

Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Nanobiotecnologia

Itajaí Oliveira de Albuquerque

ENSAIO CLÍNICO PARA A AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR NANOEMULSÃO DE AI-CI-FTALOCIANINA NO TRATAMENTO DO CARCINOMA BASOCELULAR DE PELE.

Tese apresentada como requisito para obtenção do Título de Doutor em Nanociências e Nanobiotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Brasília – DF

2017

Itajaí Oliveira de Albuquerque

ENSAIO CLÍNICO PARA A AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR NANOEMULSÃO DE AI-CI-FTALOCIANINA NO TRATAMENTO DO CARCINOMA BASOCELULAR DE PELE.

Tese apresentada como requisito para obtenção do Título de Doutor em Nanociências e Nanobiotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília

Aprovada em 30 de junho de 2017.

MEMBROS DA COMISSÃO EXAMINADORA

**Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo – presidente
Universidade de Brasília**

**Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos
Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Cláudio Eduardo de Oliveira Cavalcanti
Hospital de Base do Distrito Federal**

**Dr. Samuel Vidal Mussi
Achê Laboratórios Farmacêuticos**

**Profa. Dra. Graziella Joanitti - suplente
Universidade de Brasília**

AGRADECIMENTOS

Ao professores Ricardo Bentes, Luiz Muehlmann e João Paulo Longo pela orientação e apoio na realização deste trabalho.

Ao professor João Nunes, presença constante na realização da etapa clínica e na orientação da redação do protocolo de pesquisa.

A colega de pós-graduação Ludmila David, pelo apoio na realização da Terapia Fotodinâmica.

Aos médicos e enfermeiros que colaboraram no Ambulatório de Dermatologia do Hospital da Universidade de Brasília (HUNB).

A Ludmila Corá e Valeria Gonçalves, funcionárias do Centro de Estudos Clínicos – Trials do HUNB.

Ao médico cirurgião plástico Cesar Daher.

Aos sujeitos de pesquisa que concordaram em participar deste ensaio clínico.

Dedico este trabalho acadêmico

*Aos sobrinhos Daniel, Hugo, Maíra, Pedro e Rafael,
com a esperança de que nunca deixem de estudar.*

A Esther, minha esposa.

*These things, which come last in the dissection,
answer to those that went first in the history.¹*

The Seats and Causes of Diseases Investigated by Anatomy.

Giovanni Battista Morgagni

Where doubt is, there truth is - it's her shadow.²

Ambroise Bierce

¹ Estes achados, vistos por último na dissecação, respondem àqueles que foram descritos primeiro na história.

² Onde existe a dúvida, lá está a verdade – à sua sombra.

RESUMO

As estatísticas globais mostraram aumento progressivo da incidência de câncer de pele em diversos países. A exposição cumulativa à radiação solar (ultravioleta B) nas duas primeiras décadas da vida representa fator de risco crítico para o desenvolvimento da doença. O carcinoma basocelular (CBC) é uma neoplasia com origem na derme profunda. TFD demonstra potencial inovador para tratar pacientes diagnosticados com CBC que têm contra-indicações para outras modalidades terapêuticas e que estão de acordo com os riscos de recorrência relacionados ao tratamento. Para melhor avaliar como a TFD modifica o histórico natural do CBC, é necessário realizar ensaios controlados randomizados avaliem não apenas a efetividade imediata dos protocolos, mas seus efeitos a longo prazo em termos de resposta terapêutica completa, de modo a gerar melhores evidências que orientem a prática clínica. Para responder a essas questões, foi desenhado um ensaio clínico fase II, aberto, com TFD combinada a nanoemulsão de Alumínio-Cloro Ftalocianina (TFD-AICIFc-N). A pesquisa foi projetada com dois braços de intervenções, um primeiro para definir a melhor dose - resposta patológica do CBC (30 pacientes) e um segundo para avaliar a não inferioridade da TFD em comparação ao tratamento cirúrgico, com 120 sujeitos de pesquisa. Durante a realização da primeira parte do ensaio, foi observado que a nanoemulsão de AICIFc a 10 μ M apresentou permeação cutânea inadequada, observando-se histologicamente a não remissão dos tumores.

Palavras Chaves: Terapia Fotodinâmica; Carcinoma Basocelular; Ensaios Clínicos; Nanomedicina.

ABSTRACT

Basal Cell Carcinoma (BCC) is an epithelial neoplasm with origin in the deep dermis. Global statistics have shown the progressive increase in the incidence of skin cancer in several countries. The cumulative exposure to solar radiation (ultraviolet B) in the first two decades of the lifetime represents the critical risk for the development of the disease. TFD demonstrates innovative potential for treat patients diagnosed with BCC who may prefer best cosmetic results or have contraindications to others therapeutic modalities, which are in accordance with the risks of recurrence. Although, in order to better evaluate how TFD modify the natural history of BCC it is necessary to perform randomized controlled trials which should assess not only the immediate effectiveness of the protocols but their long-term effects in terms of complete therapeutic response, in order to generate the best evidence to guide the clinical practice. To answer these questions, it was designed a clinical trial phase II, open label, with PDT combined to a nanoemulsion of Aluminum-Chloride Phthalocyanine (PDT-AICIFc-N) to treat Superficial Basal Cell Carcinoma clinical and histologically diagnosed. The research was designed with two arms of intervention, one to define the best dose to achieve a complete pathologic answer of sBCC (30 patients) and a second branch to evaluate the non-inferiority of TFD when compared to surgery treatment (130 patients). The second arm would be a non-inferiority study to compare PDT to surgery with 120 patients. During the realization of the first part of research, it was observed the nanoemulsion of AICIFc 10 μ M was not absorbed, with no histologically remission of the tumors and the trial was cancelled for ethical reasons.

Keywords: Photodynamic Therapy, Photosensitizers, Basal Cell Carcinoma, Clinical Trials, Nanomedicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Carcinoma Basocelular Superficial localizado na região interescapular, dorso do nariz e maxilar direito. As duas últimas lesões estão localizadas na chamada Zona H.

Figura 2 –Esquema do ensaio clínico fase II para avaliação da segurança e eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada por nanoemulsão de Al-Cl-Ftalocianina, considerando dois braços de investigação.

Figura 3 – Biópsia *punch* de lesão de carcinoma basocelular.

Figura 4. Padronização da fonte luminosa utilizada nas sessões de TFD combinada a nanoemulsão de AICIFc. Comprimento de onda: 660 nm. Potencia 100 mW/cm².

Figura 5. Paciente submetida a TFD-AICIFcN 10µM para tratamento de lesão na face.

Figura 6. Paciente submetido a TFD-AICIFc N 10µM, para tratamento de lesão no braço esquerdo (região deltóide).

Figura 7. Administração tópica de AICIFc-N 10 µM (a esquerda) e 50 µM (a direita), em quadruplicata, com correspondentes grupos controles. Pele de abdome in situ anatômico.

Figura 8. Histopatologia pós TFD + AICIFc-N, 10 µM, corado por hematoxilina eosina (aumento 10 x). Carcinoma Basocelular Superficial confirmado na revisão da lâmina. Observa-se infiltrado monocitário, com epiderme e estrato córneo adelgaçados.

Figura 9. Histopatologia pós TFD + AICIFc-N, 10 µM, corado por hematoxilina eosina (aumento 10 x). Carcinoma Basocelular Superficial confirmado na revisão da lâmina. Observa-se infiltrado monocitário, com epiderme e estrato córneo adelgaçados. .

Figura 10. Histopatologia pós TFD + AICIFc-N, 10 µM, corado por hematoxilina eosina (aumento 10 x). Carcinoma Basocelular Superficial confirmado na revisão da lâmina. Observa-se infiltrado monocitário, com epiderme e estrato córneo adelgaçados.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tamanho da amostra para a frequência de uma população.

Tabela 2. Terapia fotodinâmica com Photofrin®, Photoeme® e Foscan® .

Tabela 3. Resposta clínica e histológica do carcinoma basocelular superficial a terapia fotodinâmica com Hipericin.

Tabela 4. Resposta clínica a terapia fotodinâmica com NPe6.

Tabela 5. Ensaio de permeação com AICIFc-N

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Características do carcinoma basocelular.

Quadro 2. Pacientes submetidos a terapia fotodinâmica com AICIFc-N – 10 μ M.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Retenção de AICIFc-N e solução de AICIFc em pele humana, após 12 horas de aplicação.

LISTA DE ABREVIATURAS

AICIFc-N: Nanoemulsão de Alumínio – Cloro-Ftalocianina

ALA: Ácido Amino Levulínico

BLI: Bioluminescência

CBC: Carcinoma Basocelular de Pele

CBCS: Carcinoma Basocelular Superficial

CEP-UNB: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília

Cacon – UNB: Centro de Assistência em Alta Complexidade em Oncologia da Universidade de Brasília

DNA: Ácido Desoxiribonucleico

DMSO: Dimetil Sulfóxido

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio

EVA: Escala Visual de Avaliação

FS: Fotossensibilizador

Gli1: *Zinc finger protein GLI1*

MAL: Ácido 5-Amino Levulínico

NPe6: Mono-L –aspartyl chlorin e6

PARP-1: Poly [ADP-ribose] polymerase 1

PPIX: Precursores da protoporfirina IX

RUVB: Radiação Ultra-Violeta B

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TFD: Terapia Fotodinâmica.

TFD-AICIFcN: Terapia Fotodinâmica com AICIFc

APÊNDICE

A - Protocolo do Ensaio Clínico

B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

C- Excertos da Ficha Clínica Individual

ANEXOS

Anexo A – Comprovante de Envio

Anexo B – Parecer Circunstanciado

Anexo C – Classificação de Fitzpatrick

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	Pg. 1
2	JUSTIFICATIVA	Pg. 12
2	OBJETIVOS	Pg. 13
3	METODOLOGIA	Pg. 14
4	RESULTADOS	Pg. 25
5	DISCUSSÃO	Pg. 29
6	CONCLUSÃO	Pg. 43
7	BIBLIOGRAFIA	Pg. 44
8	APÊNDICES	Pg. 56
9	ANEXOS	Pg. 88

I. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS CLÍNICOS DO CARCINOMA BASOCELULAR DE PELE

O potencial mutagênico e carcinogênico fazem da radiação solar ultravioleta B (RUV-B) um carcinógeno perfeito, reconhecido como o principal fator causal para o desenvolvimento de qualquer tipo de câncer de pele. A relação entre a exposição desprotegida a RUV-B e o surgimento da neoplasia cutânea é complexa e depende tanto de características individuais (idade, tipo de pele, cronicidade e características histológicas do tumor) quanto de fatores ambientais. Considera-se que a exposição excessiva e cumulativa à radiação solar nas duas primeiras décadas de vida, e em especial na infância, representa o mais importante fator de risco para o desenvolvimento da doença anos mais tarde [1;2;3].

Desde o século XX, tem se observado o aumento da incidência de câncer de pele em vários países do mundo. No carcinoma basocelular de pele (CBC), observa-se que a doença é mais freqüente nos países próximos da linha do Equador e entre trabalhadores expostos ao Sol, constituindo-se desse modo como doença ocupacional. O aumento da longevidade da população e a maior exposição recreativa à radiação UV relacionada a estilos de vida têm sido implicados como fatores predisponentes ao desenvolvimento da doença. O *National Health System* (NHS) calcula que em 2020 o câncer de pele consumirá recursos do sistema de saúde inglês na ordem de 180 milhões de libras [4], enquanto nos EUA esse gasto tem sido 6-7 vezes maior que o relacionado ao tratamento do melanoma, alcançando cerca de US\$ 650 milhões/ano [5], sem contar os impactos econômicos relacionados à produtividade [6]. Apesar do consenso mundial quanto à importância epidemiológica do CBC tem sido observado que a doença recebe pouca atenção em termos de pesquisa pré clínica e clínica.

No Brasil, 25% do total das neoplasias diagnosticadas tem origem primária na pele. O Instituto Nacional do Câncer do Brasil estima que em 2016 - 2017 surjam 175.760 casos novos da doença, que, distribuídos por subgrupos de gênero, representam 81,66 casos novos por 100 mil homens ou 91,98 por 100 mil mulheres [7].

A região brasileira com maior número de casos diagnosticados é a Sul (138,75/100 mil), onde a população possui maior proporção de pessoas com origem caucasiana. Nas Regiões Norte e Nordeste, mais próximas da linha do Equador, observam-se taxas de 42,48 / 100 mil e 28,89 / 100 mil. Possivelmente essas diferenças estariam relacionadas à quantidade maior de melanina nessa população ou à subnotificação da doença [7].

Estudos epidemiológicos demonstraram que o sexo masculino e a idade avançada representam fatores de risco independentes para o desenvolvimento de CBC, ainda que sua incidência entre jovens venha aumentando devido a adoção de novos estilos de vida em que o bronzeamento da pele possui valor estético, resultado que é obtido tanto de modo natural quanto por equipamentos luminosos nem sempre utilizados com segurança adequada [8].

O principal mecanismo para a origem do carcinoma basocelular é a lesão do DNA das células da epiderme profunda, além de alterações na vigilância imunológica local. Em indivíduos com risco para a doença, o uso de medicações imunossupressivas, tais como ciclosporina, azatioprina e micofenolato, comumente utilizadas em transplantes de órgãos e em outras condições crônicas, aumentam a predisposição para o desenvolvimento da doença. O desenvolvimento de CBC estaria também relacionado ao declínio na capacidade biológica de reparar danos cumulativos no genoma. Indivíduos superexpostos à radiação solar que apresentam capacidade insuficiente para reparar o DNA lesado apresentam risco estimado para CBC cinco vezes maior quando comparados a grupo controle [9, 14].

Em termos clínicos, o CBC se apresenta como lesões dermatológicas de crescimento lento e baixo potencial metastático [15], ainda que localmente apresente comportamento invasivo com o desenvolvimento de lesões multicêntricas, sincrônicas e metacrônicas. De um modo geral o CBC é oligossintomático, muito raramente sensível ou doloroso. À dermatoscopia são observadas lesões de cor variável, do róseo ao avermelhado, pouco elevadas, com limites bem definidos, com presença em sua superfície de telangiectasias e crosta (Figura 1). Ulceração e queixa de dor local sugerem agressividade tumoral e possível infiltração perineural [16].



Figura 1 - Carcinoma Basocelular Superficial localizado na região interescapular, dorso do nariz e maxilar direito. As duas últimas lesões estão localizadas na chamada Zona H.

O ciclo celular dessa neoplasia assemelha-se ao das células normais da epiderme e dura em média cerca de 217 horas, embora a fase S, quando o DNA é replicado, esteja aumentada cerca de duas vezes (19-20 horas) em relação a normalidade [17]. O alongamento da fase S denota desregulação dos controles de checagem (*checkpoints controls*) que asseguram a regularidade da síntese do material genético, a transição para a fase seguinte até que seja completado todo o ciclo celular. Considerando que a fase S em mamíferos dura entre 6 e 8 horas, a alteração no tempo de duração conforme observado nas células de CBC indica transtornos na vigilância molecular do processo [10].

Apesar do CBC comportar-se com baixa agressividade, a doença está relacionada à morbidade importante devido as lesões acometerem com frequência a face, em especial na chamada Zona H, considerada de difícil tratamento devido a maior incidência de recorrências e a obtenção de resultados estéticos quase sempre insatisfatórios.

Histopatologicamente a lesão é descrita como neoplasia maligna originada nas células basalóides da epiderme, que apresentam núcleos comparativamente maiores que o citoplasma. Completando o quadro, observam-se a perda das pontes celulares, raras mitoses, separação entre o estroma e o parênquima tumoral e uma arquitetura neoplásica organizada em clusters organizados em paliçada.

No CBC superficial as células neoplásicas não invadem a derme papilar. Tem sido demonstrado que ponto de vista histológico a arquitetura da lesão do CBC representa um fator crítico para prognosticar o crescimento da lesão,

assim como para a escolha do método terapêutico, enquanto os padrões de diferenciação celular devem ser considerados como parte do diagnóstico diferencial do complexo espectro histopatológico do CBC [18]. Embora os autores não raramente adotem terminologias histopatológicas não uniformes para descrever a doença, o CBC classicamente tem sido classificado em tipos indiferenciado e diferenciado, cada qual com subtipos com frequência, evolução e prognósticos distintos. Estudos tem demonstrado que o processo de diferenciação celular a partir de uma linhagem específica não impacta o prognóstico tumoral. Entre os CBCS indiferenciados, os mais frequentes e os que tem recebido maior atenção em termos de pesquisa têm sido o CBC superficial e o CBC Nodular, que em geral apresentam crescimento indolente. CBC infiltrativos, CBC metatípico, CBC morfeiforme ou esclerosante apresentam crescimento agressivo e infiltrativo (Quadro 1).

Em cerca de 37-43% ou 1/3 dos casos diagnosticados podem ocorrer associações de tipos histológicos em um mesmo tumor [18; 19] O CBC metastático, a forma mortal da neoplasia, é entretanto doença muito rara, somando cerca de 400 casos registrados na literatura desde quando descrito pela primeira vez no final do século XIX [20]. As metástases em ordem de frequência disseminam-se para linfonodos regionais, pulmão e fígado. A sobrevida nesses casos é tão baixa quanto 0,1% e varia de 8 meses a 3.6 anos [19; 21].

O padrão ouro para o tratamento da neoplasia é a cirurgia, que permite a remoção completa da lesão com margem de segurança. Mais raramente têm sido empregados a eletrocirurgia, a criocirurgia, a radio e a quimioterapia. Ensaio clínicos e estudos econômicos de custo-efetividade têm demonstrado que a Terapia Fotodinâmica (TFD) é inovação tecnológica promissora no tratamento de cânceres de pele não melanoma, como alternativa para direcionar substâncias fotossensibilizantes preferencialmente às células tumorais, reduzindo os efeitos citotóxicos nas células sãs. Mais recentemente, os resultados promissores observados in vitro e in vivo no tratamento do hepatocarcinoma humano mediado pelo fator inibidor da transcrição Gli1 nanoencapsulado (NanoHH1), que regula a via de sinalização Hedghog, da qual alguns CBC possuem dependência crítica,

definiram uma nova fronteira de estudos para tratamento do Carcinoma Basocelular – a terapia gênica [21].

Quadro 1 – Algumas Características do Carcinoma Basocelular							
Indiferenciado						Diferenciado	
Crescimento Lento			Crescimento Agressivo			Histopatologia	F
Histopatologia	F	RPC	Histopatologia	F	RPC		
CBC Superficial	17,4%	3,6%	CBC infiltrativo	7,4%	26,5%	CBC Queratótico CBC infundíbulo-cístico CBC folicular CBC pleomórfico CBC com diferenciação em duto sudoríparo CBC com diferenciação em glândula sebácea Fibroepithelioma de Pinkus	raro
CBC Nodular	21%	6,4%	CBC Metatípico	-	10%*		
CBC Micronodular	14,5%	-	CBCC Morfeico	1,1%	-		

CBC – Carcinoma Basocelular. RPC – recorrência pós-cirurgia. F – frequência. Apud Crowson [46]; Tarallo [15]

Em termos práticos a TFD foi incorporada ao arsenal disponível para o tratamento do CBC, a partir da regulamentação de dois fármacos precursores da protoporfirina IX. O Centro Europeu Para a Prevenção e Controle de Doenças (European Centre for Disease Prevention and Control), responsável pela regulação sanitária no continente, aprovou o seu uso combinado com o fotossensibilizante metil-aminolevulinato (MAL), tanto para a forma superficial quanto nodular do carcinoma basocelular. A agência norte-americana Food and Drug Administration aprovou a TFD com ácido aminolevulínico (ALA) para o tratamento da ceratose actínica. Nesse país, contudo, tem sido cada vez mais frequente o uso *off label* da TFD combinada com MAL no tratamento do Carcinoma Basocelular Superficial [22, 23].

1.2. BREVE HISTÓRICO DA TERAPIA FOTODINÂMICA

A primeira evidência clínica da eficácia da TFD foi obtida em 1903 por Dreyer, em Copenhague, e Jesionek e Von Tappeiner, em Munique,

quando aplicaram eosina ou eritrosina tópica, seguida de exposição à luz, em pacientes portadores de pitíriase versicolor, psoríase, carcinoma basocelular, lúpus vulgar, sífilis, condiloma acuminado e molusco contagioso. Apesar dos pesquisadores terem obtido alguns desfechos clínicos favoráveis, falhas metodológicas dos estudos relativos ao acompanhamento clínico dos pacientes, à inconveniência do uso de radiação UV e a precariedade dos FS disponíveis à época levaram ao abandono das linhas de pesquisa, só retomadas na década de 70, com os estudos com Photophrin™ conduzidos por Dougherty e colaboradores.

