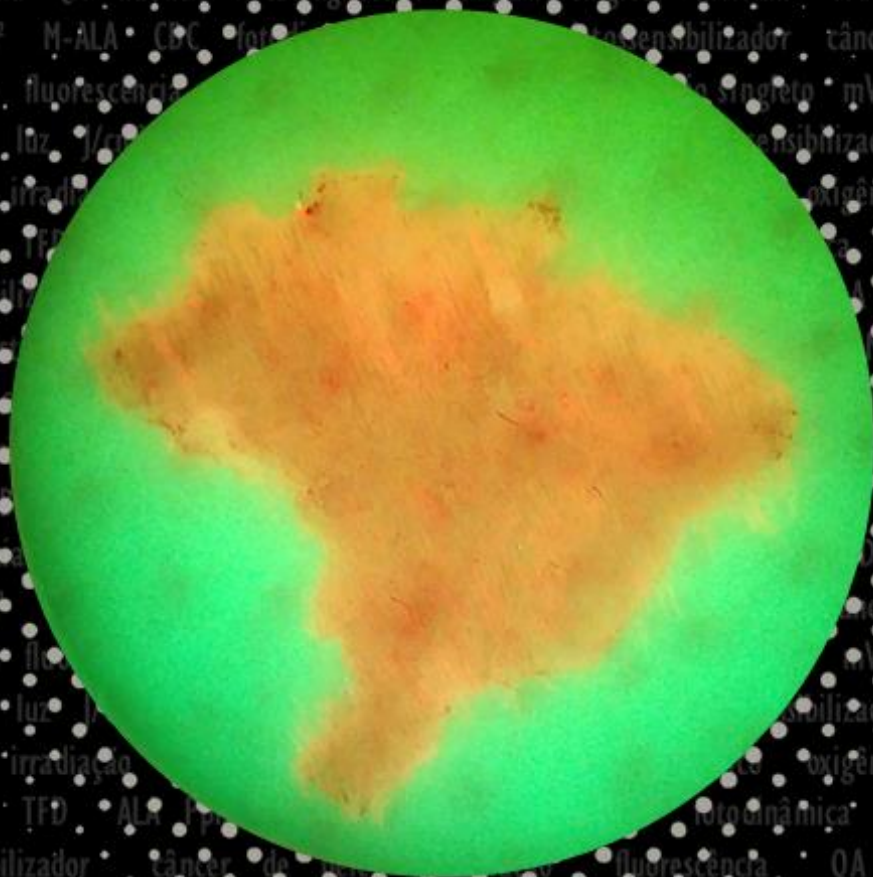


TERAPIA FOTODINÂMICA DERMATOLÓGICA

PROGRAMA TFD BRASIL

VOLUME 2

Iª EDIÇÃO



VANDERLEI S. BAGNATO
MICHELLE B. REQUENA
ORGANIZADORES

Copyright© dos autores

Todos os direitos garantidos. Qualquer parte desta obra pode ser reproduzida, transmitida ou arquivada desde que levados em conta os direitos dos autores.

Vanderlei S. Bagnato e Michelle B. Requena [Organizadores]

Terapia fotodinâmica. São Carlos: Even3 Publicações Editora, 2023. 312 p.

ISBN 978-85-5722-550-3

1. Terapia fotodinâmica. 2. Câncer de pele não melanoma. 3. Lesões pré-malignas. 4. Estudo clínico. 5. Autores. I. Terapia fotodinâmica dermatológica: Programa TFD Brasil

CDD - 610

Capa: Michelle B. Requena. Mirian D. Stringasci, Lilian T. Moriyama e Dianeth Sara L. Bejar

Editor: Michelle Barreto Requena

Editora do e-book: Even3 Publicações

doi: 10.29327/terapia-fotodinamica-dermatologica-programa-tfd-brasil-309087

Microagulhas dissolvíveis contendo ALA para otimização da terapia fotodinâmica

Michelle B. Requena, Dianeth Sara L. Bejar, José Dirceu Vollet-Filho, Clara Maria G. de Faria, Marlon R. Garcia, Sebastião Pratavieira e Vanderlei S. Bagnato

