



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Anna Carolina Miola**

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DO CREME DE COLCHICINA 0,5%  
VERSUS TERAPIA FOTODINÂMICA COM AMINOLEVULINATO DE  
METILA NO TRATAMENTO DO CAMPO DE CANCERIZAÇÃO  
CUTÂNEO: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

**Botucatu**

**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA - CAMPUS DE BOTUCATU**

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DO CREME DE COLCHICINA 0,5% *VERSUS* TERAPIA  
FOTODINÂMICA COM AMINOLEVULINATO DE METILA NO TRATAMENTO DO CAMPO DE  
CANCERIZAÇÃO CUTÂNEO: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Mestrando: Anna Carolina Miola

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, para obtenção do título  
de Mestre em Patologia

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Miola, Anna Carolina.

Eficácia e segurança do creme de colchicina 0,5% versus terapia fotodinâmica com aminolevulinato de metila no tratamento do campo de cancerização cutâneo : um ensaio clínico randomizado / Anna Carolina Miola. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Helio Amante Miot  
Capes: 40101029

1. Colchicina. 2. Fotoquimioterapia. 3. Carcinoma de células escamosas. 4. Câncer - Quimioprevenção.

Palavras-chave: Campo de cancerização; Carcinoma espinocelular; Colchicina; Eratose actínica; Terapia fotodinâmica.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS .....	5
AGRADECIMENTOS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS .....	8
LISTA DE SÍMBOLOS .....	9
RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	11
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1 Queratoses actínicas e campo de cancerização cutâneo.....	12
1.2 Tratamentos disponíveis.....	14
1.3 Colchicina.....	17
1.4 Terapia Fotodinâmica.....	19
1.5 Referências.....	21
2. OBJETIVOS .....	24
3. MANUSCRITO.....	25
4. CONCLUSÕES.....	41
5. PERSPECTIVAS .....	42
ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	43
ANEXO 2: Randomização dos antebraços dos pacientes.....	44
ANEXO 3: Escala de fotoenvelhecimento dos antebraços .....	45
ANEXO 4: Escala de Gravidade de Queratoses Actínicas .....	46
ANEXO 5: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	47

## DEDICATÓRIA

A Deus, por guiar meu caminho sempre. Por me iluminar e me manter em pé mesmo nas horas mais difíceis.

Aos meus pais, Claudio e Sueli, por todo o esforço e dedicação na minha formação. Nada seria possível sem seu apoio, sempre incondicional.

Ao meu irmão, Daniel, pelo apoio à distância e por toda a ajuda imprescindível com a informática para o meu trabalho.

Ao meu noivo, Arley, pelo apoio, compreensão e auxílio de inúmeros modos, indispensáveis durante todo o período, da coleta ao desenvolvimento da tese.

A todos familiares e amigos que sempre me incentivaram durante todo o período, especialmente meus tios José e Denise, que sempre me apoiaram, desde a adolescência, a continuar estudando e não desistir dos meus sonhos.

Aos meus cães Pitty (*in memoriam*), Marley e Úrsula, por todas as alegrias que me proporcionaram e carinho dispensados a mim do modo que lhes é possível.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Hélio Amante Miot,

Por toda dedicação e incentivo à ciência, desde as primeiras reuniões até as fases finais de redação. Pela paciência e cuidado com nosso projeto. Por sempre me estimular a fazer o meu melhor. Exemplo de médico, dermatologista e pesquisador. Amigo que essa ótima experiência me proporcionou.

À Prof.<sup>a</sup> Luciana Patrícia Fernandes Abbade,

Por estar sempre presente, mesmo com a distância física, empenhada em sempre buscar o melhor para esse projeto.

Ao Prof. Juliano Vilaverde Schmitt,

Por todo apoio e dedicação desde o início da orientação.

A minha amiga Eliane Roio, pela amizade, apoio e cuidado com o nosso projeto durante todo o período de execução.

## AGRADECIMENTOS

Aos voluntários que participaram do estudo,  
Pela confiança que depositaram em mim.

Aos residentes, contratados e docentes do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu,  
Pelo apoio e aprendizado que recebi durante todo o projeto.

À divisão de Dermatologia, seus contratados e docentes e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP,  
Pelo conhecimento e formação concedidos a mim. Anos vividos que jamais esquecerei.

Ao Departamento de Dermatologia e à Faculdade de Medicina de Botucatu,  
Pelo acolhimento e pelas oportunidades únicas de crescimento profissional que têm me proporcionado.

Trabalho desenvolvido no ambulatório de Dermatologia

**HC-UNESP**



**LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS**

5-FU – 5-fluorouracil  
AK – do inglês *Actinic Keratosis*: queratose actínica  
ALA – ácido 5-delta aminolevulínico  
ATA – ácido tricloroacético  
Beta HCG – gonadotrofina coriônica humana tipo beta  
CEC – carcinoma espinocelular  
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa  
dp – desvio-padrão  
FMB-Unesp – Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
HSCORE – escore histológico  
ITT – do inglês *Intention To Treat*: análise tipo intenção de tratamento  
Ki67 – proteína Ki67  
KIN – do inglês *Keratinocyte Intraepithelial neoplasia*: neoplasia intraepitelial queratinocítica  
LED – do inglês *Light Emitting Diode*: diodo emissor de luz  
LOCF – do inglês *Last Observation Carried Forward*  
MAL – do inglês *methyl aminolevulinate*: aminolevulinato de metila  
p53 – proteína p53  
p.ex. – por exemplo  
PDT-MAL – do inglês *Photodynamic Therapy with Methyl Aminolevulinate*  
PVC – do inglês *Polyvinyl Chloride*: policloreto de vinila  
QA – queratose actínica  
RUV – radiação ultravioleta  
SCC – do inglês *Squamous Cell Carcinoma*: carcinoma espinocelular  
sd – do inglês *standard deviation*: desvio padrão  
SFC – do inglês *Skin Field Cancerization*: campo de cancerização cutâneo  
TFD – terapia fotodinâmica  
UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
UVA – radiação ultravioleta tipo A  
UVB – radiação ultravioleta tipo B

## LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca Registrada

## RESUMO

**Fundamentos:** Campo de cancerização cutâneo representa uma área com alterações genômicas induzidas pela radiação ultravioleta, cujo sinal de atividade são as queratoses actínicas (QA). Tratamentos que visem sua estabilização podem reduzir a incidência de QA e de tumores cutâneos não melanoma. Estudos em terapia fotodinâmica com metil aminolevulinato (TFD-MAL) no tratamento do campo de cancerização cutâneo mostram redução de até 89% na contagem de QA, já com colchicina tópica, há redução de até 78%. Até o momento, não há estudos comparando colchicina com TFD-MAL. Esse trabalho objetiva avaliar eficácia e segurança de colchicina 0,5% creme *versus* TFD-MAL no tratamento do campo de cancerização dos antebraços.

**Casuística e métodos:** Ensaio clínico aberto, controlado, randomizado, envolvendo 36 pacientes do ambulatório de Dermatologia da UNESP-Botucatu, com 3-10 QAs em cada antebraço, tratados (cada antebraço) com creme de colchicina 0,5% (2x/dia por 10 dias) ou uma sessão de TFD-MAL; reavaliados após 60 dias. A avaliação clínica foi realizada pela contagem de QAs, seus subtipos clínicos, sua escala de gravidade e escala de fotoenvelhecimento dos antebraços. Avaliação histopatológica foi realizada pelo escore KIN (*Keratinocyte Intraepithelial Neoplasia*), atrofia epitelial e imunohistoquímica de p53 e Ki67. Todos os pacientes incluídos no estudo e randomizados fizeram parte da população ITT (*intention to treat*). Os dados do único *dropout* foram imputados como LOCF (*last observed carried forward*).

**Resultados:** Foram incluídos 36 participantes: 50% eram do sexo masculino, com idade média (dp) de 70,9 (8,6) anos e predominância de pacientes fototipos I e II (89%). O *clearance* total de QAs ocorreu em 6 (17%) de COL e 7 (19%) de MAL-PDT ( $p=0,76$ ), e *clearance* parcial ( $> 50\%$ ) foi alcançado em 16 (44%) dos antebraços COL e 24 (67%) MAL-PDT ( $p=0,07$ ). Houve redução significativa no escore da escala de fotoenvelhecimento para COL e TFD-MAL (-6% vs -6%), escore de gravidade de QA (-65% vs -73%), subtipos clínicos das QAs presentes e contagem de QA (-45% vs -40%), após as intervenções ( $p<0,01$ ), sem diferenças significativas entre os grupos. Houve redução no escore KIN em ambos os grupos ( $p<0,01$ ), normalizado em 28% dos pacientes MAL-PDT e 20% em COL. Houve redução da atrofia epitelial após 60 dias ( $p<0,01$ ), sem diferenças entre os tratamentos ( $p=0,58$ ). Houve redução significativa do escore Ki67 em ambos os tratamentos: 15% em COL e 9% em MAL-PDT, sem diferença entre os grupos ( $p=0,32$ ). Houve redução do escore de p53 em 27% no grupo COL, porém, um aumento de 4% na MAL-PDT ( $p<0,05$ ). Efeitos adversos foram relatados em ambos os grupos: 69% em COL e 67% em TFD-MAL. Não houve evento adverso grave.

**Conclusão:** Colchicina 0,5% creme e TFD-MAL são eficazes e seguros no tratamento do campo de cancerização cutâneo.

**Palavras-chave:** Campo de cancerização, Carcinoma espinocelular, Ceratose actínica, Colchicina, Dermatologia, Fotoquimioterapia, Oncologia, Quimioprevenção, Terapia fotodinâmica.

## ABSTRACT

**Background:** Skin field cancerization is an area with genomic alterations induced by ultraviolet radiation, and actinic keratosis (AK) is a sign of its activity. Treatments to stabilize it may reduce the incidence of non-melanoma skin cancers and AK. Photodynamic therapy with methyl aminolevulinate (TFD-MAL) in the treatment of skin field cancerization shows a reduction of up to 89% in the AK count, and topical colchicine, up to 78% of reduction. To date, there are no studies comparing colchicine with PDT-MAL. The aim of this study was to evaluate the efficacy and safety of colchicine 0.5% cream versus PDT-MAL in skin field cancerization treatment of the forearms.

**Patients and methods:** A randomized, controlled clinical trial involving 36 patients from the UNESP-Botucatu Dermatology outpatient clinic, with three to 10 AKs in each forearm, treated (each forearm) with colchicine cream (2x / day for 10 days) and one session of PDT-MAL. Reassessed after 60 days. Clinical evaluation was performed by AK count, its clinical subtypes, severity scale and forearm photoaging scale. Histopathological evaluation performed by KIN (Keratinocyte Intraepithelial Neoplasia), epithelial atrophy and immunohistochemistry of p53 and Ki67. All patients included in the study and randomized were part of the ITT population (intention to treat). The only dropout was analyzed through LOCF (last observation carried forward).

**Results:** Thirty-six participants were included: 50% were males, mean age (SD) of 70.9 (8.6) years and predominance of phototype I and II patients (89%). Total clearance of AK occurred in 6 (17%) of COL and 7 (19%) of MAL-PDT ( $p = 0.76$ ), and partial clearance ( $> 50\%$ ) was achieved in 16 (44%) of COL and 24 (67%) of MAL-PDT ( $p = 0.07$ ). There was a significant reduction in the photodamage scale for COL and PDT-MAL (-6% vs -6%), AK severity score (-65% vs -73%), clinical subtypes of the present AK and AK (-45% vs -40%) after interventions ( $p < 0.01$ ), with no significant differences between the groups ( $p > 0.24$ ). There was a reduction in KIN score in both groups ( $p < 0.01$ ), normalized in 28% of MAL-PDT patients and 20% in COL. There was reduction of epithelial atrophy after 60 days ( $p < 0.01$ ), with no differences between treatments ( $p = 0.58$ ). There was a significant reduction of the Ki67 score in both treatments: 15% in COL and 9% in MAL-PDT, with no difference between groups ( $p = 0.32$ ). There was a reduction of the p53 score in 27% in the COL group, but a 4% increase in MAL-PDT ( $p < 0.05$ ). Adverse effects were reported in both groups: 69% in COL and 67% in PDT-MAL. There was no serious adverse event.