Esses pontos negativos apresentados pela primeira geração de FS (retenção cutânea da droga e fotossensibilidade prolongada nas áreas tratadas e expostas à luz) conduziram a pesquisas por novas formulações que demonstrassem maior eficiência e segurança, o que originou a segunda geração de fotossensibilizantes. Em geral, os compostos da segunda geração apresentam características mais favoráveis à aplicação na TFD em comparação com aqueles de primeira geração de FS, tais como: elevado rendimento quântico na geração de oxigênio singleto, maior estabilidade química e física, atoxicidade em ausência de luz, alto grau de pureza química e redução de efeitos secundários [25;26]. Algumas das principais classes de FS estudadas com aplicação terapêutica são: texafirinas, clorinas, feoforbídeos, purpurinas, protoporfirinas, derivados de benzoporfirinas e ftalocianinas [26;27]. O desenvolvimento de fotossensibilizantes de terceira geração consiste na conjugação de FS a compostos biologicamente ativos, tais como anticorpos, peptídeos e ácido fólico [26], e mais recentemente, a associação de FS a carreadores nanoestruturados como lipossomos e compostos nanopoliméricos [24].

As ftalocianinas constituem uma classe de FS amplamente estudada que tem apresentado bons resultados em aplicações na TFD. Derivadas de azoporfirinas, as ftalocianinas possuem alto coeficiente de absorção espectral na faixa de comprimentos de onda longos, entre 650 - 850 nm [28]. Dentre as demais vantagens dos derivados de ftalocianina estão: elevada capacidade de produção de ERO comparadas a outros FS, alto potencial seletivo de agregação a células tumorais e rápida eliminação do organismo.

Entretanto uma das limitações à utilização dos FS, incluídas as ftalocianinas e seus derivados na TFD, deve-se a alta hidrofobicidade, pois apresentam baixa solubilidade em meios fisiológicos hidrofílicos, o que gera dificuldades de transporte através dos sistemas biológicos e eleva drasticamente o seu potencial de agregação [28;29]. Essa propriedade afeta suas propriedades fotofísicas, químicas e biológicas com a conseqüente redução na formação de ERO, quando as FS são comparadas a outras espécies monoméricas que apresentam propriedades fotoativas ideais [29]. É possível, entretanto, melhorar a absorção dos FS por meio da associação com carreadores de drogas, em particular sistemas nanoparticulados.

A eficácia das ftalocianinas depende da presença de íon metálico na sua molécula, que influenciam diretamente no chamado rendimento quântico de quando assume o chamado estado triplete ao receber foto-estimulação. Os complexos de ftalocianina de zinco e alumínio apresentam dentre suas características fotoquímicas a meia vida longa nos estados singlete e triplete, o que produz campos quânticos mais altos e maior eficiência de ação nos substratos celulares. Outras ganhos importantes, obtidos pela incorporação de metais à molécula, são o acúmulo seletivo em órgãos [30] e a rápida eliminação após decorridas 24 h de administração da droga. Por outro lado, as nanoemulsões constituem um sistema de entrega que permite melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade de drogas lipofílicas, de forma a permitir que sejam mais facilmente absorvidos e distribuídos nos tecidos, como é o caso da alumínio-cloro-ftalocianina (AICIFc).

Estudos pré-clínicos de farmacocinética, em que está incluído um realizado com cães, acometidos de tumores de pele espontâneos, demonstraram alta afinidade e seletividade da AICIFc tópica pelo tecido neoplásico, com meia vida tecidual de 2,6 a 3,34 horas e meia vida de eliminação de 4,3 horas e ausência de evidência de captação por músculos e tecidos são próximos da lesão tratada, o que lhe garante maior segurança no que respeita à possibilidade de efeito adverso de fotossensibilização [31;32;33].

1.3 – USO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM DOENÇAS HUMANAS

A Terapia Fotodinâmica utilizando fotossensibilizantes nanoestruturados possui um horizonte tecnológico promissor, com potencial de aplicação amplo em várias especialidades médicas. Estudos pré-clínicos realizados desde 2003 no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biologia/ UNB, na rede de pesquisa vinculada ao Instituto Nacional de Nanobiotecnologia [34;35;36;37;38;39;40;41;42;43;44) e em outras centros internacionais de pesquisa [45;46;47;48;] têm demonstrado a eficácia terapêutica da TFD combinada a alumínio-cloro-ftalocianina nanoestruturada em neoplasias malignas da boca, da boca e da mama. Em termos de ensaios clínicos, deve-se ressaltar que a TFD combinada a AICIFc foi utilizada em ensaios clínicos conduzidos no Laboratório de Nanobiotecnologia/UNB, para o tratamento de cárie dentária e na doença periodontal [29;42].

De um modo geral a TFD é considerada um procedimento seguro, bem tolerado pelos pacientes [47;48;49;50]. Não existem relatos de eventos adversos importantes ou letais. Efeitos adversos relatados em ensaios clínicos com TFD para tratamento de Ceratose Actínica, Carcinoma Basocelular Superficial e Doença de Bowman foram em sua maioria locais [48].

Estudos publicados demonstram que sintomas locais, entre 43 e 99% dos pacientes, estão relacionados com dor, eritema e prurido no sítio da lesão tratada. Esses efeitos foram mais frequentes no dia da aplicação do tratamento e raramente se prolongaram por uma semana. Entretanto, a descontinuidade do tratamento, por causa de dor local, foram relatados em 43 ensaios clínicos selecionados por revisão sistemática produzida pela Universidade de Alberta (Canadá), para avaliação da segurança do uso terapêutico da TFD e outras variáveis relacionadas ao custo e ao financiamento dessa tecnologia, no sistema de saúde daquele país [51]. No que respeita a qualidade do resultado estético, dados analisados nessa revisão demonstraram que os desfechos obtidos com o uso da TFD foram consistentemente superiores em relação aos alcançados com outros tratamentos convencionais para tratamento do câncer de pele não-melanoma.

O custo baixos de aquisição da fonte luminosa e da produção dos fotossensibilizadores, a facilidade da execução do protocolo terapêutico e a extensa capilaridade do Sistema Único de Saúde - SUS apontam para a hipótese de que no Brasil a TFD possuiria um grande potencial de custo-efetividade, ao modo como estudos realizados em outros países têm demonstrado, inclusive quando a técnica é utilizada na rede de atenção primária à saúde [52;53;54;55].

1.4 Mecanismo de ação da TFD

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que envolve a combinação de três componentes não tóxicos: substância fotossensibilizante (FS), luz em comprimento de onda específico e oxigênio molecular. Quando esses elementos interagem, ocorre a produção em cadeia de espécies reativas de oxigênio (ROS) [56;57;58;59]. Os fotossensibilizadores per se têm propriedades não tóxicas, mas constituem a pedra angular da eficácia da TFD, pois representam o substrato molecular que promoverá a transição da energia fotoelétrica para a energia química, o que é um passo essencial para a geração de ERO [56;58]. Entre os principais oxidantes orgânicos estão os chamados radicalares: hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcóxila ($\text{RO}\cdot$); e os não radicalares, que incluem o próprio oxigênio; o peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso. O quadro completa-se com as espécies reativas de nitrogênio (ERN), igualmente citotóxicas, em que estão incluídos o óxido nítrico ($\text{ON}\cdot$); o óxido nitroso (N_2O_3); o ácido nitroso (HNO_2); os nitritos (NO_2^-); nitratos (NO_3^-) e o peroxinitritos (ONOO^-), cujo o processo de formação está correlacionado àqueles que originam as ERO [60].

O processo de formação das ERO é mediado por dois mecanismos básicos e interdependentes – de fotoreações tipo I e tipo II. No primeiro tipo, a radiação de luz leva o FS ao estado de singlet, o que lhe permite reagir com várias moléculas orgânicas do substrato do tumor. Em paralelo, por reações cruzadas, o fotossensibilizador excitado eletronicamente reage com O_2 para formar espécies reativas de oxigênio, iniciando a fotoreação do tipo II. Os ERO resultam da transição energética do oxigênio em estado molecular triplet ($^3\text{O}_2$) para singlet ($^1\text{O}_2$). A fotoreação do tipo II é fortemente

influenciada pela concentração de O_2 e ERN antes citadas, cabendo assinalar que a deprivação de vitamina A nas células facilita o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial, a ativação de um conjunto de reações químicas hostis a homeostase, centrada na ativação de PARP-1, mediador químico que atua em cadeias de checkpoint de danos ao DNA, à regulação da transcrição, à dinâmica da diferenciação e à morte celular. Alguns estudos demonstram que a superativação da PARP-1 em microambiente de stress oxidativo relacionado à isquemia levam a morte celular independente da ativação de caspases. Por sua vez, o ON em reação com o O_2 pode produzir peroxinitrito, um poderoso ERO que aumenta o estado do estresse oxidativo no microambiente tecidual.

Os ERO representam assim o principal mediador dos efeitos fotooxidativos e reagem com as moléculas integradas nas estruturas celulares, especialmente as da membrana plasmática, das mitocôndrias e dos lisossomos, levando ao transtorno das vias de sinalização e a bloqueio energético terminal. A morte das células neoplásicas ocorre por apoptose, necrose ou autofagia combinada com a ativação da resposta imune e com o colapso da vasculatura tumoral [25].

Os fotossensibilizadores com afinidade para as mitocôndrias e o retículo endoplasmático (mito-TFD) promovem via proteases a clivagem das proteínas anti-apoptóticas da família BCL2 e BCL-XL, enquanto as proteínas proapoptóticas permanecem intactas no citosol. BAX via tBID promove a liberação mitocondrial do citocromo C, que, através das caspases, conduz a célula a processo de apoptose irreversível [61]. No entanto, a perda da função BCL2 permite que a célula inicie o processo chamado de autofagia [62].

Os fotossensibilizadores com endereçamento subcelular para lisossomas (Liso-TFD) podem ignorar a autofagia como mecanismo de morte celular, o que, por causa de seu efeito citoprotetor, poderia contribuir para a resistência de tumores à TFD. As células com superexpressão de mediadores do processo autofágico adquirem a capacidade de resistir à fototoxicidade, uma vez que as mitocôndrias e o retículo endoplasmático são sequestrados e reciclados antes do conjunto de reações bioquímicas que orientam a morte celular para a apoptose [61], limitando a geração de ERO e,

consequentemente, produzindo os efeitos citotóxicos [63]. A autofagia é um processo biológico que permite a sobrevivência celular pela remoção de proteínas específicas e de organelas em situação de estresse foto-oxidativo, cabendo ser classificado conforme o sítio em que esse processo acontece, v.g. reticulofagia, mitofagia (mitocôndria), pexofagia (peroxissomas) e agregofagia (agregosomos).

2. JUSTIFICATIVA

O ensaio clínico teve por objetivo analisar o uso da TFD combinada a AICIFc-N no tratamento clínico do carcinoma basocelular superficial, a partir das seguintes pontos que integram o racional do estudo:

A incidência crescente do câncer de pele não-melanoma no mundo e, em especial, do carcinoma basocelular, representa um problema de saúde pública. No Brasil esta tendência adquire maior relevância por conta do envelhecimento populacional, quando a prevalência de doenças crônicas não transmissíveis acentua-se.

A segurança e a eficácia terapêutica da TFD no tratamento dos cânceres não melanoma, em especial do carcinoma basocelular, conforme demonstrado em ensaios clínicos publicados na literatura médica internacional e também pela sua aprovação para uso nos sistemas de saúde da Europa e Estados Unidos da America.

A disponibilidade no Brasil de evidências pré-clínicas (in vitro e in vivo), produzidas por grupos de pesquisa vinculados a Rede Nano do Instituto Nacional de Ciência em Nanotecnologia, no Instituto de Biologia da UNB e na literatura internacional, que demonstram eficácia e a segurança da AICIFc no tratamento de neoplasias de boca, mama e pele, com citotoxicidade bem estabelecidas para esse fotossensibilizador.

Existência de estudos internacionais que demonstram que a TFD é bem tolerada pelos pacientes, com efeitos adversos leves e bons resultados estéticos, além de que seu custo-efetividade ser comparável ao tratamento cirúrgico convencional, com a possibilidade ampliar essa vantagem quando realizada em nível primário de atenção em saúde.

A escassez de estudos na literatura científica brasileira que avaliem a a eficácia, a segurança e efetividade da TFD no tratamento do carcinoma basocelular.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL DA PESQUISA

Avaliar a TAXA DE RESPOSTA PATOLÓGICA da TFD + AICIFc-N no tratamento PRÉ-OPERATÓRIO do carcinoma basocelular superficial.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Definir da melhor dose / resposta a AICIFc-N (Ensaio Clínico Fase II).
- II. Identificar os efeitos adversos relacionados à concentração utilizada do fotossensibilizante (Ensaio Clínico Fase II).
- III. Comparar, num segundo momento (Ensaio Clínico Fase III), a não inferioridade da TFD mediada pela AICIFc-N com a cirurgia convencional para o tratamento do CBC superficial.

4. METODOLOGIA

4.1. SÍNTESE DA NANOEMULSÃO DE ALUMÍNIO-CLORO FTALOCIANINA

Foi utilizado uma nanoemulsão óleo em água com fotossensibilizador Alumínio-Cloro Ftalocianina (AICIPc [chloro (29H,31H-phthalocyaninato) aluminum] Sigma [Sigma–Aldrich Co. St. Louis, MO, USA.]), produzida previamente, de acordo com as boas práticas de manipulação farmacêutica no Instituto de Biologia, Laboratório de Nanotecnologia.

Estudos realizados no Instituto de Biologia demonstraram a estabilidade estrutural e físico-química da referida formulação por um período de 180 dias e a temperatura de 37°C. Além disso, estudos de citotoxicidade em modelos de culturas celulares, conduzidos naquele centro de pesquisa da Universidade de Brasília (UNB) , demonstraram que a formulação é citocompatível nas concentrações de até 10µM de AICIFc. Na realização da TFD foi empregado sempre o mesmo lote da formulação, sendo este produzido antes do início da intervenção terapêutica. A avaliação da estabilidade da emulsão de AICIFc-N foi monitorada por meio de avaliações de estabilidade das propriedades fotofísicas, da capacidade de geração de espécies reativas de Oxigênio e da estabilidade das propriedades nanoscópicas conforme descrito por Muehlmann *et al* [64].

4.2. ENSAIO CLÍNICO

O estudo foi conduzido em acordo com a Declaração de Helsinki e com as Diretrizes de Boas Práticas de Pesquisa Clínica [65;66;67]. O início da pesquisa esteve condicionada à aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de Brasília (CEP/HUNB).

Seguida à aprovação do projeto pelo CEP/HUNB, o projeto de pesquisa foi explicado aos pacientes selecionados, que, individualmente, no caso de concordarem em participar do projeto, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE .

Após aprovação no CEP-HUNB, o protocolo foi incluído e periodicamente atualizado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos – REBEC

(<http://www.ensaiosclinicos.gov.br/>). Todos os pesquisadores envolvidos na pesquisa, como evidência de boa prática investigatória, assinaram declaração de ausência de conflitos de interesses para conduzir, analisar e elaborar conclusões sobre os resultados decorrentes do emprego da TFD combinada a AICIFc-N em CBC.

4.3. DESENHO DO ENSAIO [40; 42; 43; 44; 65; 67; 68;69]

Trata-se de estudo clínico FASE II (ECF2), aberto, não randomizado, desenhado com o objetivo de avaliar a eficácia e a segurança do tratamento do carcinoma basocelular superficial com base na aplicação tópica de AICIPc-NP combinada à terapia fotodinâmica. Os ECF2 são utilizados para definição da melhor dose e para avaliar a efetividade e a segurança de intervenções terapêuticas, utilizando-se um número variável de pacientes portadores de uma determinada patologia. Pode ser classificado em dois tipos: ensaios clínicos II – a e II-b. O primeiro em geral é realizado com poucos pacientes, possibilitando uma avaliação prévia do cenário de pesquisa, que parametriza a evolução ao segundo tempo, com amostra mais ampliada. O ensaio clínico aqui apresentado (Apêndices – A e B) é considerado do tipo II – a, embora esteja vinculado a projeto mais amplo destinado à exploração da segurança e da efetividade da AICIFc (Figura 2)

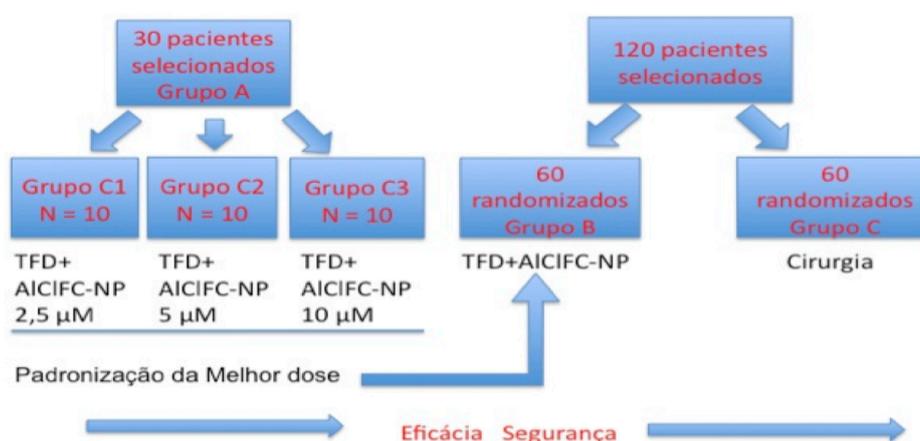


Figura 2 –Esquema do ensaio clínico fase II para avaliação da segurança e eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada por nanoemulsão de Al-CI-Ftalocianina, considerando dois braços de investigação.

Como estratégia exploratória, decidiu-se iniciar a pesquisa pelo subgrupo C3 do Grupo A, que utilizou dose de 10 µM da nanoemulsão de AICIF. Esta decisão permitiria avaliar pela dose superior o desempenho do FS, balizando assim o início dos grupos anteriores e ao fim a definição da melhor dose. Para o cálculo numérico das amostras foi utilizado o programa online Openep, disponível em <http://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm>, considerando os parâmetros descritos na Tabela 1.

Tabela 1

Tamanho da amostra para a frequência em uma população

Tamanho da população (para o fator de correção da população finita ou fcp)(N): 10
 frequência % hipotética do fator do resultado na população (p): 50%+/-5
 Limites de confiança como % de 100(absoluto +/- %)(d): 5%
 Efeito de desenho (para inquéritos em grupo-EDFF): 1

Tamanho da Amostra(n) para vários Níveis de Confiança

IntervaloConfiança (%)	Tamanho da amostra
95%	10
80%	10
90%	10
97%	10
99%	10
99.9%	10
99.99%	10

Equação

Tamanho da amostra $n = [EDFF * Np(1-p)] / [(d^2/Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p*(1-p)]$

Resultados do OpenEpi, Versão 3, calculadora de código aberto--SSPropor
 Imprima a partir do navegador com ctrl-P
 ou selecione o texto para copiar e colar em outros programas.

Tamanho da amostra para a frequência em uma população

Tamanho da população (para o fator de correção da população finita ou fcp)(N): 30
 frequência % hipotética do fator do resultado na população (p): 50%+/-5
 Limites de confiança como % de 100(absoluto +/- %)(d): 5%
 Efeito de desenho (para inquéritos em grupo-EDFF): 1

Tamanho da Amostra(n) para vários Níveis de Confiança

IntervaloConfiança (%)	Tamanho da amostra
95%	28
80%	26
90%	28
97%	29
99%	29
99.9%	30
99.99%	30

Equação

Tamanho da amostra $n = [EDFF * Np(1-p)] / [(d^2/Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p*(1-p)]$

Resultados do OpenEpi, Versão 3, calculadora de código aberto--SSPropor
 Imprima a partir do navegador com ctrl-P
 ou selecione o texto para copiar e colar em outros programas.

Foi previsto acompanhamento (*follow up*) por cinco anos dos pacientes incluídos nos dois braços do estudo, no Centro de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital da Universidade de Brasília (Cacon /HUNB), para

avaliação da efetividade tardia do tratamento, cobrindo assim largo espaço temporal na busca de recidivas no local.

4.4. ETAPAS DO ENSAIO

4.4.1. Clínica

A etapa clínica da pesquisa foi realizada nas dependências do Centro de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital da Universidade de Brasília (Cacon/HUNB), no Ambulatório de Dermatologia do HUNB e no Cetro – Centro de Câncer de Brasília .

4.4.2. Analítica

A etapa analítica foi realizada no HUNB (exames hematológicos, eletrocardiograma, raio X de tórax e histopatologia de biópsias) e no Lâmina – Laboratório de Patologia e Prevenção do Câncer (histopatologia de biópsias e da peça cirúrgica). O material de biópsia e da lesão removida cirurgicamente foi encaminhado imediatamente para os laboratórios, onde foram coradas pela técnica de hematoxilina eosina, mediante protocolo em uso nessas unidades.