¹ Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil

O uso de microagulhas vem sendo amplamente explorado para facilitar a permeação de substâncias na pele. Para terapia fotodinâmica (TFD) tópica, estudos com o uso de microagulhamento metálico prévio à aplicação do creme demonstraram melhorar a eficiência em termos de homogeneidade de produção de protoporfirina IX (PpIX). Neste estudo, a aplicação de microagulhas dissolvíveis contendo ácido aminolevulínico (ALA) foi avaliada em modelo tumoral de camundongos, assim como testes prévios de caracterização de resistência mecânica e capacidade de inserção *in vitro*. Os arranjos de microagulhas são produzidos com 20% de Gantrez AN-139 e 5% de ácido aminolevulínico (ALA) em água, compostos por 19x19 microagulhas em formato de pirâmides com 500 µm de comprimento. Nos testes *in vitro*, as microagulhas tiveram bom desempenho mecânico, apresentando deformação desprezível e capacidade de inserção para atravessar a pele. Nos resultados em animais, foi possível observar que a formação superficial de PpIX a partir da aplicação de microagulhas foi similar à aplicação do creme, mas atingiu camadas mais profundas do tumor. Considerando a maior distribuição de fotossensibilizador no tumor em profundidade, este modelo de microagulhas dissolvíveis apresenta potencial para diversas aplicações e, posteriormente, uso em estudos clínicos.

doi: 10.29327/terapia-fotodinamica-dermatologica-programa-tfd-brasil-309087.605431

1 Introdução

Microagulhas são dispositivos minimamente invasivos que devido às suas dimensões reduzidas, não atingem terminações nervosas, não causam dor ou sangramento, mas são capazes de penetrar o estrato córneo e permitir a entrega de substâncias através da pele [1]. Há diversos estudos utilizando microagulhas para facilitar a administração intradérmica e transdérmica de medicamentos na pele. Donnelly *et al.*, por exemplo, possui publicações com microagulhas para entrega de antibióticos [2, 3], vacinas [4–6], fármacos para o tratamento de filariose linfática [7, 8], herpes [9], diabetes [10], Alzheimer [11] e reposição de vitaminas [12].

Existem diversos tipos de microagulhas. As microagulhas sólidas, sejam elas confeccionadas com metal ou polímero, costumam ser utilizadas para criação de orifícios para aumentar a permeação de fármacos. Este tipo de microagulhas também pode ser revestido com o fármaco em sua superfície permitindo uma entrega mais rápida. Microagulhas dissolvíveis, por sua vez, são utilizadas para liberação rápida ou controlada de moléculas diretamente incorporadas em sua formulação polimérica. As microagulhas podem ser confeccionadas para serem ocas e permitir a liberação de fármacos líquidos após infusão ou difusão através dos orifícios criados. Por fim, existem microagulhas poliméricas de hidrogel que absorvem fluidos intersticiais do tecido e após o inchamento delas são capazes de induzir a difusão do fármaco presente num reservatório. Larrañeta *et al.* exemplificou e descreveu estes modelos de microagulhas (Figura 1) [13].

O número de trabalhos publicados utilizando microagulhas poliméricas vem crescendo ao longo dos anos [14]. Contudo, este tipo de tecnologia ainda não foi muito explorado no Brasil.

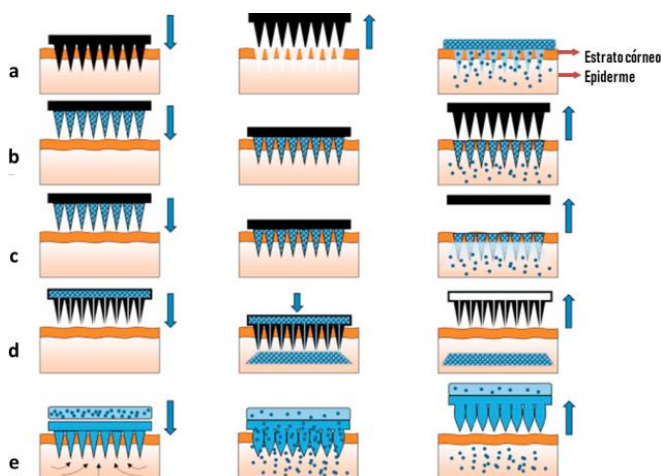


Figura 1. Esquema dos tipos de microagulhas utilizadas para facilitar a entrega de medicamentos na pele; a) microagulhas sólidas, b) microagulhas revestidas, c) microagulhas dissolvíveis, d) microagulhas ocas, e) microagulhas de hidrogel. Fonte: Adaptada de LARRAÑETA [13].