**Conclusion:** Colchicine 0.5% cream and TFD-MAL are effective and safe in skin field cancerization treatment.

**Keywords:** Actinic keratosis, Chemoprevention, Colchicin, Dermatology, Field cancerization, Oncology, Photochemoterapy, Photodynamic therapy, Squamous cell carcinoma.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Queratoses actínicas e campo de cancerização cutâneo

Queratoses actínicas (QA), ceratoses actínicas ou queratoses solares, são neoplasias cutâneas pré-malignas, resultantes, principalmente, da fotobexposição crônica. Acometem especialmente sujeitos de pele clara, adultos e idosos, nas áreas fotoexpostas<sup>1</sup>.

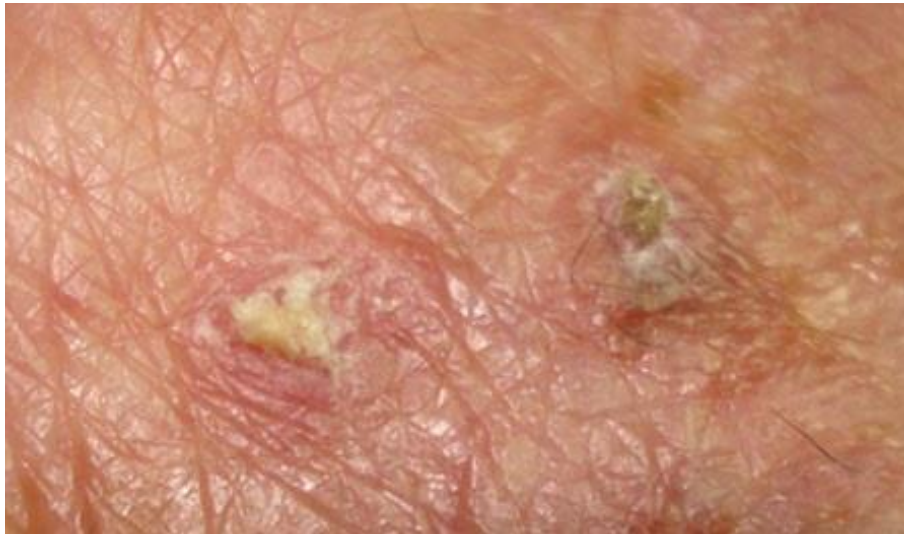
São formadas por proliferações atípicas de queratinócitos intraepiteliais e, com o tempo, apresentam risco de evoluir para carcinoma espinocelular (CEC) de 0,025 a 20% por ano<sup>2</sup>.

Pacientes de fototipos I e II de Fitzpatrick, imunocomprometidos, idosos e com antecedente de fotoexposição crônica sem fotoproteção, constituem o grupo de maior risco para desenvolvimento de QAs<sup>2</sup>. Isso decorre da maior ação da radiação ultravioleta (RUV) na pele menos melanizada, além da redução do reparo ao dano genômico induzido pela RUV no seu epitélio.

As QAs desenvolvem-se, clinicamente, como lesões maculares, papulosas ou máculo-papulosas, confluentes ou não, cobertas por escamas aderentes e hiperqueratósicas, com cerca de 0,5 a 1 cm (Figura 1). Apresentam crescimento lento, e ocorrem principalmente nas áreas mais expostas à luz solar, como colo, face, couro cabeludo, antebraços e dorso das mãos. QAs podem evoluir com infiltração, crescimento rápido, sangramento e ulceração, sinais que indicam possível progressão para CEC<sup>1,3</sup>.

A apresentação clínica das lesões foi dividida por Olsen em três graus: Grau I (visível e levemente palpável), Grau II (visível e palpável), Grau III (francamente visível e hiperqueratótica)<sup>4</sup>, porém, essa classificação ainda não se baseia em critérios histológicos ou da biologia das lesões (p.ex. atividade de proliferação e apoptose). A maior parte dos estudos ainda emprega a contagem de QAs por área como sinal de atividade do campo de cancerização cutâneo<sup>1,5</sup>.

Geralmente, pacientes com diagnóstico de QA possuem mais de uma lesão em uma mesma área. Múltiplas QAs incidentes em uma mesma região caracterizam – clinicamente – um campo de cancerização cutâneo em atividade<sup>6</sup>.



**Figura 1.** Queratoses actínicas: lesões eritematosas, hiperqueratósicas e infiltradas em área de pele danificada pela exposição solar crônica (Fonte: Departamento de Dermatologia-FMB-Unesp).

Descrito pela primeira vez em 1953 por Slaughter em pacientes com CEC oral, o campo de cancerização compreende uma área de tegumento aparentemente normal, porém, com alterações subclínicas e multifocais, composta por células geneticamente alteradas, teoria que justificaria a recorrência de tumores considerados completamente excisados à histopatologia ou surgimento de novas neoplasias em áreas adjacentes<sup>7</sup>.

O conceito de campo de cancerização cutâneo sugere que a pele aparentemente normal que circunda as QAs seja a base da expansão clonal de células geneticamente alteradas, o que explicaria a ocorrência de novas QAs ou outras neoplasias cutâneas em uma mesma área tegumentar, além da recorrência local de tumores considerados completamente excisados pela análise histopatológica<sup>8</sup>.

Recentemente, o campo de cancerização cutâneo vem sendo intensamente estudado devido a sua importância clínica, pois sua estabilização pode prevenir o surgimento de neoplasias, sua recorrência ou a evolução das lesões já existentes (Figura 2)<sup>9</sup>. Esses estudos têm utilizado a contagem de QAs, seu diâmetro e a erupção de novos tumores como medidas clínicas indiretas de atividade do campo de cancerização cutâneo, bem como análise de dímeros de ciclobutano pirimidina, expressão imunohistoquímica de p53, Ki67, survivina, tenascina-C, entre outros. Entretanto, ainda não há consenso na literatura quanto a parâmetros clínicos ou histológicos que possam medir sua atividade<sup>6</sup>.

Tendo em vista o envelhecimento da população, a maior exposição à RUV e o aumento da incidência de neoplasias cutâneas, terapêuticas que visem à estabilização da atividade do

campo de cancerização podem contribuir para a redução da incidência de QA e outras neoplasias malignas da pele, especialmente, em populações susceptíveis<sup>1</sup>.



**Figura 2.** Campo de cancerização cutâneo: múltiplas queratoses actínicas (identificadas) em antebraço de idoso exposto cronicamente ao sol (Fonte: Departamento de Dermatologia-FMB-Unesp).

## 1.2 Tratamentos disponíveis

O objetivo do tratamento das QAs e do campo de cancerização cutâneo é evitar o risco de progressão para lesões malignas e diminuir o número de lesões pré-malignas na área afetada. Atualmente, há várias modalidades terapêuticas, que devem ser escolhidas de acordo com a região a ser tratada: o número de lesões, a presença ou não de imunossupressão ou outras comorbidades, além do custo e tolerabilidade do tratamento, que consequentemente influenciarão na aderência do paciente<sup>6</sup>.

A crioterapia com nitrogênio líquido é o tratamento mais utilizado para QAs<sup>10</sup>. Geralmente bem tolerada, de fácil acesso e com bons resultados clínicos e histopatológicos: resposta clínica de 83% com um tempo de congelamento superior a 20 segundos. Podem ocorrer desconforto na aplicação e hipocromia persistente pós-procedimento. A crioterapia, entretanto, trata apenas as lesões visíveis de QAs, sem efeito no epitélio genomicamente instável do campo de cancerização<sup>11</sup>.

A curetagem associada à eletrocirurgia é uma modalidade altamente eficaz para o tratamento de QAs. É utilizada especialmente para lesões hiperqueratóticas e infiltradas, porém

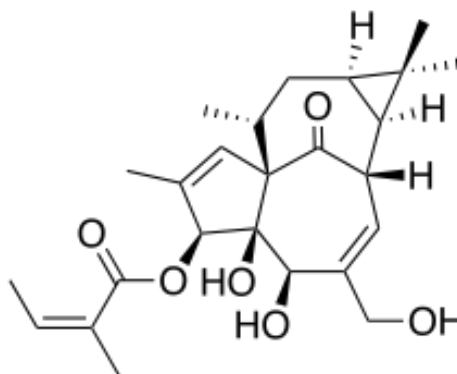
também fica restrita ao tratamento de um número limitado de QAs e não trata o campo de cancerização cutâneo como um todo<sup>12</sup>.

O laser de CO<sub>2</sub> pode ser utilizado no tratamento de QAs. Com uma única sessão, após 90 dias, obteve-se taxa de resposta completa de 64%; entretanto, há recidiva da lesão de 71%<sup>13</sup>. Além disso, o laser de CO<sub>2</sub>, assim como a crioterapia, trata somente as QAs visíveis.

O 5-fluorouracil (5FU) é droga quimioterápica tópica, antimetabólica, inibidora da síntese do DNA. Utilizada em concentrações que variam de 0,5 a 5%, pode ser utilizado na forma de creme ou em *peelings* semanais. Apresenta boa resposta terapêutica, com redução de até 80% na contagem de QAs<sup>14</sup>, e ação concomitante no fotodano, estabilizando, conseqüentemente, o campo de cancerização. Entretanto, seus efeitos colaterais podem levar à interrupção do tratamento: eritema, dor, edema e ulceração nos casos mais graves<sup>14-16</sup>.

O imiquimode é um imunomodulador tópico, agonista dos receptores *toll-like* tipo 7. Age estimulando a imunidade celular local e, conseqüentemente, leva à destruição da lesão por apoptose. Apresenta taxa de *clearance* completo de QAs de 57,1% e parcial de 72,1%, *versus* placebo, com 2,2% e 4,3%, respectivamente<sup>9</sup>. É disponível nas formulações de 3,75% e 5%, pode causar eritema, edema e desconforto local variável, assim como o 5-FU<sup>10-17</sup>.

O mebutato de ingenol é um novo agente ativo extraído da planta *Euphorbia peplus* (Figura 3), com mecanismo de ação pouco conhecido, porém com evidente efeito citotóxico direto e ação na resposta imune celular mediada por neutrófilos. Apresenta clareamento parcial de 75% e total de 42% das QAs, com a vantagem do tempo curto de tratamento (2 a 3 dias). Seus efeitos colaterais são leves a moderados e representados por irritação, eritema (em dois terços dos casos), dor, vesículas, pústulas e crostas, entretanto, com período rápido de recuperação<sup>18</sup>.





**Figura 3.** Planta *Euphorbia peplus*, fonte de extração do mebutato de ingenol, e sua estrutura química.

(Fonte: [https://projects.ncsu.edu/cals/plantbiology/ncsc/deployed/sliks/Euphorbia\\_peplus.htm](https://projects.ncsu.edu/cals/plantbiology/ncsc/deployed/sliks/Euphorbia_peplus.htm)).

A tretinoína, ou ácido retinoico, também pode ser utilizada na estabilização do campo de cancerização cutâneo, pois promove a redução de atipias nos queratinócitos, aumenta o número de células de Langerhans na área de aplicação, a espessura epitelial e reduz p53 e BAX. Houve redução de 45% do número de QAs em estudo feito com tretinoína 0,05%, versus redução de 23% no grupo placebo, com filtro solar<sup>19,20</sup>.

A fotoproteção efetiva reduz a contagem de QAs. Em estudo controlado, usuários de filtro solar reduziram em até 40% a incidência de novas QAs<sup>21</sup> no período de seis meses.

