



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

BRUNO AUGUSTO ALVARES

**Filtro solar versus filtro solar contendo fotoliase e
antioxidantes tópicos no tratamento da queratose actínica
e campo de cancerização cutâneo: um ensaio clínico
randomizado e fatorial.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Medicina (MEPAREM).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciana Patrícia Fernandes Abbade
Coorientador: Prof. Dr. Helio Amante Miot

**Botucatu
2020**

Bruno Augusto Alvares

Filtro solar versus filtro solar contendo fotoliase e antioxidantes tópicos no tratamento da queratose actínica e campo de cancerização cutâneo: um ensaio clínico randomizado e fatorial.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina (MEPAREM).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Patrícia Fernandes Abbade
Coorientador: Prof. Dr. Helio Amante Miot

Botucatu
2020

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

Alvares, Bruno Augusto.

Filtro solar versus filtro solar contendo fotoliase e antioxidantes tópicos no tratamento da queratose actínica e campo de cancerização cutâneo : um ensaio clínico randomizado e fatorial / Bruno Augusto Alvares. - Botucatu, 2020

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

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Dermatologia. 3. Antioxidantes. 4. Pele - Doenças. 5. Ensaio clínico controlado aleatório.

Palavras-chave: Campo de cancerização; Carcinoma espinocelular; Dermatologia; Fotodano; Queratose actínica.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS.....	5
AGRADECIMENTOS.....	6
PREFÁCIO.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS.....	9
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
1.1 Queratose actínica e campo de cancerização cutâneo.....	14
1.2 Tratamentos disponíveis.....	18
1.2.1 5-fluoruracil.....	18
1.2.2 Mebutato de ingenol.....	19
1.2.3 Imiquimode.....	19
1.2.4 Retinoides.....	20
1.2.5 Diclofenaco.....	20
1.2.6 Colchicina.....	21
1.2.7 Terapia fotodinâmica.....	21
1.2.8 Fotoliase.....	22
1.2.9 Antioxidantes.....	22
1.3 Referências.....	25
2 OBJETIVOS DO ESTUDO.....	34
3 MANUSCRITO.....	36
4 CONCLUSÕES	52
APÊNDICES.....	59
Apêndice 1: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética.....	60
Apêndice 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	63
Apêndice 3: Escala de fotoenvelhecimento dos antebraços (EFA).....	66
Apêndice 4: Escore de gravidade das queratoses actínicas (AKSS).....	67
Apêndice 5: Contagem de QA em T0 e T60 após cada tratamento.....	68
Apêndice 6: Evolução da EFA em T0 e T60 após cada tratamento.....	69
Apêndice 7: Evolução da AKSS em T0 e T60 após cada tratamento.....	70

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ana e Luis, que ao longo de muitos anos têm se dedicado a tornar meus sonhos realidade. Sem eles, nada que conquisei seria possível.

A meu irmão, Davi, que mesmo a distância sempre apoiou meus projetos e me auxiliou nos momentos difíceis.

A minha noiva, Gabi, pelo seu apoio incondicional, compreensão e ajuda em todos os momentos da realização deste projeto.

Aos meus amigos de residência, pela bela amizade que criamos, pelo aprendizado desenvolvido em conjunto e pelo apoio no desenvolvimento deste projeto.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Prof^a. Dr^a. Luciana Patricia Fernandes Abbade, amiga e orientadora deste projeto, que me inspirou ainda na graduação em Medicina a me tornar Dermatologista. Sempre presente no desenvolvimento deste projeto, foi fundamental para o direcionamento da pesquisa e a redação desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Helio Amante Miot, amigo e coorientador deste projeto, por sua dedicação ao ensino e a ciência, por ser um exemplo de Médico Dermatologista. Por sempre me estimular a estudar. Pela paciência e rigor no desenvolvimento deste projeto.

Aos amigos residentes de Dermatologia, por me ajudarem no desenvolvimento deste projeto.

Aos meus amigos Luan Bastos e Luiz Garbers, pela amizade e apoio com este e outros projetos científicos.

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, que em 2010 me acolheu ainda muito jovem e abriu um universo de oportunidades, foi capaz de me fazer evoluir pessoal e profissionalmente. Sou eternamente grato.

A disciplina de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e todos os docentes, médicos e funcionários a ela vinculados.

A todos os pacientes que já atendi na Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, que me permitiram desenvolver as habilidades profissionais exigidas para a carreira médica, que confiaram em mim sua saúde.

Ao Sistema Único de Saúde (SUS) por ter disponibilizado um sistema de saúde onde pude me formar Médico e que tornou possível o desenvolvimento deste projeto.

Trabalho desenvolvido no ambulatório de Dermatologia
HC – Unesp

Apoio financeiro do Fundo de Apoio à Dermatologia do Estado de São Paulo –
Sebastião Sampaio (FUNADERSP).

PREFÁCIO

Esta tese de Mestrado é parte do programa de pós-graduação em Medicina da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Seu desenvolvimento foi realizado com apoio financeiro da Fundação para o Desenvolvimento da Dermatologia do Estado de São Paulo – Sebastião Sampaio (FUNADERSP)

A apresentação desta tese está dividida em duas partes: revisão da literatura e apresentação da pesquisa desenvolvida.

A primeira parte é uma revisão ampla do tema que norteou essa dissertação. Trata-se do estudo das queratoses actínicas (QA) e do campo de cancerização cutâneo (CCC). Nessa parte, fizemos a revisão dos mecanismos fisiopatológicos descritos para a carcinogênese cutânea, os principais fatores de risco associados, aspectos epidemiológicos, características clínicas e dermatoscópicas da QA e do CCC, os achados anatomopatológicos e, por fim, as principais opções terapêuticas disponíveis.

A segunda parte do texto contém toda a descrição do ensaio clínico que serviu de base para essa dissertação, bem como a apresentação dos resultados da pesquisa, discussão dos achados e as conclusões. Está apresentada sob forma de artigo de acordo com as regras do British Journal of Dermatology.