Considerando os avanços em terapia fotodinâmica (TFD) tópica, uma das barreiras é a permeação limitada do creme através do estrato córneo da pele, devido às propriedades hidrofílicas do ALA em pH fisiológico, e a heterogeneidade na formação da protoporfirina IX (PpIX) com influência direta na taxa de sucesso do tratamento, principalmente em lesões espessas.

Técnicas para a entrega intradérmica têm sido estudadas para minimizar a ação de obstáculos à permeação efetiva de drogas na pele; entre elas, técnicas baseadas em equipamentos de microescala têm se mostrado promissoras, que incluem injetores de líquidos, injetores de pó, ablação térmica e microagulhamento [15]. Neste contexto, este estudo propôs avaliar a disponibilização do ácido aminolevulínico (ALA), precursor de PpIX, em maiores profundidades por meio de microagulhas dissolvíveis.

Os resultados descritos neste capítulo são partes da tese de Doutorado de Michelle B. Requena [16]. O objetivo foi desenvolver e avaliar um modelo microagulhas dissolvíveis contendo ALA na formação e

distribuição do fotossensibilizador em camadas mais profundas em um estudo pré-clínico inédito.

2 Fabricação e testes de resistência

Para a fabricação das microagulhas dissolvíveis, é muito importante considerar aspectos relacionados com a formulação, devem ser escolhidos materiais biocompatíveis e biodegradáveis, a fim de não deixar depósitos de polímeros na pele e facilitar a aplicação e descarte [13]. Também é importante considerar a estabilidade do fármaco e capacidade de inserção das microagulhas na pele.

A base polimérica utilizada na formulação foi Gantrez AN-139, que é um copolímero contendo alternadamente éter metilvinílico e anidrido maleico (Ashland, Kidderminster, Reino Unido). Este polímero possui moléculas biodegradáveis, baixa toxicidade, alta biocompatibilidade e propriedades bioadesivas [17, 18]. Neste estudo, foi avaliada uma formulação contendo de 20% de Gantrez AN-139 dissolvido em água, seguindo a preparação descrita na literatura [19, 20].

O ALA foi adquirido da empresa brasileira PDT Pharma LTDA (Cravinhos, SP, Brasil) na forma de pó e incorporado na formulação. Para verificar a quantidade de ALA que poderia ser carregada nas microagulhas, foram realizados testes com diferentes concentrações e secagem à temperatura ambiente. A quantidade com melhor desempenho foi de 5% de ALA.

Para a fabricação dos arranjos de microagulhas (Figura 2), foi utilizado um molde de silicone (LTS, Alemanha) com um arranjo denso de 19x19 em formato de pirâmide, com 500 µm de altura e um espaçamento de 300 µm entre as pontas e 50 µm entre as bases.

O molde com a formulação era posicionado em um galão com pressão de 4 bar por 5 minutos, após despressurização lenta, este processo era repetido. Os moldes com a formulação permaneceram em bancada em temperatura ambiente por 48 horas.

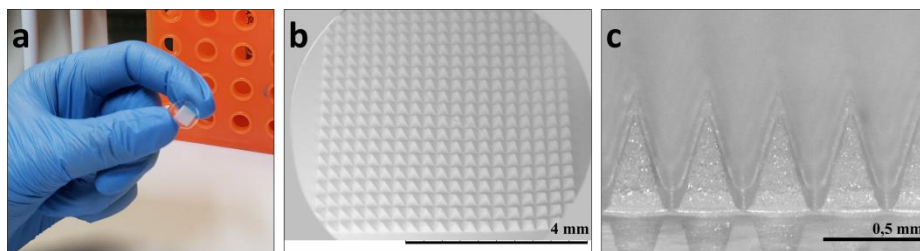


Figura 2. a) Arranjo de microagulha, b) imagem de microscopia eletrônica de varredura do arranjo de microagulhas e c) imagem microscópica das microagulhas.