O fotoprotetor associado à enzima fotoliase pode ser usado como adjuvante no tratamento do campo de cancerização. A fotoliase é enzima reparadora do DNA, ativada por luz visível, que mostrou benefício no tratamento do campo de cancerização, pois leva à melhora dos parâmetros clínicos e histopatológicos, além de reduzir a expressão epitelial de p53 e Ki67, evidenciada através de imunohistoquímica<sup>22</sup>. Em estudos comparativos com filtro solar comum, o fotoprotetor associado à fotoliase demonstrou maior redução no grau de alterações moleculares relacionadas à fotoexposição<sup>23</sup>.

*Peelings* químicos também podem ser utilizados no tratamento do campo de cancerização cutâneo, como *peelings* de média profundidade de ácido glicólico 70% ou solução de Jessner e 5FU 5% em propilenoglicol, em sessões quinzenais<sup>24</sup>. *Peelings* de solução de Jessner associada a ácido tricloroacético (ATA) 35% apresentam boa resposta dentro de 12 meses de tratamento<sup>25</sup>. O ATA também pode ser utilizado em concentrações mais altas, como 50 e 70%, de forma pontuada nas QAs, sem tratar, entretanto, o campo de cancerização em si.

Além dos tratamentos acima, existem outros descritos, como diclofenaco sódico, resiquimod, colchicina e a terapia fotodinâmica (TFD), esses dois últimos são objetos desse estudo e serão discutidos posteriormente.

Um sumário de estudos clínicos randomizados e controlados que empregaram diferentes estratégias no tratamento das QAs está disposto na tabela 1.

Na Unesp de Botucatu, QAs são extremamente prevalentes e os tratamentos mais empregados são a crioterapia com nitrogênio líquido, 5FU e TFD.

**Tabela 1.** Principais estudos sobre o tratamento de queratoses actínicas e do campo de cancerização.

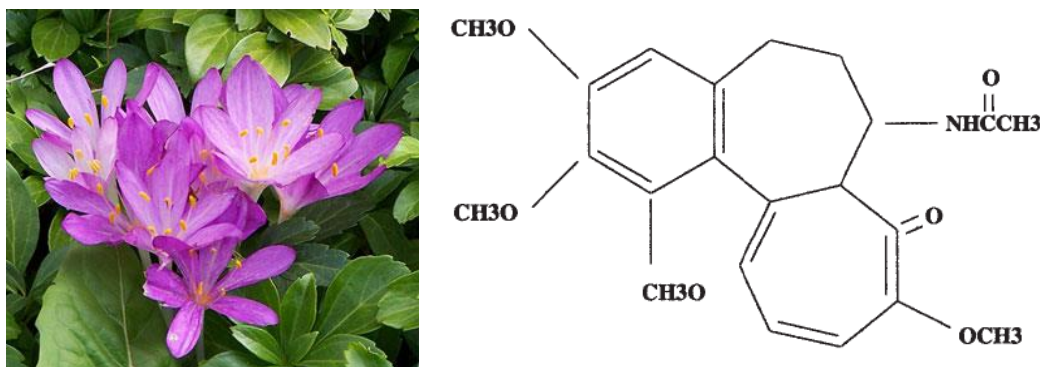
Autor (referência)	Intervenção	Número de pacientes (tipo de estudo)	Regime	Resultados
Harvey <i>et al</i> (26)	Acompanhamento	1034 (longitudinal)	Observação por 12 meses	Redução de 21% #
Thompson <i>et al</i> , (21)	Fotoprotetor FPS 17	588 (controlado, randomizado, aberto)	Aplicação diária por 6 meses Controle: placebo	Redução de 25% # Controle: redução de 18% #
Carducci <i>et al</i> , (23)	Fotoprotetor associado à fotoliase	28 (randomizado, controlado, aberto)	Aplicação diária por 6 meses Controle: fotoprotetor	Redução de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) de 61% Controle: redução de CPD de 35% Redução de QAs hiperqueratóticas em ambos os grupos
Kurwa <i>et al</i> , (27)	5FU 5%	17 (randomizado, controlado, aberto)	2x por dia por 3 semanas Controle: TFD 5-ALA única sessão	Redução da área lesionada de 70% * TFD (controle): redução da área lesionada 73% *
Szeimies <i>et al</i> (9)	Imiquimod 5%	286 (duplo-cego, controlado, randomizado, paralelo)	Uma vez ao dia, três vezes por semana, 16 semanas Controle: placebo	Clearance completo de QA: 57.1% vs 2.2% (placebo) Clearance parcial de QA: 72.1% vs 4.3% (placebo)
Wolf <i>et al</i> (28)	Diclofenaco sódico 3%	96 (duplo-cego, controlado, randomizado)	1x/ dia por 90 dias Controle: placebo Recomendado filtro solar em ambos os grupos	Redução de 47% # Controle: redução de 19% #
Euvrard (20)	Tretinoína 0,5%	100 (duplo-cego, controlado, randomizado)	1x ao dia por 90 dias Controle: placebo	Redução de 45% # Controle: redução de 23% #
Akar <i>et al</i> (29)	Colchicina	16 (randomizado, aberto, pareado)	Colchicina 1% vs 0,5 2x/ dia por 10 dias Reavaliação: 6 meses	Colchicina 1% : redução de 74% # * Colchicina 0,5% : redução de 78% # *
Pariser <i>et al</i> (30)	TFD	80 (randomizado, duplo-cego)	TFD-MAL 2 sessões com intervalo de 1 semana. Controle: TFD com placebo	Clearance completo 89% Controle: Clearance completo 38%
Fagihhi (31)	Colchicina	70 lesões (duplo-cego, randomizado)	Colchicina 1% gel 2x/ dia por 6 semanas Controle: diclofenaco 3% gel	50% de redução da média do tamanho das lesões em ambos os grupos*

# Contagem de QAs; \* p&gt;0,05 = ns; TFD = Terapia fotodinâmica

Há poucos ensaios clínicos na literatura com o uso de colchicina tópica, e os encontrados apresentam um pequeno número de participantes. Além disso, não há nenhum estudo comparando a eficácia da colchicina com a terapia fotodinâmica com aminolevulinato de metila (MAL), o que justifica a importância do projeto apresentado.

### 1.3 Colchicina

A colchicina, extraída da planta *Colchicum autumnale* (Figura 4)<sup>32</sup>, é uma droga muito antiga e de baixo custo, conhecida historicamente pela melhora em dores articulares e, por isso, primariamente utilizada no tratamento da gota.



**Figura 4:** *Colchicum autumnale* (Bhat, 2009) e estrutura química da colchicina (Grimaitre, 2000)

A colchicina se liga às proteínas microtubulares e interfere na função dos fusos mitóticos. Com isso, inibe a proliferação celular e a quimiotaxia de polimorfonucleares. Como efeitos colaterais, pode causar dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia, anemia aplástica e agranulocitose. Apresenta janela terapêutica restrita e lenta eliminação (meia-vida de 14 a 30 horas), através de eliminação renal e biliar<sup>33,34</sup>. O grau de absorção cutânea é desconhecido<sup>35</sup>.

Na dermatologia, a colchicina foi empregada em diferentes indicações terapêuticas, tanto na via sistêmica ou tópica, dentre elas: psoríase vulgar, psoríase pustulosa generalizada, pustulose palmo plantar, vasculite de pequenos vasos, reação tipo II da hanseníase, doença de Behçet, dentre outras<sup>35</sup>.

A primeira descrição do uso da colchicina tópica para QA foi em 1968 por Marshall<sup>36</sup>. O primeiro ensaio clínico foi realizado em 2000, com a aplicação de colchicina 1% creme nas QAs, por até 10 dias, quando efeitos colaterais como eritema, crostas e erosões foram encontrados<sup>37</sup>. Até então, poucos estudos foram realizados<sup>29,31,36,37</sup>.

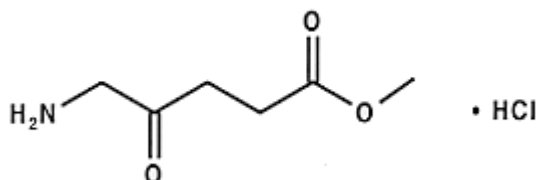
A colchicina já foi estudada nas concentrações de 0,5% e 1% em gel, sem diferenças estatísticas nos resultados e eventos adversos, com boa tolerabilidade. Apresentou redução das taxas de QAs em 77%, associada a satisfatório resultado estético pós-tratamento, com possibilidade de eritema discreto ou hipopigmentação<sup>29</sup>. Entretanto, faltam estudos que sistematizem a posologia e duração do tratamento, bem como avaliações comparativas com outras drogas já consagradas no tratamento das QAs<sup>31,32,33</sup>.

### 1.4 Terapia Fotodinâmica

A TFD é uma modalidade terapêutica utilizada por diversas especialidades oncológicas, que consiste em induzir citotoxicidade nas células proliferativas de um tumor através da emissão de uma fonte de luz e de localização dessa atividade por meio de um agente fotossensibilizante, podendo este ser oral ou tópico<sup>38-40</sup>.

Em dermatologia, a TFD destina-se ao tratamento de lesões pré-malignas e de tumores cutâneos não-melanoma, como o carcinoma basocelular superficial e doença de Bowen (CEC *in situ*). Além de seu uso na dermatologia oncológica, a TFD também é utilizada no tratamento de dermatoses inflamatórias como psoríase, doença de Darier, sarcoidose e necrobiose lipóidica<sup>41</sup>.

Para sua execução, o paciente deverá ser exposto previamente a um agente tópico fotossensibilizante. Os mais utilizados são o ácido 5-delta aminolevulinílico (ALA) e seu derivado lipofílico, o metil éster do ALA (MAL) (Figura 5). Este último é mais empregado por se utilizar de mecanismos de absorção não-saturáveis, com conseqüente maior penetração e maior absorção pelas células neoplásicas<sup>41,42</sup>.



**Figura 5:** Aminolevulinato de metila (Pharmazeutische zeitung online. Methyl-(5-amino-4-oxopentanoat) Metvix® Creme (Galderma Laboratorim)

Disponível em: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=185> – acesso em 29/05/17)

O MAL é precursor da protoporfirina IX, que gera espécies ativas de oxigênio nos queratinócitos displásicos, que são metabolicamente mais ativos, caso haja exposição oriunda de uma fonte de luz com comprimento de onda adequado<sup>42</sup>.

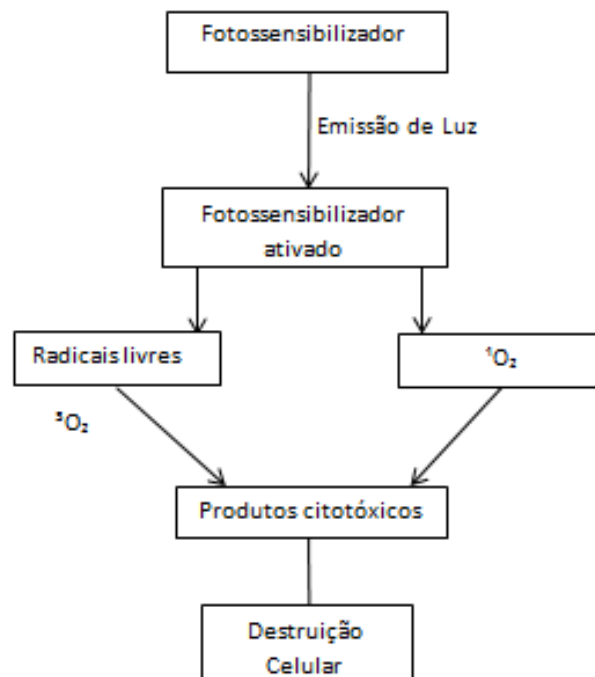
O MAL é administrado via tópica, na formulação em creme a 16%, e mantido sob oclusão durante três horas antes do procedimento. Passado esse período, o paciente é submetido à exposição de uma fonte de luz, que pode ser de três tipos: lâmpadas de amplo espectro, lâmpadas de diodo e lasers<sup>40</sup>.

As lâmpadas de diodo são fontes de luz de alta potência, que trabalham em faixas restritas de bandas de luz, podendo ser de luz azul ou vermelha<sup>38</sup>. Fontes de luz azul ativam o MAL com intensidade maior que fontes de luz vermelha<sup>43,44</sup>, enquanto esta apresenta maior penetração no tecido. No Departamento de Dermatologia da UNESP-Botucatu, a fonte utilizada é diodo emissor de luz vermelha (Figura 6).