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

- 5-FU – 5-fluoruracil
6-4PP – fotoprodutos pirimidina-pirimidona
ALA – ácido 5-delta aminolevulínico
AOx – antioxidantes
Beta HCG – gonadotrofina coriônica humana tipo beta
CBC – carcinoma basocelular
CBP – dímeros ciclobutano pirimidina
CEC – carcinoma espinocelular
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
dp – desvio-padrão
EROs – espécies reativas de oxigênio
FMB-Unesp – Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
HPV – do inglês *Human Papiloma Virus*: papiloma vírus humano
ITT – do inglês *Intention To Treat*: análise tipo intenção de tratamento queratinocítica
LED – do inglês *Light Emitting Diode*: diodo emissor de luz
MAL – do inglês *methyl aminolevulinate*: aminolevulinato de metila
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo
p53 – proteína p53
p.ex. – por exemplo
QA – queratose actínica
RUV – radiação ultravioleta
TFD – terapia fotodinâmica
UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UVA – radiação ultravioleta tipo A
UVB – radiação ultravioleta tipo B

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Revisão da Literatura

Figura 1. Queratoses actínicas: pápulas eritematosas e hiperqueratóticas em área de pele com fotodano	16
---	----

Manuscrito

Figura 1. Diagrama de fluxo da randomização	43
Figura 2. Diagrama de fluxo CONSORT	46
Tabela 1. Principais características demográficas dos participantes na inclusão (T0) de acordo com o grupo de randomização	47
Tabela 2. Principais desfechos clínicos resultantes dos tratamentos	48
Tabela 3. Diferença das médias e intervalo de confiança 95% para os desfechos estudados	49

Resumo

Introdução: Diversos tratamentos são disponíveis para pele com fotodano avançado, caracterizada pela presença de queratoses actínicas (QAs), não havendo padrão ouro.

Objetivo: Avaliar a eficácia e segurança da formulação de antioxidantes tópicos (L-ácido ascórbico 15%, alfa-tocoferol 1%, ácido ferúlico 0,5%) associado ao filtro solar comum ou filtro solar com fotoliase no tratamento do fotodano avançado.

Método: Ensaio clínico randomizado, duplo-cego e fatorial. Foram randomizados participantes com QAs nos antebraços para aplicar durante o dia filtro solar (FPS) ou filtro solar com fotoliase (EryF) em ambos antebraços. Um dos antebraços de cada grupo foi randomizado novamente para receber antioxidantes tópicos (AOx) e o outro antebraço creme placebo (ambos de aplicação noturna). Os quatro grupos foram EryF + AOx, EryF + placebo, FPS + AOx, FPS + placebo. A duração dos tratamentos foi de 8 semanas. Os desfechos primários foram *clearance* total de QA, escala de fotoenvelhecimento e escore de gravidade de QA e os secundários foram a redução na contagem de QAs, taxa de *clearance* parcial e segurança.

Resultados: Houve a inclusão de 40 participantes. Todos os grupos apresentaram melhora significativa dos desfechos ao longo do tempo. Não houve diferença significativa entre FPS e EryF, entretanto AOx levou a redução significativa da contagem das QAs. *Clearance* parcial foi obtido em 18 (47,4%) antebraços tratados com AOx e em nove (23,7%) tratados com placebo ($p < 0,05$).

Conclusões: Filtro solar e filtro solar contendo fotoliase não apresentaram diferença significativa. AOx promoveu melhora do fotodano com redução da contagem de QA dos antebraços.

Palavras-chave: Dermatologia, Fotodano, Queratose actínica, Campo de cancerização, Carcinoma espinocelular, Oncologia, Filtro solar, Fotoliase, L-ácido ascórbico, Alfa-tocoferol, Ácido ferúlico.

Abstract

Introduction: Several treatments are available for skin with advanced photodamage, which is characterized by the presence of actinic keratoses (AK), with no gold standard.

Objective: To evaluate the effectiveness and safety of topical antioxidant formulation (L- ascorbic acid 15%, alpha-tocopherol 1%, ferulic acid 0.5%) associated with common sunscreen or sunscreen with photolyase in treating advanced photodamage.

Method: Randomized, double-blind and factorial clinical trial. Participants with AKs on their forearms were randomized to apply sunscreen (FPS) or sunscreen with photolyase (EryF) on both forearms during the day. One of the forearms in each group was randomized again to receive topical antioxidants (AOx) and the other forearm was a placebo cream (both for night application). The four groups were EryF + AOx, EryF + placebo, FPS + AOx, FPS + placebo. The duration of treatments was 8 weeks. The primary outcomes were total AK clearance, photoaging scale and AK severity score, and the secondary outcomes were a reduction in AK count, partial clearance rate and safety.

Results: There were 40 participants included. All groups showed a significant improvement in outcomes over time. There was no significant difference between FPS and EryF, however AOx led to a significant reduction in the QA count. Partial clearance was obtained in 18 (47.4%) forearms treated with AOx and in nine (23.7%) treated with placebo ($p < 0.05$).

Conclusions: Sunscreen and sunscreen containing photolyase showed no significant difference. AOx improved photodamage by reducing the AK count in the forearms.

Keywords: Dermatology, Photodamage, Actinic keratosis, Field cancerization, Squamous cell carcinoma, Oncology, Sunscreen, Photolyase, L-ascorbic acid, alpha-tocopherol, ferulic acid.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 QUERATOSES ACTÍNICAS E CAMPO DE CANCERIZAÇÃO CUTÂNEO

O câncer de pele não melanoma representa o tipo de câncer mais comum da humanidade e inclui principalmente o carcinoma basocelular (CBC) e carcinoma espinocelular (CEC). Sabe-se que a exposição crônica à radiação ultravioleta (RUV), especialmente UVB, representa o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pele, com lesões ocorrendo principalmente nas áreas de maior exposição como face, couro cabeludo, pavilhão auricular, antebraços e mãos (1).

A lesão ao DNA dos queratinócitos é o ponto chave para o início do fotodano e da carcinogênese cutânea e pode ser causado por ambos espectros de radiação UVA e UVB de maneira direta ou indireta (1,2). Para que ocorra sua ação carcinógena, a RUV deve ser transmitida pelas camadas da pele e por fim ser absorvida por moléculas cromóforas ou fotossensibilizantes (3).

Múltiplos cromóforos possuem afinidade específica pela UVB, tais como ácidos nucleicos, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), aminoácidos aromáticos, heme, quinonas, flavinas, porfirinas, carotenoides, ácido urânico e eumelanina (3).

O mecanismo de lesão direta ao DNA do queratinócito é causado principalmente pela radiação UVB, a qual é absorvida por cromóforos que induzem alterações das bases pirimidínicas, altamente predispostas à dimerização, formando assim os dímeros ciclobutano pirimidina (CBP) e fotoprodutos pirimidina-pirimidona (6-4PP) (4).

A lesão indireta envolve principalmente a radiação UVA que promove excitação de moléculas fotossensibilizantes, transformando-as na forma excitada denominada *triplet*. Tal molécula é altamente instável e tende a transferir energia para retornar ao seu estado de repouso. Sua energia pode ser transferida para outros fotossensibilizantes, formando os radicais livres, ou ser transferida para molécula de oxigênio, compondo as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio *singlet* (1,4,5).