A resistência mecânica das microagulhas foi avaliada utilizando um equipamento para compressão controlada (Stable Micro Systems®, Surrey, Reino Unido). Cada arranjo de microagulha foi acoplado em uma haste metálica e pressionado por 30 segundos com uma força de 32 N, seguindo protocolo definido por Larrañeta *et al.* [21]. Os arranjos foram pressionados em oito camadas de um filme polimérico comercial (Parafilm M®, Bemis Company, Inc, EUA) seguindo o modelo de membrana *in vitro* aplicado para simular a inserção das microagulhas na pele. [21] Este experimento foi replicado para quatro arranjos de microagulhas.

Para avaliar a deformação após a compressão, cada lado do arranjo de microagulhas teve uma imagem coletada usando microscópio digital (EZ4D, Leica Microsystems, Milton Keynes, Reino Unido) com uso dois filtros polarizadores. Foram feitas medidas da altura antes e depois da compressão de cinco pirâmides aleatórias de cada uma das quatro laterais, para estimar a altura média das microagulhas antes e depois da compressão. Para avaliar a capacidade de inserção das microagulhas, cada camada de parafilme foi separada e observada no microscópio sendo possível quantificar a porcentagem média de furos em cada camada e, assim, associar a capacidade de penetração ao serem inseridas na pele.

3 Modelo animal

O modelo tumoral utilizado foi através da indução xerográfica com células de carcinoma espinocelular (CEC, A-431, ATCC® CRL-1555™) em

camundongos, fêmeas, da linhagem balb c do tipo nude. A inoculação foi feita no flanco do animal (Figura 3), e os experimentos foram conduzidos com tumores de volume médio de $26 \pm 2 \text{ mm}^3$.

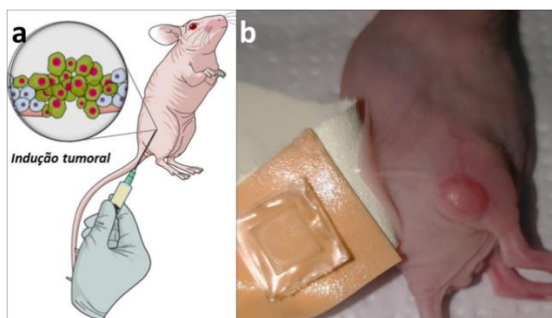


Figura 3. a) Esquema para ilustrar a indução tumoral no modelo animal. b) imagem de um arranjo de microagulha retirado do tumor após período de incubação, demonstrando dissolução na região que estava em contato com a lesão. Fonte: Adaptada de REQUENA [16].

Após um teste piloto, verificou-se que as microagulhas não tinham dissolução aceitável mesmo após 1 hora em contato com tumor. Foi feito um aquecimento local a 40°C por 15 minutos com o equipamento comercial (Derma Cool DC®, Dermius, Brasil), obtendo assim, maior dissolução das microagulhas no tempo de incubação. Para uma avaliação controle, foi feita a comparação da aplicação das microagulhas com a aplicação tópica de creme contendo ALA na mesma concentração (5%) e tempo de incubação.

4 Análise da formação e distribuição da PpIX

Para avaliação da PpIX localizada na superfície do tumor após o tempo de incubação, foram realizadas imagens de fluorescência de campo amplo (Figura 5a e b) através do acoplamento de uma câmera fotográfica à ponteira para evidencição de fluorescência do dispositivo comercial de irradiação (LINCE®, MM Optics, São Carlos, Brasil) à base de LEDs (que emitem na região entre 400 e 450 nm). O processamento destas foi feito a partir de um algoritmo desenvolvido em Python (Python Software

Foundation) considerando a média de intensidade no canal vermelho após decomposição da imagem RGB para associação com a intensidade de fluorescência da PpIX.

Também para avaliação superficial da PpIX, foi feita a coleta de espectros de fluorescência a partir de um sistema montado no Grupo de Óptica do IFSC-USP, que consiste de um espectrofotômetro USB2000 (OceanOptics Inc., EUA) acoplado a um computador e a um laser para excitação de comprimentos de onda em 408 nm. O processamento dos espectros foi feito no programa Origin® (OriginLab Corporation, EUA) associando a intensidade do pico de fluorescência em 630 nm normalizado pela intensidade de fluorescência em 450 nm (Figura 5c).

