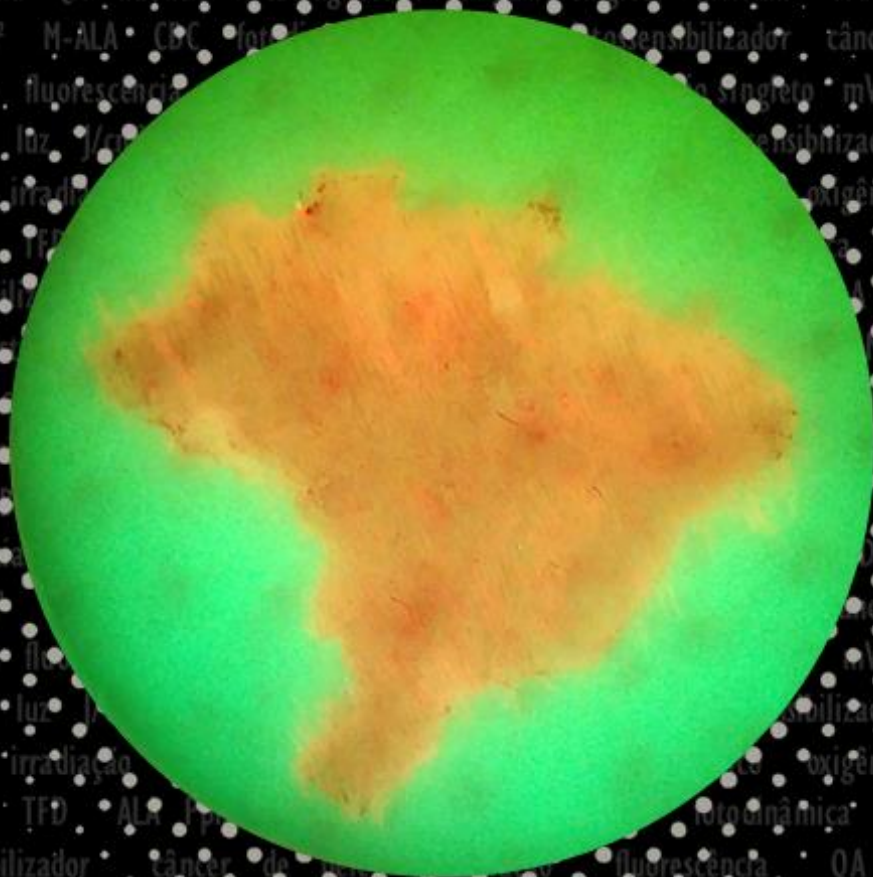


TERAPIA FOTODINÂMICA DERMATOLÓGICA

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

Uso do aumento da temperatura na superfície para promover o aumento da produção da PpIX no tecido

Mirian D. Stringasci, Hilde Harb Buzzá e Vanderlei Salvador Bagnato

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

A terapia fotodinâmica tópica comumente utiliza o ácido aminolevulínico ou o aminolevulinato de metila como agentes precursores da protoporfirina IX (PpIX), um fotossensibilizador endógeno presente em pequenas quantidades na célula. Estudos vem sendo realizados utilizando alteração da temperatura na superfície da pele para aumentar a produção da PpIX no tecido, um fator limitante do tratamento. Nestes estudos foi verificado que temperaturas mais elevadas influenciam principalmente no aumento da permeação do precursor no tecido. O uso de agentes termogênicos/vasodilatadores também se mostrou eficaz, aumentando tanto a quantidade quanto a profundidade da PpIX presente no tecido. Os resultados se mostraram promissores, podendo favorecer o desenvolvimento de novos protocolos clínicos que permitam tratar lesões mais espessas e, até mesmo, diminuir o período de incubação do creme, aumentando o conforto do paciente e favorecendo a rotina ambulatorial.

doi: 10.29327/terapia-fotodinamica-dermatologica-programa-tfd-brasil-309087.605433

1 Introdução

O ácido aminolevulínico (ALA) e o aminolevulinato de metila (M-ALA) são comumente usados no tratamento tópico de lesões de pele não melanoma utilizando terapia fotodinâmica (TFD). ALA e M-ALA ao serem aplicados sobre o tecido, penetram nas células, participam da biossíntese do grupo heme e estimulam maior formação de protoporfirina IX (PpIX) que se acumula preferencialmente em tecidos anormais. A PpIX é um fotosensibilizador endógeno presente em pequenas quantidades nas células. [1, 2]