A nível molecular, o dano direto e indireto das radiações UVB e UVA culminam com a desregulação da proteína supressora de tumor p53, ponto chave para o

desenvolvimento de queratoses actínicas (QAs) e CEC (6–8). A proteína p53 é responsável pelo controle do ciclo celular, reparo do DNA e supressão tumoral. Mutações no gene dessa proteína levam a desregulação do ciclo celular, perda do controle da apoptose de queratinócitos, e expansão clonal de queratinócitos mutados (9).

A proliferação dos queratinócitos alterados geneticamente levam ao surgimento da QA, lesão cutânea considerada marcadora da fotoagressão. Tipicamente, as lesões estão localizadas em áreas de fotoexposição crônica, como a face, couro cabeludo, antebraços e dorso das mãos, especialmente em pacientes de pele clara (10).

O fotodano induzido pela RUV é caracterizado por uma série de alterações cutâneas que incluem discromia, lentiginoses, elastose, formação de rugas finas e profundas, telangectasias, eritema, cicatrizes atróficas, alterações de textura e o surgimento de lesões pré-neoplásicas como a QA e neoplasias malignas como o CEC (11).

São considerados como principais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento das QAs: idade (cerca de 80% de adultos com idade entre 60 e 69 anos apresentam lesões de QA), sexo masculino, pele clara (fototipos I e II de Fitzpatrick), exposição à RUV, imunossupressão, antecedente pessoal de QA ou câncer de pele e doenças genéticas que apresentam defeito no reparo do DNA (xeroderma pigmentoso, síndrome de Bloom, síndrome de Rothmund-Thompson). Além destes, novos estudos tem relacionado a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) com o desenvolvimento de QAs (12).

A prevalência da QA varia na literatura, a depender de diversos fatores, como o país onde foi desenvolvido o estudo e da composição de sua população(10).

No Brasil, a QA é o 4º diagnóstico dermatológico mais comum e, dentre os pacientes com mais de 65 anos, é a principal causa de busca por atendimento dermatológico (13). Em um estudo realizado na cidade de Curitiba-PR com 491 participantes, com média de idade de 58,9 anos, a prevalência da QA foi de 60,79% nas mulheres e 30,9% nos homens (14)

Já nos Estados Unidos, a QA é o terceiro diagnóstico dermatológico mais comum e, segundo a Academia Americana de Dermatologia (AAD), 60% de indivíduos acima de 40 anos apresentam ao menos uma lesão de QA (15,16).

Clinicamente as lesões de QA se caracterizam por pápulas ou máculas eritematosas, confluentes ou não, recobertas por escamas aderentes e hiperqueratósicas, com cerca de 0,5 a 1 cm (Figura 1). As lesões podem evoluir com infiltração, crescimento rápido, sangramento e ulceração, sinais que indicam possível progressão para CEC (17,18).



Figura 1. Queratoses actínicas: pápulas eritematosas e hiperqueratósicas em área de pele com fotodano.

Certos autores dividem a apresentação clínica das QAs em três graus: Grau I (visível e levemente palpável), Grau II (visível e palpável), Grau III (francamente visível e hiperqueratótica), porém, essa classificação ainda não se baseia em critérios histológicos ou da biologia das lesões (p.ex. atividade de proliferação e apoptose) (18).

O diagnóstico da QA é predominantemente realizado pela avaliação clínica, podendo ser complementado pela dermatoscopia. A precisão do diagnóstico clínico varia de 74 a 94% (19).

À dermatoscopia, Zalaudek et al reconheceu 3 padrões dermatoscópicos mais prevalentes, dividindo a lesão em 3 graus: o primeiro, exibe padrão em pseudo-rede eritematosa e escamas esbranquiçadas discretas; o segundo, caracterizada pelo fundo eritematoso, chamado “padrão em morango”; e o terceiro demonstra aberturas

foliculares aumentadas preenchidas com plug queratótico sobre um fundo descamativo ou branco amarelado. A sensibilidade e especificidade do diagnóstico dermatoscópico da QA não pigmentada pode chegar a 98 e 95%, respectivamente (20).

Do ponto de vista histológico, o qual é o padrão ouro para o diagnóstico, a QA é definida pela atipia queratinocítica leve nas camadas mais baixas da epiderme, resultando em defeito na maturação da epiderme superficial (21–23). A gravidade da QA pode ser determinada pela distribuição dos queratinócitos atípicos. O acometimento do 1/3 até 2/3 inferiores da epiderme caracteriza Grau I e II, respectivamente. O acometimento para além dos 2/3 inferiores da epiderme caracteriza o CEC in situ ou QA grau III (24,25).

Acreditava-se que a evolução para CEC seguia uma cadeia lógica de QA grau I, para grau II e III, levando ao desenvolvimento do CEC. Contudo, Fernández-Figueras et al demonstraram que CECs invasivos estavam localizados em áreas com QAs grau I (26).

O risco de transformação das QAs para CEC varia na literatura de 0,025% a 16% (27), sendo que o risco aumenta naqueles pacientes com múltiplas lesões. Pacientes com 6-20 QAs apresentam risco quatro vezes maior, e pacientes com >20 apresentam risco onze vezes maior de desenvolver CEC (28).

Pacientes com diagnóstico de QA geralmente 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 (7).

O termo campo de cancerização foi descrito pela primeira vez em 1953 por Slaughter (29). 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 (30). Se deixado sem tratamento, a incidência em 10 anos de progressão de QA para CEC é de aproximadamente 10%, podendo evoluir para metástase e morte (28,31).

1.2 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS

Até o momento, não há tratamento padrão ouro para as QAs, devendo-se levar em conta o número e características clínicas das lesões, tolerabilidade e custos do tratamento, idade, atividade do sistema imune e aceite do paciente. Os tratamentos podem ser divididos em direcionados à lesão e direcionadas ao campo de cancerização. Os tratamentos voltados para as lesões incluem: crioterapia, laser, cirurgia (shaving ou exérese) e curetagem (19), entre outras.

A terapia direcionada ao campo de cancerização vem se tornando alvo de estudo uma vez que pode levar à redução da incidência de QA e CEC em pacientes de alto risco (32). Diversas modalidades terapêuticas estão disponíveis: 5-fluoruracil (5FU) (33), mebutato de ingenol (34), imiquimod (35), tretinoína (36), diclofenaco (37), colchicina (38), terapia fotodinâmica (39), entre outras.