Para análise da PpIX, principalmente em profundidade, os tumores passaram por um processo de congelamento (a fim de minimizar a degradação do FS) e depois foram cortados em criostato (Leica Biosystems, CM1850, Reino Unido) para avaliação por microscopia confocal de fluorescência (Zeiss - LSM780, Alemanha). Foi utilizado um laser de diodo (405 nm) para excitação e o sinal de fluorescência foi coletado em dois canais, um 430-580 nm devido à fluorescência endógena da pele, e outro 630-670 nm para a fluorescência da PpIX. O processamento destes dados em um algoritmo desenvolvido em Python (Python Software Foundation) associando a informação das imagens de fluorescência do canal vermelho (Figura 6) com a concentração de PpIX em função da profundidade.

5 Resultados e discussão

As microagulhas demonstraram boa resistência mecânica, com diminuição desprezível da altura após a compressão. Considerando a capacidade de inserção, as microagulhas contendo a formulação com ALA tiveram um melhor desempenho comparado à formulação com apenas o polímero. Estes dados concordam com os testes de compressão, sendo um indicativo de que os precursores do ALA, de alguma forma, contribuíram para uma melhor resistência mecânica das microagulhas.

De acordo com um estudo publicado em 2018, foi estimada a espessura média da epiderme por histometria, os resultados variaram de 76,9 a 267,4 μm para mulheres e 112,4 a 244,8 μm para homens. [23] Considerando estes valores, a penetração das microagulhas estimada no teste de permeação seria suficiente para fazer a entrega intradérmica dos precursores em pacientes, uma vez que 80% de microagulhas penetraram até 250 μm de profundidade (Figura 4).

Estes resultados de caracterização demonstram a viabilidade de exploração segura e confiável da entrega de ALA por microagulhas e da avaliação da produção de PpIX após liberação em modelo in vivo tumoral.

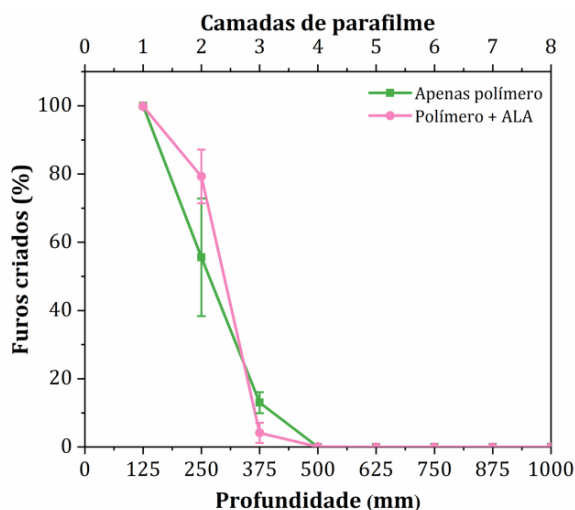


Figura 4. Porcentagem de furos criados em função das camadas de parafilme ou profundidade, considerando a aplicação de microagulhas contendo apenas o polímero e microagulhas com o polímero e ALA.

Fonte: Adaptada REQUENA. [22]

A fluorescência endógena do tumor (Figura 5a) e após 1 hora de incubação (Figura 5b) demonstra a distribuição do FS foi mais localizada quando utilizada a microagulha que com o creme. Isto pode estar relacionado com que a espessura do tumor era maior que o comprimento das microagulhas (a distância entre a superfície perfurada do tumor e a

pele sadia adjacente), portanto, após a aplicação do arranjo, as microagulhas não necessariamente entravam em contato com a pele ao redor do tumor, mas apenas com o tecido da própria lesão.