4.4.3. Estatística da Pesquisa

Ao final da coleta de dados, a estatística seria realizada no Instituto de Biologia (IB/UNB) conforme metodologia descrita no protocolo.

4.5. POPULAÇÃO DO ESTUDO

4.5.1 Critérios de elegibilidade para participação do estudo

No Grupo A, seriam elegíveis 30 indivíduos, sem distinção de sexo, tipo de pele, que fossem maiores de 18 anos. Os pacientes selecionados seriam distribuídos igualmente nos 3 grupos antes descritos, desde que fosse confirmado histologicamente o diagnóstico clínico de carcinoma basocelular superficial.

4.5.2. Critérios de Inclusão

Foram considerados os seguintes critérios para inclusão do atendendo as recomendações da legislação em vigor e aqueles relacionados a patologia de base e para avaliação da condição clínica dos pacientes em processo de seleção.

- a) TCLE escrito e assinado para participar do estudo, autorizando também o uso científico dos tecidos tumorais coletados;
- b) Lesão de pele visível e mensurável, passível de ressecção cirúrgica;
- c) Capacidade para compreender e tomar decisões;
- d) Ausência de tratamento anterior na lesão;
- e) Glicemia de jejum ≤ 150 mg / dL. O uso concomitante de terapia anti-hiperglicêmica foi permitida se a dose fosse estável para \geq quatro semanas;
- f) Adequada função hematopoiética, hepática e renal, definida como segue:

Número de neutrófilos $\geq 1,5 \times 10^9 / L$

A contagem de plaquetas $\geq 100 \times 10^9 / L$

A bilirrubina $\leq 1,5 \times$ limite superior do normal (LSN)

AST e ALT $\leq 2,5 \times$ LSN

A creatinina sérica $\leq 1,5 \times$ LSN

Potássio, magnésio e cálcio dentro dos limites normais (permitindo-se suplementação e reteste);

- g) Para pacientes do sexo feminino:

Diagnóstico de pós-menopausa (definida como pelo menos 1 ano, sem qualquer fluxo menstrual) antes da triagem, ou

Documentado cirurgicamente condição estéril ou estado pós histerectomia (pelo menos 1 mês antes do rastreo)

- h) Pacientes do sexo feminino em idade fértil:

Teste plasmático de gravidez negativo na triagem e

Utilizar duas formas de controle de natalidade, excluído o método da tabela.

Não estar em aleitamento materno no período de estudo;

- i) Paciente do sexo masculino e seu cônjuge / parceira em idade fértil devem utilizar duas formas de controle da natalidade, excluída o método da tabela.

4.5.3. Critérios de exclusão

Para a exclusão do ensaio foram recomendados:

- a) Não disponibilidade para participar do ensaio clínico;
- b) Diagnóstico de gravidez, vigência de período de amamentação e desejo de engravidar no período do ensaio clínico, e em até 30 dias após o recebimento da última dose do droga;
- c) História clínica de discrasia sanguínea, cardiopatias, diabetes mellitus não controlado, hipertensão arterial não controlada, insuficiência renal, doença

pulmonar descompensada, hepatopatias agudas e crônicas, imunossupressão, SIDA, alergia, tabagismo, histórico de abuso de álcool e drogas, hipersensibilidade aos componentes da formulação AICIFc-N, gravidez, amamentação e intenção de engravidar no período de realização do ensaio clínico;

d) História de doença psiquiátrica ou neurológica que pudessem prejudicar a capacidade do paciente de compreender ou de cumprir os requisitos do estudo, ou para fornecer o consentimento informado;

e) História clínica de dermatopatia genética do tipo névica e infecções de pele.

f) Tratamento prévio de dermatopatias por meio de crioterapia, cirurgia, radioterapia, imiquimoid, eletrocauterização, imunossupressores, antineoplásicos e terapia fotodinâmica;

g) Uso de medicamento fotossensibilizante por até 4 semanas anteriores a seleção;

h) Uso de medicamentos que alterassem a cicatrização da pele, ou alterar a coagulação;

i) Participação em pesquisa clínica ou uso de terapêutica experimental nos 30 dias anteriores à fase de seleção do presente estudo.

4.5.4 Critérios para retirada dos pacientes durante o estudo

a) Ocorrência de efeito adverso grave.

b) Solicitação do paciente.

c) Evasão.

d) Participação em pesquisa clínica ou uso de outra terapêutica experimental na vigência da realização deste estudo.

4.5.5. Avaliação Clínica Pré-Tratamento e Registros de Evolução

Constou de consulta clínica individual, constituída de anamnese e exame físico completos com registro da localização, tipo e dimensões da lesão, agendamento de biópsia, evolução clínica, registro de intercorrências durante a aplicação da TFD + AICIFc-N e documentação fotográfica pré, per e pós tratamento (Apêndice C).

4.6. PROCEDIMENTOS

4.6.1 Testes diagnósticos solicitados previamente à intervenção

- a. Hemograma completo.
- b. Provas de função renal: uréia e creatinina plasmáticas.
- c. Provas de função hepática: Gama-GT , bilirrubina direta e indireta, TGO e TGP.
- d. Coagulograma, TAP e INR.
- e. Glicemia de jejum.
- f. Eletrocardiograma em 12 derivações.
- g. Radiografia simples do tórax.
- h. Teste plasmático para gravidez, quando aplicável.

primeiras 6 horas após o tratamento e nos 6 primeiros meses de evolução.

4.6.2. Contagem de células neoplásicas remanescentes por campo microscópico.

Destinada a avaliação da eficácia da aplicação de TFD + AICIFc-N no tratamento do carcinoma basocelular, assim como para identificar variações de resposta entre indivíduos com o mesmo tipo histológico da neoplasia.

4.6.3. Pesquisa de interleucinas e de marcadores da apoptose.

O Carcinoma Basocelular está relacionado a atividade inflamatória expressiva. O objetivo de pesquisar interleucinas consiste em avaliar se a TFD+AICIFc-N possui propriedades imunomodulatórias para a expressão de citocinas (como a INF-a e a IL-10) [71;72;73;74]. Os pacientes submetidos a TFD, independente do desfecho observado, seriam testados por grupo e aleatoriamente para avaliação da expressão desses marcadores.

4.7. MONITORAMENTO DA INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA

Os pacientes incluídos foram avaliados clinicamente 02 horas após a aplicação do composto em estudo. A medicação analgésica foi prescrita via oral, consistindo de paracetamol na concentração de 750 mg/comprimido, quando necessário a cada 8 horas. O aspecto lesional foi documentado por registro fotográfico à cores, em formato digital, mediante câmera Nikon Coolpix P7000®, imediatamente antes, depois dos procedimentos terapêuticos e a cada visita de controle clínico.

4.8. RESTRIÇÕES DURANTE O ESTUDO

Foi informado previamente a realização da TFD que os sujeitos de pesquisa selecionados deveriam abster-se de exposição à radiação solar nas

4.9. DESFECHOS CONSIDERADOS

4.9.1. Quanto à segurança

4.9.1.1 Toxicidade Local

Foram avaliadas variáveis de eritema, edema, dor, ulceração, aumento da temperatura no local da lesão e formigamento surgidas após a aplicação da AICIFc-N+ TFD. Os sintomas locais de eritema, edema e ulceração foram avaliados por meio de colorimetria, obedecendo a uma escala de avaliação de 0 a 5. A variável dor foi avaliada por escala visual-analógica (EVA), em que a quantificação desse sintoma subjetivo foi descrita pelo paciente em tabela com escalonamento numeral de 0 a 10, onde zero representa nenhuma dor e dez a pior dor possível. Pediu-se também ao paciente para descrever a qualidade da dor experimentada, considerando descritores algícos relacionados ao tegumento, isto é: ardor; queimação; formigamento; ferroadada e pulsátil (Apêndice C).

4.9.1.2. Toxicidade sistêmica

Foi avaliada com base na descrição da sintomatologia clínica e, quando necessário, pelo resultado de testes de laboratório, gráficos ou de imagem, apropriados à situação. Avaliaram-se os sintomas como náuseas, vômitos, cefaléia, falta de ar, palpitação, dor articular, tonteira, artralgia, mialgia, zumbido auditivo e febre (temperatura axilar superior a 37,5o C (Apêndice C).

4.9.1.3. Quanto à eficácia

4.9.1.3.1 *Insucesso de tratamento*

Foi estabelecido que a presença de células neoplásicas viáveis em campo microscópico, decorridos 7 dias da TFD + AICIFc-N, ou a qualquer tempo em que houvesse recorrência do tumor durante a evolução seria considerado falha terapêutica. Em termos de Grupo B, no caso de recidiva tumoral, o paciente seria encaminhado para o tratamento cirúrgico convencional, sem que no entanto fosse retirado da amostra.

4.9.1.3.2 Sucesso do tratamento

Demonstração clínica de ausência de neoplasia em sete dias e aos 6, 12, 24, 36, 48 e 60 meses após a aplicação da TFD + AICIFc-N, considerando-se ainda intervalo de confiança de 95%.

4.9.1.4. Resultado estético

Após 12 meses de acompanhamento clínico os pacientes seriam avaliados quanto a estética do local tratado, mediante atribuição dos seguintes juízos: ruim, regular, bom, muito bom e excelente. O sítio de tratamento também seria classificado quanto à hiperpigmentação, considerando três possibilidades: normal, hipopigmentada e hiperpigmentada.

4.10. REGISTRO DE EFEITOS ADVERSOS

Todos os efeitos adversos (EA) foram pesquisados durante o período da investigação. Foi elaborada ficha própria para registro dos EA, na qual os sintomas foram descritos quanto a tipologia e classificados na sua intensidade como leve, moderado e severo e, quanto à funcionalidade, como não associados ou associados à limitação de atividades diárias, assim como as medidas prescritas para revertê-los, ou aliviá-los (Apêndice C).

4.11. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Foi prevista a realização de estatística descritiva para avaliação de segurança e da eficácia da AICIFc-N + TFD, com nível de significância < 0.050. O cálculo para variáveis de intenção de tratamento (ITT) e por Protocolo (PP) também seria realizado. O cálculo do ITT e do IPP são indicadores importantes para assegurar que os dados analisados estavam em acordo com as regras de alocação previstas no protocolo, evitando assim que vieses de análise viessem a influir na avaliação dos desfechos, o que vem a ser um desafio quando há perdas significativas durante a realização de um estudo (ANEXO B).

4.12. ENSAIO COM A ALCLFC-N 10 MM + TFD

Biópsias clínicas do tipo *punch* foram realizadas para avaliar e confirmar a lesão, e consistiu da obtenção de espécime tecidual com 3 mm de diâmetro. A anestesia local foi feita com xilocaína injetável a 2%. O objetivo foi de confirmar a hipótese clínica de Carcinoma Basocelular Superficial e atender recomendações bioéticas [70].

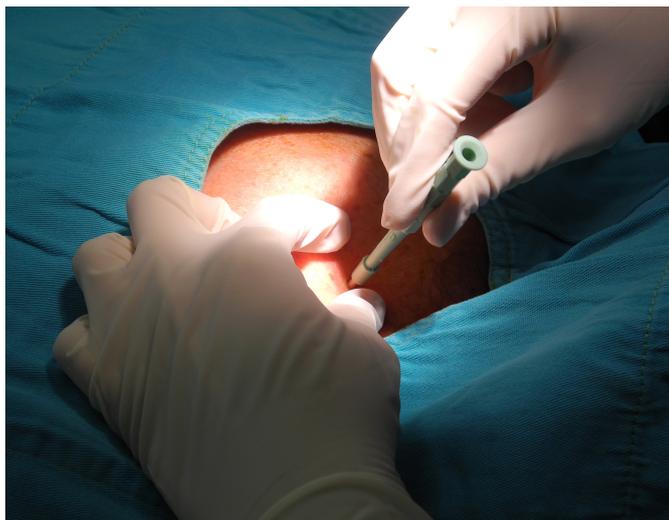


Figura 3 – Biópsia *punch* de lesão de carcinoma basocelular.

Sete dias após a confirmação histopatológica foi iniciada a TFD com AICIFc-N. Após assepsia, para reduzir a espessura da camada córnea, realizou-se curetagem superficial com lâmina de bisturi, utilizando-se de anestesia local. A raspagem constitui medida mecânica destinada a facilitar a absorção da nanoemulsão de AICIFc, e incluiu margem de segurança adiante estabelecida.

A seguir, com dedo enluvado, foram aplicados $1 \text{ mL} / \text{cm}^2$ de nanoemulsão sobre toda a extensão da área da lesão ampliada com margem de segurança de 10 mm. O local da aplicação recebeu curativo opaco e oclusivo por 1 hora. Após esse tempo, a lesão foi submetida à radiação luminosa na faixa da cor vermelha. Os comprimentos de onda emitida foram entre 630 a 675 nm, na potência de $100 \text{ mW}/\text{cm}^2$. Os tempos de aplicação tiveram por linha de base 15 minutos. A distancia do fonte de luz para a lesão foi de 6 cm. A fonte de luz empregada foi composta por bancos de 20 díodos emissores de luz (LED), modelo XL001WP01NRC660 (Shenzen Sealand Optoelectronics Co. Ltde., China), equipado com circuito de alimentação montado sob supervisão do doutor Paulo Souza, professor do Instituto de Física da Universidade de Brasília (Figuras 4, 5 e 6). Decorridos 7 dias da aplicação, os pacientes retornaram para serem submetidos à cirurgia de exérese completa da neoplasia.



Figura 4. Padronização da fonte luminosa utilizada nas sessões de TFD combinada a nanoemulsão de AICIFc. Comprimento de onda: 660 nm. Potencia 100 mW/cm² .



Figura 5. Paciente submetida a TFD + AICIFC 10 μ M, para lesão de face.

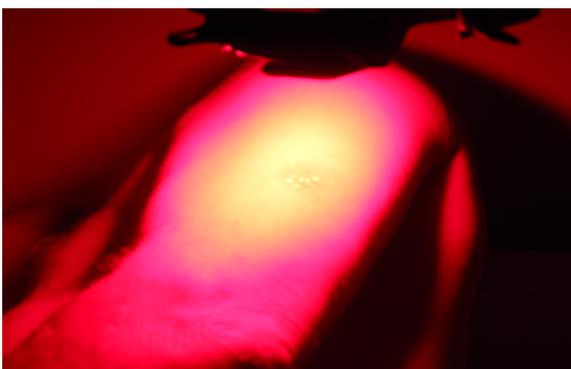


Figura 6. Paciente submetido a TFD + AICIFC 10 μ M, para lesão de braço esquerdo (região deltóide).

5. RESULTADOS

Quatorze pacientes foram selecionados no Ambulatório de Dermatologia do HUNB, dos quais seis foram excluídos (43%) por não satisfazerem aos critérios de inclusão do estudo e três outros por não comparecerem à consulta para conhecimento e assinatura do TCLE (21%).

Cinco pacientes foram incluídos (36%), sendo quatro do sexo masculino e um do feminino, todos com diagnóstico histopatológico confirmado de carcinoma basocelular superficial. Destes, quatro foram submetidos à TFD com AICLFC na concentração de 10 μ M (Figura 1, 2) e, após sete dias de intervenção, foram tratados com remoção cirúrgica completa da lesão. As lesões tratadas foram localizadas na face (2), dorso (2) e braço (1).

As principais causas de exclusão na seleção foram o não comparecimento à consulta (67%) e a presença de condições clínicas graves (uso de imunossupressores pós-transplante renal), assim como histopatologia positiva para ceratose actínica.

Os pacientes tratados relataram queixas clínicas mínimas durante e após a realização do procedimento, referindo leve e transitório formigamento no local da lesão. A exérese cirúrgica da lesão foi acompanhada de infecção local em apenas um paciente, sendo tratada e resolvida ambulatorialmente com medidas de higiene e curativo local. Não foi necessário antibioticoterapia.

A histopatologia após a TFD, entretanto, demonstrou quadro inalterado em 3 pacientes e 1 resolução completa. Com base nesses resultados o quinto paciente não foi submetido a TFD, sendo tratado mediante remoção cirúrgica da lesão.

5.1. REAVALIAÇÃO DO ENSAIO

Frente aos achados anátomo-clínicos inesperados, foi recomendado a reavaliação do ensaio. Decidiu-se fazer a reanálise da histopatologia (second look), com o examinador cegado para o diagnóstico anterior, rever-se a bibliografia referente aos ensaios e avaliar a difusão da AICIFc-N em pele humana hígida, o que não estava previsto inicialmente no protocolo (Quadro II).

5.2. OBTENÇÃO DA MATERIAL DERMATOLÓGICO HÍGIDO

Utilizou-se para esse fim tecido de abdome removido por abdominoplastia pelo medico cirurgião plástico Cesar Daher e equipe, oriundo de paciente branca, tipo de pele 3 de Fitzpatrick, sem queixas clínicas para carcinoma basocelular de pele ou outra patologia cutânea. A paciente autorizou a cessão do material cirúrgico, que fora removido de seu corpo para fins estéticos.

A metodologia, empregada sem interferência nos tempos cirúrgicos da abdominoplastia, consistiu na delimitação de pequenos quadrados sobre a pele, nas medidas de 1 x 1 cm, demarcados com tinta indelével, para teste de duas concentrações de AICIFc-N, a 10 μ M e 60 μ M, em quadruplicata com respectivos grupos controle. As amostras foram avaliadas com microscopia confocal [75] e analisadas também quanto a bioluminescência (Lumina®), de modo a verificar a absorção cutânea da AICIFc – NP. (Figura 7).



Figura 7. Administração topica de AICIFc-N, nas concentrações de 10 μ M (à esquerda) e 60 μ M (à direita), em quadruplicata, com correspondentes grupos controles. Pele de abdome in situ anatômico.

A administração da droga obedeceu as etapas prevista anteriormente no protocolo do ensaio, excetuada a exposição à radiação luminosa e o tempo de oclusão, com o tecido em sítio anatômico. Após uma hora de oclusão, a pele foi removida e, em seguida, as áreas marcadas que receberam a

AICLFC – NP, foram fixadas imediatamente por congelamento em Nitrogênio líquido.

5.3. RESULTADOS DE LUMINESCÊNCIA

A avaliação da luminescência foi realizada em aparelho Lumina® cerca de 1 hora após a fixação do material orgânico em Nitrogênio líquido, por pesquisador não diretamente envolvido na realização do ensaio clínico. A técnica de bioluminescência possui alta sensibilidade para avaliação de drogas que induzam a expressão de luciferase pelos tecidos orgânicos. Os resultados de campo microscópico demonstraram baixa bioluminescência (BLI) nos grupos experimentais de nanoemulsão de AICIFc e em seus respectivos controles.

4.4 Reavaliação histopatológica cegada da lesão tumoral (biópsia e peça cirúrgica)

As lâminas das peças cirúrgicas foram reavaliadas no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. O procedimento foi cegado para os resultados histopatológicos anteriores, de modo a controlar vieses de interpretação e os resultados foram todos concordantes entre si (Quadro 2).

Paciente 1

Peça Cirúrgica Pós-TFD (B15031317AP) – revisão da lâmina

Corte tangencial á superfície da epiderme com presença de agrupamentos com carcinoma basocelular.

Paciente 2

Peça Cirúrgica Pós-TFD (15031999AP) – revisão da lâmina

Degeneração basofílica do colágeno. Observa-se infiltrado inflamatório mononuclear acompanhando o tumor. Área focal de ulceração. Margens da lesão livres. Carcinoma basocelular.

Paciente 3

Peça Cirúrgica Pós-TFD (B 15028514 AP) – revisão da lâmina

Degeneração basofílica do colágeno. Ausência de neoplasia.

Paciente 4

Peca Cirúrgica Pós-TFD (15031314AP) – revisão da lâmina

Múltiplas áreas com carcinoma basocelular, com pequeno foco localizado na derme e ulceração. Degeneração basofílica do colágeno. Presença de inflamatório mononuclear.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Pele	Histologia Pré-TFD	Histopatologia Pós-TFD	Local	Diâmetro	Sintomas e sintomas pós TFD
1	59	M	II	CBCS	CBCS	braço	0,8 cm	eritema leve
2	58	M	II	CBCS	CBCS	nariz	0,5 cm	eritema leve
3	54	F	I	CBCS	Ausência de Neoplasia	nariz	1 cm	ardor eritema leve
4	44	M	albinismo	CBCS	CBCS	dorso	2 cm	eritema leve

Quadro 2 - Pacientes submetidos a TFD + AICIFc-N, concentração 10 µM

6. DISCUSSÃO

Ensaio clínico representam o melhor potencial para gerar evidências robustas sobre o valor das intervenções terapêuticas experimentais em seres humanos. Entretanto, para seus resultados terem validade interna e externa, o desenho do estudo deve fundamentar-se na aleatorização, atribuição cega dos sujeitos aos grupos de intervenção, na seleção controlada de parâmetros e desfechos. A pesquisa clínica com CBC em geral é bastante escassa na literatura, apesar da crescente demanda de novos casos nos ambulatórios e o correspondente impacto no financiamento dos cuidados de saúde. Esta insuficiência de estudos, por sua vez, influencia as diretrizes para o tratamento com CBCS, que não demonstram um consenso claro sobre a primeira escolha entre terapias não invasivas [76].