A permeação cutânea do ALA ou M-ALA, assim como os longos tempos necessários de incubação para produção de PpIX suficiente para o tratamento são fatores limitantes da técnica. É necessário um período de incubação de cerca de 3 horas para que a PpIX produzida atinja até 2 mm de profundidade no tecido. Ainda assim, as heterogeneidades do tecido fazem com que a PpIX seja produzida de maneira não uniforme, de forma com que porções de tecido não contenham fotossensibilizador e o tratamento possa ser prejudicado. [3, 4]

Existem relatos que o aumento da temperatura do tecido pode favorecer a permeação do fármaco, além de aumentar o metabolismo celular acelerando o processo de produção da PpIX nas células. Desta forma, o aquecimento do tecido a ser tratado pode melhorar a eficácia da PDT em muitos aspectos, especialmente em áreas do corpo que apresentam temperaturas mais baixas naturalmente, como as extremidades. [5, 6] O aumento de temperatura também provoca a dilatação dos vasos sanguíneos da região, aumentando desta forma o aporte sanguíneo e, conseqüentemente, o abastecimento de oxigênio ao tecido. O Oxigênio é um elemento fundamental para que ocorra a ação fotodinâmica e, garantir que mais de suas moléculas cheguem ao tecido, é outra forma de favorecer a eficiência do tratamento. [7, 8]

Existem agentes termogênicos e/ou vasodilatadores comumente utilizados em tratamentos tópicos. O mentol é um vasodilatador que

possui também efeito analgésico, o que poderia aliviar a sensação de dor frequentemente reportada pelos pacientes e que vem sendo um fator limitante para aceitação da TFD. [9, 10] O uso do mentol em produtos cosméticos é autorizado pela ANVISA na concentração máxima de 1%. [11] O nicotinato de metila (NM) é outro vasodilatador que vem sendo utilizado em formulações tópicas para favorecer maior penetração na pele. [12] A ANVISA permite o uso na concentração máxima de 0,5%. [13] O gengibre é considerado um agente termogênico de origem natural e sem contraindicações. [14]

Vários estudos têm sido realizados no Instituto de Física de São Carlos utilizando modelo animal para explorar técnicas eficazes para aumentar e acelerar o processo de produção da PIX alterando a temperatura na superfície do tecido, por meio de instrumentos físicos e por uso de agentes termogênicos incorporados no creme.

2 Alterando a temperatura do tecido para aumento da produção da PpIX

Foi realizado um estudo em modelo de pele de rato sadio testando o resfriamento/aquecimento do tecido tanto antes quanto após a aplicação de creme contendo ALA/M-ALA 20%. A condição de resfriamento/aquecimento previamente à aplicação do creme permitiu demonstrar se a alteração de temperatura da superfície tem efeito na permeação do fármaco. A condição de resfriamento/aquecimento imediatamente após a retirada do creme permitiu observar se a alteração da temperatura influencia no metabolismo celular no processo de produção da PpIX. [15]

Foi utilizado um equipamento peltier em contato com a pele do animal para resfriamento (em 20 °C) ou aquecimento (em 40 °C). As condições experimentais utilizadas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições experimentais utilizadas no estudo.

Imediatamente antes da aplicação do creme	Período de incubação	Imediatamente após a aplicação do creme
Resfriamento (20 °C) / aquecimento (40 °C) da pele por 15 minutos	Creme contendo ALA/M-ALA por 30 minutos	_____
_____	Creme contendo ALA/M-ALA por 30 minutos	Resfriamento (20 °C) / aquecimento (40 °C) da pele por 180 minutos
_____	Creme contendo ALA/M-ALA por 30 minutos	_____

Foram adquiridos espectros de fluorescência para diferentes tempos de incubação (0, 1, 2 e 3 horas) e, imediatamente após os períodos de incubação, os animais foram eutanasiados e um fragmento de tecido foi retirado e foi obtida imagem de fluorescência utilizando um microscópio confocal. Alguns exemplos estão demonstrados na Figura 1.