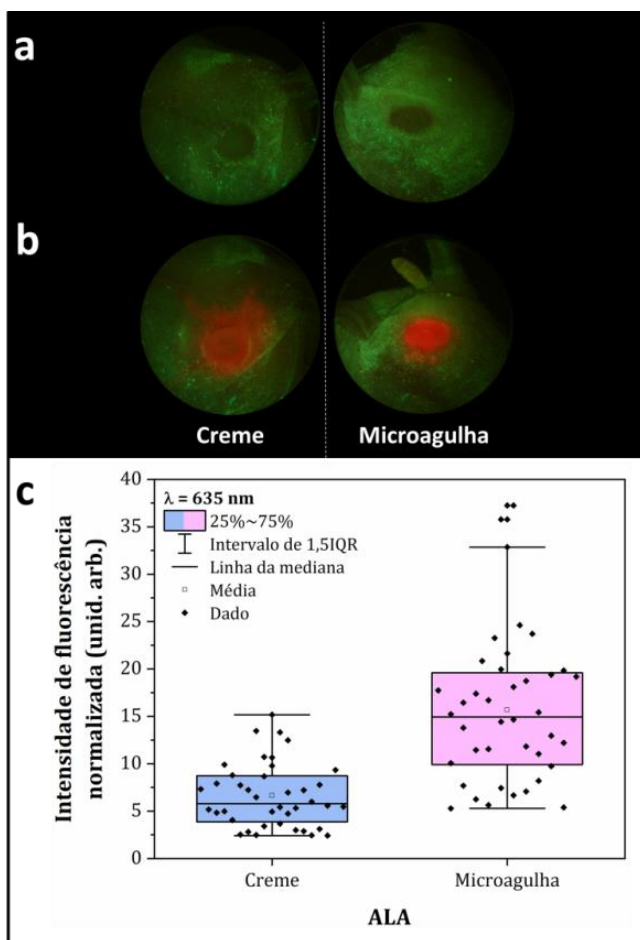


Figura 5. a) Imagem de campo amplo de fluorescência dos tumores antes da sensibilização (fluorescência endógena), b) imagem de campo amplo de fluorescência coletada após 1 hora de incubação do ALA a 5% com aplicação do creme e da microagulha e c) gráfico do tipo boxplot com a intensidade de fluorescência normalizada calculada utilizando os espectros de fluorescência coletados nos tumores 1 hora após a incubação. Cada losango representa o valor da intensidade de fluorescência normalizada de cada espectro coletado em cada animal, sendo 5 espectros por tumor considerando 8 animais.

Fonte: Adaptada REQUENA. [22]

Na Figura 6 estão imagens para ilustrar a fluorescência do canal vermelho considerando o ALA aplicado via tópica por creme (Figura 6a) e via intradérmica por microagulhas dissolvíveis (Figura 6b). As imagens de fluorescência estão sobrepostas pelas imagens da microscopia de transmissão para facilitar a visualização das regiões do tumor.

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

Após o processamento das imagens de microscopia confocal de fluorescência, foi possível quantificar a intensidade média de fluorescência no canal vermelho em função da profundidade. A Figura 5c contém os resultados obtidos, considerando de profundidade de até 1 mm.

Até aproximadamente 200 μm , não foi observada diferença significativa na intensidade de fluorescência entre as aplicações (exceto controle). Porém, a partir desta profundidade, no protocolo envolvendo a aplicação por microagulha, a intensidade de fluorescência sempre é maior que a aplicação por creme.

A integral dos valores em função da profundidade da Figura 6c foi calculada, considerando a subtração do valor para a condição controle (sem sensibilização do tumor). Os resultados mostram que, no geral, o acúmulo quando o ALA foi aplicado por microagulha foi aproximadamente 2,2 vezes maior que quando aplicado por creme.

A permeação do fármaco entre as camadas da pele é uma das principais limitações da TFD tópica. Por isso, alternativas que possibilitem uma entrega mais eficiente de fotossensibilizadores ou precursores podem favorecer o tratamento de tumores mais espessos, para os quais o índice de sucesso da TFD é comumente menor que em tumores superficiais. [25]