Para melhor compreender os resultados aqui descritos, que demonstram a ineficácia da nanoemulsão de AICLFC no tratamento do CBCS, realizou-se revisão bibliográfica nas bases PubMed, Scielo, Ovide e Cochrane com o objetivo de rever aspectos metodológicos de ensaios clínicos que utilizaram a TFD como alternativa terapêutica no tratamento do CBC superficial. Foram selecionados trabalhos publicados em língua inglesa entre 2005 e 2017, que utilizaram como FS o Photoeme® [77], Photofrin® [78], Foscan® [79,80], NPe6 [81], Hipericum [82], Cianinas [83], ácido 5-amino-levulínico (MAL) [84;85] e ácido amino-levulínico (ALA) [86;89] ambos precursores da protoporfirina IX (PPIX) e, sempre que possível, optou-se pela análise de estudos com metodologia randomizada e com *follow up* longo.

Estudos com acompanhamento clínico longo são importantes, porque o design mais estendido permite avaliar a efetividade pós-tratamento, considerando a história natural da doença. Esse cuidado redimensiona a avaliação da resposta terapêutica e o significado do chamado intervalo clinicamente livre de doença. Os ensaios clínicos TFD com Photofrin®, Photoeme® e Foscan® possuem qualidades metodológicas que comprometem a validade externa dos seus resultados (Tabela 2). A ausência de aleatorização e de cegamento, o pequeno número de sujeitos incluídos, a falta de correlação anatomopatológica das lesões tratadas, o uso de um

método de biópsia seguro e a ausência de subgrupos estratificados possibilitam a ocorrência vieses.

Estudo	ECR	Protocolo						Histopatologia (N)	BCCS (N)	Remissão Completa N (%)	Não remissão N (%)	RR (anos)	Follow up Longo	Estética	Efeitos Adversos
		FS	Dose FS	WL (nm)	Dose Luz J/Cm2	IR	S								
Kaviani, A et cols	Não	Photoheme®	2 – 2,5 mg/kg IV	632	110 -200	500 - 1000 W/Cm 2	1	Todas	Sim (4)	3 (75)	1 (25)	Not	6 meses	Bom	Leve
Oseroff e cols	Não	Photofrin®	0,75 mg/kg 0,85 mg/kg 1 mg/Kg IV	630	215 +/- 10%	150 mW/cm2	1	Não todas pre PDT + FS, Todas as recorrências	Sim sem número	Não informado	Não informado	1%=1 a 12%= 3a 28%= 5 a	5 anos	Bom/ Excelente	Leve
Betz et cols (Não	Foscan®	0,03– 0,15 mg/Kg, IV	652	20 to ≥ 100	100 mW /cm	1	Todas	Sim sem número	-	-	-	6 anos	Bom/ Excelente	Grave*

ECR: ensaio clínico randomizado; FS: fotossensibilizante; BCCS: carcinoma basocelular superficial; N (%): número (percentual); RR: recorrência. IV: intravenoso; terapia fotodinâmica; IR: irradiância; S: número de sessões de TFD. * Queimadura solar (fotorreação). Modificado de Kaviani at al, Oseroff at all, and Betz at al [77, 78, 79, 80].

Kacerovska *et al* avaliaram a eficácia da TFD com aplicação tópica de extrato de H.

Perforatum (Hipericim) na lesão actínica, carcinoma basocelular (CBC) e doença de Bowen [82]. O princípio ativo presente na solução é a hipericina, considerada o mais potente fotossensibilizador natural. Foram tratados 18 pacientes com carcinoma basocelular superficial. O diagnóstico clínico foi confirmado por histopatologia. Para uma melhor penetração de FS, antes da aplicação tópica de Hipericim, as lesões foram limpas e desencrustadas por métodos inespecíficos. A concentração média de hipericina utilizada no tratamento foi de 17 mg (0,07%). Após duas horas, o curativo oclusivo foi removido e a lesão irradiada semanalmente na faixa de 580 e 680 nm, com dose de luz total de 75J / cm², durante 15-20 minutos. O número de aplicações de TFD variou de acordo com as características clínicas da lesão e a persistência do FS na pele, verificada pela lâmpada de Wood. As biópsias foram realizadas nas 3^a e 8^a semanas após o tratamento. Os resultados demonstraram baixa eficácia devido à variabilidade na pureza e concentração do ingrediente ativo no extrato e o alto peso molecular da hipericina (504 Daltons), que dificulta sua absorção para além da pele, apesar da lipofilicidade favorável (Tabela 3).

Tabela 3 - Resposta Clínica e Histológica de Carcinoma Basocelular Superficial à Terapia Fotodinâmica com Hipericin.

Pacientes	Idade /Sexo	Localização	Dimensões (mm)	Sessões (n)	Resposta Clínica	Resposta Histológica
1	48/M	tronco	20 x 10	6	Parcial	Incompleta
2	71/F	tronco	80 x 40	15	Parcial	Incompleta
3	82/M	tronco	20 x 30	9	Completa	Completa
4	61/M	tronco	40 x 15	6	Completa	Completa
5	69/M	tronco	20 x 10	6	Completa	Incompleta
6	74/F	tronco	15 x 10	5	Inalterado	Incompleta
7	34/F	membro superior	20 x 10	5	Completa	Incompleta
8	32/M	tronco	35 x 30	6	Inalterado	Incompleta
9	71/M	face	10 x 10	6	Parcial	Incompleta
10	69/F	tronco	20 x 15	6	Parcial	Incompleta
11	60/F	tronco	20 x 10	8	Parcial	Incompleta
12	74/F	tronco	15 x 12	6	Inalterado	Incompleta
13	71/F	tronco	35 x 20	9	Inalterado	Incompleta
14	73/M	tronco	15 x 10	6	Inalterado	Incompleta
15	68/M	tronco	25 x 25	6	Parcial	Incompleta
16	58/F	tronco	15 x 10	6	Inalterado	Incompleta
17	74/M	tronco	25 x 12	7	Parcial	Incompleta
18	77/F	tronco	10 x 10	9	Completa	Completa

ECR: ensaio clínico randomizado; FS: fotossensibilizante; CBCS: carcinoma basocelular superficial; N (%): número (percentual); RR: recorrência. IV: intravenoso; terapia fotodinâmica; IR: irradiância; S: número de sessões de TFD. * Queimadura solar (fotorreação). Modified from Oseroff et al, Kaviani et al and Betz et al [29, 30, 31, 32]

Chan *et al* avaliaram o NPe6 (mono-L -aspartyl chlorin e6), que é um fotossensibilizante hidrofílico derivado da clorofila, com afinidade para lisossomos, por meio de ensaio aberto, dose única para avaliar a farmacocinética da substância [81]. A desvantagem clínica do NPe6 é a longa meia vida da molécula que varia de 264 – 672 horas (média de 452 horas), o que estabelece um risco elevado de fotossensibilidade que pode durar até 10 semanas após exposição ao FS. Foram tratados quatro pacientes com diagnóstico de CBC, sem que os autores informassem os subtipos histológicos. Três pacientes receberam respectivamente doses endovenosas de 1, 1.65 e 2.5 mg/kg e um paciente recebeu a dose de 3.5 mg/kg. A variabilidade das doses foi calculada com base nas características clínicas da neoplasia. As lesões foram expostas à radiação luminosa 4-8 horas, com dose que variou entre 0,50 e 200 J/cm². No total foram tratadas 6 lesões, observando-se remissão completa em 4 e insucesso terapêutico em 2 decorridos 28 dias da realização da TFD. O ensaio concluiu que a vida média do NPe6 foi de 106 horas (Tabela 4).

Table 4 – Resposta Clínica a TFD - NPe6 *

Idade/Sexo	Neoplasia	Localização	Dose NPe6 (mg/kg)	Lesões Tratadas (n = 24)	Tamanho (cm)	Dose Total de Luz (J/cm ²)	Resposta (28 ^o dia)
63/F	CBC	MI e Tórax	0.50	3	1.5 x 1.0 x plana	25	SR
					1.4 x 1.0 x plana	100	RC
					4.0 x 4.0x0.5	200	SR
68/M	CE + CBC	Cabeça e Tórax	1.00	3	1.0 x 1.0 x plana	50 to	RC
					1.0 x 1.0 x plana	100	RC
46/M	CBC	Cabeça e Dorso	1.65	17	0.6 x 0.4 x plana	12.5 to	RC
					12.0 x 5.0 x plana	200	RC
65/F	CBC	MI	3.5	1	3.5 x 4.5 x 0.4	200	RC

CBC: carcinoma de células basais. CE: carcinoma Epidermóide. MI: membro inferior. SR: sem remissão. RC: Remissão Completa. Modificado de Chan AL, Juarez M, Allen R, Volz W, Albertson T. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005 Apr;21(2):72-8.

As cianinas são FS de segunda geração que mostram semelhança molecular com as porfirinas. A inclusão de metais no anel central macrocíclico dá as características anfífilas da molécula PHC, melhorando o desempenho fotofísico. As propriedades de hidrofiliabilidade e hidrofobicidade tornam a PHCs uma das mais versáteis FS de segunda geração em uso [87]. A ftalocianina de silício (PC-4) é caracterizada pela inserção de silício em anel macrocíclico, o que amplifica o desempenho quântico da molécula quando exposto à luz vermelha. Seu pico de absorção de 675 nm confere maior potencial de penetração de luz na pele. O ensaio realizado por Baron *et al* avaliou o uso tópico de PC-4 no tratamento de câncer de pele [88]. O ensaio clínico foi aberto, não randomizado, e incluiu 43 homens e mulheres, com idade média de 58 anos, com inclusão de dois casos de CBC. Todas as lesões foram biopsiadas e histopatologicamente confirmadas, mas os autores não informaram os tipos histológicos de CBC incluídos no estudo. A dose de PC-4 foi de 5 a 10 mL por cm² de lesão e foi aplicada à pele e protegida por curativo opaco. Após 1 hora da aplicação tópica de FS, a lesão foi irradiada a 675 nm, com fluência leve e irradiação de 50-200 J / cm² e 100 mW / cm². Após 24 horas, 48 horas e 14 dias de TFD, as lesões foram biopsiadas. Em geral, o tratamento foi bem tolerado pelos pacientes e não foram observadas reações adversas. Porém os resultados clínicos foram decepcionantes: 43/43 pacientes não apresentaram remissão do tumor.

Os ensaios clínicos com ALA e MAL associados à TFD nem sempre com acompanhamento prolongado apresentaram melhores níveis de evidência científica. Os ensaios selecionados foram controlados, randomizados (ECR) e com diferentes graus de cegueira nas etapas da pesquisa. A TFD combinada com estes FS foi também comparada quanto a

superioridade/inferioridade a outras modalidades terapêuticas aplicadas ao CBCS.

Um ponto importante a ser assinalado é a heterogeneidade dos parâmetros luminosos de irradiação, baseados em ensaios clínicos pré-clínicos e clínicos prévios observado nesses estudos. No que respeita a TFD_MAL, as diferenças nos protocolos tiveram consequências marcantes nos resultados primários dos ensaios. Arits e Szeimies adotaram um protocolo aprovado para duas sessões de TFD com intervalo de uma semana e ambos obtiveram resultados diferentes, apesar de usarem a mesma concentração e parâmetros de luminosos. O ensaio conduzido por Szeimies *et al* obteve resultados comparáveis aos observados no tratamento cirúrgico do CBCS em termos de resposta terapêutica completa, enquanto o estudo de Arits apresentou altas taxas de recorrência do tumor. A comparação entre estes ensaios randomizados e controlados, conduzida em uma coorte muito similar, sugere que mais de duas sessões de TFD podem ser necessárias para obter melhor resultado terapêutico.

Estudos com PPIX demonstraram que a TFD repetida (fracionada) com intervalo de tempo prefixado em uma única sessão, induz uma fototoxicidade tecidual maior do que a observada nos protocolos convencionais, porque fotobleaching e o intervalo de tempo entre as irradiações estimulam a resíntese da PPIX, e a concentração tecidual do FS passa a ser uma função da taxa de fluência utilizada na primeira sessão de TFD [90].

Embora estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* apresentem evidências promissoras para o uso das ftalocianinas combinadas a TFD no tratamento de neoplasias, em que foram demonstrados os efeitos citotóxicos imediatos e tardios, levando a diminuição ou a eliminação da proliferação celular, características físico-químicas relacionadas à hidro ou lipossolubilidade e à tendência agregativa, assim como as relações de carga estabelecidas com a membrana celular, são igualmente descritas como fatores que podem interferir desfavoravelmente na absorção da droga [91,92,93].

A impermeabilidade natural da pele constitui uma barreira à difusão de FS em camadas mais profundas. Considerando que a difusão constitui o principal mecanismo de absorção de drogas pela pele, o tamanho molecular representa um fator limitante que obriga a adoção de medidas físicas e

químicas que favoreçam seu transporte transcutâneo. A via transcelular (através de corneócitos e bicamadas lipídicas) e as vias intercelulares (através da solubilização nas bicamadas lipídicas) constituem os facilitadores mais importantes da difusão passiva de drogas através da pele.

As ftalocianinas como fotossensibilizantes de segunda geração com absorção na faixa de espectro vermelho (670 nm a 780 nm) possuem valor de uso na TFD, desde que sua formulação possua características físico-químicas que facilitem a permeação cutânea, do contrário ficará retida nos estratos córneos e não alcançará a derme profunda ou o fará em concentração insuficiente. Como composto lipofílico de alto peso molecular (574,96 g/Mol) e coeficiente de partição octanol-água de 7.3, possui forte tendência a ficar retida no estrato córneo. A nanotecnologia permite que moléculas com estas características aumentem sua capacidade de difusão através da pele, combinando-a a amplificadores químicos de permeação como o ácido oleico, o dodecilazacocloheptan-one ou azone, o dimetil sulfóxido, propilenoglicol, que provocam ruptura temporária e reversível das junções de corneócitos, possibilitando que o fotossensibilizante difunda-se até os estratos cutâneos profundos e alcance o tecido tumoral em concentração suficiente para provocar os efeitos fototóxicos associados a TFD. Esse processo é dependente do tempo e da concentração do fotossensibilizante. A eficácia do fotossensibilizante dependerá assim da localização final da molécula no tecido e esta, por sua vez, dependerá diretamente do sistema de liberação utilizado, do microambiente e das propriedades físico-químicas do FS [91].

Para avaliar o processo de difusão dos FS na pele, são realizados testes de permeação cutânea com diferentes metodologias (in vivo e in vitro), ainda que, raramente, tenha-se referencia a eles nos ensaios clínicos com TFD. Os testes de permeação cutânea permitem que seja avaliada a passagem de drogas desde a penetração no estrato córneo (EC) até as camadas celulares proliferativas do sistema tegumentar, representadas pela epiderme viável (EV) e a derme (DE). O uso de pele de porco para a avaliação da permeação de medicamentos é um dos mais utilizados em pesquisa pela facilidade de sua obtenção, manutenção e sua biosemelhança histológica e funcional com a pele humana [100].

Testes de permeação em orelha porcina foram realizados no Laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Genética e Morfologia, do Instituto de Biologia da UNB, com o objetivo de avaliar a permeação da AICIFc utilizada neste estudo. Utilizou-se a concentrações de 40 μM , comparando-se a nanoemulsão com a solução etanólica de ftalocianina com o objetivo de determinar e diferenciar a dinâmica da difusão passiva do FS, ou, especificamente, as concentrações de ftalocianina retida no EC e da que penetrando o sistema tegumentar alcançasse a epiderme viável (EV) e a derme.

Para a obtenção e análise desses dados quantitativos empregou-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com base em método desenvolvido pela Técnica Karen Rapp Py-Daniel no laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Genética e Morfologia. Após a obtenção da curva padrão da AICIFc-N, foram calculados apud Miller e Miller [101] os limites de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do FS conforme as equações $LD = 3.3 * (\text{desvio padrão}) / (\text{angulação da reta})$ e $LQ = 10 * (\text{desvio padrão}) / (\text{angulação da reta})$ []. O valores de referência de LD e LQ foram, respectivamente, 0,005 $\mu\text{g/mL}$ e 0,016 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados do teste demonstraram que a nanoemulsão de AICIFc apresenta um perfil farmacocinético de baixa permeação em pele de porco, conforme demonstrado por valores quantificáveis, mas abaixo do limite de quantificação estabelecido para o método tabela 5 – A e B.

Tabela 5 - Ensaio de Permeação com AICIFc-N

A

Nanoemulsão (NE)	04/04/2014	16/05/2014
	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
Permeado 2h	0	0
Permeado 3h	0	0
Permeado 4h	0	0,005*
Permeado 5h	0	0,006*
Permeado 6h		0,008*
Extrato córneo	0	0
Epiderme	0	0,005*

B

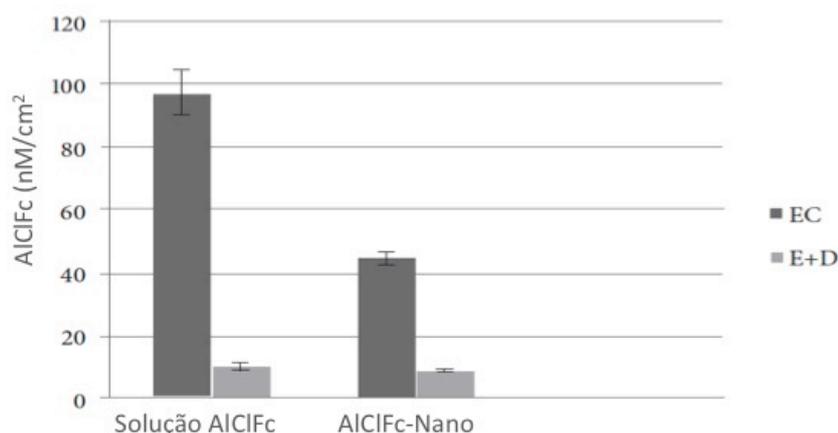
Gel + nanoemulsão	04/04/2014	16/05/2014
	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
Permeado 2h		
Permeado 3h	0	0
Permeado 4h	0	0
Permeado 5h	0	0
Permeado 6h	0	0
Extrato córneo	0	0,006*
Epiderme	0	0

*Valores detectados, mas abaixo do limite de quantificação do método analítico; ND: valores não detectados pelo método.

Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Ospina e col [94], que estudaram a permeação em pele humana de uma nanoemulsão de AICIFc para uso no tratamento de Leishmaniose cutânea, comparando-a com a solução convencional desse FS e soluções controle (brancos). Os resultados do ensaio demonstraram que tanto a AICIFc da nanoemulsão quanto aquela da solução ficaram predominantemente retidas no estrato córneo (para a solução AICIFc os níveis na córnea foram de 96,99 μM e na epiderme-derme

9,82 μM e para a nanoemulsão 44,17 e 8,48 μM , respectivamente (Gráfico 1).

GRÁFICO 1



Retenção de AICIFc-Nano e solução de AICIFc em pele humana, após 12 horas de aplicação. Resultados expressos em mM/cm². EC: Estrato córneo. E+D: Epiderme e derme.

O desempenho da permeação da AICIFc-N nesses resultados não divergem ao que foi observado no teste de luminescência realizado em pele humana, conforme antes descrito.

Há evidente consenso na literatura de que as nanoemulsões são excelentes sistemas de entrega de drogas, porém desequilíbrios na formulação relacionados a maior ou menor concentração e à proporção dos promotores químicos da permeação podem dificultar o processo de difusão transdérmica. Essas dificuldades relacionadas podem levar à retenção do FS, conforme considerado por Baron *et al* [83], para explicar os resultados desencorajadores que obtiveram no ensaio sobre o uso da ftalocianina siliconada no tratamento do CBCS.

O *stratum corneum* constitui o principal obstáculo para uma substância difundir-se através da pele. Entre as estratégias para melhor absorção de um FS de administração tópica, destaca-se a curetagem local, que permite a abertura de poros com diâmetro igual ou superior a 103 nm. Conforme antes observado, a incapacidade para superar a barreira superficial de

queratinócitos e das ceramidas que integram o estrato córneo aumenta em muito a probabilidade de retenção dos FS, tornando possível que doses subótimas no tecido e, em consequência, a não resolução da lesão ou maiores índices de recorrência tardia. No caso da nanoemulsão de AICIFc utilizada neste ensaio, seu tamanho hidrodinâmico situa-se em torno de 25 nm [64], abaixo portanto do diâmetro de poro que a escarificação possibilita. O procedimento de curetagem antes da TFD, incluída a área de margem de segurança, é obrigatória para uma melhor absorção tópica do FS e afeta significativamente a taxa de depuração [97]. Este efeito também pode ser obtido com aplicação de dimetil sulfóxido (DMSO), porém não foram identificados estudos comparativos entre as duas alternativas que permitissem avaliar a superioridade de uma e outra entre si.