1.2.1 5-fluoruracil

O 5FU é um análogo da pirimidina, utilizado como quimioterápico em tratamentos oncológicos, pertencendo a família dos antimetabólitos. Seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição da timidina-sintetase e a incorporação do 5FU ao RNA e DNA. Suas apresentações tópicas incluem 5FU à 5% em creme ou solução, 5FU à 0,5% em creme, 5FU à 1% creme ou solução e 2% em solução (15,40). A forma habitualmente utilizada e disponível no Brasil é o 5FU à 5% em creme. O tratamento padronizado é a aplicação diária na área a ser tratada, duas vezes ao dia, durante 4 semanas. Apresenta efeitos adversos como dor, prurido, eritema, inflamação e exulceração (41). Em ensaio clínico desenvolvido por Jansen et al, 74,7% dos pacientes que utilizaram 5FU a 5% atingiram clearance de 75% do número de QAs da face e couro cabeludo (42).

1.2.2 Mebutato de ingenol

O mebutato de ingenol age por meio de diferentes mecanismos: induz a necrose de queratinócitos mutados, induz resposta inflamatória local e estimula a produção de anticorpos anti-tumorais (40,43).

A apresentação da substância é em gel, sendo disponíveis as concentrações de 0,015% para tratamento da face, e 0,05% para tratamento das demais áreas corporais. Deve ser aplicado uma vez ao dia por 3 dias consecutivos para tratamento da face e 2 dias consecutivos para tratamento das lesões corporais (40,43). Apresenta como efeitos adversos eritema, exulceração e descamação (40). As taxas relatadas de clearance total do número de QAs são de aproximadamente 42% e taxa de redução de lesões de 83% (44).

Atualmente, esta droga deixou de ser comercializada no Brasil. O elevado custo de fabricação e conseqüente alto valor de venda, dificultava a comercialização do produto no Brasil. Na Europa, o produto foi retirado de comercialização após estudos indicarem aumento do risco de desenvolvimento de CEC com uso da medicação (45).

1.2.3 Imiquimode

Imiquimode é uma droga sintética imunomoduladora com liberação de uso em 1999 pelo FDA para tratamento de verrugas genitais e perianais; em 2004 seu uso foi estendido para tratamento de QAs e CBC (19). Atua como agonista de receptores toll-like 7 e estimula a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama, interferon alfa e interleucina 12. Por meio dessas citocinas, é capaz de ativar macrófagos, células dendríticas, linfócitos T citotóxicos e células natural-killer. Também possui ação anti-viral indireta e poder anti-tumoral (31,40).

O imiquimode é comercializado nas concentrações de 2,5%, 3,5% e 5% em creme (40). Seu uso a 5% é limitado a uma área de pele de 25 cm², podendo ser aplicado 3 vezes na semana por 4 semanas, com aplicação cíclica por até 16 semanas. Apresenta como efeitos adversos eritema, exulceração e formação de crostas (21). O uso cíclico por 16 semanas demonstrou clearance de 85% das QAs e taxa de recorrência anual de 10% (40).

A formulação de imiquimode a 3,75% pode ser utilizada para o tratamento de áreas mais extensas, podendo ser aplicados em área de pele de até 200 cm² (19), porém ainda não está disponível no Brasil.

1.2.4 Retinoides

Os retinoides podem ser usados tanto por via oral como tópico para prevenção e tratamento das lesões de QAs e do campo de cancerização, por reduzir o estresse oxidativo e a diferenciação celular, porém não deve ser utilizado como primeira linha de tratamento (15,46). Os principais efeitos colaterais com uso tópico são eritema, descamação, queimação e irritação (36). O uso oral da medicação deve ser reservado para pacientes com múltiplas lesões ou que apresentam alterações imunes, como nos transplantados renais, ou naqueles com genodermatoses que predisõem ao desenvolvimento de neoplasias queratinocítica (15). Houve redução de 45% do número de QAs em estudo feito com creme tópico de tretinoína 0,05%, versus redução de 23% no grupo placebo, com filtro solar (36)

1.2.5 Diclofenaco

O uso do diclofenaco, droga anti-inflamatória não hormonal, é considerada opção terapêutica para campo de cancerização. A substância age ao bloquear a via da ciclooxigenase e inibir as citocinas pró-inflamatórias produzidas a partir da exposição à RUV (47). Além disso, o diclofenaco atua inibindo a proliferação e angiogênese de células tumorais, e induz a ativação de metaloproteinases resultando em queratólise e degradação do colágeno (16,40). Os estudos com a substâncias utilizam o diclofenaco a 3% em ácido hialurônico a 2,5% na forma de gel, devendo ser aplicado diariamente durante 8 a 12 semanas, atingindo taxas de clearance de até 58% em 30 dias (40). Apresenta boa tolerabilidade, com poucos efeitos colaterais, que incluem prurido, eritema e descamação superficial (44).

1.2.6 Colchicina

Na dermatologia, a colchicina foi empregada em diferentes indicações terapêuticas, tanto na via sistêmica como 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 (48).

A primeira descrição do uso da colchicina tópica para QA foi em 1968 por Marshall (49). 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. Ensaio clínico recente comparou colchicina com diclofenaco 3% tópico demonstrando bons resultados, com redução de aproximadamente 50% na área acometida por QA (50). Outro estudo indicou que o uso da colchicina tópica a 0,5% associado a terapia fotodinâmica (TFD) com o derivado metil-éster do ácido 5-delta aminolevulínico (MAL) demonstraram redução da atividade do campo de cancerização, sendo o tratamento bem tolerado (51).

1.2.7 Terapia fotodinâmica

A TFD baseia-se na interação entre uma fonte luminosa e um agente fotossensibilizante, com capacidade de induzir citotoxicidade em células tumorais proliferativas. Os agentes fotossensibilizantes tópicos mais utilizados são ácido 5-delta aminolevulínico (ALA) e seu derivado metil-éster do ALA (MAL). Este último é o agente mais utilizado por ser o que apresenta maior absorção pelas células tumorais. O MAL é aplicado por via tópica a 16% e mantido sob oclusão por 3 horas. Em seguida é exposto à luz vermelha e ao ser ativado, entra na cascata de produção da protoporfirina IX, que ao se acumular nas células alteradas induz a apoptose das mesmas (52).

A TFD apresenta ótimas taxas de resposta com 81% de clearance em uma única sessão e até 90% após a segunda sessão. Apresenta efeitos adversos leves, levando a um resultado estético satisfatório, podendo apresentar como fator limitante a dor durante o procedimento, que pode ser leve até de forte intensidade (53–55).