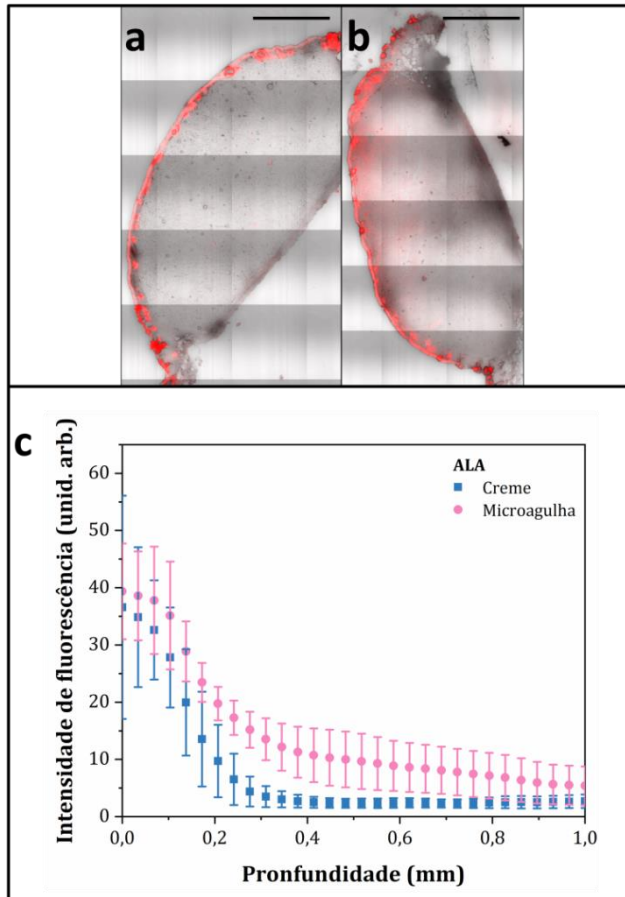


Figura 6. Imagens representativas da microscopia confocal de fluorescência no canal vermelho com sobreposição da imagem de transmissão para as lâminas dos tumores, sendo a) após 1 hora da aplicação de creme, b) após 1 hora da aplicação por microagulhas. A barra no canto superior direito corresponde à escala de 1 mm. c) Intensidade média no canal vermelho das imagens de microscopia confocal de fluorescência em função da distância, para tumores após 1 hora de incubação. Fonte: Adaptada REQUENA. [22]

6 Conclusões

A aplicação de microagulhas dissolvíveis mostraram resultados que superaram a aplicação tópica, mesmo utilizando uma concentração menor que a formulação convencional (20%). Os resultados sugerem que a técnica seja extremamente promissora para estudos de aplicações clínicas, para

confirmar a eficácia para o tratamento de lesões.

O aprofundamento de estudos básicos de eficiência do protocolo para os estudos clínicos são de extrema importância. Estudos de otimização da formulação e tempo de dissolução estão sendo desenvolvidos para viabilizar a aplicação clínica e tornar a técnica ainda mais acessível com mais versatilidade de aplicações.

Referências bibliográficas

- [1] Donnelly RF, Morrow DIJ, McCarron PA, *et al.* Microneedle-mediated intradermal delivery of 5-aminolevulinic acid: Potential for enhanced topical photodynamic therapy. *J Control Release* 2008; 129: 154–162.
- [2] González-Vázquez P, Larrañeta E, McCrudden MTCMTCC, *et al.* Hydrogel-forming and dissolving microneedles for enhanced delivery of photosensitizers and precursors. *Photochem Photobiol* 2014; 104: 641–647.
- [3] Rodgers AM, McCrudden MTC, Courtenay AJ, *et al.* Control of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Mice by Using Dissolving Microarray Patches Containing Gentamicin . *Antimicrob Agents Chemother.* Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1128/aac.02612-18.
- [4] Quinn HL, Kearney M-C, Courtenay AJ, *et al.* The role of microneedles for drug and vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1517/17425247.2014.938635.
- [5] Ali AA, McCrudden CM, McCaffrey J, *et al.* DNA vaccination for cervical cancer; a novel technology platform of RALA mediated gene delivery via polymeric microneedles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1016/j.nano.2016.11.019.
- [6] Cole G, Ali AA, McCrudden CM, *et al.* DNA vaccination for cervical cancer: Strategic optimisation of RALA mediated gene delivery from a biodegradable microneedle system. *Eur J Pharm Biopharm.* Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.02.029.
- [7] Permana AD, Tekko IA, McCarthy HO, *et al.* New HPLC–MS method for rapid and simultaneous quantification of doxycycline, diethylcarbamazine and albendazole metabolites in rat plasma and organs after concomitant oral administration. *J Pharm Biomed Anal.* Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.03.047.
- [8] Permana, McCrudden, Donnelly. Enhanced Intradermal Delivery of Nanosuspensions of Antifilaria Drugs Using Dissolving Microneedles: A

Proof of Concept Study. *Pharmaceutics* 2019; 11: 346.