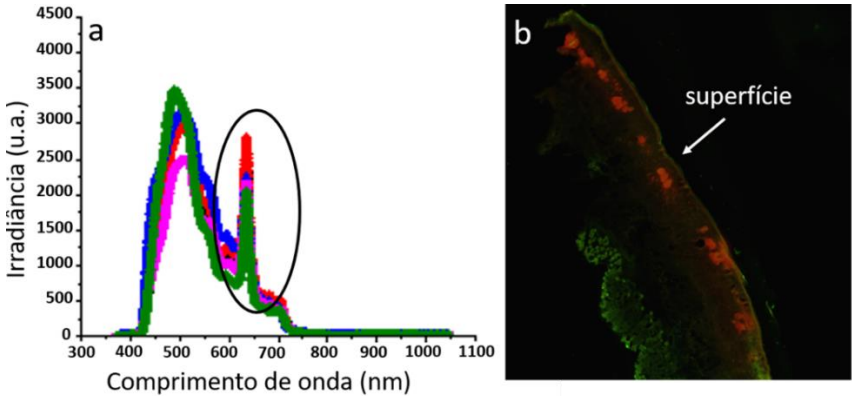


Figura 1. Dados obtidos da pele após 2 horas de incubação do creme M-ALA 20% associado com NM 0,5%. (a) Espectro de fluorescência. Dentro do círculo preto está o pico característico da PpIX emitido em 630nm; (b) imagem de microscopia confocal, a fluorescência verde é característica da autofluorescência do tecido, enquanto a vermelha é característica da PpIX.

A fluorescência verde (pico em 500 nm) observada tanto no espectro de fluorescência quanto na imagem por confocal é característica da autofluorescência do tecido, enquanto a fluorescência vermelha (pico em

630 nm) é característica da PpIX. [16]

Através dos resultados obtidos no estudo foi observado que tanto o aumento quanto a diminuição da temperatura durante longos períodos após a incubação do creme de ALA ou MAL causou melhora na produção de PpIX. A maior produção de PpIX foi observada na condição em que o tecido foi aquecido previamente á incubação do creme, favorecendo sua penetração.

No entanto, este estudo utilizou grandes variações de temperatura. A temperatura natural da superfície da pele dos ratos é cerca de 32 °C, sendo que foram refrigeradas a 20 °C ou aquecidas a 40 °C. Então, foram conduzidos novos estudos utilizando agentes termogênicos incorporados ao creme a fim de obter aumentos de temperatura mais discretos.

3 Uso de agentes termogênicos/vasodilatadores incorporados ao creme ALA/M-ALA

Este estudo também foi realizado em modelo de pele de rato sadio. Os agentes mentol (1%), NM (0,5%) e gengibre (5%) foram incorporados aos cremes contendo ALA/M-ALA 20% e ficaram incubados por 3 horas. [17]

Através dos espectros de espectroscopia de fluorescência foi verificado que o NM incorporado ao M-ALA aumentou a produção de PpIX em cerca de 50% após 180 minutos de incubação. Todos os agentes (mentol, NM e gengibre) incorporados ao ALA aumentaram a produção de PpIX nas 2 primeiras horas de incubação, porém, em 3 horas a PpIX produzida foi equivalente. Nas imagens de confocal dos fragmentos de pele dos animais verificou-se que os tecidos que receberam os cremes contendo agentes termogênicos apresentaram fluorescência vermelha, característica da PpIX, mais intensa e mais predominante se comparado aos tecidos que receberam os cremes contendo apenas ALA/M-ALA.

Devido os resultados promissores observados do NM 0,5% incorporado ao creme M-ALA 20%, um novo estudo foi realizado. Neste foi demonstrado *in vitro* que a concentração de 0,5% de NM não é citotóxica

Estudos pré-clínicos

às células saudáveis, além de demonstrar o efeito vasodilatador da substância em modelo de membrana coreoalontóica (Figura 2). [18]

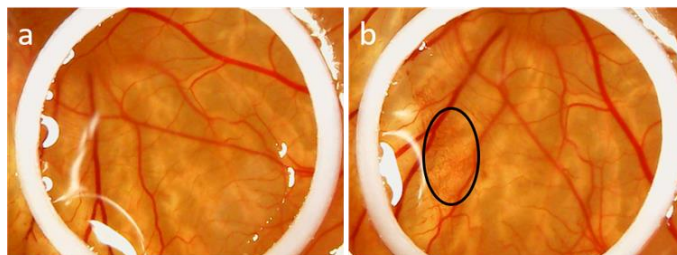


Figura 2. Imagens de modelo de membrana coreoalontóica (a) inicialmente e (b) após 15 minutos de incubação com NM 1%.

Na Figura 2, podem-se observar vasos de ovo de galinha após 15 minutos de incubação com MN 1 %, no círculo preto é possível observar pequenos vasos que se romperam devido à dilatação promovida pelo MN. Neste estudo também foi aplicada a TFD nos tecidos previamente incubados com os diferentes cremes e, através de análise visual das crostas (Figura 3) e das lâminas histológicas, foi observado que os danos mais severos foram apresentados nos grupos que receberam NM associado ao creme M-ALA 20%.