1.2.8 Fotoliase

Mais recentemente a fotoliase de aplicação tópica surgiu como nova alternativa para o tratamento do campo de cancerização cutâneo e das QAs (56–58). A fotoliase é uma enzima monomérica, não encontrada nas células de mamíferos placentários, capaz de se ligar especificamente aos CBPs e 6-4PPs e desfazer os dímeros para as formas normais das bases nitrogenadas com a energia da luz visível, mecanismo denominado “fotorreativação”. O reparo e eliminação dos dímeros do DNA em humanos é controlado pelo mecanismo de “reparo por remoção de nucleotídeos” (NER), que apresenta baixa efetividade com relação à correção dos CBPs e 6-4PPs (56,59).

Recentemente, Puig et al publicou artigo de revisão de um filtro solar de alta proteção UVA e UVB que contém em sua formulação a enzima fotoliase proveniente da alga *Anacystis nidulans*. A enzima encontra-se no interior de lipossomos multilamelares a semelhança da enzima de reparo T4 endonuclease. O produto em questão vem sendo estudado desde 2003 e é comercializado no Brasil pelo nome Eryfotona AK-NMSC, distribuído pelo laboratório ISDIN. A revisão conclui que a evidência da substância nos últimos 10 anos suporta efeitos benéficos no tratamento da QA e do campo de cancerização, levando a melhora clínica, dermatoscópica e histológica (10).

1.2.9 Antioxidantes

Levando em conta os danos indiretos causados pela RUV, com formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), envolvidas no processo de fotoenvelhecimento e a carcinogênese cutânea, estudos com agentes antioxidantes (AOx) se iniciaram.

A pele humana conta com uma rede de agentes antioxidantes (AOx). Dentre eles, AOx enzimáticos como superóxido dismutase e catalase, glutathiona peroxidase e AOx não enzimáticos de baixo peso molecular, como vitamina E, vitamina C, glutathiona, ácido úrico e uiquinol. A maior concentração dos AOx, tanto hidrossolúveis como lipossolúveis, encontra-se na epiderme (60).

Apesar de a pele apresentar AOx inatos para neutralizar os radicais endógenos e exógenos, esta reserva pode ser rapidamente depletada. Sendo assim, a suplementação tópica de AOx, pelo menos em teoria, pode promover benefícios extras a pele, especialmente sob estresse oxidativo excessivo como na exposição à UVA (61). A suplementação oral de AOx não apresentou associação com risco de câncer de pele conforme revisão realizada por Chang et al (62).

Halliday examinou o DNA de QA e CEC em procura de danos induzidos por EROs. Um grande número de mutações foi encontrado no gene do p53, tanto no grupo de QA quanto no grupo de CEC, sugerindo que EROs podem ser mutagênicos, levando lesões precursoras a se transformarem em malignas (63). Além disso, a presença de AOx tópicos e inibição de EROs reduziu a carcinogênese induzida pela RUV na pele de ratos, sugerindo ser um método capaz de atenuar a carcinogênese (64–66).

A vitamina C (ácido ascórbico) é um AOx hidrossolúvel e é o AOx predominante na pele (67). A vitamina C neutraliza os radicais livres nos compartimentos aquosos da pele, além de ter papel importante na regeneração da vitamina E (tocoferol) (68). A vitamina E é um AOx lipossolúvel, encontrada em maior concentração nas camadas profundas do estrato córneo, sendo produzida a partir da secreção das glândulas sebáceas. A função principal da vitamina E é proteger a membrana celular do estresse oxidativo (67).

A aplicação tópica de L-ácido-ascórbico demonstrou efeitos fotoprotetores incluindo a redução de eritema (69), diminuição da formação de “sunburn cells” (69) e diminuição da expressão de citocinas imunossupressoras (70).

As “sunburn cells” são queratinócitos apoptóticos induzidos pela exposição a RUV, especialmente UVB, que provocou danos graves e irreversíveis ao seu DNA. Caso este mecanismo protetor não fosse ativado, um queratinócito de fenótipo alterado poderia predispor ao desenvolvimento de uma neoplasia (71). Além disso, a RUV induz aumento da síntese de citocinas imunossupressoras na epiderme, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e IL-10, reduzindo o controle da carcinogênese local (72).

Uma série de estudos em animais e humanos demonstrou a redução da peroxidação lipídica (73), fotoenvelhecimento (74), imunossupressão (65,75) e

fotocarcinogênese (65,66) após aplicação tópica da vitamina E. A nível molecular, o uso tópico de alfa-tocoferol diminui a transcrição de metaloproteinase de matriz 1 (MMP-1) e inibe a formação de dímeros de timina, reduzindo o processo de quebra do colágeno e a carcinogêneses, respectivamente (76).

Estudos utilizando o L-ácido-ascórbico a 15% em associação com alfa-tocoferol a 1% demonstraram que essas substâncias apresentam efeito sinérgico na pele. Quando o alfa-tocoferol neutraliza o estresse oxidativo nos lipídios, seus produtos oxidados podem ser regenerados pelo L-ácido-ascórbico. Esta interação ajuda a renovar a proteção antioxidantes nos tecidos. A formulação contendo os dois produtos dobrou a proteção UV para a pele quando comparado com o L-ácido-ascórbico isoladamente (77,78).

Em busca de substâncias antioxidantes sinérgicas e que pudessem aumentar a estabilidade da solução de L-ácido-ascórbico e alfa tocoferol, Lin et al demonstraram que a adição de ácido ferúlico a 0,5%, um antioxidante vegetal, aumentou tanto a estabilidade da fórmula quanto dobrou a proteção UV para a pele. O ácido ferúlico, um ácido hidroxicinâmico, provavelmente protege o L-ácido-ascórbico e alfa-tocoferol servindo como substrato “sacrifício”, sofrendo oxidação antes dos outros da fórmula (79).

Murray et al demonstraram que a combinação dos três AOx (L-ácido-ascórbico a 15%, alfa-tocoferol a 1% e ácido ferúlico a 0,5%), quando comparado ao placebo (veículo), apresentaram efeito fotoprotetor ao reduzir o eritema induzido pela RUV. Além disso, a área tratada com a combinação dos AOx reduziu significativamente a formação de “sunburn cells” bem como reduziu a expressão de p53 e a formação de dímeros de timina (72).

Em revisão da literatura, não encontramos estudos que relatassem o uso de tal combinação para o tratamento da pele com fotodano avançado, caracterizada por QAs em um campo de cancerização. Também não há descrição na literatura do uso concomitante de AOx de uso tópico e da fotoliase, o que justifica a realização deste estudo.