- [9] Pamornpathomkul B, Ngawhirunpat T, Tekko IA, *et al.* Dissolving polymeric microneedle arrays for enhanced site-specific acyclovir delivery. *Eur J Pharm Sci.* Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1016/j.ejps.2018.05.009.
- [10] Migdadi EM, Courtenay AJ, Tekko IA, *et al.* Hydrogel-forming microneedles enhance transdermal delivery of metformin hydrochloride. *J Control Release.* Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.07.009.
- [11] Kearney MC, Caffarel-Salvador E, Fallows SJ, *et al.* Microneedle-mediated delivery of donepezil: Potential for improved treatment options in Alzheimer's disease. *Eur J Pharm Biopharm.* Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.03.026.
- [12] Ramöller IK, Tekko IA, McCarthy HO, *et al.* Rapidly dissolving bilayer microneedle arrays – A minimally invasive transdermal drug delivery system for vitamin B12. *Int J Pharm* 2019; 566: 299–306.
- [13] Larrañeta E, Lutton REM, Woolfson AD, *et al.* Microneedle arrays as transdermal and intradermal drug delivery systems: Materials science, manufacture and commercial development. *Materials Science and Engineering R: Reports.* Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1016/j.mser.2016.03.001.
- [14] Mishra R, Maiti TK, Bhattacharyya TK. Development of SU-8 hollow microneedles on a silicon substrate with microfluidic interconnects for transdermal drug delivery. *J Micromechanics Microengineering.* Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1088/1361-6439/aad301.
- [15] Arora A, Prausnitz MR, Mitragotri S. Micro-scale devices for transdermal drug delivery. *Int J Pharm* 2008; 364: 227–236.
- [16] Requena MB. *Otimização da entrega de fármacos para tratamento de câncer de pele por terapia fotodinâmica.* Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Epub ahead of print 13 May 2020. DOI: 10.11606/T.76.2020.tde-07052020-165906.
- [17] Gardner CM, Burke NAD, Chu T, *et al.* Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) polymers for cell encapsulation. *J Biomater Sci Polym Ed.* Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1163/092050610X535149.
- [18] Iglesias T, Dusinska M, El Yamani N, *et al.* In vitro evaluation of the genotoxicity of poly(anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery. *Int J Pharm.* Epub ahead of print 2017. DOI:

10.1016/j.ijpharm.2017.03.016.

- [19] Raj Singh TR, McCarron PA, Woolfson AD, *et al.* Investigation of swelling and network parameters of poly(ethylene glycol)-crosslinked poly(methyl vinyl ether-co-maleic acid) hydrogels. *Eur Polym J* 2009; 45: 1239–1249.
- [20] Mikolajewska P, Donnelly RF, Garland MJ, *et al.* Microneedle pre-treatment of human skin improves 5-aminolevulinic acid (ALA)- and 5-aminolevulinic acid methyl ester (MAL)-induced PpIX production for topical photodynamic therapy without increase in pain or erythema. *Pharm Res.* Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1007/s11095-010-0227-2.
- [21] Larrañeta E, Moore J, Vicente-Pérez EM, *et al.* A proposed model membrane and test method for microneedle insertion studies. *Int J Pharm* 2014; 472: 65–73.
- [22] Requena MB, Permana AD, Vollet-Filho JD, *et al.* Dissolving microneedles containing aminolevulinic acid improves protoporphyrin IX distribution. *J Biophotonics* 2021; 14: jbio.202000128.
- [23] Oltulu P, Ince B, Kökbudak N, *et al.* Measurement of epidermis, dermis, and total skin thicknesses from six different body regions with a new ethical histometric technique. *Türk Plast Rekonstruktif ve Estet Cerrahi Derg.* Epub ahead of print 2018. DOI: 10.4103/tjps.tjps_2_17.
- [24] Calabro K, Curtis A, Galarneau J-R, *et al.* Gender variations in the optical properties of skin in murine animal models. *J Biomed Opt.* Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1117/1.3525565.
- [25] Buzzá HH, Moriyama LT, Vollet-Filho JD, *et al.* Overall Results for a National Program of Photodynamic Therapy for Basal Cell Carcinoma: A Multicenter Clinical Study to Bring New Techniques to Social Health Care. *Cancer Control* 2019; 26: 107327481985688.