**Figura 6:** Aparelho Aktelite Galderma – Diodo emissor de luz vermelha (disponível em: <http://www.galderma.se/Vara-produkter-/Produkter-ej-lakemedel/Aktelite> - acesso em 29/05/17)

No período de absorção, o MAL é demetilado a 5-ALA e este entra na cadeia de produção de protoporfirina IX, que se acumula nas células alteradas. Durante a emissão de luz, a protoporfirina IX é ativada. Essa ativação leva o oxigênio presente nos tecidos do estado de repouso (ou forma *triplet*) à forma ativa, de meia vida curta, denominada *singlet*. Em decorrência da presença do oxigênio *singlet*, as células passam a sofrer alterações de membrana (Figura 7), o que prejudica a permeabilidade e o transporte de substâncias, além de causar toxicidade às organelas citoplasmáticas, induzindo as células neoplásicas à apoptose<sup>40</sup>.



**Figura 7.** Representação esquemática TFD. (Fonte: adaptado de Piacquadio, 2004).

A TFD apresenta taxas de resposta de 81% para uma única sessão de TFD a 90% após duas sessões no tratamento das QAs, com efeitos adversos de curta duração e moderada intensidade, além de resultados estéticos satisfatórios<sup>30,44-46</sup>.

Até o momento, há poucos ensaios clínicos realizados com colchicina tópica e somente um estudo comparativo para tratamento para campo de cancerização cutâneo<sup>31</sup>, justificando a importância deste estudo.

## 1.5 Referências

1. Schmitt JV, Miot HA. Actinic keratosis: a clinical and epidemiological revision. *An Bras Dermatol* 2012;87:425-34.
2. Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2000;42:4-7.
3. Moy RL. Clinical presentation of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:8-10.
4. Olsen EA, Abernethy ML, Kulp-Shorten C et al. A double-blind, vehicle-controlled study evaluating masoprocol cream in the treatment of actinic keratoses on the head and neck. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 738-43.
5. Ianhez M, Junior LFFF, Bagatin E, et al. The reliability of counting actinic keratosis. *Arch Dermatol Res* 2013; 841-4.
6. Torezan LA, Festa-Neto C. Cutaneous field cancerization: clinical, histopathological and therapeutic aspects. *An Bras Dermatol* 2013; 88: 775-86.
7. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; 6: 963-8.
8. Szeimies RM, Torezan L, Niwa A, et al. Clinical, histopathological and immunohistochemical assessment of human skin field cancerization before and after photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 2012; 167: 150-9.
9. Ulrich C. Topical treatment of field cancerization. *Cancer Treat Res* 2009; 146: 439-46.

10. Kirby JS, Scharnitz T, Seiverling EV, et al. Actinic keratosis clinical practice guidelines: an appraisal of quality. *Dermatol Res Pract* 2015;2015:456071.
11. Ianhez M, Miot HA, Bagatin E. Liquid nitrogen for the treatment of actinic keratosis: a longitudinal assessment. *Cryobiology* 69.1 (2014):140-3.
12. Freeman RG, Knox JM, Heaton CL. The treatment of skin cancer. A statistical study of 1,341 skin tumors comparing results obtained with irradiation, surgery, and curettage followed by electrodesiccation. *Cancer*. 1964; 17:535-8.
13. Zane C, Facchinetti E, Rossi MT, et al. Cryotherapy is preferable to ablative CO2 laser for the treatment of isolated actinic keratoses of the face and scalp: A randomized clinical trial. *Br J Dermatol*. 2014; 170(5): 1114-21.
14. Segatto MM, Dornelles SI, Silveira VB, et al. Comparative study of actinic keratosis treatment with 3% diclofenac sodium and 5% 5-fluorouracil. *An Bras Dermatol* 2013; 88: 732-8.
15. Hagele TJ, Levender MM, Davis SA, et al. Practice trends in the treatment of actinic keratosis in the United States: 0.5% fluorouracil and combination cryotherapy plus fluorouracil are underused despite evidence of benefit. *J Cutan Med Surg* 2012; 16: 107-14.
16. Martin G. Prospective, case-based assessment of sequential therapy with topical Fluorouracil cream 0.5% and ALA-PDT for the treatment of actinic keratosis. *J Drugs Dermatol* 2011; 10: 372-8.
17. Testerman TL, Gerster JF, Imbertson LM, et al. Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *J Leukoc Biol* 1995; 58: 365-72.
18. Lebwohl M, Swanson N, Anderson LL, et al. Ingenol Mebutate Gel for Actinic Keratosis. *N Engl J Med*. 2012; 14; 366(11): 1010-9.
19. Ianhez M, Fleury LF, Jr., Miot HA, et al. Retinoids for prevention and treatment of actinic keratosis. *An Bras Dermatol* 2013; 88: 585-93.
20. Euvrard S, Verschoore M, Touraine JL, et al. Topical retinoids for warts and keratosis in transplant recipients. *Lancet* 1992; 340: 48-9.
21. Thompson SC, Jolley D, Marks R. Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. *N Engl J Med* 1993; 329: 1147-51.
22. Puviani M, Barcella A, Milani M. Efficacy of a photolyase-based device in the treatment of cancerization field in patients with actinic keratosis and non-melanoma skin cancer. *G Ital Dermatol Venereol* 2013;148: 693-8.
23. Carducci M, Pavone PS, De Marco G, et al. Comparative effects of sunscreens alone vs sunscreens plus DNA repair enzymes in patients with actinic keratosis: clinical and molecular findings from a 6-month, randomized, clinical study. *J Drugs Dermatol* 2015; 14(9): 986-90.
24. Witheiler DD, Lawrence N, Cox SE, et al. Long-term efficacy and safety of Jessner's solution and 35% trichloroacetic acid vs 5% fluorouracil in the treatment of widespread facial actinic keratoses. *Dermatol Surg*. 1997; 23(3): 191-6.
25. Bagatin E, Teixeira SP, Hassun KM, et al. 5-Fluorouracil superficial peel for multiple actinic keratoses. *Int J Dermatol*. 2009; 48(8): 902-7.
26. Harvey I, Frankel S, Marks R et al. Non-melanoma skin cancer and solar keratoses. I. Methods and descriptive results of the South Wales Skin Cancer Study. *Br J Cancer* 1996; 74:1302-7.
27. Kurwa HA, Young-Gee AS, Seed P, et al. A randomized paired comparison of photodynamic therapy and topical 5-fluorouracil in the treatment of actinic keratoses. *J Acad Dermatol* 1999; 41 (3); 414-18.
28. Wolf JE, Taylor JR, Tschen E, et al. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses. *Internat J Dermatol* 2001; 40 (11); 709-13.
29. Akar A, Bülent Taştan H, Erbil H et al. Efficacy and safety assessment of 0.5% and 1% colchicine cream in the treatment of actinic keratoses. *J Dermatolog Treat* 2001; 12(4): 199-203.
30. Pariser DM, Lowe NJ, Stewart DM, et al. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinic acid for actinic keratosis: Results of a prospective randomized multicenter trial. *J Amer Acad Dermatol* 2003; 48(2): 227-32.
31. Faghihi G, Elahipour A, Iraj F, et al. Topical colchicine gel *versus* diclofenac sodium gel for the treatment of actinic keratoses : a randomized , double-blind study. *Adv in Med*; 2016:6-11.
32. Konda C, Rao AG. Colchicine in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2010; 76: 201-5.
33. Falkson G. Some aspects of the use of cytostatic drugs in dermatology. *S Afr Med J* 1966; 40: 339-42.
34. Guy RH, Hadgraft J. Physicochemical aspects of percutaneous penetration and its enhancement. *Pharm Res*. 1988; 5(12): 753-8.
35. Sullivan TP, King LE, Jr., Boyd AS. Colchicine in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 993-9.
36. Marshall J. Treatment of solar keratosis with topically applied cytostatic agents. *Br J Dermatol* 1968;80:540-2.

37. Grimaire M, Etienne A, Fathi M. Topical Colchicine Therapy for Actinic Keratoses. *Dermatology* 2000; 200: 346-8.
38. Wegell SR. Update on photodynamic treatment for actinic keratosis. *Curr Probl Dermatol* 2015; 46: 122-8.
39. Morton CA, McKenna KE, Rhodes LE. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br J Dermatol* 2008; 159: 1245-66.
40. Torezan L, Niwa AB, Neto CF. Photodynamic therapy in dermatology: basic principles. *An Bras Dermatol* 2009; 84: 445-59.
41. Mitra A, Stables GI. Topical photodynamic therapy for non-cancerous skin conditions. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2006; 3: 116-27.
42. Braathen LR, Morton CA, Basset-Seguín N, et al. Photodynamic therapy for skin field cancerization: an international consensus. *International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology. J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; 26: 1063-6.
43. Kim HS, Yoo JY, Cho KH, et al. Topical photodynamic therapy using intense pulsed light for treatment of actinic keratosis: clinical and histopathologic evaluation. *Dermatol Surg* 2005; 31: 33-6.
44. Piacquadio DJ, Chen DM, Farber HF et al. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. *Arch Dermatol* 2004 Jan;140(1):41-6.
45. Hsi RA, Rosenthal DI, Glatstein E. Photodynamic therapy in treatment of cancer. *Drugs* 1999; 57(5): 725-34.
46. Tarstedt M, Rosdahl I, Berne B, et al. A randomized multicenter study to compare two treatment regimens of topical methyl aminolevulinate (Metvix)-PDT in actinic keratosis of the face and scalp. *Acta Derm Venereol* 2005; 85: 424-8.



## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia e segurança do creme de colchicina 0,5% duas vezes por dia por 10 dias *versus* TFD sessão única com cloridrato de aminulevulato de metila (MAL-TFD) no tratamento do campo de cancerização cutâneo em pacientes com múltiplas queratoses actínicas dos antebraços após 60 dias.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a melhora clínica das QAs através da quantificação da contagem de QAs, graduação de sua intensidade e escore de gravidade de QAs entre os tratamentos realizados;
2. Avaliar o aspecto do campo de cancerização através da escala de fotoenvelhecimento dos antebraços, entre os tratamentos realizados;
3. Avaliar a modificação do perfil de atipia histológica do campo de cancerização entre os tratamentos através do escore KIN;
4. Avaliar melhora da espessura epitelial entre os tratamentos;
5. Avaliar a modificação da expressão de p53 e Ki67 do campo de cancerização entre os tratamentos;
6. Avaliar a tolerabilidade através da preferência subjetiva e efeitos adversos dos tratamentos.

**3. MANUSCRITO**

**Formato:** British Journal of Dermatology

**Section:** Original article

**Title:** Efficacy and safety of colchicine 0.5% cream *versus* photodynamic therapy (methyl aminolevulinate) in the treatment of actinic keratosis and skin field cancerization of the forearms: a randomised controlled trial.

**Running head:** Colchicine *versus* photodynamic therapy in skin field cancerization.

**Counting:** words = 3021; tables = 3; figure = 1

**Authors:** AC Miola<sup>1</sup>, EF Roio<sup>1</sup>, TRR Lima<sup>2</sup>, JV Schmitt<sup>1</sup>, LPF Abbade<sup>1</sup>, HA Miot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology and Radiotherapy, FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Pathology, UNESP-Botucatu, São Paulo, Brazil

**Corresponding author:**

Anna Carolina Miola

Departamento de Dermatologia e Radioterapia

Botucatu Medical School - Unesp

Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n

Rubião Júnior, Botucatu/SP, Brasil, 18618-970

Mail address: anna\_fmnp@yahoo.com.br

What's already known about this topic?

- Photodynamic therapy is a known treatment for actinic keratosis and skin field cancerization
- There are trials with topical colchicine demonstrating its efficacy in the treatment of actinic keratoses
- There are no studies comparing colchicine with photodynamic therapy for the treatment of actinic keratosis and skin field cancerization

What does this study add?