Referências

1. Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006;150(1):25–38.
2. Brennan JA, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, Goodman SN, Sidransky D. Molecular Assessment of Histopathological Staging in Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med.* 1995;332(7):429–35.
3. Torezan LAR. Estudo da pele do campo cancerizável antes e após a terapia fotodinâmica através dos métodos clínicos , histopatológicos e imunohistoquímicos. Tese de Doutorado em Dermatologia - Universidade de São Paulo; 2011.
4. Rodust PM, Stockfleth E, Ulrich C, Leverkus M, Eberle J. UV-induced squamous cell carcinoma - A role for antiapoptotic signalling pathways. *Br J Dermatol.* 2009;161 Suppl. 3:107–15.
5. Nishigori C. Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci.* 2006;5(2):208–14.
6. Stockfleth E, Kerl H. Pathology and pathobiology of actinic (solar) keratosis – an update. *Br J Dermatolo.* 2007;157:18–20.
7. Torezan LAR, Festa-Neto C. Cutaneous field cancerization: clinical, histopathological and therapeutic aspects. *An Bras Dermatol.* 2013;88(5):775–86.
8. Chai H, Brown RE. Field Effect in Cancer – An Update. *Ann Clin Lab Sci.* 2009;39(4):331–8.
9. Anwar J, Wrone DA, Kimyai-Asadi A, Alam M. The development of actinic keratosis into invasive squamous cell carcinoma: Evidence and evolving classification schemes. *Clin Dermatol.* 2004;22(3):189–96.
10. Puig S, Granger C, Garre A, Trullàs C, Sanmartin O, Argenziano G. Review of Clinical Evidence over 10 Years on Prevention and Treatment of a Film-Forming Medical Device Containing Photolyase in the Management of Field Cancerization in Actinic Keratosis. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2019;9(2):259–70.
11. Guimarães COZ, Bagatin E, Guadanhim LRS, Sternberg F, Picosse FR, Nunes G, et al. Development and validation of a clinical scale for the evaluation of forearm skin photoaging. *J Cutan Med Surg.* 2015;19(4):380–7

12. Marneffe A, Suppa M, Miyamoto M, Del Marmol V, Boone M. Validation of a diagnostic algorithm for the discrimination of actinic keratosis from normal skin and squamous cell carcinoma by means of high-definition optical coherence tomography. *Exp Dermatol*. 2016;25(9):684–7.
13. Reinehr CPH, Bakos RM. Actinic keratoses: review of clinical, dermoscopic, and therapeutic aspects. *An Bras Dermatol*. 2019;94(6):637–57.
14. Dergham AP, Muraro CC, Ramos EA, Mesquita LAF, Collaço LM. Distribution of diagnosis of neoplastic and pre neoplastic skin lesions at Evangelical Hospital in Curitiba . *An Bras Dermatol*. 2004; 79(5):555-59
15. Nashan D, Meiss F, Müller M. Therapeutic strategies for actinic keratoses - A systematic review. *Eur J Dermatol*. 2013;23(1):14–32.
16. Nelson C. Diclofenac gel in the treatment of actinic keratoses. *Ther Clin Risk Manag*. 2011;7:207-11.
17. Schmitt JV, Miot HA. Actinic keratosis: a clinical and epidemiological revision. *An Bras Dermatol*. 2012;87(3):425–34.
18. 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.
19. Dianzani C, Conforti C, Giuffrida R, Corneli P, di Meo N, Farinazzo E, et al. Current therapies for actinic keratosis. *Int J Dermatol*. 2020;59(6):677-84.
20. Zalaudek I, Argenziano G. Dermoscopy of actinic keratosis, intraepidermal carcinoma and squamous cell carcinoma. *Curr Probl Dermatol*. 2015;46:70–6.
21. Stockfleth E, Kerl H. Guidelines for the management of actinic keratoses Developed by the Guideline Subcommittee Guidelines for the management. *Eur J Dermatol*. 2006;16(6):599–606.
22. Laino L, Elia F, Desiderio F, Scarabello A, Sperduti I, Cota C, et al. The efficacy of a photolyase-based device on the cancerization field: a clinical and thermographic study. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34(1):84.
23. Ceilley RI, Jorizzo JL, Zografos P. Current issues in the management of actinic keratosis. *J Am Acad Dermatol*. 2013;68(1 SUPPL.1):S28–38.
24. Rößert-Huber J, Patel MJ, Forschner T, Ulrich C, Eberle J, Kerl H, et al. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: A proposal for reclassification *Br J Dermatol*. 2007;156 Suppl 3:8-12.

25. Werner RN, Stockfleth E, Connolly SM, Correia O, Erdmann R, Foley P, et al. Evidence- and consensus-based (S3) Guidelines for the Treatment of Actinic Keratosis - International League of Dermatological Societies in cooperation with the European Dermatology Forum - Short version. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(11):2069–79.
26. Fernández-Figueras MT, Carrato C, Sáenz X, Puig L, Musulen E, Ferrándiz C, et al. Actinic keratosis with atypical basal cells (AK I) is the most common lesion associated with invasive squamous cell carcinoma of the skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(5):991–7.
27. Martin GM. Impact of interval and combination therapies on the management of actinic keratosis: Review and clinical considerations. *J Dermatolog Treat.* 2011;22(5):288–97.
28. Stockfleth E. From a new vision of actinic keratosis to imiquimod 3.75%, the new treatment standard. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29 Suppl 1:1–2.
29. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953;6(5):963–8.
30. Szeimies RM, Torezan L, Niwa A, Valente N, Unger P, Kohl E, et al. Clinical, histopathological and immunohistochemical assessment of human skin field cancerization before and after photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2012;167(1):150–9.
31. Ferrándiz C. Update on actinic keratosis in clinical trial experience with imiquimod. *Br J Dermatol.* 2007;157 Suppl 2:32–3.
32. Ulrich M, Maltusch A, Röwert-Huber J, González S, Sterry W, Stockfleth E, et al. Actinic keratoses: Non-invasive diagnosis for field cancerisation. *Br J Dermatol.* 2007;156 Suppl 3:13–7.
33. Hagele T, Levender MM, Davis SA, Williford PM, Feldman SR. Practice Trends in the Treatment of Actinic Keratosis in the Cryotherapy plus Fluorouracil Are Underused despite Evidence of Benefit. *J Cutan Med Surg.* 2012;16(2):107–14.
34. Lebwohl M, Swanson N, Anderson LL, Melgaard A, Stat MS, Xu Z, et al. Ingenol Mebutate Gel for Actinic Keratosis. *N Engl J Med.* 2012;366(11):1010–9.
35. Gerster F, Wagner L, Reiter J, Miller L, Testerman TL, Gibson SJ, et al. Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod. *J Leukoc Biol.* 2017;58(3):365–