A pesquisa clínica com TFD não deve reproduzir a prática clínica rotineira, em que prescinde-se da biópsia para diagnosticar CBC. Os ensaios aqui analisados com hipericina, ALA e MAL demonstraram que a ocorrência de desacordo entre o diagnóstico clínico e o histopatológico pode comprometer a avaliação dos desfechos observados e a conclusão do estudo [82,84,85,88,89]. Cabe destacar que a biópsia guarda limitações técnicas para avaliar lesões primárias e recorrentes de câncer de pele. Roseboom, ao analisar retrospectivamente 243 CBC primários, demonstrou apenas 60,9% de concordância dos resultados de biópsia com a histopatologia das peças cirúrgicas, e concluiu que a biópsia pode prever o CBC agressivo apenas em 84,4% dos casos.

A entrega adequada de radiação luminosa é um fator limitante para o tratamento de lesões malignas por TFD. Estudos mostraram que, em condições normais, a luz não penetra mais de 3 mm de profundidade. A intensidade luminosa, a polarização, a coerência e a reflexão que interagem com os tecidos tumorais e normais são fenômenos físicos e biológicos que influenciam a trajetória do feixe de luz no tecido [95]. O desenvolvimento de lasers com a capacidade de interagir otimamente com o pico de absorção específico do FS aumentou em muito a eficácia da TFD no tratamento do câncer de pele, ainda quando aplicada a tumores profundos, que exigem o uso de FS com uma absorção máxima de cerca de 700 nm.

Estudos compararam a eficácia de lasers pulsados (PL) e lasers de onda contínua e mostraram a superioridade dos primeiros para aumentar a eficiência da TFD. Em teoria, os PL permitiriam a reoxigenação do tecido irradiado e melhor dinâmica na produção de ROS, modulando os efeitos citocitotóxicos. Entretanto, concentrações altas de FS podem, paradoxalmente, reduzir a penetração da energia luminosa devido a ampliação do fenômeno de photobleaching e self-shielding (autoblindagem), este último observado principalmente entre fotossensibilizantes que requerem comprimentos de onda elevados para funcionalização, como é o caso das ftalocianinas. Ao absorver intensamente a radiação luminosa, a molécula de FS sobre a superfície da lesão seria autodestruída, mas também diminuiria o coeficiente de penetração da radiação às camadas mais profundas do tecido, comprometendo assim a funcionalidade das moléculas que escapassem ao processo [96].

A dor representa um sintoma freqüente na realização de TFD, aumentando na razão direta do número de sessões realizadas. Tem sido relatada tanto no tratamento de lesões neoplásicas, quanto em ceratose actínica, acne, verruca vulgaris e psoríase. Os mecanismos de sua fisiopatologia não são ainda completamente conhecidos. Por sua vez, o tipo de fotossensibilizador utilizado desempenha papel importante na fisiopatologia álgica. A maior ou menor seletividade da droga para células anormais e para terminações nervosas são questionadas para explicar as diferenças de freqüência do sintoma dor em TFD mediadas por MAL (menos dolorosa) e ALA (mais dolorosa).

No estudo da sintomatologia álgica relacionada a TFD, cabe destacar a importância da extensão e do sítio da lesão. Localizações em regiões com rica inervação, tais como cabeça, mãos e períneo estão associadas a queixas dolorosas intensas. Metade das lesões incluídas neste estudo estavam localizadas na região nasal e não estiveram associadas a eritema ou dor importante, ainda que tivessem dimensões pequenas. Considerando que a dor tem por causa primeira a ativação do fotossensibilizador pela luz no tecido alvo, sua ausência sugere baixa absorção transcutânea e efeito subclínico em decorrência de geração insuficiente de O₂ singlete nas células neoplásicas [98;99].

Aspecto importante a ser destacado na avaliação da queixa dolorosa e sua correlação com a absorção transcutânea da AICIFc-N, é o fato de dois dos pacientes apresentarem peles tipo 1 e 2 e um terceiro ser acometido de albinismo. Tratam-se de peles que possuem baixa quantidade de melanina e, conseqüentemente, menor resistência à penetração luminosa, o que possibilitaria otimização do efeito fotoativador sobre a AICIFc. Esses achados não opõem-se à conclusão do estudo prospectivo com 104 pacientes, conduzido por ARITZ e cols, em que ficou demonstrado que o tipo de pele 1 e 2 na classificação de Fitzpatrick constituiu a única variável preditiva independente para queixa dolorosa na coorte estudada. Nesse sentido seria esperado maior freqüência de queixas dolorosas entre os pacientes incluídos na TFD mediada por nanoemulsão de AICIFc, o que não veio a ocorrer.

Outros fatores que possuem relação com a dor são a dose total de radiação (J/cm^2) e a fluência ou irradiância (MW/cm^2). Estudos na literatura demonstram que existe relação entre esses fatores e a intensidade dolorosa experimentada pelos pacientes submetidos a TFD. Com respeito a fonte de luz e o comprimento de onda, a revisão de ensaios clínicos demonstra dados conflitantes, que não permitem assegurar correlação exata entre essas variáveis e a sintomatologia dolorosa.

No desenho original do ensaio fora previsto a quantificação de mediadores químicos da apoptose e da inflamação. Contudo, diante de evidência clínica e histopatológica de não remissão tumoral após a aplicação de TFD, o que impôs a suspensão do ensaio por critérios éticos, esses testes de laboratório não foram realizados.

O acompanhamento de ensaios clínicos com TFD aplicada ao CBC deve ser de até 3 anos para monitorar a maior freqüência de recorrências da doença nesse intervalo. A literatura demonstra que o tempo para monitorar as lesões e recorrências tratadas com TFD precisa receber mais atenção, de modo que se tenha uma avaliação precisa da efetividade real desse tratamento. Os motivos da recorrência apontam para a persistência de microtumores resistentes, que escapam dos efeitos fototóxicos do tratamento. Estudos pré-clínicos têm procurado investigar o papel da autofagia na resistência tumoral a TFD, bem como a participação de possíveis células tronco neoplásicas

como matriz imortal de persistência tumoral. Os resultados alcançados, contudo, ainda não possuem robustez clínica que permita alterar os protocolos terapêuticos voltados para o tratamento do câncer de pele.

Os achados histopatológicos observados sete dias após a administração da TFD + AICIFc-N indicam a baixa absorção do fotossensibilizador após uma hora de curativo oclusivo e sessão única com irradiação por quinze minutos, comprometendo assim a efetividade terapêutica da TFD mediada pela AICIFc em CBC e determinando a suspensão do ensaio pelos pesquisadores.

Sabe-se que os efeitos da TFD são tempo e dose de FS dependentes, mas os efeitos são observáveis em cerca de 15 minutos após a exposição luminosa, demonstrados com a identificação de apoptose em queratinócitos, e posteriormente, em até 96 horas, pelo surgimento de infiltrado inflamatório com formas dominantes de polimorfonucleares (linfócitos e macrófagos), em decorrência do aumento de fatores quimiotáticos locais, tais como a maior expressão de interleucina 8 (IL-8), de fator de crescimento fibroblástico, do fator de crescimento vascular endotelial e do fator estimulante de colônia granulócito – monocitária [62, 71, 74]. Adicionalmente, além dos efeitos citotóxicos produzidos nas células neoplásicas, outros constituintes do estroma peritumoral, representados por fibroblastos e macrófagos relacionados com a expressão de metaloproteases e dos fatores de crescimento endotelial e de necrose tumoral são afetados pelo efeito fotodinâmico [73].

Esses achados estiveram parcialmente presentes em apenas um caso tratado, no qual não foi identificado tumor após TFD mediada por AICIFc-N , tanto no diagnóstico preliminar quanto na revisão. Nos demais pacientes não houve modificação do quadro histopatológico observado inicialmente (Figuras 8,9 e 10).

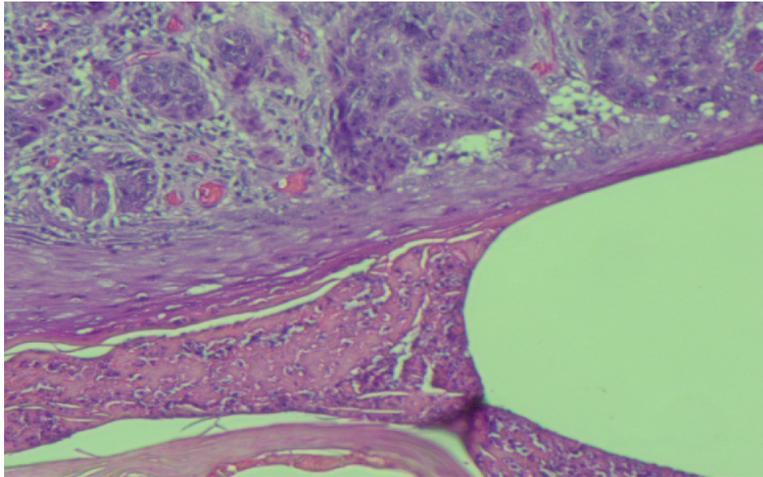


Figura 8. Histopatologia pós TFD + AICIFc-N, 10 μ M, corado por hematoxilina eosina (aumento 10 x). Carcinoma Basocelular Superficial confirmado na revisão da lâmina. Observa-se infiltrado monocitário, com epiderme e estrato córneo adelgaçados.

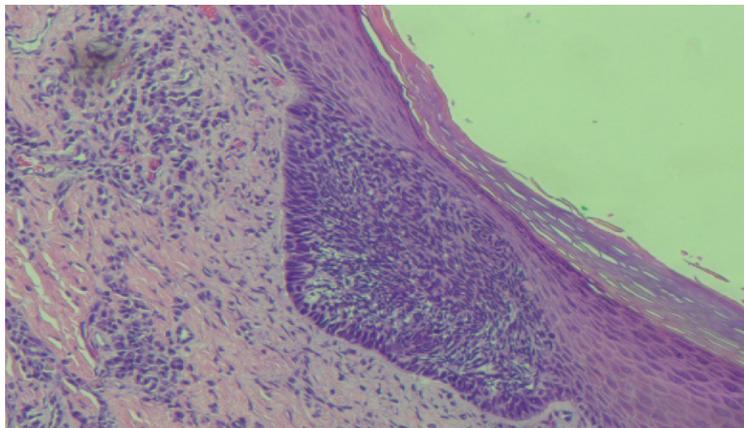


Figura 9. Histopatologia pós TFD + AICIFc-N, 10 μ M, corado por hematoxilina eosina (aumento 10 x). Carcinoma Basocelular Superficial confirmado em revisão de lâmina. Presença de infiltrado monocitário, com estrato córneo adelgaçados.

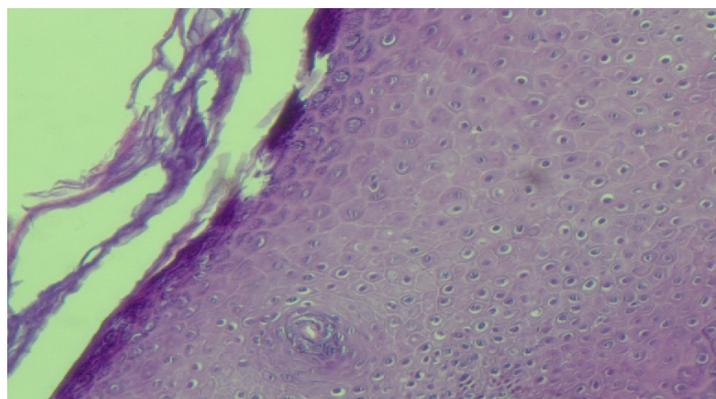


Figura 10. Histopatologia pós TFD + AICIFc-N, 10 μ M, corado por hematoxilina eosina (aumento 10 x). Carcinoma Basocelular Superficial. Presença de infiltrado inflamatório predominantemente monocitário e estrato córneo adelgaçado.

7. CONCLUSÃO

O presente ensaio teve por objetivo avaliar a resposta terapêutica do CBCS a TFD combinada a AICIFc-N. Durante a condução do ensaio observou-se sinais de inefetividade da ftalocianina em nanoemulsão, demonstrada em correlação clínica-histopatológica de não remissão tumoral. No contexto da reavaliação da pesquisa procedeu-se a revisão de ensaios que investigaram a TFD em combinação com diferentes substâncias fotossensibilizantes, com o fim de identificar inconsistências metodológicas e desfechos que permitissem melhor avaliar os desfechos do presente estudo. Entre as possíveis causas para o baixo rendimento terapêutico da TFD mediada pela AICIFc-N, observado no presente ensaio, destacam-se a realização de sessão única de aplicação do tratamento e a possível retenção do FS na camada córnea da pele, o que pode ter levado a doses teciduais subclínicas e à correspondente falha terapêutica histologicamente documentada. Recomenda-se para o prosseguimento da pesquisa o aumento do número de sessões de TFD, a revisão da formulação no que respeita a inclusão de substâncias promotoras da permeação e o aumento das doses de AICIFc.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 810:120-40.
2. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *British Journal of Dermatology.* 2012;166 (5):1069-1080.
3. D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol Sci.* 2013; 14,: 12222 - 12248.
4. Griffin LL, Ali FR, Lear JT. Non-melanoma skin cancer. *Clin Med (Lond).* 2016; 16(1): 62-5.
5. Apalla Z, Nashan D, Weller RB, Castellsagué X. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis and Therapeutic Approaches. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2017; 7(1): 5-19.
6. Ghandi SA, Kampp S. Skin câncer epidemiology, detection and management. *Med Clin N AM.* 2015; 99: 1323-1335.
7. Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/ Estimate 2016: Câncer Incidence in Brazil. 1^a Ed. Rio de Janeiro: INCA; 2015.
8. Karagas MR, Zens MS, Li Z *et al.* Early-Onset Basal Cell Carcinoma and Indoor Tanning: A Population-Based Study. *Pediatrics.* 2014;134(1): 4-12.
9. Wei Q, Matanoski G, Farmer ER, Hedayati MA, Grossman L. **DNA repair and aging in basal cell carcinoma: a molecular epidemiology study.** *PNAS.* 1993; 90 (4): 1614-1618.
10. Weinberg RA. *The Biology of Câncer.* 2nd Ed. New York: Garland Science; 2014.
11. Syed DN, Lall RK, Mukhtar H. MicroRNAs and photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 2015; 91(1):173-87.
12. Holíková Z, Massi D, Lotti T, Hercogová J. MicroRNAs and photocarcinogenesis. *International Journal of Dermatology.* 2004; 43: 865–869.
13. Mi-Yeon K, Park HJ, Baek SC *et al.* Mutations of the *p53* and *PTCH* gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias. *Journal of Dermatological Science.* 2002; 29 (1): 1 – 9.

14. Rass K, Reichrath J. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008; 624:162-178.
15. Tovo LFR *et al.* Carcinoma Basocelular IN Projeto Diretrizes. [Internet]. São Paulo: Associação Médica Brasileira, Conselho Federal de Medicina, Sociedade Brasileira de Dermatologia; 2002. [citado em 20 de Marco de 2016]. Disponível em: http://www.projetodiretrizes.org.br/novas_diretrizes_sociedades.php
16. Madan V, Lear JT, Szeimies RM. Non melanoma skin câncer. *The Lancet.* 2010; 375 (9715): 673 – 685.
17. Miller SJ. Biology of basal cell carcinoma (Part I). *Journal of the American Academy of Dermatology.* 1991; 24 (1):1-13.
18. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Modern Pathology.* 2006; 19: 127-147.
19. Chinem VP, Miot HA. Epidemiology of basal cell carcinoma. *An Bras Dermatol.* 2011; 86(2): 292-305.
20. McCusker M, Basset-Seguín N, Dummer R *et al.* Metastatic basal cell carcinoma: Prognosis dependent on anatomic site and spread of disease. *European Journal of Cancer.* 2014; 50: 774–783.
21. Trakatelli M, Morton C, Nagore E. Update of the European guidelines for basal cell carcinoma management. *Eur J Dermatol.* 2014; 24(3):312-29.
21. Dianzani C, Zara GP, Maina G, Pettazoni P *et al.* Drug delivery nanoparticles in skin cancer. *Biomed Res Int.* 2014; 1: 1 -13.
22. Botto N, Rogers G. Nontraditional management of basal cell carcinoma. *J Drugs Dermatol.* 2013; 12 (5): 525-533.
23. Wan MT, Jennifer YL. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology.* 2014; 7: 145-163.
24. Willens E, Den Wildenberg V. NanoRoadMap: Work document on Nanomaterials. España: W&W; 2004.

25. Nyman E, Hynninen P. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*. 2004; 73: 1-28
26. Yano S; Hirohara S; Obata M; Hagiya Y *et al*. Current states and future views in photodynamic therapy. *J. Photochem Photobiol C: Photochemistry Reviews*. 2011; 12: 46-47.
27. Phillips D. Light relief: photochemistry and medicine. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2010; 9 (12): 1589-1596.
28. Allison R, Downie G, Cuenca R, Hu X, Childs C, Sibata C. Photosensitizers in clinical TFD. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004; 1: 27-42.
29. Maftoum-Costa M, Naves K, Oliveira A, Tedesco A, Silva N, Pacheco-Soares C. Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after TFD with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells. *Cell Biology International*. 2008; 32:1024-1028.
30. Gupta S, Dwarakanath BS, Chaudhury NK, Mishra AK, Muralidhar K, Janin V. In vitro and in vivo targeted delivery of photosensitizers to the tumor cells for enhanced photodynamics effects. *Journal of Câncer Research and Therapeutics*. 2011; 7(3): 314-324.
31. Bauer, L. A. *Applied Clinical Pharmacokinetics*. 2nd ed. USA: McGraw Hill Medical; 2008.
32. Gloi AM, Beck E. Biodistribution of three photosensitizers in dogs with spontaneous tumors. *Veterinary Therapeutics*. 2003; 2 (4): 155 -165.
33. Kyriazi M, Alexandratou E, Yova D, Rallis M, Trebst T. Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2008; 24(2): 87-94.

34. Tapajós EC, Longo JP, Simioni AR, Laçava ZGM, Santos MFMA, Morais PC, Tedesco AC e Azevedo RB. In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine. *Oral Oncol.* 2008; 44 (11): 1073-1079.
35. Longo JP, Lozzi SP, Simioni AR, Morais PC, Tedesco AC, Azevedo RB. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 94 (2): p. 143-146.
36. Muehlmann LA, Joanitti GA, Silva JR, Longo JPF, Azevedo RB. Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2011; (44): 729-737.
37. Longo JP, Lozzi S, Simioni A, Morais P, Tedesco A ; Azevedo RB. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. *Journal of Photochemistry and Photobiology.* 2009; 94: 143-146.
38. Longo JPF, Muehlmann LA, Velloso NV, Simioni AR, Lozzi SP, Cavalcanti CEO, Tedesco AC e Azevedo RB. Effects of Photodynamic Therapy Mediated by Liposomal Aluminumphthalocyanine Chloride on Chemically Induced Tongue Tumors. *Chemotherapy,* 2012; 1:1-4.
39. Albuquerque, I. Citotoxicidade in Vitro da Terapia Fotodinâmica com Alumínio-Cloro-Ftalocianina Lipossomal em Melanoma Murino (B16F10). [Dissertação]. Universidade de Brasília: Instituto de Ciências da Saúde; 2008.
40. Muehlmann, L. A. Cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas de poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico) como potencial fotossensibilizante de terceira geração para terapia fotodinâmica antineoplásica [Tese]. Universidade de Brasília: Instituto de Ciências da Saúde; 2011.
41. Rocha MST, Lucci CM, Longo JPF, Galera PD, Simione AR, Laçava ZGM, Tedesco AG, Azevedo RB. Aluminum-chloride-phthalocyanine encapsulated in liposomes: activity against naturally occurring dog breast cancer cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology,* 2012; 8: 1-7.