- Topical colchicine decreases the activity of skin field cancerization
- Colchicine doesn't differ from photodynamic therapy in the treatment of skin field cancerization

**Summary**

**Background:** Skin field cancerization (SFC) is an epithelial zone with genomic alterations induced by UVR, and actinic keratosis (AK) is a sign of its activity. Several treatments may reduce the incidence of AK. Photodynamic therapy with methyl aminolevulinate (PDT-MAL) and topical colchicine were reported as effective in AK count reduction.

**Objective:** Evaluate efficacy and safety of colchicine 0.5% cream *versus* PDT-MAL in the treatment of AK and SFC.

**Patients and methods:** Randomised, open, intrasubject controlled clinical trial: 36 participants, with 3-10 AK in each forearm, treated with colchicine (COL) cream (b.i.d., 10 days) or a single session of PDT-MAL, they were reassessed after 60 days. Clinical evaluation was performed by AK count, forearm photoaging scale (FPS), AK degree (AKD) and AK severity score (AKSS). The subjects were biopsied in both central forearms and histopathological evaluation was performed through KIN assessment, epithelial atrophy and immunohistochemistry (p53 and Ki67).

**Results:** 50% were males, mean (sd) age of 70.9 (8.6) years and predominance of phototypes I and II (89%). Total clearance occurred in 6 (17%) of COL and 7 (19%) of PDT-MAL ( $p=0.76$ ); partial clearance was 44% in COL and 67% in PDT-MAL ( $p=0.07$ ). COL and PDT-MAL FPS (-6% vs -6%), AKSS (-65% vs -73%) and AKD (-45% vs -40%) were reduced ( $p<0.01$ ). KIN normalized in 28% of MAL-PDT patients and 20% in COL. Epithelial atrophy reduced after treatment ( $p<0.01$ ); Ki67 reduced 15% in COL and 9% in PDT-MAL ( $p<0.01$ ). There was no difference between groups for any of the variables above ( $p>0.07$ ). p53 was reduced 27% in COL and increased 4% in PDT-MAL ( $p<0.05$ ). Mild or moderate adverse effects were observed in 75% of COL patients and 69% of PDT-MAL.

**Conclusion:** Colchicine 0.5% cream and PDT-MAL are effective and safe in the treatment of SFC.

This study was recorded in the Brazilian Registry of Clinical Trials (REBEC no. RBR-8y3sj9).

**Keywords:** *Actinic keratosis, Chemoprevention, Colchicin, Dermatology, Field cancerization, Oncology, Photochemoterapy, Photodynamic therapy, Squamous cell carcinoma.*

## Introduction

Actinic keratosis (AK) is an atypical keratinocyte proliferation that can evolve to a squamous cell carcinoma (SCC) in up to 20% of the cases within ten years<sup>1,2</sup>.

Field cancerization is an area with genomic alterations induced by ultraviolet radiation (UVR). This concept was described in 1953 by Slaughter in oral squamous cell carcinoma, as an apparently normal tegument area with subclinical and multifocal changes, composed of genetically altered cells<sup>3</sup>. The skin field cancerization (SFC) concept suggests that the apparently normal skin adjacent to AKs is the basis for clonal expansion of genetically altered cells, which can explain the eruption of new AK, skin cancer (non melanoma) in same area as well as the local recurrence of neoplasms considered completely excised by histopathological analysis<sup>4,5</sup>.

The treatment for SFC has been extensively studied, because it can lead to reduce the incidence of AK and SCC in high risk patients<sup>6</sup>. Many treatment modalities for SFC are available, e.g. 5-fluorouracil (5FU)<sup>7</sup>, ingenol mebutate<sup>8</sup>, imiquimod<sup>9</sup>, tretinoin<sup>10</sup>, diclofenac<sup>11</sup> and photodynamic therapy<sup>12</sup>.

Colchicine is an antimetabolic agent, extracted from the plant *Colchicum autumnale*<sup>13</sup>, which binds to microtubular proteins and interfere with the activity of mitotic spindles<sup>14</sup>, interrupting mitosis at metaphase. Colchicine has been initially studied at concentration of 1% gel, twice daily, with adverse events reported after 10 days of use. It disclosed a significant reduction of AK counting<sup>15</sup>. Topical colchicine at 0.5% and 1% gel were studied in treatment of AKs, and showed a similar reduction up to 77% in AK counting, associated with satisfactory aesthetic results and low adverse events<sup>16</sup>.

Photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic modality applied by several oncological specialities<sup>17,18</sup>. PDT induces cytotoxicity in the proliferative cells through the emission of a light source after application of a photosensitizing agent (e.g. methyl aminolevulinate – MAL). A single treatment with PDT-MAL shows response rates up to 70-90% in the counting of AK. The adverse effects have short duration and they were of moderate intensity, as well as the aesthetic results were satisfactory<sup>19</sup>. To date, there is no study comparing colchicine with photodynamic therapy in the treatment of AK.

The purpose of this study was to evaluate the efficacy and safety of 0.5% colchicine cream, twice a day for ten days, versus MAL-PDT, single session, on field cancerization treatment in patients with multiple AK, by AK count, AK clinical degree and a score of AK severity. The secondary objectives were: evaluate the aspect of forearms by a photoaging scale<sup>20</sup>, the

histological atypia assessed as the keratinocyte intraepithelial neoplasia (KIN)<sup>21</sup>, epithelial atrophy, p53 and Ki67 expression<sup>22</sup>. Moreover, the adverse effects were observed, as the preference and tolerability of the treatments.

## Patients and methods

### PATIENTS

Fourty outpatients from a public dermatologic clinic at Unesp Medical School (Botucatu-SP, Brazil) over the age of 18 years-old, both sexes, with the clinical diagnosis of forearms AK (three to ten lesions) and without treatment to AK (except for sunscreen) for at least six months were enrolled in this study. Thirty six subjects of this group were randomized after signing informed consent (Anexo 1).

The exclusion criteria were: extensive skin diseases affecting the forearms, current clinical diagnosis or evidence of any medical condition that exposes patient to increased risk, interfere with safety or efficacy of proposed treatment; presence of hypersensitivity or allergy to the substances under study, use of topical or systemic immunosuppressive drug, oral retinoid, and other topical treatments (corticosteroids, anti-inflammatory drugs, retinoids), immunosuppression, coagulation disorders, pregnancy suspected or confirmed or women breast-feeding.

### STUDY DESIGN

This was an open, arm-randomised, intrasubject controlled clinical trial in which thirty six patients were treated with colchicine cream or MAL-PDT in each forearm.

This study was approved by the institutional board review (no. 1.356.401) and registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials (REBEC no. RBR-8y3sj9).

### STUDY OUTCOMES

Primary outcome: reduction in AK count of the forearms 60 days after treatment with MAL- PDT or colchicine.

Secondary outcome: The proportion of total AK clearance and partial (-50%) clearance of AK counting, reduction of activity of SFC aspect between the treatments analyzed by AK score, AK grades, AK severity score and the forearm photoaging scale; reduction of the histological atypia assessed through the KIN score and its normalization (KIN=0), the epithelial atrophy and the modification of p53 and Ki67 expression.

### PROCEDURES

The study units of analysis were each forearm in which treatment was randomised to the groups named as MAL-PDT and colchicine (COL).

In COL group, whole forearms were treated with colchicine 0.5% cream twice a day for 10 days, provided by a compounding pharmacy. In MAL-PDT, AK were curetted and the forearm occluded with methyl aminolevulinate 16% (Metvix®, Galderma Inc.) for three hours with PVC film and aluminum foil<sup>23</sup>, and after occlusion whole forearm has received one PDT session, with a light emitting diode (LED) of 630nm wavelength (Aktlite®, Galderma Inc) at a distance of five to eight centimeters from treated surface, for eight minutes, administered by the same researcher (ACM).

Each patient was followed for 60 days and instructed to apply in the forearms a broad spectrum (UVA and UVB) sunscreen SPF 30 (Nivea Sun®, Beiersdorf Inc.) three times along the day.

AK diagnosis was based on clinical and dermoscopic evaluation of a certified dermatologist. The areas of AK counting were delimited from the antecubital fossa to radiocarpal and radioulnar joints and biopsies were made in central region of each forearm, in an area without visible AKs or another cutaneous lesion.

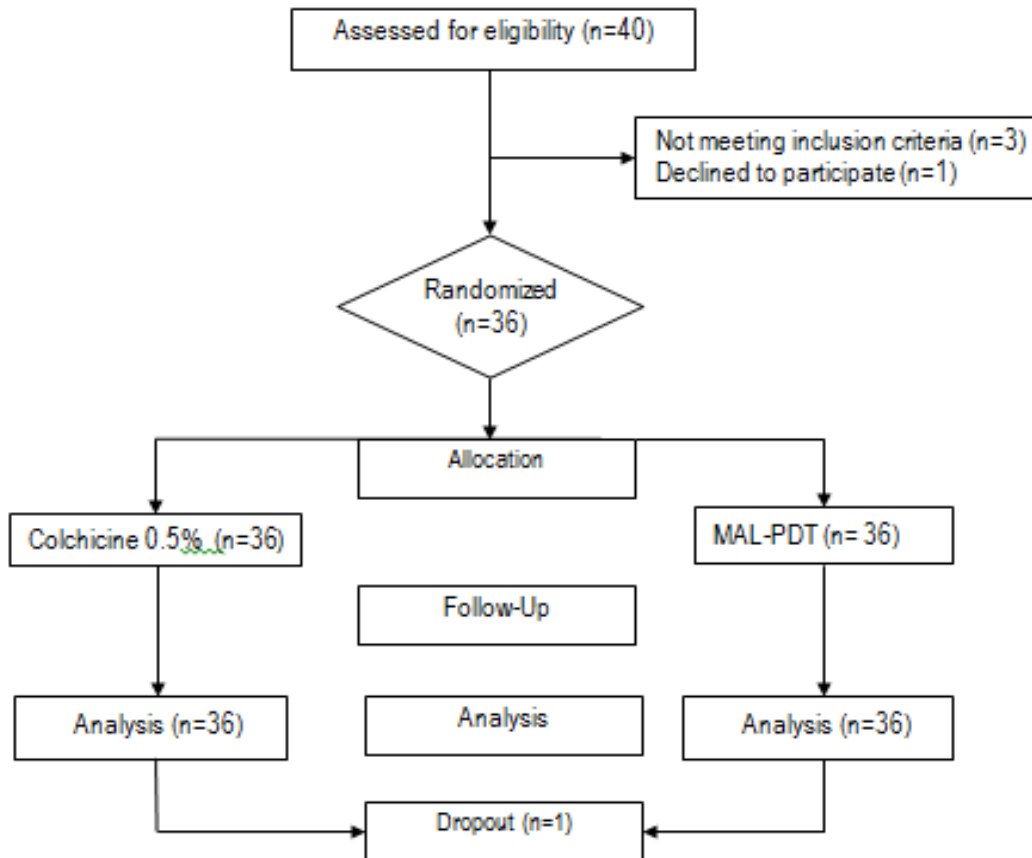
Participants were assessed at: T0 for inclusion, randomization, clinical evaluation (AKs count, AK grades, severity score of AK, photoaging scale), skin biopsy (bilateral) and the treatment onset; at T15 for assessment of adverse effects and preference; at T60 for clinical evaluation (AKs count, AK grades, severity score of AK, photoaging scale) and bilateral skin biopsy (figure 1).

The AK severity score was developed for this study (under validation-Anexo 4) and it allowed the evaluation of the intensity of the AKs present in skin. Its value was calculated by an index:  $(E+H+I)*D$ , of each AK. In this equation, E is erythema, H is hyperkeratosis, I is infiltration and D is diameter. The results of each AK are summed, resulting in a score of each forearm.