- 72.
36. Ianhez M, Fleury Junior LFF, Miot HA, Bagatin E. Retinoids for prevention and treatment of actinic keratosis. *An Bras Dermatol*. 2013;88(4):585–93.
 37. Wolf JE Jr, Taylor JR, Tschen E, Kang S. Topical 3.0 % diclofenac in 2.5 % hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol*. 2001;40(11):709–13.
 38. Grimaître M, Etienne A, Fathi M, Piletta P-A, Saurat J-H. Topical colchicine therapy for actinic keratoses. *Dermatology*. 2000;200(4):346–8.
 39. Morton CA, Szeimies RM, Sidoroff A, Braathen LR. European guidelines for topical photodynamic therapy part 2: Emerging indications - Field cancerization, photorejuvenation and inflammatory/infective dermatoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27(6):672–9.
 40. Samrao A, Cockerell CJ. Pharmacotherapeutic management of actinic keratosis: Focus on newer topical agents. *Am J Clin Dermatol*. 2013;14(4):273–7.
 41. Gold M, Nestor M. Current treatments of actinic keratosis. *J Drugs Dermatol*. 2006;5(2):17–25.
 42. Jansen MHE, Kessels JPHM, Nelemans PJ, Kouloubis N, Arits AHMM, Van Pelt HPA, et al. Randomized trial of four treatment approaches for actinic keratosis. *N Engl J Med*. 2019;380(10):935–46.
 43. Costa C, Scalvenzi M, Ayala F, Fabbrocini G, Monfrecola G. How to treat actinic keratosis? An update. *J Dermatol Case Rep*. 2015;9(2):29–35.
 44. Chetty P, Choi F, Mitchell T. Primary Care Review of Actinic Keratosis and Its Therapeutic Options: A Global Perspective. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2015;5(1):19–35.
 45. Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. Ingenol mebutate gel (Picato): suspension of the licence due to risk of skin malignancy. Vol. 13, Drug Safety Update. 2020.
 46. Weinstock MA, Bingham SF, Digiovanna JJ, Rizzo AE, Marcolivio K, Hall R, et al. Tretinoin and the prevention of keratinocyte carcinoma (basal and squamous cell carcinoma of the skin): A veterans affairs randomized chemoprevention trial. *J Invest Dermatol*. 2012;132(6):1583–90.
 47. Berman B, Amini S. Pharmacotherapy of actinic keratosis: An update. *Expert Opin Pharmacother*. 2012;13(13):1847–71.

-
48. Sullivan TP, King LE, Boyd AS. Colchicine in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 1998;39:993–9.
 49. Marshall J. Treatment of Solar Keratoses With Topically-Applied Cytostatic Agents. *Br J Dermatol.* 1968;80(8):540–2.
 50. Togsverd-Bo K, Lerche CM, Poulsen T, Wulf HC, Hædersdal M. Photodynamic therapy with topical methyl- and hexylaminolevulinate for prophylaxis and treatment of UV-induced SCC in hairless mice. *Exp Dermatol.* 2010;19(8):166–72.
 51. Miola AC, Ferreira ER, Lima TRR, Schmitt J V., Abbade LPF, Miot HA. Effectiveness and safety of 0.5% colchicine cream vs. photodynamic therapy with methyl aminolaevulinate in the treatment of actinic keratosis and skin field cancerization of the forearms: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 2018;179(5):1081–7.
 52. Miola AC. Eficácia e segurança do creme de colchicina 0,5 por cento versus terapia fotodinâmica com aminolevulinato de metila no tratamento do campo de cancerização cutâneo: um ensaio clínico randomizado. Botucatu - SP. Tese Mestrado em Patologia - Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2017.
 53. Pariser DM, Lowe NJ, Stewart DM, Jarratt MT, Lucky AW, Pariser RJ, et al. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: Results of a prospective randomized multicenter trial. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48(2 SUPPL.):227–32.
 54. Piacquadio DJ, Chen DM, Farber HF, Fowler Jr JF, Glazer SD, Goodman JJ, 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;140(1):41–6.
 55. Tarstedt M, Rosdahl I, Berne B, Svanberg K, Wennberg AM. 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(5):424–8.
 56. Malvey J SP. Field Cancerisation Improvement with Topical Application of a Film-Forming Medical Device Containing Photolyase and UV Filters in Patients with Actinic Keratosis, a Pilot Study. *J Clin Exp Dermatol Res.* 2014;5: 220.

-
57. Carducci M, Pavone PS, De Marco G, Lovati S, Altabas V, Altabas K, 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.
 58. Navarrete-Dechent C, Molgó M. The use of a sunscreen containing DNA-photolyase in the treatment of patients with field cancerization and multiple actinic keratoses: A case-series. *Dermatol Online J*. 2017;23(1):4–7.
 59. Jans J, Schul W, Sert Y, Rijksen Y, Rebel H, Eker APM, et al. Powerful Skin Cancer Protection by a CPD-Photolyase Transgene. *Curr Biol*. 2005;15(2):105–15.
 60. Godic A, Poljsak B, Adamic M, Dahmane R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014.
 61. Chen L, Hu JY, Wang SQ. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(5):1013–24.
 62. Chang YJ, Myung S-K, Chung ST, Kim Y, Lee E-H, Jeon Y-J, et al. Effects of vitamin treatment or supplements with purported antioxidant properties on skin cancer prevention: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Dermatology*. 2011;223(1):36–44.
 63. Halliday GM. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat Res*. 2005;571(1-2):107–20.
 64. Halliday GM, Russo PAJ, Yuen KS, Robertson BO. Effect of inhibitors of oxygen radical and nitric oxide formation on UV radiation- induced erythema, immunosuppression and carcinogenesis. *Redox Rep*. 1999;4(6):316–8.
 65. Gensler HL, Magdaleno M. Topical Vitamin E Inhibition of Immunosuppression and Tumorigenesis Induced by Ultraviolet Irradiation. *Nutr Cancer*. 1991;15(2):97–106.
 66. Burke KE, Clive J, Combs GF, Comisso J, Keen CL, Nakamura RM. Effects of Topical and Oral Vitamin E on Pigmentation and Skin Cancer Induced by Ultraviolet Irradiation in Skh:2 Hairless Mice. *Nutr Cancer*. 2009;38(1):87–97.
 67. Thiele JJ, Traber MG, Packer L. Depletion of human stratum corneum vitamin E: An early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation. *J Invest Dermatol*. 1998;110(5):756–61.