42. Passos SK. Terapia fotodinâmica com ácido 5-amino-levulínico em nanoemulsão no tratamento de queratoses actínicas e câncer de pele não melanoma: estudo clínico. [Tese] Universidade de Brasília: Instituto de Biologia; 2012.
43. Silva ARA. Estudos fitofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexos de ftalocianina de cloro-alumínio e indocianina verde em lipossomas. [Tese]. Universidade de São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. São Paulo; 2010.
44. Muehlmann LA , Azevedo RB. On How Could Light and Nanostructures Lead the Way to a Safer Anticancer Therapy. *Chemotherapy*. 2012;1:1-1.
45. Ozolins M, Williams HC, Armstrong SJ, Bath-Hextall F. The SINS Trial: A randomised controlled Trial of excisional surgery versus imiquimod 5% cream for nodular and superficial basal cell carcinoma. *Trials*. 2010; 11:42.
46. Szeimies RM, Ibbotson S, Murrell DF, Rubel D *et al*. A Clinical Study comparing methyl aminolevulinate photodynamic therapy and surgery in small superficial basal cell carcinoma (8-20 mm), with a 12 month *follow up*. *Journ European Acad Dermatology Venereology*. 2008; 22: 1302 -1311.
47. Baron ED, Malbasa CL, Santo-Domingo D, Fu P *et al*. Silicon Phthalocyanine (Pc4) Photodynamic therapy is a safe modality for cutaneous neoplasms: Results of a Phase 1 Clinical Trial. *Lasers Surg Med*. 2010; 42 (910): 728-735.
48. Ericson MB, Wenberg AM e Larcö O. Review of photodynamic therapy in actinic kaeratoses and basalcell carcinoma. *Therapeutic and Clinical Risk Management*. 2008; 4 (1): 1-9.
49. Braathen LR, Szeimies RM, Basset-Seguín N, Bissonnette R *et al*. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin câncer: An international consensus. *J AM Acad Dermatol*. 2007; 56:125-43.
50. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH *et al*. Photodynamic Therapy of Câncer: An Update. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61: 250-281.

51. Canadá. University of Alberta. School of Public Health. Photodynamic Therapy for Skin Cancer & Pre-cancerous Skin Conditions. Final STE (Short Term Expert) Report. 2011: 1 -167.
52. HOPPER C e cols. The cost-effectiveness of Foscan mediated photodynamic therapy (Foscan-TFD) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK. *Oral Oncol.* 2004; 40: 372–382.
53. KUBLER A e col. Analysis of cost effectiveness of photodynamic therapy with Foscan (Foscan-TFD) in comparison with palliative chemotherapy in patients with advanced head-neck tumors in Germany]. *Laryngorhinootologie.* 2005; 84: 725–732.
54. Hur C, Nishioka NS, Gazelle GS. Cost-effectiveness of photodynamic therapy for treatment of Barrett's esophagus with high grade dysplasia. *Dig Dis Sci.* 2003; 48:1273–1283.
55. AGUILAR M e cols. A cost analysis of photodynamic therapy with methyl aminolevulinate and imiquimod compared with conventional surgery for the treatment of superficial basal cell carcinoma and Bowen's disease of the lower extremities. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2010, 24: 1431–1436.
56. Dolmans D, Fukuma D and Jain R. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2003; 3: 380-387.
57. Robertson CA, Evans DH and Abrahamse H. Photodynamic therapy (TFD): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for TFD. *J Phtochem Photobiol B.* 2009; 96 (1): 1-8.
58. Plaetzer K, Krammer Berlanda J, Berr F and Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in Medical Science.* 2009; 24: 259-268.
59. Gupta S *et al.* In vitro and in vivo targeted delivery of photosensitizers to the tumor cells for enhanced photodynamics effects. *Journal of Cancer Research and Therapeutics.* 2011; 7(3): 314 - 324.

60. Barreiros LBS, David JM. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova.* 2006; 29 (1): 113-123.
61. Kessel D, Reiners Jr J. Light-Activated Pharmaceuticals: Mechanisms and Detection. *Isr J Chem.* 2012; 52 (8-9): 674 – 680.
62. Spring BQ, Rizvi I, Xu N and Hasan Tayyaba. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. *Photochem Photobiol Sci.* 2015; 14: 1476–1491.
63. Garg AD, Maes H, Romano E and Agostinis P. Autophagy, a major adaptation pathway shaping cancer cell death and anticancer immunity responses following photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015; 14: 1410–1424.
64. Muehlmann LA, Rodrigues MC, Longo JPF, Garcia MP *et al.* Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and *in vitro* activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. *Journal of Nanobiotechnology.* (2015); 13(36): 1 – 11.
65. Mathieu MP. *Good Clinical Practice: A Question & Answer Reference Guide.* 1st ed. USA: Barnett Education Services; 2010.
66. Portney LG, Watkins MP. *Foundations of Clinical Research: Applications to Practice.* 3rd ed. New Jersey: Pearson-Prentice Hall;2009.
67. Ivy SP, Siu LL, Garrett-Mayer E, Rubinstein L. Approaches to phase 1 clinical trial design focused on safety, efficiency, and selected patient populations: A report from the clinical trial design task force of the National Cancer Institute Investigational Drug Steering Committee. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 1726-1736.
68. BAUER, L. A. *Applied Clinical Pharmacokinetics.* 2nd ed. New York: McGraw Hill Medical; 2008.
69. Stone J. *Conducting Clinical Research: A Practical Guide For Physicians, Nurses, Study Coordinators And Investigators.* 2nd ed. Cumberland: Mountainside MD Press; 2010.

70. Olson EM, Lin NU, Krop IE, Winer EP. The ethical use of mandatory research biopsies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8: 620-625.
71. Tilli CMLJ, Van Steensel MAM, Krekels GAM, Neumann HAM, Ramaekers FGS. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2005; 152(6): 1108 - 1124.
72. Mfouo-Tynga AH. Cell death pathways and phtalocyanine as an efficient agenta for photodynamic therapy. *Int J Molecular Sci*. 2015; 16 (5): 10228-10241.
73. Erb P, Jingmin J, Kump E *et al*. Apoptosis and pathogenesis of melanoma and non melanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 624: 283-295.
74. Son KD, Kim TJ, Lee YS, Park GS *et al*. Comparative analisis of immunohisochemical markers with evasiveness and histologic differentiation in squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma of the skin. *J Surg Oncol*. 2008; 97: 615-620.
75. Gonzáles S. Swindells K, Rajadhyksha M, Torres A. Changing paradigms in Dermatology: Confocal microscopy in clinical and surgical Dermatology. *Clinics in Dermatology*. 2003; 21: 359 – 369.
76. Rozeboom MH, Arits AHMM, Mosterd K, Sommer A, Essers BAB *et all*. Three-year follow-up results of photodynamic therapy vs. imiquimod vs. fluorouracil for treatment of superficial basal cell carcinoma: a single blind, noninferiority, randomized Controlled Trial. *Journal of Investigative Dermatology*. 2016; 136: 1568 – 1574.
77. Kaviani A, Ataie-Fashtami L, Fateh M, Sheikhabaee N, Ghodsi M *et all*. Photodynamic therapy of head and neck basal cell carcinoma according to different clinicopathologic features. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2005; 36: 377–382.
78. Oseroff AR, Blumenson LR, Wilson D, Mang TS and Bellnier DA. A dose ranging study of photodynamic therapy with porfimer sodium (Photofrin®) for treatment of basal cell carcinoma. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2006; 38: 417–426.

79. Betz CS, Rayschning W, Stranadko EP, Riabov MV, Albrecht V *et al.* Optimization of treatment parameters for Foscan®-TFD of basal cell carcinomas. *Lasers Surg Med.* 2008; 40(5): 300 -11.
80. Betz CS, Rauschning W, Stranadko EP, Riabov MV, Volgin VN *et al.* Long-term outcomes following Foscan®-TFD of basal cell carcinomas. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2012; 44:533–540.
81. Chan, AL, Juarez MJ, Allen R, Volz W, Albertson T. Pharmacokinetics and clinical effects of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) photodynamic therapy in adult patients with primary or secondary cancer of the skin and mucosal surfaces. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2005; 21: 72–78.
82. Kacerovska D, Pizinger K, Majers F and Smid F. Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical *Hypericum perforatum* extract — A pilot study. *Photochemistry and Photobiology.* 2008; 84: 779–785.
83. Baron ED, Malbasa CL, Santo-Domingo D, Fu P, Miller JD *et al.* Silicon phthalocyanine (Pc 4) photodynamic therapy is a safe modality for cutaneous neoplasms: results of a phase 1 clinical trial. *Lasers Surg Med.* 2010; 42(10): 728–735.
84. Cristensen E, Skogvoll E, Viset T, Warloe T and Sundstrøm S. Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid, dimethylsulfoxide and curettage in basal cell carcinoma: a 6-year clinical and histological follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009; 23: 58–66.
85. Christensen E, Mørk C and Skogvoll E. High and sustained efficacy after two sessions of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for basal cell carcinoma: a prospective, clinical and histological 10-year follow-up study. *Br J Dermatol.* 2012; 166: 1342–1348.
86. Vijlder HC, Seterenborg HJCM, Neumann HAM, Robinson DJ and Haas ERM. Light fractionation significantly improves the response of superficial basal cell carcinoma to aminolaevulinic acid photodynamic therapy: five-year follow-up of a randomized, prospective Trial. *Acta Derm Venereol.* 2012; 92: 641–647.

87. Tedesco AC, Primo FL and Beltrame M. Phtalocyanines: synthesis, characterization and biological applications of photodynamic therapy (TFD), nanobiotechnology, magnetohypertermia and photodiagnosis (theranostics). Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. 2016; current as of 25 July 2016: p 1-6.
88. Baron ED, Malbasa CL, Santo-Domingo D, Fu P, Miller JD *et al*. Silicon phthalocyanine (Pc 4) photodynamic therapy is a safe modality for cutaneous neoplasms: results of a phase 1 clinical trial. *Lasers Surg Med*. 2010; 42(10): 728–735.
89. Szeimies RM, Ibbotson S, Murell DF, Rubel D, Frambach Y *et al*. A clinical study comparing methyl aminolevulinate photodynamic therapy and surgery in small superficial basal cell carcinoma (8–20 mm), with a 12-month follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008; 22:1302–1311.
90. Mallidi S, Anbil S, Bulin AL, Obaid G, Ichikawa M and Hasan T. Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy. *Theranostics*. 2016; 6 (13): 2458-2487.
91. Rossetti FC, Lopes LB, Carollo AR, Thomazini JA, Tedesco AC, Bentley MV. A delivery system to avoid self-aggregation and improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *J Control Release*. 2011; 155 (3): 400-408.
92. Broekgaarden M, Kroon AL, Gulik TM, Heger M. Development and in vitro proof of concept of interstitially targeted zinc-phthalocyanine liposomes for photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2016; 13: 148-157.
93. LA Muehlmann, BC Ma, JPF Longo, MFMA Santos, RB Azevedo. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2014; 9: 1199 -1213.
94. Ospina VE, Mantilla JC, Conde CA, Escobar P. Permeación en piel humana de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada para la optimización de tratamientos tópicos de leishmaniasis cutánea. *Rev Cienc Salud*. 2014;12(2):195-211.

95. Zhou Z, Song J, Nie L and Chen X. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. *Chem. Soc. Rev.* 2016; 45: 6597 -6626.
96. Mallidi S, Anbil S, Bulin AL, Obaid G, Ichikawa M and Hasan T. Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy. *Theranostics.* 2016; 6 (13): 2458-2487.
97. Wang H, Xu Y, Shi J, Gao X and Geng L. Photodynamic therapy in the treatment of basal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2015; 31: 44–5398.
98. Arits AH, Van de Weert MM, Nelemans PJ, Kelleners-Smeets NW. Pain during topical photodynamic therapy: uncomfortable and unpredictable. *J Eur Acad Dermatol Venerol.* 2010; 24 (12): 1452 -1457.
99. Chaves YN, Torezan LA, Niwa ABM, Sanches Junior JA, Festa Neto C. Pain in photodynamic therapy: mechanism of action and management strategies. *An Bras Dermatol.* 2012; 87 (4): 521 – 529.
100. Abd E, Yousef SA, Pastore MN, Telaprolu K *et al.* Skin models for the testing of transdermal drugs *Clinical Pharmacology: Advances and Applications.* 2016; 8:163–176.
101. Miller JC, Miller JN. *Statistics for Analytical Chemistry.* 2nd ed. New York: Wiley; 1988.
102. D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences.* 2013;14(6):12222-12248.

APÊNDICES

APÊNDICE A – PROTOCOLO DE PESQUISA

Ensaio Clínico Fase II para Avaliação da Segurança e Eficácia da Terapia Fotodinâmica Mediada por Nanoemulsão de Al-CI-Ftalocianina em Relação ao Tratamento Cirúrgico do Carcinoma Basocelular Superficial.

Versão aprovada pelo CEP-UNB

Investigador principal: Biólogo Ricardo Bentes de Azevedo (Doutor em Biologia Celular e Tecidual; professor titular do Instituto de Biologia/UNB).

Investigador adjunto: João Paulo Longo (Odontólogo, Mestre em Patologia Molecular, Doutor em Biologia Animal, Professor Adjunto do Instituto de Biologia/UNB).

Investigadores clínicos

- a) João Nunes (Médico Especialista em Oncologia Clínica; Oncologista Chefe do Centro de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital da Universidade de Brasília).
- b) Itajaí Oliveira de Albuquerque (Médico Especialista em Clínica Médica, Mestre em Ciências da Saúde; aluno do Curso de Doutorado em Nanociências e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília).

1. INTRODUÇÃO

O principal fator causal relacionado a qualquer tipo de câncer de pele é a exposição à radiação solar ultravioleta (UV). A relação entre a exposição à radiação UV e o surgimento da neoplasia cutânea é complexa e depende tanto de características individuais quanto de fatores ambientais. Considera-se que a exposição excessiva e cumulativa à radiação solar, nas duas primeiras décadas de vida, e particularmente na infância, representa o mais importante fator de risco para o desenvolvimento da doença (INCA, 2006).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (Inca), o câncer de pele constitui a doença maligna mais frequente no Brasil, correspondendo a 25% do total de tumores registrados. Estima-se que surjam em 2012, no país, cerca de 134.170 novos casos, dos quais 62.280 corresponderão a câncer de pele não melanoma. Sob essa denominação clínico-patológica estão agrupados o carcinoma epidermóide e o carcinoma basocelular, ambos apresentando baixa letalidade, reduzido potencial de metástase à distância e bons índices de cura clínica.

Entre os cânceres de pele não-melanoma, cerca de 70% dos diagnósticos correspondem a carcinomas basocelulares, que constituem por essa razão em importante problema de saúde pública. Apesar do carcinoma basocelular ser mais freqüente a partir da quinta década de vida, estudos epidemiológicos têm observado o aumento da incidência no grupo etário entre 30-40 anos de idade, mantendo-se raro na infância e em adolescentes. Cerca de 50% das pessoas tratadas de carcinoma basocelular tem recidiva da doença em cinco anos. Para o tratamento são empregadas a excisão cirúrgica, a curetagem, a eletrocirurgia, a criocirurgia, o laser e mais raramente a radio e a quimioterapia (11).

2. RACIONAL DO ENSAIO CLÍNICO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que envolve a combinação de dois componentes atóxicos: substância fotossensibilizante (FS) e luz em comprimento de onda específico. Uma vez conjugados esses dois elementos, há indução de efeitos tóxicos nos tecidos e células-alvos, a partir da produção em cadeia de espécies reativas moleculares dependentes de oxigênio [ERO] (3;4;33). Os fotossensibilizantes per si são atóxicos e sensíveis à irradiação luminosa, constituindo-se em elementos-chaves para a eficácia/efetividade da Terapia Fotodinâmica, por representarem o substrato molecular que media a transição da energia fotoelétrica para a energia química, reação essencial à geração de espécies reativas de oxigênio (3; 5).

A primeira evidência clínica da eficácia da TFD foi obtida em 1903 por Dreyer, em Copenhague, e Jesionek e Von Tappeiner, em Munique, quando aplicaram eosina ou eritrosina tópica, seguida de exposição à luz, em pacientes portadores de pitíriase versicolor, psoríase, carcinoma basocelular, lúpus vulgar, sífilis, condiloma acuminado e molusco contagioso. Apesar dos pesquisadores terem obtido alguns desfechos clínicos favoráveis, falhas metodológicas dos estudos relativos ao acompanhamento clínico dos pacientes, à inconveniência do uso de radiação UV e a precariedade dos FS disponíveis à época levaram ao abandono das linhas de pesquisa, só retomadas na década de 70, com os estudos com Photophrin® conduzidos por Dougherty e colaboradores.

Esses pontos negativos apresentados pela primeira geração de FS (retenção cutânea e fotossensibilidade prolongada nas áreas tratadas e expostas à luz) conduziram a pesquisas por novas formulações que demonstrassem maior eficiência e segurança, o que originou a segunda geração de fotossensibilizantes. Em geral, os compostos da segunda geração apresentam características mais favoráveis à aplicação na TFD em comparação com aqueles de primeira geração de FS, tais como: elevado rendimento quântico na geração de oxigênio singleto, maior estabilidade química e física, atoxicidade em ausência de luz, alto grau de pureza química e redução de efeitos secundários (6; 7). Algumas das principais classes de FS estudadas com aplicação terapêutica são: texafirinas, clorinas, feoforbídeos, purpurinas, protoporfirinas, derivados de benzoporfirinas e ftalocianinas (8; 7). O desenvolvimento de fotossensibilizantes de terceira geração consiste na conjugação de FS a compostos biologicamente ativos, tais como anticorpos, peptídeos e ácido fólico (7), e mais recentemente, a associação de FS a carreadores nanoestruturados como lipossomos e compostos nanopoliméricos.

As ftalocianinas constituem uma classe de FS amplamente estudada que tem apresentado bons resultados em aplicações na TFD. Derivadas de azoporfirinas, as ftalocianinas possuem alto coeficiente de absorção espectral na faixa de comprimentos de onda longos, entre 650-850 nm (9). Dentre as demais vantagens dos derivados de ftalocianina estão: elevada capacidade de produção de ERO comparadas a outros FS, alto potencial seletivo de agregação a células tumorais e rápida eliminação do organismo.

Entretanto uma das limitações à utilização dos FS, incluídas as ftalocianinas e seus derivados na TFD, deve-se a alta hidrofobicidade, pois apresentam baixa solubilidade em meios fisiológicos hidrofílicos, o que gera dificuldades de transporte através dos sistemas biológicos e eleva drasticamente o seu potencial de agregação (9; 10). Essa propriedade afeta suas propriedades fotofísicas, químicas e biológicas com a consequente redução na formação de ERO, quando as FS são comparadas a outras espécies monoméricas que apresentam propriedades fotoativas ideais (10). É possível, entretanto, melhorar a absorção dos FS por meio de arranjos moleculares na farmacotécnica.

A eficácia das ftalocianinas depende da presença de íon metálico na sua molécula, que influenciam diretamente no chamado rendimento quântico de quando assume o chamado estado triplete ao receber foto-estimulação. Os complexos de ftalocianina de zinco e alumínio apresentam dentre suas características fotoquímicas a meia vida longa nos estados singlete e triplete, o que produz campos quânticos mais altos e maior eficiência de ação nos substratos celulares. Outros ganhos importantes, obtidos pela incorporação de metais à molécula, são o acúmulo seletivo em órgãos e a rápida eliminação após decorridas 24 h de administração da droga. Por outro lado, as nanoemulsões, uma das tecnologias mais promissoras da atualidade, constituem um sistema de entrega que permite melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade de drogas lipofílicas, de forma a permitir que sejam mais facilmente absorvidos e distribuídos nos tecidos, como é o caso da AICIFc.

Estudos de farmacocinética pré-clínicos, em que está incluído um realizado com cães, acometidos de tumores de pele espontâneos, demonstraram alta afinidade e seletividade da AICIFc tópica pelo tecido neoplásico, com meia vida tecidual de 2,6 a 3,34 horas e meia vida de eliminação de 4,3 horas e ausência de evidência de captação por músculos e tecidos são próximos da lesão tratada, o que lhe garante maior segurança no que respeita à possibilidade de efeito adverso de fotossensibilização (41;42).

A Terapia Fotodinâmica utilizando fotossensibilizantes nanoestruturados possui um horizonte tecnológico promissor, com potencial de aplicação amplo em várias especialidades médicas. Estudos realizados desde 2003 no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biologia/ UNB, assim como na rede de pesquisa vinculada ao Instituto Nacional de Nanobiotecnologia (12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22), assim como em outras instituições internacionais de pesquisa (27; 28; 29; 31) têm demonstrado a eficácia da associação da alumínio-cloro-ftalocianina nanoestruturada no tratamento de neoplasias malignas, a exemplo, entre outras patologias, em cânceres cutâneos, de boca e de mama.

Deve-se também ressaltar que a TFD combinada a AICIFc foi também utilizada em ensaios clínicos conduzidos por pesquisadores vinculados ao Laboratório de Nanobiotecnologia/UNB, para o tratamento de cárie dentária e na doença periodontal (10; 20). Atualmente, pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética de Pesquisa da FEPECS (numero do protocolo), que investiga a AICIFc no tratamento da queilite actínica em seres humanos, está em andamento no Hospital Regional da Asa Norte (HRAN), em Brasília-DF.