The AK were classified into three grades: Grade I (visible and slightly palpable), Grade II (visible and palpable) and Grade III (clearly visible and hyperkeratotic). Groups were compared after an individual standardization of AK clinical severity as the Grade I AK were added to Grade II x 2 and the Grade III x 3<sup>24</sup>.

The photoaging scale evaluated the skin chronically exposed to the sun through the following aspects: presence of superficial actinic keratoses, presence of hypertrophic actinic

keratoses, wrinkles, lentiginosis, visible purple, starred atrophic scars, loss of elasticity and elastosis, on a scale ranging from 0 to 192<sup>20</sup>.



**Figure 1:** Study Design. CONSORT flow chart.

#### SPECIMEN PROCESSING

The skin biopsies were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin blocks and submitted to histological sections of 4 $\mu$ m and stained by hematoxylin-eosin for histopathological evaluation of KIN score (*Keratinocyte Intraepithelial Neoplasia*) and epithelial atrophy. KIN classification is a way to classify the intensity of keratinocytes atypia by its presence in epidermis<sup>25</sup>. KIN I has focal atypia, with depolarization at basal stratum, or the lower third of keratinocytes; KIN II has depolarization at spinosum-granulosum strata; KIN III has depolarization in all epidermal strata. Epithelial atrophy was measured counting stacked keratinocytes in



epidermis (basal to granulous strata-epithelial layers). The assessment of KIN grade and epidermal atrophy were blinded to the groups of treatment.

For immunohistochemistry, histological sections of 4µm thickness were mounted on silanized slides (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, MO, USA) and subjected to immunohistochemical staining for detection of Ki67 (Cell Sig. Tech., Inc., Danvers, MA, USA, mouse mAb IgG1, #9449) or p53 (Cell Sig. Tech., Inc., Danvers, MA, USA, mouse mAb Ig2b, #48818). After sections deparaffinization and rehydration was performed the endogenous peroxidase blockade with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dinâmica® Ltda, Diadema, SP, BRA) followed by heat-induced antigen retrieval and protein blockade by treatment with milk. The sections were then incubated overnight at 4°C with the primary antibody diluted 1:300 or 1:150 for the Ki67 and p53 respectively. Signal amplification was performed by biotin-free polymer detection system using the MACH 4® universal HRP-Polymer kit (Biocare Medical, Pike Lane Concord, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Lastly, 3-3' diaminobenzidine (DAB Substrate kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used as a chromogenic substrate and the sections were counterstained with Harris hematoxylin. Histological sections of mammary carcinoma were used as a positive control.

The epithelial expression of p53 and Ki67 was evaluated (T0 and T60) from the HSCORE, calculated in a central field (objective 40x) of the epithelium<sup>26</sup>. The nuclei were categorized individually according to staining as strong, medium, weak and stain-free, in order to determine the HSCORE. Manual counting of stained nuclei was performed by a researcher blinded to sample origin. HSCORE is a method for assessing the extent of nuclear immunoreactivity, applicable to steroid receptors. The calculus of score is: 3x the percentage of strongly staining nuclei + 2x the percentage of moderately staining nuclei + 1x the percentage of weakly staining nuclei, giving a range from 0 to 300.

#### RANDOMIZATION AND BLINDING

Subjects were eligible after clinical evaluation and included by convenience. Their forearms were randomized by computer simulation (block randomization) for treatment with colchicine 0.5% cream, or MAL-PDT (Anexo 3). Inclusion was proceeded consecutively, by convenience to the scheduled patients in the dermatologic clinic. This study was blinded only to the histopathological evaluation regarding the treatment group (COL-MAL-PDT) and phase (T0-T60).

#### STATISTICAL ANALYSIS

All participants included in study and randomized were part of ITT group (intention to treat)<sup>27</sup>. Data analysis were performed for ITT population<sup>28</sup> and the dropouts were imputed as the last visit outcomes (LOCF)<sup>29</sup>.

Categorical variables were represented by their percentages. Continuous variables were assessed for normality using the Shapiro-Wilk test and represented by means and standard deviations or medians and quartiles (p25-p75), if indicated<sup>30</sup>.

AK counting, AK grade, AK severity scale, forearms photodamage scale and the analysis of the histopathologic data were compared according to time and to the groups (over time) by linear mixed-effects model with robust covariance matrix and probability adjustment for each distribution. *Post-hoc* analysis was performed by sequential Sidak procedure.

Data were tabulated in Microsoft Excel 2013, and statistical analysis were performed in SPSS 22.0. Two-tailed p value <5% was set as significant<sup>31</sup>.

The sample size was dimensioned in order to detect a reduction difference of more than 10% between the groups and standard deviation of the equivalent differences. The power of 0.9, alpha of 0.05, and dropout of 10% were adopted, resulting in 36 patients (72 forearms)<sup>32</sup>.

## Results

### PATIENTS

Between May 2016 and March 2017, 40 patients were eligible, of whom 36 were treated with MAL-PDT or COL in each forearm, after randomization (figure 1). Only one subject was not present at the final (T60) evaluation (dropout) due to the impossibility to contact her after several attempts.

Pretreatment AK counting, AK grades, photoaging scale or AK severity did not differ between the groups (p>0.28). The main demographic characteristics of participants are disclosed in table 1.

**Table 1:** Main demographics and baseline characteristics of patients (n=36).

Age(years)*mean (sd)		70.9 (8.6)
Sex, n (%)		
	Male	18 (50)
	Female	18 (50)
Fitzpatrick skin phototype, n (%)		
	I	11 (30.5)
	II	21 (58.4)
	III	4 (11.1)
Chronic sun exposure, n (%)		33 (92)

AK count was reduced in 45% and 40% in COL group and MAL-PDT group, respectively. Both groups disclosed reductions ( $p < 0.01$ ) at all endpoints regarding the time of follow-up (table 2). There was a reduction of AK severity score in 65%, photoaging scale in 6%. In MAL-PDT group, there was found a reduction of AK severity score (73%) and photoaging scale (6%). No differences were found between the groups in any tested variable ( $p \geq 0.24$ ).

Total clearance occurred in 6 (17%) of COL group and 7 (19%) of MAL-PDT group ( $p = 0.76$ ). Partial (>50%) clearance was achieved by 16 (44%) of COL forearms and 24 (67%) MAL-PDT ( $p = 0.07$ ).

At histopathologic analysis, epithelial thickness reduced after 60 days of treatment (table 2) and was observed regularization of KIN of 20% in COL group and 28% in MAL-PDT group. In Ki67 HSCORE analysis, there was a reduction of 15% in COL and 9% in MAL-PDT. These results were significant after 60 days of treatment ( $p < 0.001$ ), but without difference between them ( $p > 0.32$ ). In p53 HSCORE, there was a reduction of 27% in COL and an increase of 4% in MAL-PDT, with statistical significance between the groups ( $p < 0.05$ ).

**Table 2:** Clinical and histopathological results of MAL-PDT and COL (T0 - T60).

Variables	COL T0	COL T60	MAL-PDT T0	MAL-PDT T60	p (time)	p (group*time)
AK Count*	5 (4-6)	3 (1-4)	6 (4-7)	3 (1-4)	<0.01	0.56
AK severity score*	5.1 (2.4-8.3)	1.8 (0.5-3.3)	4.7 (2.6-8.0)	1.3 (0.4-2.4)	<0.01	0.24
AK clinical subtypes*	I 2 (1-4) II 3 (2-4) III 0 (0-0)	1 (0-3) 1 (0-2) 0 (0-0)	2 (0-4) 3 (1-5) 0 (0-0)	1 (1-2) 1 (1-3) 0 (0-0)	<0.01	0.46
Photodamage scale*	84 (73-103)	79 (66-95)	84 (70-105)	80 (65-93)	<0.01	0.87
Predominant KIN**	0 2 (6) I 9 (25) II 25 (69) III 0 (0)	7 (20) 12 (33) 13 (36) 4 (11)	2 (6) 8 (22) 25 (69) 1 (3)	10 (28) 9 (25) 16 (44) 1 (3)	<0.01	0.35
Epithelial layers*	4 (3.5-4)	4 (4-4.5)	4 (3.25-4)	4 (4-4.5)	<0.01	0.58
Ki67 HSCORE***	49.4 (15.5)	41.9 (14.3)	50.0 (20.4)	38.0 (18.0)	<0.01	0.32
p53 HSCORE*	37.8 (23.2-63.2)	27.7 (21.9-51.8)	36.5 (17.4-55.9)	38.3 (18.6-71.8)	0.31	<0.05

\* median (p25-p75); \*\* n (%); \*\*\* mean(sd)

**Safety and tolerability**

There were adverse events (AE) reported in both groups. In COL, 27 patients (69%) related AE, *versus* 24 (67%) in MAL-PDT. Most of AE were mild (69%). No serious AEs were reported. In MAL-PDT group, the most AE reported was erythema and crusts, in 2% of the patients only, followed by peeling (1%) and edema, with only one affected patient. In COL group, AE most frequently found were: erythema (12%), crusts (5%), peeling (4%) and edema (4%). There was no difference in AE frequency between the groups ( $p=0.34$ ) (table 3).

At T15, 60% patients preferred MAL-PDT, 28% preferred COL and 12% have no preference between two treatments ( $p=0.06$ ).

**Table 3:** Adverse events 15 days after treatment

Adverse Events - n(%)	COL group	MAL-PDT group
<b>Absent</b>	9 (25)	12 (33)
<b>Mild</b>	26 (72)	24 (67)
<b>Moderate</b>	1 (3)	0 (-)
<b>Severe</b>	0 (-)	0 (-)

**Discussion – Conclusions**

This study indicates that 0.5% colchicine cream and MAL-PDT are effective in the treatment of SFC, without significant difference between them.

Topical colchicine has already been studied in other cutaneous diseases, and also for the treatment of AK in concentrations from 0.5% to 1%, with reduction of up to 77% in the AK count<sup>15,16</sup>. The most recent trial with colchicine compared it with topical diclofenac 3%, b.i.d during 6 weeks, and it has demonstrated efficacy of approximately 50% in reduction of the area of the AKs, with good aesthetic results and without significant AE, in agreement with our results<sup>33</sup>.

Conversely, MAL-PDT has been extensively studied in the last decade, with good results in SFC treatment, reduction of recurrences of premalignant lesions and non-melanoma skin cancer. Moreover, it requires fewer treatments and few side effects, as well as aesthetic satisfactory results. Nevertheless, it is an expensive treatment for field cancerization and can cause variable local pain along each PDT session<sup>34</sup>.

One single session of MAL-PDT seems to be enough to treat thin AK, with responses up to 81%. However, two sessions of MAL-PDT are recommended for the hyperkeratotic lesions<sup>35</sup>,

and with an interval of one week presents reduction of AK counting up to 89%, with low recurrence of the lesions. However, our patients have different grades of AK, but not only thin ones, which decreases the comparability of our results with other studies.

Sunscreen can also reduce AK counting and stabilize SFC. In a double-blind controlled study with a SPF 17 sunscreen during six months, there was a reduction of 24% in AK counts, in comparison to 18% in placebo, which means that regular sunscreen may help to reduce the AK incidence and consequently treat the SFC<sup>36</sup>. In our study, all subjects were oriented to use sunscreen SPF 30 regularly and had received sunscreen during the following. This procedure can improve the final results of any AK treatment.

AKs can evolve to reduction or self-resolution in up to 21% of the cases within one year of follow-up<sup>37</sup>, which can influence the reduction of AK count in any trial. Nonetheless, it is advisable to treat all AKs and the whole SFC because there is a risk of 5-20% to evolve to a squamous cell carcinoma<sup>1,2</sup>.

Both MAL-PDT and colchicine have mild or moderate AE in a predictable proportion of patients, easily resolved, in agreement with previously published results in the literature. However, MAL-PDT was preferred, with marginal significance, probably due to reduced AE, pain only during red light exposure and good aesthetic results within 15 days. Additionally, a single MAL-PDT session can be more affordable than 10 days of colchicine home use one.