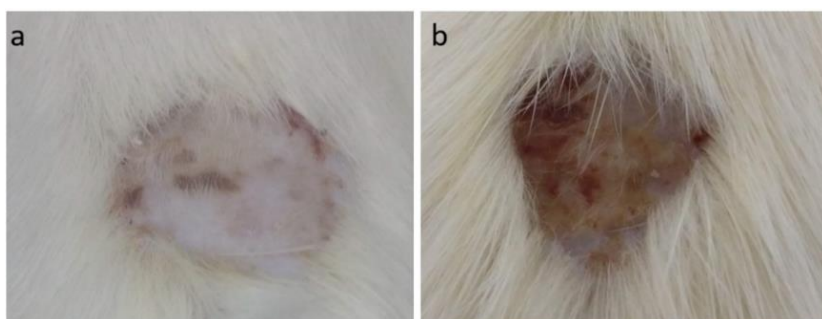


Figura 3. Exemplos do aspecto visual dos tecidos após tratamento de TFD usando (a) apenas M-ALA 20% e (b) M-ALA 20% associado com NM 0,5%.

Estes estudos são promissores e podem favorecer os protocolos clínicos aumentando a profundidade da produção de PpIX no tecido permitindo

que lesões mais espessas sejam tratadas e, além disso, pode tornar-se viável para a diminuição do tempo de incubação do creme, aumentando o conforto do paciente e favorecendo a rotina ambulatorial.

Referências bibliográficas

- [1] Torezan L, Niwa ABM, Neto CF. Terapia fotodinâmica em dermatologia: Princípios básicos e aplicações. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2009; 84: 445–459.
- [2] MacCormack MA. Photodynamic Therapy. *Advances in Dermatology* 2006; 22: 219–258.
- [3] LaRochelle EPM, Marra K, LeBlanc RE, *et al.* Modeling PpIX effective light fluence at depths into the skin for PDT dose comparison. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2019; 25: 425–435.
- [4] Peng Q, Soler AM, Warloe T, *et al.* Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *J Photochem Photobiol B Biol* 2001; 62: 140–145.
- [5] Willey A, Anderson RR, Sakamoto FH. Temperature-Modulated Photodynamic Therapy for the Treatment of Actinic Keratosis on the Extremities. *Dermatologic Surg* 2014; 40: 1094–1102.
- [6] Ishida N, Watanabe D, Mizutani K, *et al.* Heating increases protoporphyrin IX production in normal skin after delivery of 5-aminolevulinic acid by iontophoresis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2009; 25: 333–334.
- [7] House J, Tipton M. Using skin temperature gradients or skin heat flux measurements to determine thresholds of vasoconstriction and vasodilatation. *Eur J Appl Physiol* 2002; 88: 141–145.
- [8] Wilson BC. Photodynamic therapy for cancer: principles. *Can J Gastroenterol* 2002; 16: 393–396.
- [9] Galeotti N, Di Cesare Mannelli L, Mazzanti G, *et al.* Menthol: a natural analgesic compound. *Neurosci Lett* 2002; 322: 145–148.
- [10] Nortier YLM, van de Haven JA, Koks CHW, *et al.* Preparation and stability testing of a hydrogel for topical analgesia. *Pharm World Sci* 1995; 17: 214–217.
- [11] Anvisa. Assunto: Mentol em produtos cosméticos. Disponível em:

<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/cosmeticos/parceres/parecer-tecnico-no-8-de-1o-de-novembro-de-2005-atualizado-em-26-7-2006>

- [12] Boelsma E, Anderson C, Karlsson AMJ, *et al.* Microdialysis technique as a method to study the percutaneous penetration of methyl nicotinate through excised human skin, reconstructed epidermis, and human skin *in vivo*. *Pharm Res* 2000; 17: 141–147.
- [13] Anvisa. Assunto: Avaliação toxicológica do nicotinato de metila.
- [14] Kemper KJ. Ginger (*Zingiber officinale*). *The Longwood Herbal Task Force* 1999; 1–18.
- [15] Stringasci MD, Moriyama LT, Vollet-Filho JD, *et al.* Temperature effect on the PpIX production during the use of topical precursors. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2020; 30: 101786.
- [16] Valentine RM, Ibbotson SH, Brown CT a, *et al.* A quantitative comparison of 5-Aminolaevulinic acid- and methyl aminolevulinate-induced fluorescence, photobleaching and pain during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2011; 87: 242–249.
- [17] Stringasci MD, Vollet-Filho JD, Moriyama LT, *et al.* Investigation of protoporphyrin IX production induced by aminolevulinic acid combined with thermogenic and/or vasodilator substances. In: Hasan T (ed) *17th International Photodynamic Association World Congress*. SPIE, p. 216.
- [18] Stringasci MD, Ciol H, Romano RA, *et al.* MAL-associated methyl nicotinate for topical PDT improvement. *J Photochem Photobiol B Biol* 2020; 213: 112071.