De um modo geral o uso da TFD no tratamento dessas patologias é considerada um procedimento seguro. Não existem relatos de eventos adversos importantes ou letais. Efeitos adversos relatados em ensaios clínicos com TFD para tratamento de Ceratose Actínica, Carcinoma Basocelular Superficial e Doença de Bowman foram na maioria locais, auto-limitados e em geral descritos como leves a moderados.

Estudos publicados demonstram que sintomas locais, entre 43 e 99% dos pacientes, estão relacionados com dor, eritema e prurido no sítio da lesão tratada. Esses efeitos foram mais frequentes no dia da aplicação do tratamento e raramente se prolongando por uma semana. Descontinuidade do tratamento, por causa de dor local, foram raramente relatados em 43 ensaios clínicos selecionados por revisão sistemática produzida pela Universidade de Alberta (Canadá), para avaliação da segurança do uso terapêutico da TFD e outras variáveis relacionadas ao custo e ao financiamento dessa tecnologia no sistema de saúde daquele país (40). No que respeita a qualidade do resultado estético, dados analisados nessa revisão demonstraram que os desfechos obtidos com o uso da TFD foram consistentemente superiores em relação aos alcançados com outros tratamentos convencionais para tratamento do câncer de pele não-melanoma.

O custo de aquisição da fonte luminosa e da produção dos fotossensibilizadores, assim como a composição do financiamento e a extensa capilaridade do Sistema Único de Saúde apontam para a hipótese de que no Brasil a TFD possui um grande potencial de custo-efetividade na clínica dermatológica, diferenciando-se das conclusões de equivalência econômica com alternativas terapêuticas consagradas que estudos realizados em outros países apontam.

Porém a aplicação da TFD em diferentes patologias (36; 37; 38; 39), em que não poucas vezes estão relacionados diferentes alternativas e protocolos terapêuticos, subgrupos de doenças e diferentes estágios evolutivos de patologia indicam a necessidade da realização de estudos com metodologia mais consistente, que permitam especificidade na avaliação econômica de seus usos e a elaboração de metanálises conclusivas.

A presente proposta de projeto de pesquisa clínica tem por objetivo analisar algumas dessas dimensões do uso da TFD combinada a AICIFc-N no tratamento do carcinoma basocelular superficial, a partir das seguintes evidências disponíveis:

1. A incidência crescente do câncer de pele não-melanoma e, em especial do carcinoma basocelular no mundo e no Brasil, constituindo-se em problema de saúde pública num cenário a curto prazo de envelhecimento populacional, em que a prevalência de doenças neoplásicas é mais expressivo.
2. A segurança e a eficácia terapêutica daquela terapêutica no tratamento dos cânceres não melanoma, em especial da forma superficial do carcinoma basocelular, conforme demonstrado em ensaios clínicos publicados na literatura médica internacional.
3. A disponibilidade no Brasil de informações pré-clínicas (in vitro e in vivo), produzidas por grupos de pesquisa vinculados a Rede Nano do Instituto Nacional de Nanotecnologia, no Instituto de Biologia da UNB e na literatura internacional, que demonstram eficácia e a segurança da AICIFc no tratamento de neoplasias de boca, mama e pele, com farmacocinética e citotoxicidade bem estabelecidas para esse fotossensibilizador.
4. A escassez de estudos na literatura internacional e brasileira de estudos que comparem a TFD com o procedimento cirúrgico no tratamento do carcinoma basocelular.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Este projeto de ensaio clínico prospectivo, aberto, randomizado e paralelo tem por objetivo:

a) avaliação da segurança e eficácia da TFD + AICIFc-N no tratamento do carcinoma basocelular superficial, quando comparada ao tratamento cirúrgico convencional, durante 5 anos de *follow up*.

2.2. ESPECÍFICOS

- Definição da melhor dose/resposta, considerando concentrações de 2,5; 5 e 10 μM .

- Identificar efeitos adversos do tratamento relacionados à toxicidade.

3. Metodologia

3.1. NANOEMULSÃO CONTENDO DE ALUMÍNIO-CLORO FTALOCIANINA

Uma nanoemulsão óleo em água, que tem como disperso o fotossensibilizador Alumínio-Cloro Ftalocianina (AICIPc [chloro (29H,31H-phthalocyaninato) aluminum] Sigma [Sigma–Aldrich Co. St. Louis, MO, USA.]), será produzida, de acordo com as boas práticas de manipulação farmacêutica, junto ao laboratório farmacêutico do CACON. Estudos prévios (dados não publicados) do Instituto de Biologia demonstraram a estabilidade estrutural e físico-química da referida formulação por um período de 180 dias, mesmo quando submetida a condições de estresse térmico (37^oC). Além disso, estudos de citotoxicidade em modelos de culturas celulares, conduzidos no centro de pesquisa citado, demonstraram que a formulação é citocompatível nas concentrações de até 10µM de AICIFt. Para este ensaio clínico serão utilizadas as concentrações de 2,5; 5 e 10µM do fotossensibilizador.

As amostras serão produzidas de acordo com o método desenvolvido por Muehlmann (17) no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, em que as principais características físico-químicas (diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, carga de ftalocianina/polímero) do AICIFc-N serão determinadas.

No ensaio clínico com Terapia Fotodinâmica associada a nanoemulsão de AICIFC será utilizado sempre o mesmo lote da formulação, sendo este produzido imediatamente antes do início da intervenção terapêutica. A avaliação da estabilidade da emulsão de AICIFc-N será monitorada por meio de avaliações de estabilidade das propriedades fotofísicas, da capacidade de geração de espécies reativas de Oxigênio e da estabilidade das propriedades nanoscópicas da amostra de acordo com o protocolo.

3.2. ENSAIO CLÍNICO

O estudo será realizado em acordo com a Declaração de Helsinki e com as Diretrizes de Boas Práticas de Pesquisa Clínica (19) vigentes. O início da pesquisa está condicionado à aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de Brasília (CEP/HUNB).

Seguida à aprovação do projeto pelo CEP/HUNB, o projeto de pesquisa será explicado aos pacientes selecionados, que, individualmente, e no caso de concordarem participar do projeto, deverão assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Após aprovação no CEP-HUNB, o protocolo também será incluído e periodicamente atualizado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos – REBEC (<http://www.ensaiosclinicos.gov.br/>), para cumprir com os requisitos para publicação em periódicos indexados e de impacto científico reconhecido.

A etapa clínica da pesquisa será realizada nas dependências do Centro de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital da Universidade de Brasília (Cacon/HUNB). A etapa analítica será realizada nos laboratórios de análise clínica e de histopatologia do HUNB e do Instituto de Biologia (IB/UNB). A etapa estatística será realizada na unidade de pesquisa clínica do Cacon/HUNB.

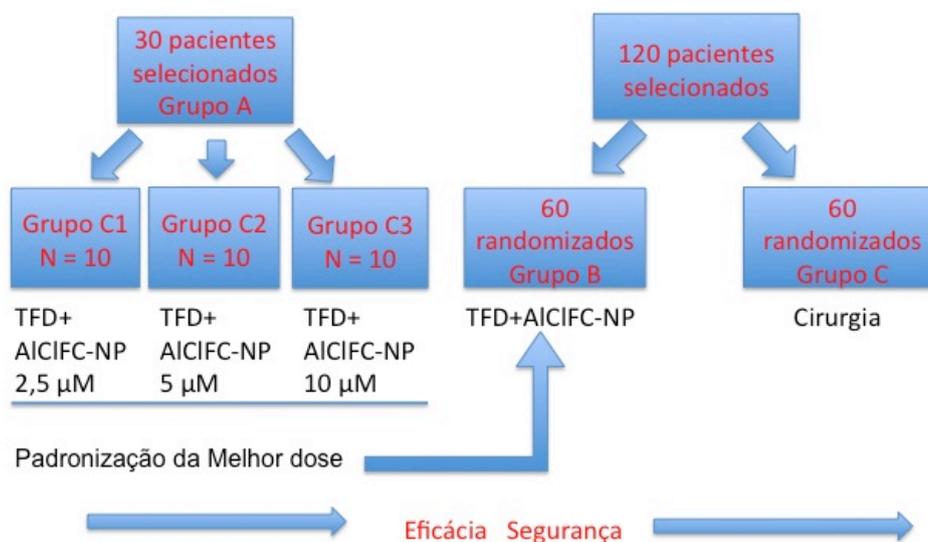
Os responsáveis por esse projeto declaram que não possuem conflitos de interesse para conduzir, analisar e elaborar conclusões sobre os resultados decorrentes do estudo clínico proposto.

3.2.1. DESENHO DO ENSAIO (18; 20; 21; 22; 23; 24; 34; 35)

Trata-se de estudo clínico fase 2, aberto, não randomizado, escalonado, que tem por objetivo avaliar a eficácia e a segurança do tratamento do carcinoma basocelular superficial (8 a 10 mm), com base na aplicação tópica de AICIFc-NP combinada à terapia fotodinâmica, em comparação com o tratamento cirúrgico convencional. Nos dois braços da pesquisa serão selecionados o total de 150 indivíduos de pele clara, sem distinção de sexo, mas distribuídos igualmente entre três grupos de tratamento, todos maiores de 30 anos, com diagnóstico clínico e anatomo-patológico de carcinoma basocelular superficial. Os voluntários selecionados serão distribuídos em dois braços: no primeiro braço (Grupo A), serão alocados trinta pacientes, distribuídos em três sub-grupos (A1, A2 e A3) em que serão avaliadas a segurança e a eficácia de três concentrações pré-determinadas de AICIFc-N combinadas à TFD, buscando-se padronizar aquela que apresenta melhor dose/resposta; no segundo braço serão distribuídos igualmente em dois grupos 120 indivíduos para a avaliação da segurança e da eficácia da TFD + AICIFc-N (Grupo B: 60 pacientes) em relação ao tratamento cirúrgico convencional (Grupo C: 60 pacientes). No Grupo B será utilizada a concentração de AICIFc-N padronizada como de melhor dose/resposta no estudo conduzido com o Grupo A. No Grupo C, onde serão alocados os pacientes que serão tratados por cirurgia, também será estudada a distribuição da AICIFc-N nos estratos cutâneos, sem que haja combinação com a TFD (Figura 1), mas utilizando a concentração padronizada antes referida.

Figura1.

Ensaio Clínico para Avaliação da Segurança e Eficácia da Terapia Fotodinâmica Mediada por Nanoemulsão de Al-CI-Ftalocianina em Relação ao Tratamento Cirúrgico do Carcinoma Basocelular Superficial.



3.2.2. CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE PARA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

Serão elegíveis 150 indivíduos maiores de 30 anos, de pele clara, sem distinção de sexo, com diagnóstico clínico e anátomo-patológico de carcinoma basocelular superficial, não pigmentado, sem evidência de agressividade (subtipos basoescamoso e infiltrativo) e virgens de tratamento. A biópsia para histopatologia adotará método do tipo *punch*. O tratamento com TFD + AICIFc-ND será iniciado 15 dias após a avaliação clínica-laboratorial. Os sujeitos de pesquisa serão acompanhados por cinco anos no Centro de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital da Universidade de Brasília (Cacon /HUNB).

3.2.3. AVALIAÇÃO CLÍNICA PRÉ-TRATAMENTO E REGISTROS DE EVOLUÇÃO

Constará de consulta clínica individual, constituída de anamnese e exame físico completos em que constarão dados relativos a localização, tipo e dimensões da lesão de pele, agendamento de biópsias, intercorrências durante a aplicação da TFD + AICIFc-Nd, evolução clínica, desfechos de pesquisa, condições de alta e documentação fotográfica pré, per e pós tratamento.

3.2.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO NA ETAPA DE SELEÇÃO

Não será permitida a exclusão de mais que 10% dos indivíduos selecionados para o estudo até a sua conclusão. Para a exclusão serão consideradas as seguintes condições:

- 1) não disponibilidade para participar do ensaio clínico;
- 2) diagnóstico de dermatopatia genética do tipo névica;
- 3) lesões com espessura superior a 15 mm no exame histopatológico;
- 4) lesões > 8 mm e >10 mm de maior diâmetro;
- 5) história clínica de recorrência de carcinoma basocelular;
- 6) história clínica de carcinoma epidermóide e melanoma;
- 7) tratamento prévio de patologias malignas por meio de crioterapia, cirurgia, radioterapia, imiquimoid, eletrocauterização, imunossupressores, antineoplásicos e terapia fotodinâmica;
- 8) uso de medicamento fotossensibilizante por até 4 semanas anteriores a seleção;
- 10) diagnóstico de discrasia sanguínea, miocardiopatias, diabetes mellitus, insuficiência renal, doença pulmonar, hepatopatias agudas e crônicas, imunossupressão, SIDA, alergia, tabagismo, histórico de abuso de álcool e drogas, história de fotossensibilização, hipersensibilidade aos componentes da formulação AICIFc-N, gravidez, amamentação e intenção de engravidar no período do ensaio clínico.

3.2.5. CRITÉRIOS PARA RETIRADA DOS PACIENTES DURANTE O ESTUDO

Os pacientes selecionados para participar do estudo serão retirados dos braços de pesquisa, de seus grupos e sub-grupos nas seguintes condições:

- a) Ocorrência de efeito adverso grave.
- b) Solicitação do paciente.
- c) Evasão.
- d) Falha terapêutica.

Em caso de falha terapêutica após segunda aplicação de AICIFc-N + TFD, os pacientes serão retirados da pesquisa e encaminhados ao tratamento cirúrgico convencional .

3.2.6. TESTES DIAGNÓSTICOS A SEREM SOLICITADOS

- 1. Hemograma completo.
- 2. Provas de função renal: uréia e creatinina plasmáticas.
- 3. Provas de função hepática: Gama-GT , bilirrubina direta e indireta, TGO e TGP.
- 4. Eletrocardiograma em 12 derivações.
- 5. Radiografia simples do tórax.
- 6. Teste plasmático para diagnóstico de gravidez .
- 7. Sorologia para HIV, hepatite B e C.

Os testes hematológicos, excetuados os de exclusão de gravidez e sorológicos, serão repetidos sete e trinta dias após a intervenção com TFD + AICIFc-N. O eletrocardiograma e a radiografia simples de tórax serão repetidos decorrido um mês de tratamento.

3.2.6. RESTRIÇÕES DURANTE O ESTUDO

Todos os sujeitos de pesquisa selecionados deverão abster-se de exposição à radiação solar nas primeiras 6 horas após o tratamento e durante os 12 primeiros meses de evolução.

3.2.7. ALOCAÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS SELECIONADOS À PARTICIPAÇÃO NO ENSAIO CLÍNICO

A lista de alocação dos grupos, não cegada, será produzida por meio de software próprio, sem a participação da equipe médica, sob a responsabilidade do investigador principal e dos investigadores clínicos.

3.2.8 . PROTOCOLO DO GRUPO DE PESQUISA A

Nesse grupo serão analisados variáveis que permitirão definir entre as concentrações de AICIFc-N, qual aquela que representa a melhor dose/resposta, assim como comparar as diferentes dosagens quanto aos efeitos adversos e desfechos de cura e resultado estético obtido após um ano decorrido de tratamento. Após aleatorização dos pacientes em três sub-grupos de concentração (2,5; 5 e 10 μ M), no dia 1, a lesão escolhida será tratada com AICIFc + TFD.

A lesão para tratamento será submetida a assepsia e anestesiada para realização de curetagem superficial para diminuição da camada córnea, de forma a permitir melhor absorção do fotossensibilizador. A área de curetagem deverá abranger a margem de segurança estabelecida neste protocolo.

A seguir, com dedo enluvado, serão aplicados 1 ml de nanoemulsão sobre toda a extensão da área da lesão + 10 mm de margem livre. O local da aplicação receberá curativo opaco e oclusivo por 1 hora.

Após esse tempo, a superfície total que recebeu a AICIFc-N será submetida à radiação luminosa, utilizando-se de equipamento INDUSTRA (BR-SP), equipado com fonte de luz LED (Light Emitting Diodes), na faixa da cor vermelha. Os comprimentos de onda serão emitidos entre 630 a 675 nm, na potência de 100 mW/cm². Os tempos de aplicação do tratamento variarão de acordo com a espessura da lesão, mas terão por linha de base 15 minutos.

Biópsias do tipo *punch* e histopatologia serão realizadas com 30 dias, 180 dias e 1 ano após a aplicação do tratamento, para acompanhamento da evolução clínica. Nos espécimes de biópsia será utilizado como corante a hematoxilina eosina e as amostras serão testadas para apoptose, mediante técnica histoquímica para identificação de atividade da caspase 3.

3.2.8. PROTOCOLO DO GRUPO DE PESQUISA B

O grupo B receberá a TFD + AICIFcNP na concentração padronizada no Grupo A como aquela que obteve a melhor dose/resposta. Os desfechos observados quanto a segurança e a eficácia serão comparados com àqueles relacionados no Grupo C, onde a cirurgia é a intervenção de escolha. O protocolo para uso da TFD + AICIFc-N na concentração padronizada será o mesmo aplicado no grupo A.

3.2.9. PROTOCOLO DO GRUPO DE PESQUISA C

No grupo C será aplicado o procedimento comparador – cirurgia – com a TFD + AICIFcNP. O protocolo cirúrgico será aquele adotado para tratamento do carcinoma basocelular superficial no Cacon/HUNB. Antes do procedimento cirúrgico e após a assepsia, a lesão será curetada e receberá aplicação de AICIFc-N na mesma concentração, volume e tempo de cobertura de 1 hora com curativo opaco, conforme descrito no protocolo do grupo B. Decorrido esse tempo, não haverá aplicação de radiação luminosa e a peça será cirúrgica será encaminhada ao laboratório, acondicionada em recipiente opaco que contenha soro fisiológico a 0,9%. A peça cirúrgica será estudada por microscopia ótica para diagnóstico e estadiamento, além de microscopia confocal para análise da distribuição e da cinética do fotossensibilizador nos diferentes estratos celulares da pele.

3.2.10. MONITORAMENTO DA INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA

Os sujeitos de pesquisa incluídos serão avaliados clinicamente nas primeiras quatro horas do procedimento; 24 horas; 48 horas e sete dias após a intervenção, com registro do estado das lesões e das queixas clínicas. Será realizada avaliação clínica-laboratorial completa decorridos 7 dias, 30 dias, 180 dias e um ano após a aplicação dos protocolos terapêuticos nos grupos A, B e C. O volume total de sangue a ser coletado durante todo o ensaio clínico será menor de 200 mililitros em 12 meses. A medicação analgésica a ser prescrita para todos os grupos, por via oral e se necessário a cada 8 horas, será o paracetamol na concentração de 750 mg/comprimido. O aspecto lesional será documentado por registro fotográfico à cores, em formato digital, imediatamente antes e depois dos procedimentos terapêuticos, e no acompanhamento clínico pós-intervenção, em conformidade com os tempos acima referidos das consultas de avaliação.

4. DESFECHOS A SEREM CONSIDERADOS

4.1. QUANTO À SEGURANÇA

A. Toxicidade Local: será avaliada pelas variáveis eritema, edema, dor, ulceração, aumento da temperatura no local da lesão e formigamento após a aplicação da AICIFc-N+ TFD. Os sintomas locais de eritema, edema e ulceração serão avaliados por meio de colorimetria, obedecendo a uma escala de avaliação de 0 a 5. A variável dor será avaliada por escala visual-analógica (EVA), em que a quantificação desse sintoma subjetivo será descrita pelo paciente em tabela com escalonamento numeral de 0 a 10, onde zero representa nenhuma dor e dez a pior dor possível. O paciente também deverá descrever a qualidade da dor experimentada, considerando os descritores algícos relacionados ao tegumento, isto é: ardor; queimação; formigamento; ferroadada e pulsátil.

B. Toxicidade sistêmica: avaliada com base em resultados de exames laboratoriais, na sintomatologia clínica. Serão avaliados os sintomas: náuseas, vômitos, cefaléia, falta de ar, palpitação, dor articular, tonteira, artralgia, mialgia, zumbido auditivo e febre (temperatura axilar superior a 37,5° C).

4.2. QUANTO À EFICÁCIA

A. Insucesso de tratamento: quando, após 30 dias da segunda aplicação de AICIFc-N + TFD, não houver remissão completa da lesão; ou a qualquer tempo houver recorrência do tumor no local previamente tratado. Tanto a suspeita clínica de falha do tratamento (a qualquer tempo) quanto a remissão da lesão serão confirmadas por histopatologia. No caso de falha do tratamento o paciente será encaminhado para o tratamento cirúrgico convencional, sem que seja retirado da pesquisa ou incluído no grupo dos pacientes alocados para receber o tratamento cirúrgico.

