2) resposta parcial, a redução da lesão em pelo menos 20% no diâmetro;

(3) nenhuma resposta, a redução da lesão em menos de 20% no diâmetro;

Efeitos adversos:_____ (disfagia, reação alérgica). Prescrição de analgésicos pós TFD: () 1- sim; 2 - não

PROCEDIMENTOS REALIZADOS

() Sessão Data:____/____/____ Densidade Energética:_____ Pontos de aplicação:_____

Fotossensibilizador utilizado (e forma):_____ ()

Sessão Data:____/____/____ Densidade Energética:_____ Pontos de aplicação:_____

Fotossensibilizador utilizado (e forma):_____ ()

Sessão Data:____/____/____ Densidade Energética:_____ Pontos de aplicação:_____

Fotossensibilizador utilizado (e forma):_____

Profissional:_____ (

) Sessão Data:____/____/____ Densidade Energética:_____ Pontos

de aplicação:_____

Fotossensibilizador utilizado (e forma):_____ ()

Sessão Data:____/____/____ Densidade Energética:_____ Pontos de aplicação:_____

Fotossensibilizador utilizado (e forma):_____ Número de sessões realizadas:_____

Observações:_____

PROSERVAÇÃO

7 dias

Escala de avaliação: () dor () picadas () ardor () eritema () púrpura () bolhas ou () crostas

(0 = ausência de dor; 1 = leve; 2 = moderada; e 3 = severa)

Efeitos adversos:_____ (disfagia, reação alérgica).

Mensuração do maior diâmetro da lesão: () pós TFD. (1) menor que 1 cm²; (2) maior que 1 cm² e menor que 2 cm²; (3) maior que 2 cm².

30 dias

Escala de avaliação: () dor () picadas () ardor () eritema () púrpura () bolhas ou () crostas

(0 = ausência de dor; 1 = leve; 2 = moderada; e 3 = severa)

Efeitos adversos:_____ (disfagia, reação alérgica). Mensuração do maior diâmetro da lesão: () pós TFD. (1) menor que 1 cm²; (2) maior que 1 cm² e menor que 2 cm²; (3) maior que 2 cm².