AKs are the main clinical manifestation of SFC, and most researchers consider its counting as a proxy measurement of the field cancerization activity<sup>38</sup>. Meanwhile, AK counting and clinical degree of AK were the most largely used outcome for treatment assessment in clinical trials. Moreover, to date, there is no consensus about molecular markers of SFC activity.

Epidermal atrophy and loss of nuclear polarization are hallmarks of photoaging and evidences chronic sun exposure. The reversion of these parameters by both treatments are evidence of their effects on keratinocyte proliferation and stabilization of their atypia. Those findings were also reported after MAL-TFD<sup>5</sup>. Upper dermis abnormalities (e.g. elastosis, mastocytes and vascularization) were not assessed in this study, as its purpose was to explore the epidermal cancerization.

Alterations in nuclear p53 expression are found in most human cancers<sup>39</sup> and they are also present in many cases of skin cancer, as well as these alterations can be found in SFC<sup>40,41</sup>. Epidermal p53 expression is increased by sun exposure and can last up to 360h after the exposure, in order to repair DNA damage and provide apoptosis to severe genomic damaged

cells<sup>42</sup>. Another previous study with PDT-MAL in SFC also assessed the expression of p53 and disclosed just a slight decreased expression, without significant difference<sup>4,5</sup>, that reinforces our findings regarding less effect of p53 due to PDT-MAL. The repercussion of this finding in carcinogenesis at 6-month follow-up is warranted.

Ki67 nuclear expression was studied previously in skin neoplasms and it is evidenced in AK, Bowen's disease, SCC and basal cell carcinoma. It indicates a rate of epithelium proliferation and a patterned expression in epidermis in each neoplasm was described<sup>41,43</sup>. To date, there is no study describing ki67 expression in the activity of SFC. In our results, only the quantification of Ki67 was analyzed, but the pattern of SFC Ki67 expression is warranted.

In general, both Ki67 and p53 are related to the degree of malignancy in cutaneous neoplasms. The quantitative and qualitative longitudinal evaluation of Ki67 and p53 epidermal expression can suggest either proliferative and proapoptotic activity. Our results suggest that these markers can help to assess the activity of SFC.

This study has some limitations: it is monocentric, originated from a public service, which minimizes the generalization of the results. On the other hand, these characteristics improve its internal validity because it provides homogeneity between groups.

Forearms AK and SFC as well as the skin structure and photoexposure regimen are different in the face, upper chest and scalp. This can lead to a different natural history of cancerization as a different pattern of treatment response. For this reason, the results of clinical trials performed in other body topographies should not be directly compared to the results of forearms. We also believe that trials enrolling patients with low-grade AK or a less active SCF can show more favorable results to any treatment.

Colchicine cream is a low cost drug, with good efficacy and safety profiles and can be a suitable therapeutic strategy in cutaneous oncology. Other regimens, vehicles and concentrations should be investigated to optimize drug performance, with better tolerability profile.

#### **Acknowledgements:**

We would like to thank to Paulo Roberto Cardoso, official of TOXICAM (Department of Pathology-UNESP-Botucatu), for its professionalism and care with the histopathological materials.

## References

1. Schmitt JV, Miot HA. Actinic keratosis: a clinical and epidemiological revision. *An Bras Dermatol* 2012; 87: 425-34.
2. Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2000; 42: 4-7.
3. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; 6: 963-8.
4. Torezan LA, Festa-Neto C. Cutaneous field cancerization: clinical, histopathological and therapeutic aspects. *An Bras Dermatol* 2013; 88: 775-86.
5. Szeimies RM, Torezan L, Niwa A, et al. Clinical, histopathological and immunohistochemical assessment of human skin field cancerization before and after photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 2012; 167: 150-9.
6. Ulrich C. Topical treatment of field cancerization. *Cancer Treat Res* 2009; 146:439-46.
7. Hagele TJ, Levender MM, Davis SA, et al. Practice trends in the treatment of actinic keratosis in the United States: 0.5% fluorouracil and combination cryotherapy plus fluorouracil are underused despite evidence of benefit. *J Cutan Med Surg* 2012;16:107-14
8. Lebwohl M, Swanson N, Anderson LL, et al. Ingenol mebutate gel for actinic keratosis. *N Engl J Med*. 2012; 366 (11):1010–9.
9. TL Testerman, JF Gerster, LM Imbertson, et al. Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *J Leukoc Biol* 1995; 58:365–72.
10. Ianhez , Fleury LF, Jr., Miot HA, et al. Retinoids for prevention and treatment of actinic keratosis. *An Bras Dermatol* 2013;88:585-93.
11. Wolf JR, Taylor JR, Tschen E. Topical 3% diclofenac in 5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol* 2001; 40:709–13.
12. Morton CA, McKenna KE, Rhodes LE. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br J Dermatol* 2008;159:1245-66.
13. Konda C, Rao AG. Colchicine in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2010;76:201-5.
14. Falkson G. Some aspects of the use of cytostatic drugs in dermatology. *S Afr Med J* 1966;40:339-42.
15. Grimaire M, Etienne A, Fathi M. Topical colchicine therapy for actinic keratoses. *Dermatology* 2000;200:346–8.
16. Akar A, Bülent Taştan H, Erbil H et al. Efficacy and safety assessment of 0.5% and 1% colchicine cream in the treatment of actinic keratoses. *J Dermatolog Treat*. 2001;12(4):199–203.
17. Wiegell SR. Update on photodynamic treatment for actinic keratosis. *Curr Probl Dermatol* 2015;46:122-8.
18. Torezan L, Niwa AB, Neto CF. Photodynamic therapy in dermatology: basic principles. *An Bras Dermatol* 2009;84:445-59.
19. Braathen LR, Morton CA, Basset-Seguín N, et al. Photodynamic therapy for skin field cancerization: an international consensus. *International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology. J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26:1063-6.
20. Guimaraes CO, Bagatin E, Guadanhim LR, et al. Development and Validation of a Clinical Scale for the Evaluation of Forearm Skin Photoaging. *J Cutan Med Surg* 2015; 19: 380-7.
21. Anwar J, Wrone DA, Kimyai-Assadi A, et al. The development of actinic keratosis into invasive squamous cell carcinoma: Evidence and evolving classification schemes. *Clin in Dermatol* 2004; 22(3):189–96.
22. Brianezi G, Minicucci EM, Marques ME, et al. Evaluation epidermal p53 immunostaining by digital image analysis. *Skin Res Technol* 2013;19: e108-12.
23. Issa MCA, Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: literature review and iconografic documentation. *An Bras Dermatol*. 2010;85(4):501-11.
24. Olsen EA, Abernethy ML, Kulp-Shorten C et al. A double-blind, vehicle-controlled study evaluating masoprocol cream in the treatment of actinickeratoses on the head and neck. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 738–43.
25. Cockerell CJ. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma (“actinic keratosis”). *J Am Acad Dermatol*. 2000;42(1 pt 2):11–7.



26. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, et al. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(5): 2309-17.
27. Bagatin E, Miot HA. How to design and write a clinical research protocol in Cosmetic Dermatology. *An Bras Dermatol* 2013; 88: 69-75.
28. Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics: the bare essentials*: Bc Decker Hamilton; 2008.
29. Siddiqui O, Ali MW. A comparison of the random-effects pattern mixture model with last-observation-carried-forward (LOCF) analysis in longitudinal clinical trials with dropouts. *Journ of Biopharm Stat* 1998; 8(4): 545-63.
30. Miot, HA. Assessing normality of data in clinical and experimental trials. *J Vasc Bras*. 2017(ahead of print)
31. SPSS. *IBM SPSS statistics for Windows, version 24*. New York: IBM Corp 2016.
32. Overall JE, Doyle SR. Estimating sample sizes for repeated measurement designs. *Control Clin Trials*. 1994;15(2):100-23.
33. Faghihi G, Elahipour A, Iraj F, et al. Topical colchicine gel versus diclofenac sodium gel for the treatment of actinic keratoses: A Randomized, Double-Blind Study. *Adv in Med*;2016:6–11.
34. Togsverd-Bo K, Lerche C, Poulsen T, et al. Photodynamic therapy with topical methyl- and hexylaminolevulinate for prophylaxis and treatment of UV-induced SCC in hairless mice. *Exp Dermatol* 2010; 19: e166–72.
35. Tarstedt M, Rosdahl I, Berne B, et al. A randomized multicenter study to compare two treatment regimens of topical methyl aminolevulinate (Metvix)-PDT in actinic keratosis of the face and scalp. *Acta Derm Venereol* 2005; 85: 424–8.
36. Thompson SC, Jolley D, Marks R. Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. *N Engl J Med* 1993; 329:1147-51.
37. Harvey I, Frankel S, Marks R et al. Non-melanoma skin cancer and solar keratoses. I. Methods and descriptive results of the South Wales Skin Cancer Study. *Br J Cancer* 1996; 74:1302–7.
38. Ianhez M, Junior LFFF, Bagatin E, et al. The reliability of counting actinic keratosis. *Arch Dermatol Res* 2013;841–4.
39. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53 Mutations in Human Cancers. *Science*, 1991; 253:49-53.
40. Batinac T, Zamolo G, Jonjić N, et al. p53 protein expression and cell proliferation in non-neoplastic and neoplastic proliferative skin diseases. *Tumori*, 2004, 90(1): 120–7.
41. Marinescu A, Ștepan AE, Margaritescu C, et al. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Rom J Morphol Embryol* 2016, 57(2):691–6.
42. Hall PA, McKee PH, Menage HD, et al. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene*.1993;8(1):203-7.
43. Taghini S, Halimi M, Baybordi H. Expression of P27, Ki67 and P53 in squamous cell carcinoma, actinic keratosis and Bowen disease. *Pak J Biol Sci* 2009, 12(12):929-33.

#### 4. CONCLUSÕES

Colchicina 0,5% creme duas vezes por dia por 10 dias e sessão única de MAL-TFD foram eficazes e seguras no tratamento do campo de cancerização cutâneo.

Ambos os tratamentos promoveram redução do escore de gravidade das QAS, da intensidade de QAs e do número de QAs, sem diferença entre os grupos.

Ambos os tratamentos promoveram melhora do aspecto do campo de cancerização através da redução da escala de fotoenvelhecimento dos antebraços, sem diferenças entre si

À análise histopatológica, houve redução do KIN escore e melhora da espessura epitelial em ambos os grupos, também sem diferenças entre si.

À análise imunohistoquímica, houve redução da expressão de Ki67 em ambos os grupos, sem diferenças entre si; a expressão de p53, entretanto, reduziu no grupo COL e aumentou no grupo TFD, de forma estatisticamente significativa.

Colchicina e a TFD apresentaram baixo perfil de efeitos adversos com adequada tolerabilidade.

Mais pacientes preferiram o tratamento com TFD que COL.

## 5. PERSPECTIVAS

O campo de cancerização cutâneo vem sendo intensamente estudado com o objetivo de contribuir para a prevenção de novas neoplasias cutâneas, e conseqüentemente reduzir a morbimortalidade em populações de risco, expostas a altas taxas de radiação UV, cronicamente, sem fotoproteção, principalmente entre os mais idosos, os quais são mais acometidos por tumores cutâneos não-melanoma.

Apesar dos inúmeros estudos na área, ainda não há uma forma objetiva e uniforme de avaliação da atividade do campo de cancerização. A contagem de QA é a forma mais utilizada; entretanto, ainda não há uma padronização na contagem de QAs para definir um campo de cancerização em atividade, gerando controvérsias entre os estudiosos na área.

Marcadores moleculares da atividade do campo de cancerização também são conflituosos na literatura, e devem ser melhor explorados (p.ex. survivina, dímeros de pirimidina, tenascina-C). Ademais, o desenvolvimento de uma escala de contagem de QAs (sob validação) que possa refletir as alterações moleculares do epitélio afetado deve facilitar a estratificação do risco individual e a condução de ensaios clínicos comparativos mais breves.