B. Sucesso do tratamento: considerado pela demonstração histopatológica de ausência total da neoplasia em um mês, seis e doze meses após a aplicação da TFD + AICIFc-N, considerando-se intervalo de confiança de 95%.

B. Resultado estético: Para todos os grupos de tratamento, após 12 meses de acompanhamento clínico será realizada avaliação estética do local tratado, mediante atribuição dos seguintes valores: ruim, regular, bom, muito bom e excelente. O sítio do tratamento também deverá ser classificado quanto à pigmentação, considerando três possibilidades: normal, hipopigmentada e hiperpigmentada.

4.6. REGISTRO DE EFEITOS ADVERSOS

Todos os efeitos adversos (EA) serão registrados durante a integralidade do período da investigação. O investigador utilizará ficha própria para registro dos EA, na qual os sintomas serão descritos quanto a tipologia e classificados na sua intensidade como leve, moderado e severo e quanto à funcionalidade como não associados ou associados à limitação de atividades diárias, assim como as medidas prescritas para revertê-los ou aliviá-los. Efeitos adversos severos serão destacados e registrados em formulário próprio, onde constarão informações detalhadas sobre essa intercorrência, as medidas terapêuticas adotadas e os correspondentes resultados obtidos. Esse documento deverá ser assinado pelo clínico do paciente, pelos pesquisadores clínicos e pelo investigador principal, e será parte integrante do prontuário do paciente.

5. Estatística

Os dados obtidos serão tabulados no programa SPSS, versão 17 para Windows. Será realizada análise de estatística descritiva para avaliação eficácia, da segurança e da melhor dose/resposta entre as concentrações AICIFc-N + TFD empregadas no grupo A. Para a análise estatística dos desfechos relacionados AICIFc-N + TFD, em comparação àqueles obtidos com o tratamento cirúrgico (Grupo C), os testes estatísticos deverão considerar nível de significância 0.050, limite de não-inferioridade de 95%, para a concentração padronizada em uso no Grupo B, e os seguintes prognósticos de eficácia de grupo: B = 90% e C = 97%. Serão também consideradas variáveis de intenção de tratamento (ITT) e por protocolo (PP).

6. VIABILIDADE TÉCNICA DO ESTUDO

As seguintes condições garantem a viabilidade técnica e econômica do projeto: a) A elevada incidência do carcinoma basocelular; b) disponibilidade local da AICIFc-N e de equipamentos para aplicação laser; c) existência de protocolos concensuados de diagnóstico e tratamento do carcinoma basocelular no Brasil e d) disponibilidade de serviço de dermatologia, análises clínicas e hispatologia no HUNB). Os recursos de financiamento serão advindos do projeto INCT em Nanobiotecnologia.

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Você está convidado(a) a participar como voluntário(a) da pesquisa “Avaliação da Segurança e Eficácia da Terapia Fotodinâmica Mediada Por Nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina no Tratamento do Carcinoma Basocelular Superficial”.

Os motivos que nos levam a estudar novas alternativas ao tratamento do Carcinoma Basocelular Superficial é o fato desse câncer de pele não-melanoma ser um dos mais frequentes no Brasil, correspondendo a 25% do total de tumores diagnosticados, constituindo-se por essa razão em importante problema de saúde pública no país.

A pesquisa se justifica também, porque estudos científicos sobre o uso da Terapia Fotodinâmica no tratamento de doenças da pele têm demonstrado bons resultados, quando comparada ao tratamento cirúrgico convencional, e na medida em que medicações de uso local e ativadas por laser são desenvolvidas especialmente para essa modalidade de tratamento.

O objetivo da pesquisa acima nomeada é avaliar os efeitos clínicos da associação da nanoemulsão de Alumínio – Cloro – Ftalocianina com a Terapia Fotodinâmica no tratamento do carcinoma basocelular superficial, comprovando os seus resultados através do tratamento cirúrgico de rotina utilizado nesse tipo de câncer de pele não-melanoma.

Para comprovação do diagnóstico SERÁ RETIRADO UM PEQUENO FRAGMENTO DA LESÃO e a PARA A confirmação da cura clínica TODA A DOENÇA SERÁ RETIRADA ATRAVÉS DE UMA CIRURGIA. ESTA CIRURGIA SERÁ REALIZADA COM ANESTESIA LOCAL . Durante o tratamento também serão realizados exames de sangue, raio X de tórax e eletrocardiograma.

O tratamento com a Terapia Fotodinâmica associada a nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina consiste das seguintes etapas: a) limpeza, anestesia local e raspagem superficial da lesão diagnosticada; b) administração local da nanoemulsão; c) exposição da lesão ao laser; d) curativo e prescrição de analgésico por via oral em caso de dor local. Após o tratamento serão marcadas consultas para acompanhamento clínico da evolução até a alta do tratamento.

Existe a possibilidade de você sentir desconforto no local tratado, caracterizado por um ou mais dos seguintes sintomas, que também estão presentes no tratamento cirúrgico da lesão: ferimento, dor, vermelhidão, inchaço, queimadura ou formigamento.

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper sua participação a qualquer momento. Sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer prejuízo aos seus direitos.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Todos os resultados dos seus exames permanecerão confidenciais, mas acessíveis para você, e serão utilizados apenas nesta pesquisa. Seu nome ou o material que indique a sua participação nunca será liberado sem a sua permissão por escrito. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação ou apresentação científica que possa resultar deste estudo.

A participação no estudo não acarretará custos para você, e não lhe será disponibilizado qualquer compensação financeira adicional. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), você terá garantido tratamento no Hospital da Universidade de Brasília HUB, ou em outra unidade da rede hospitalar do Sistema Único de Saúde que for indicada. **Em caso da ocorrência de danos eventuais relacionados à pesquisa fica reconhecido e garantido o seu direito à indenização.** Uma cópia deste consentimento informado, assinada por você, pelo pesquisador e testemunha, será arquivada no Setor de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário de Brasília.

Eu, _____ fui informada (o) dos objetivos desta pesquisa de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e rever minha decisão se assim o desejar. Ficaram claros para mim quais são os propósitos da pesquisa, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos e as garantias de confidencialidade das informações. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas, e que tenho garantia do acesso a tratamento de apoio, se houver necessidade.

Concordo voluntariamente em participar da pesquisa “Avaliação da Segurança e Eficácia da Terapia Fotodinâmica Mediada Por Nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina no Tratamento do Carcinoma Basocelular Superficial”.

Estou ciente de que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a realização da pesquisa, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer direito legalmente assegurado. Também sei que caso existam gastos adicionais de tratamento, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa, sem prejuízo dos direitos que me são assegurados no Sistema Único de Saúde.

O projeto de pesquisa “Avaliação da Segurança e Eficácia da Terapia Fotodinâmica Mediada Por Nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina no Tratamento do Carcinoma Basocelular Superficial” está registrado no SISNEP/CONEP/CNS –. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB CEP-FS/UnB.

Em caso de dúvidas poderei pedir esclarecimentos ao pesquisador principal Dr. Itajaí Albuquerque no Telefone: 61 9554-0990; ou Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB CEP-FS/UnB no endereço: Campus Darcy Ribeiro, Faculdade de Saúde, tel.: 61 31071947 ou pelo e-mail cepfs@unb.br.

Declaro que recebi uma cópia rubricada e assinada deste termo de consentimento livre e esclarecido.

Nome	Assinatura do Participante ou responsável Legal	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data

APÊNDICE C – EXCERTOS DA FICHA CLÍNICA INDIVIDUAL

Exame Físico e Avaliação de Relacionados à Lesão

Temperatura °C Método Axilar Oral Retal (assinalar um)
Usar o mesmo método durante todo o estudo

Peso kg.

Localização anatômica:

Diâmetros em milímetros (Comp. x Larg.) :

Bordas () regulares irregulares ()

Cor () uniforme () não uniforme

Superfície () regular () irregular

Telangiectasias () sim () não

Fotografia de lesão anexada ao prontuário () sim

Sinais/Sintomas Relacionados à Lesão	Sim	Não
Alteração de tamanho e forma nos últimos seis meses		
Modificação de cor nos últimos seis meses		
Presença de prurido		
Sensibilidade		
Ulceração		
Sangramento		
História de exposição ao Sol/ Queimadura solar frequente		
Telangiectasias lesionais à inspeção		
Outras (explicitar):		

Procedimento Terapêutico: Terapia Fotodinâmica + Nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina.

Hora de início do procedimento :

Temperatura . °C Método Axilar Oral Retal (assinalar um)
Usar o mesmo método durante todo o estudo

Hora de término do procedimento :

Temperatura . °C Método Axilar Oral Retal (assinalar um)
Usar o mesmo método durante todo o estudo

AVALIAÇÃO CLÍNICA DA TOXICIDADE LOCAL

Paciente referiu queixa durante o procedimento Não Sim

Se Sim, favor identificar

Sensação de calor local

Eritema

Dor tipo () ardor () queimação () formigamento () ferroada () pulsátil

Paciente deverá identificar a intensidade dolorosa com base na escala visual-analógica – EVA: _____

Inspeção da lesão após aplicação da TFD + AICIFc-Np
A lesão deverá ser novamente fotografada e anexada ao prontuário

Diâmetros em milímetros (Comp. x Larg.):

Bordas () regulares irregulares ()

Cor () uniforme () não uniforme

Superfície () regular () irregular

Telangiectasias () sim () não

EFEITOS ADVERSOS

Deverá ser feita a seguinte pergunta ao paciente: "Você sentiu, ou percebeu algo diferente após a última consulta?"

Sim Não

Observação: Somente marcar SIM para efeito adverso novo não descrito na avaliação anterior, OU em caso de mudança na intensidade ou duração de efeito adverso antes descrito.

Se SIM por favor registre

AValiação CLÍNICA DA TOXICIDADE LOCAL

Sensação de calor local () novo () piorou

Eritema () novo () piorou

Dor tipo () ardor () queimação () formigamento () ferroada () pulsátil
 () novo () piorou

Paciente deverá idenditicar a intensidade dolorosa com base na escala visual-analógica – EVA: ____

Edema () novo () piorou

Ulceração () novo () piorou

Prurido local () novo () piorou

AValiação CLÍNICA DA TOXICIDADE SISTÊMICA

Sintomatologia em após 1 hora do procedimento Não Sim

Náuseas () novo () piorou

Número do Protocolo	Número do Registro do Paciente no Cacon	Número de Registro do Paciente (Protocolo)	Iniciais do Paciente	
XXXX/XX	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
				Day Month Year

Página 9

Vômitos

Dispnéia

Palpitação

Artralgia

Mialgia

Cefaléia

Tonteiras

Zumbido auditivo

Febre (temperatura acima de 37,5° C)

Outro a descrever:

Outro a descrever:

Página 8

Houve adoção de medida terapêutica para tratamento do sintoma referido

Não Sim

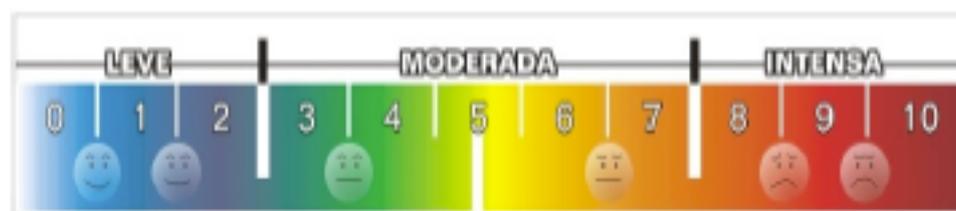
Em caso de Sim, favor descrever as Medidas adotadas:

Houve melhora dos sintomas após 1 hora do procedimento? Não Sim

Prescrição de medicação sintomática para uso em casa? Não Sim

Se Sim, favor descrever:

ESCALA VISUAL - ANALÓGICA (EVA)



Edema	<input type="checkbox"/>			
Ulceração	<input type="checkbox"/>	Prurido local	<input type="checkbox"/>	
Página 7				
AVALIAÇÃO CLÍNICA DA TOXICIDADE SISTÊMICA				
<hr/>				
Sintomatologia durante o procedimento	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Sim
Sintomatologia em até 1 hora após o procedimento	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Sim
Náuseas	<input type="checkbox"/>			
Vômitos	<input type="checkbox"/>			
Dispneia	<input type="checkbox"/>			
Palpitação	<input type="checkbox"/>			
Artralgia	<input type="checkbox"/>			
Mialgia	<input type="checkbox"/>			
Cefaléia	<input type="checkbox"/>			
Tonteiros	<input type="checkbox"/>			
Zumbido auditivo	<input type="checkbox"/>			
Febre (temperatura acima de 37,5° C)	<input type="checkbox"/>			

ANEXOS

ANEXO A – COMPROVANTE DE ENVIO



UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ζ Ensaio Clínico Fase III para Avaliação da Segurança e Eficácia da Terapia Fotodinâmica Mediada por Nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina no Carcinoma Basocelular Superficial de Pele ζ

Pesquisador: Itajaí Oliveira de Albuquerque

Versão: 8

CAAE: 20941213.6.0000.0030

Instituição Proponente: Hospital Universitário de Brasília - HUB

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 081017/2013

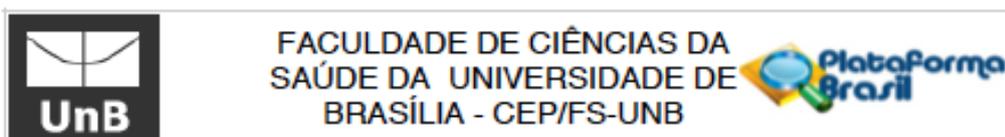
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto ζ Ensaio Clínico Fase III para Avaliação da Segurança e Eficácia da Terapia Fotodinâmica Mediada por Nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina no Carcinoma Basocelular Superficial de Pele ζ que tem como pesquisador responsável Itajaí Oliveira de Albuquerque, foi recebido para análise ética no CEP UnB - Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília em 17/10/2013 às 15:32.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** ceptsunb@gmail.com

ANEXO B - PARECER CIRCUNSTANCIADO

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ensaio Clínico Fase I/II para Avaliação da Segurança e Eficácia da Terapia Fotodinâmica Mediada por Nanoemulsão de Alumínio-Cloro-Ftalocianina no Carcinoma Basocelular Superficial de Pele

Pesquisador: Itajá Oliveira de Albuquerque

Área Temática:

Versão: 8

CAAE: 20941213.6.0000.0030

Instituição Proponente: Hospital Universitário de Brasília - HUB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 771.394

Data da Relatoria: 20/08/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa se refere a um estudo clínico, Fase 1, aberto, não randomizado, escalonado, que tem por objetivo avaliar a eficácia e a segurança do tratamento do carcinoma basocelular superficial (8 a 10 mm), com base na aplicação tópica de AICIFc-NP, combinada à terapia fotodinâmica, em comparação com o tratamento cirúrgico convencional. Serão selecionados 150 indivíduos de pele clara, sem distinção de sexo, distribuídos igualmente entre três grupos de tratamento, todos maiores de 30 anos, com diagnóstico clínico e anatomo-patológico de carcinoma basocelular. Os voluntários selecionados serão distribuídos aleatoriamente em três braços de pesquisa. Serão avaliadas a segurança e a eficácia de três concentrações pré-determinadas de AICIFc-NP combinadas à TFD, buscando-se padronizar aquela que apresenta melhor dose/resposta. Os pacientes serão submetidos a tratamento cirúrgico após trinta dias, contados da aplicação do AICIFc-NP.

Objetivo da Pesquisa:

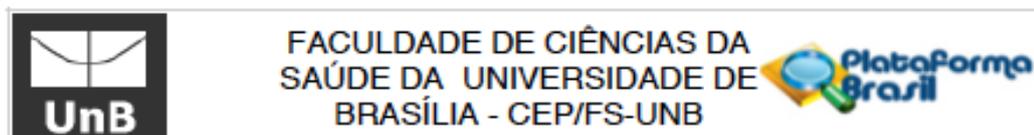
Primário:

Avaliar a taxa de resposta patológica completa da TFD + AICIFc-NP no tratamento pré-operatório do carcinoma basocelular superficial.

Secundário:

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **Fax:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepts@unb.br

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO



Continuação do Parecer: 771.394

Definir a melhor dose/resposta, considerando concentrações de 2,5 µM, 5 µM e 10 µM, bem como identificar efeitos adversos do tratamento relacionados à toxicidade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Toxicidade Local: avaliada pelas variáveis eritema, edema, dor, ulceração, aumento da temperatura no local da lesão e formigamento após a aplicação da AICIFc-NP+ TFD. Os sintomas locais de eritema, edema e ulceração serão avaliados por meio de colorimetria, obedecendo a uma escala de avaliação de 0 a 5. A variável dor será avaliada por escala visual-analógica (EVA), em que a quantificação desse sintoma subjetivo será descrita pelo paciente em tabela com escalonamento numeral de 0 a 10, onde zero representa nenhuma dor e dez a pior dor possível. O paciente também deverá descrever a qualidade da dor experimentada, considerando os descritores algícos relacionados ao tegumento, isto é: ardor, queimação, formigamento, ferroadada e pulsátil.

Toxicidade sistêmica: avaliada com base em resultados de exames laboratoriais, na sintomatologia clínica. Serão avaliados os sintomas: náuseas, vômitos, cefaléia, falta de ar, palpitação, dor articular, tonteira, artralgia, mialgia, zumbido auditivo e febre (temperatura axilar superior a 37,5 C).

Benefícios:

Possibilidade de demonstração histopatológica de ausência total da neoplasia em um mês após a aplicação AICIFc-NP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Espera-se que os dados obtidos apontem novos protocolos farmacológicos de tratamento do carcinoma basocelular superficial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos analisados para este parecer:

Versão de TCLE, "TCLE-2.doc", postado em 19/08/2014; e

"PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_209412.pdf", postado em 19/08/2014.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas.

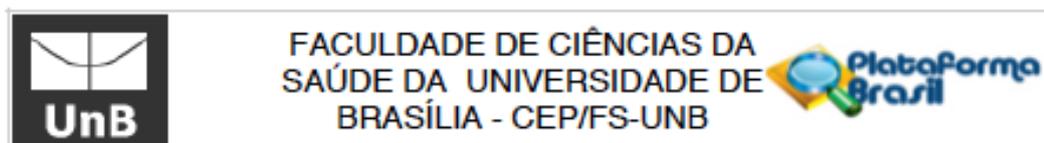
O projeto encontra-se em acordo com a Res. CNS 466/2012.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1947 Fax: (61)3307-3799 E-mail: copts@unb.br

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO



Continuação do Parecer: 771.364

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

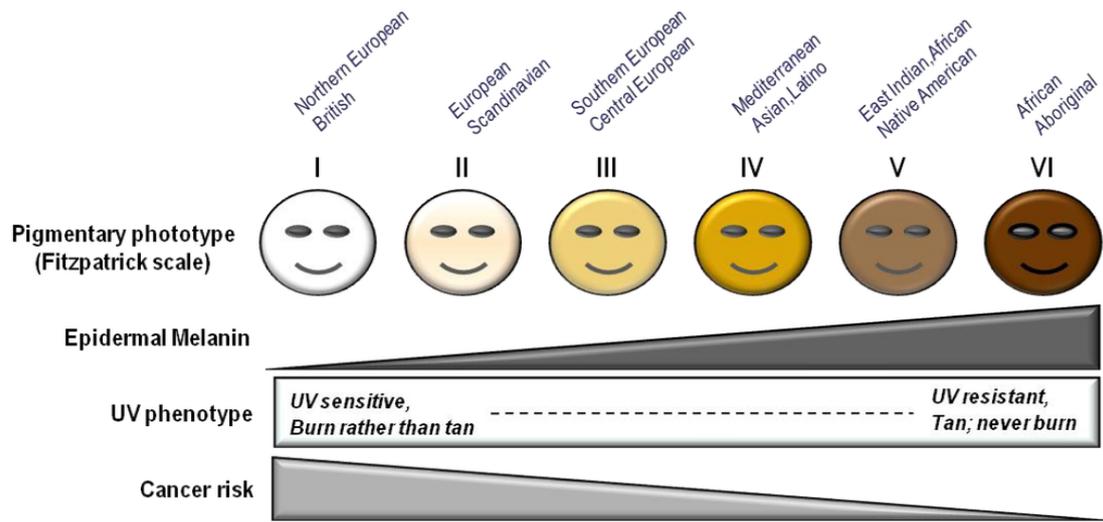
Lembramos que os relatórios de pesquisa devem ser enviados semestralmente, comunicando ao CEP a ocorrência de eventos adversos esperados ou não esperados.

BRASÍLIA, 29 de Agosto de 2014

Assinado por:
Marie Togashi
(Coordenador)

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 Fax: (61)3307-3799 E-mail: cepts@unb.br

**ANEXO C – CLASSIFICAÇÃO DA PELE HUMANA
(FITZPATRICK)**



Apud D'Orazio J *et als* [102].