Estratégias de desenvolvimento de novos parâmetros, sejam clínicos ou laboratoriais, para a detecção precisa de um campo de cancerização em atividade poderão contribuir para o desenvolvimento de protocolos padronizados de tratamento e seguimento desses pacientes, com conseqüente redução de novas neoplasias cutâneas e de sua gravidade; de tal forma que as cirurgias sejam menos mutilantes e o risco de recorrências e metástases menor, com evidentes ganhos no sistema de saúde e, principalmente, na qualidade de vida dos pacientes expostos ao risco.

Finalmente, alternativas de baixo custo e boa aderência para o tratamento do campo de cancerização, que superem os efeitos conhecidos dos filtros solares, devem ser incentivados a fim de difundir suas opções terapêuticas, especialmente, entre pacientes menos favorecidos. A exploração de combinações de tratamentos de campo (p.ex. 5FU+calcipotriol, 5FU+COL), vias de aumento de disponibilidade epitelial (p.ex. *drug delivery*) ou regimes posológicos intermitentes, devem ser explorados a fim de maximizar os efeitos e aumentar a aderência.

**ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

(TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO À RESOLUÇÃO 466/12 – CNS-MS)

Você foi atendido(a) no ambulatório geral de dermatologia da Unesp e convidado a participar do projeto de pesquisa chamado **EFICÁCIA E SEGURANÇA DO CREME DE COLCHICINA 0,5% VERSUS TERAPIA FOTODINÂMICA COM AMINOLEVULINATO DE METILA NO TRATAMENTO DO CAMPO DE CANCERIZAÇÃO CUTÂNEO: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**, que pretende comparar o efeito de duas formas de tratamento para as lesões pré-malignas dos seus antebraços (chamadas queratoses actínicas): colchicina em creme e a terapia fotodinâmica.

A pesquisa consta em avaliar seus antebraços, realizar uma biópsia (remoção de um pequeno fragmento de pele) e, submeter cada antebraço a um dos tratamentos, para comparação. Ambos os tratamentos são efetivos, ou seja, você estará em tratamento de qualquer forma.

Para a terapia fotodinâmica, um dos antebraços receberá um creme e será envolvido por um filme por 3h, depois, receberá um banho de uma luz especial por 8 minutos, para destruir as lesões. Esse procedimento causa dor durante a aplicação da luz.

Para o tratamento com colchicina, um outro creme será fornecido para aplicação noturna em um dos antebraços, por dez dias consecutivos.

Nos dias seguintes, as áreas tratadas devem evoluir com vermelhidão, inchaço e pequenos ferimentos nas áreas doentes. Durante 60 dias após o início do tratamento, você deve usar um filtro solar fornecido pelos pesquisadores.

Após 60 dias do tratamento, você será reavaliado, de forma semelhante à avaliação anterior, e um novo fragmento de pele dos seus antebraços serão removidos, para comparação. As biópsias são realizadas com anestesia local, o que pode gerar um leve desconforto no local, durante o procedimento.

Caso você não queira participar da pesquisa, é seu direito e isso não vai interferir com o seu tratamento ou a preferência de agendamento médico.

Caso você precise de orientação, ou auxílio médico decorrente do atendimento nesse ambulatório, deve procurar o responsável pela pesquisa, Dr. Hélio Miot, no ambulatório de dermatologia da Unesp Botucatu, fone (14) 3811-6167.

Você poderá entrar em contato com o CEP através dos telefones: 3880-1608 ou 3880-1609 para quaisquer informações adicionais sobre este estudo.

Uma via desse termo de consentimento deve ser guardada com o sujeito da pesquisa, e outra será arquivada junto ao pesquisador.

**CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA**

Nome:..... Assinatura:.....

Prof. Hélio Amante Miot Data:...../...../..... Assinatura:.....

Pesquisador: Hélio Amante Miot, Rua Manoel Fernandes Cardoso, 690, casa 14. Fone: (14)3882-4922.  
E-mail: heliomiot@uol.com.br. CEP

**ANEXO 2: Randomização dos antebraços dos pacientes**

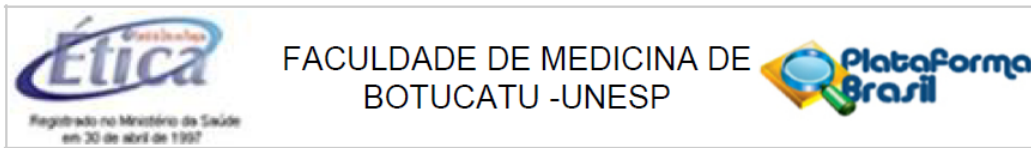
Ordem do paciente	Randomização	Antebraço direito	Antebraço Esquerdo
1	0.13	COLCHICINA	TFD
2	0.49	COLCHICINA	TFD
3	0.79	TFD	COLCHICINA
4	0.19	COLCHICINA	TFD
5	0.95	TFD	COLCHICINA
6	0.88	TFD	COLCHICINA
7	0.64	TFD	COLCHICINA
8	0.07	COLCHICINA	TFD
9	0.18	COLCHICINA	TFD
10	0.77	TFD	COLCHICINA
11	0.37	COLCHICINA	TFD
12	0.27	COLCHICINA	TFD
13	0.89	TFD	COLCHICINA
14	0.56	TFD	COLCHICINA
15	0.92	TFD	COLCHICINA
16	0.45	COLCHICINA	TFD
17	0.10	COLCHICINA	TFD
18	0.95	TFD	COLCHICINA
19	0.82	TFD	COLCHICINA
20	0.87	TFD	COLCHICINA
21	0.47	COLCHICINA	TFD
22	0.20	COLCHICINA	TFD
23	0.45	COLCHICINA	TFD
24	0.23	COLCHICINA	TFD
25	0.01	COLCHICINA	TFD
26	0.81	TFD	COLCHICINA
27	0.49	COLCHICINA	TFD
28	0.32	COLCHICINA	TFD
29	0.48	COLCHICINA	TFD
30	0.44	COLCHICINA	TFD
31	0.11	COLCHICINA	TFD
32	0.36	COLCHICINA	TFD
33	0.94	TFD	COLCHICINA
34	0.89	TFD	COLCHICINA
35	0.90	TFD	COLCHICINA
36	0.80	TFD	COLCHICINA

**ANEXO 3: Escala de fotoenvelhecimento dos antebraços**

Item	Graus de Severidade					Fator Multiplicador
	0	1	2	3	4	
Queratose actínica (superficial)	Nenhuma	1-2	3-5	6-10	>10	x 4
Queratose actínica (hipertrófica)	Nenhuma	1	2	3	> 3	x 1
Rugas	Nenhuma	Raras e finas	Múltiplas e finas	Múltiplas, finas e profundas, porém localizadas	Múltiplas, profundas e difusas	x 9
Lentiginoses	0-4	5-10	11-20	21-25	>25	x 4
Púrpura visível	Nenhuma	Sim	x	X	x	x 2
Cicatrizes Atróficas Estreladas	Nenhuma	Sim	x	X	x	x 4
Elastose	Ausente	Localizada	Difusa	x	x	x 8
Perda de elasticidade	Ausente	Localizada	Difusa	x	x	x 16

**ANEXO 4: Escala de Gravidade de Queratoses Actínicas**

Lesão	Eritema (0, 1 e 2)	Hiperqueratose (0, 1 e 2)	Infiltração (0 e 1)	Diâmetro (cm)	Escore final (E+H+I)*Dm
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					
<b>TOTAL</b>					



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** EFICÁCIA E SEGURANÇA DO CREME DE COLCHICINA 0,5% VERSUS TERAPIA FOTODINÂMICA COM AMINOLEVULINATO DE METILA NO TRATAMENTO DO CAMPO DE CANCERIZAÇÃO CUTÂNEO: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

**Pesquisador:** Anna Carolina Miola

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 50459315.3.0000.5411

**Instituição Proponente:** Departamento de Patologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.356.401

#### Apresentação do Projeto:

Projeto bem apresentado e descrito.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eficácia e segurança do creme de colchicina 0,5% em comparação à terapia fotodinâmica (TFD) com cloridrato de aminolevulato de metila (MAL-TFD) no tratamento do campo de cancerização em pacientes com múltiplas queratoses actínicas.

Objetivos específicos: Avaliar a melhora clínica das queratoses actínicas, o aspecto do campo de cancerização; a modificação do perfil de atipia histológica; a expressão de p53 e Ki67; e a tolerabilidade dos tratamentos.

Ambos os tratamentos têm sido utilizados na prática clínica. Na Unesp de Botucatu, os tratamentos mais empregados são a crioterapia com nitrogênio líquido, 5-fluoracil ou TFD.

O ensaio clínico será aberto, randomizado, comparativo e autocontrolado.

Serão incluídos 45 pacientes imunocompetentes, maior de 18 anos de idade, com mínimo de três e máximo de dez lesões compatíveis com queratose actínica em cada antebraço, selecionados durante atendimento no Ambulatório Oncológico do serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no período de março a setembro de 2016.

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**CEP:** 18.618-970

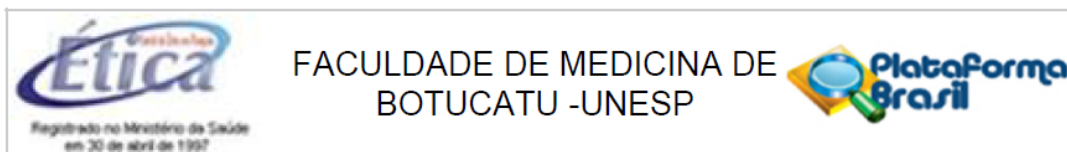
**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br





Continuação do Parecer: 1.356.401

Critérios de inclusão, de exclusão e de descontinuação do estudo, e desfechos primários e secundários estão adequadamente descritos.

Os pacientes serão submetidos a biópsia cutânea sob anestesia local infiltrativa nos dias 0 e 90 e submetidos a questionários para avaliação da segurança e eficácia dos tratamentos. O estudo terá duração de 90 dias e incluirá 3 momentos de avaliação.

Cada antebraço será submetido a um tipo de tratamento.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Benefícios do estudo estão adequadamente descritos - o tratamento das lesões ainda não está bem estabelecido na literatura.

Riscos estão bem descritos no TCLE.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto tem relevância em sua área. Deverá ser solicitado auxílio financeiro a agência de pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos e autorizações estão adequados.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto em condições de ser aprovado pelo CEP.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto de pesquisa APROVADO, deliberado em reunião do CEP de 07/12/2015, sem necessidade de envio à CONEP.

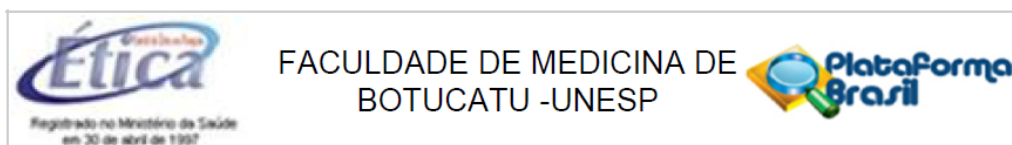
Lembramos que ao final da execução do projeto, é necessário enviar o "Relatório Final de Atividades".

Essa documentação deve ser enviada via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO"

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_591516.pdf	26/10/2015 17:55:17		Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	26/10/2015 17:52:50	Anna Carolina Miola	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	26/10/2015	Anna Carolina	Aceito

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n  
**Bairro:** Rubião Junior **CEP:** 18.618-970  
**UF:** SP **Município:** BOTUCATU  
**Telefone:** (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.356.401

Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	17:50:51	Miola	Aceito
Orçamento	orcamento.docx	26/10/2015 17:49:42	Anna Carolina Miola	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.doc	26/10/2015 17:43:59	Anna Carolina Miola	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	26/10/2015 17:43:09	Anna Carolina Miola	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia.pdf	26/10/2015 17:33:02	Anna Carolina Miola	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BOTUCATU, 08 de Dezembro de 2015

Assinado por:

**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
(Coordenador)**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n**Bairro:** Rubião Junior**CEP:** 18.618-970**UF:** SP**Município:** BOTUCATU**Telefone:** (14)3880-1608**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br