-
68. Fisher G, Datta S, Talwar H, Wang Z, Varani J, Kang S. Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. *Nature*. 1996;335–9.
 69. Darr D, Combs S, Dunston S, Manning T, Pinnell S. Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. *Br J Dermatol*. 1992;127(3):247–53.
 70. Nakamura T, Pinnell SR, Darr D, Kurimoto I, Itami S, Yoshikawa K, et al. Vitamin C abrogates the deleterious effects of UVB radiation on cutaneous immunity by a mechanism that does not depend on TNF- α . *J Invest Dermatol*. 1997;109(1):20-4.
 71. Laethem A Van, Claerhout S, Garmyn M, Agostinis P. The sunburn cell: Regulation of death and survival of the keratinocyte. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(8):1547–53.
 72. Murray JC, Burch JA, Streilein RD, Iannacchione MA, Hall RP, Pinnell SR. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59(3):418–25.
 73. Lopez-Torres M, Thiele JJ, Shindo Y, Han D, Packer L. Topical application of α -tocopherol modulates the antioxidant network and diminishes ultraviolet-induced oxidative damage in murine skin. *Br J Dermatol*. 1998;138(2):207–15.
 74. Jurkiewicz BA, Bissett DL, Buettner GR. Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin. *J Invest Dermatol*. 1995;104(4):484-8.
 75. Oresajo C, Stephens T, Hino PD, Law RM, Yatskayer M, Foltis P, et al. Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin. *J Cosmet Dermatol*. 2008;7(4):290–7.
 76. Ricciarelli R, Maroni P, Özer N, Zingg JM, Azzi A. Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by α -tocopherol via protein kinase C inhibition. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(7–8):729–37.
 77. Njus D, Kelley PM. Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo. *FEBS Lett*. 1991;284(2):147–51.
 78. Steenvoorden DPT, Beijersbergen Van Henegouwen GMJ. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B*.

1997;41(1-2):1-10.

79. Lin F, Lin J, Gupta RD, Tournas JA, Burch JA, Angelica M, et al. Ferulic acid stabilizes a topical solution containing vitamins C and E and doubles its photoprotection for skin. *J Invest Dermatol.* 2005;125(4):826-32

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

Avaliar a eficácia e segurança da formulação de antioxidantes tópicos (L- ácido ascórbico 15%, alfa-tocoferol 1%, ácido ferúlico 0,5%) versus creme placebo associado ao filtro solar comum ou filtro solar com fotoliase no tratamento da pele de antebraços com fotodano avançado caracterizada por QAs, no contexto do campo de cancerização cutâneo. Espera-se que o clearance completo das QAs, a melhora da escala de fotoenvelhecimento e do escore de gravidade das QAs seja superior no grupo que utilizou fotoliase e antioxidantes tópicos ao término de oito semanas do estudo.

3 MANUSCRITO

MANUSCRITO

Formato: British Journal of Dermatology

Section: Original article

Title: Topical antioxidants associated with sunscreen with or without photolyase are effective in treating advanced photodamage and cutaneous field cancerization – a randomized clinical trial

Running head: Sunscreen versus sunscreen with photolyase and placebo versus antioxidants in the treatment of cutaneous field cancerization.

Counting: words = 3637 ; tables = 3 ; figure = 2 ; appendix = 7

Authors: BA Alvares¹, AC Miola¹, JV Schmitt¹, HA Miot¹, LPF Abbade¹
¹ Department of Dermatology and Radiotherapy, FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

Corresponding author:

Bruno Augusto Alvares

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: brunoalvares_91@hotmail.com

What do we know about this topic?

- Different types of treatments are available for treating advanced photodamage characterized by the presence of actinic keratosis and cutaneous field cancerization, but up to date none is considered a gold standard.
- Photolyase, an enzyme not produced by mammals, has shown in past studies efficacy in the treatment of actinic keratosis and cutaneous field cancerization.
- There are no studies that analyze the efficacy of topic antioxidants in the treatment of actinic keratosis and cutaneous field cancerization.

What does this study add?

- Topical antioxidant formula containing vitamin C, vitamin E and ferulic acid decreases activity of cutaneous field cancerization.
- Sunscreen containing photolyase does not differ from regular sunscreen in the treatment of actinic keratosis or cutaneous field cancerization.

Abstract

Introduction: Several treatments are available for skin with advanced photodamage, which is characterized by the presence of actinic keratoses (AK), with no gold standard.

Objective: To evaluate the effectiveness and safety of topical antioxidant formulation (L- ascorbic acid 15%, alpha-tocopherol 1%, ferulic acid 0.5%) associated with common sunscreen or sunscreen with photolyase in treating advanced photodamage.

Method: Randomized, double-blind and factorial clinical trial. Participants with AKs on their forearms were randomized to apply sunscreen (FPS) or sunscreen with photolyase (EryF) on both forearms during the day. One of the forearms in each group was randomized again to receive topical antioxidants (AOx) and the other forearm was a placebo cream (both for night application). The four groups were EryF + AOx, EryF + placebo, FPS + AOx, FPS + placebo. The duration of treatments was 8 weeks. The primary outcomes were total AK clearance, photoaging scale and AK severity score, and the secondary outcomes were a reduction in AK count, partial clearance rate and safety.

Results: There were 40 participants included. All groups showed a significant improvement in outcomes over time. There was no significant difference between FPS and EryF, however AOx led to a significant reduction in the QA count. Partial clearance was obtained in 18 (47.4%) forearms treated with AOx and in nine (23.7%) treated with placebo ($p < 0.05$).

Conclusions: Sunscreen and sunscreen containing photolyase showed no significant difference. AOx improved photodamage by reducing the AK count in the forearms.

This study was recorded in the Brazilian Registry of Clinical Trials (REBEC no. RBR-957zf2).

Keywords: Dermatology, Photodamage, Actinic keratosis, Field cancerization, Squamous cell carcinoma, Oncology, Sunscreen, Photolyase, L-ascorbic acid, alpha-tocopherol, ferulic acid.

INTRODUCTION

Ultraviolet radiation (UVR) exposure is one of the most important promoters of extrinsic skin aging. UVR-induced photodamage is characterized by a series of skin changes that include dyschromia, lentiginosis, elastosis, formation of fine and deep wrinkles, telangiectasis, erythema, atrophic scars, texture changes and the appearance of pre-neoplastic lesions such as actinic keratosis (AK) and malignant neoplasms such as squamous cell carcinoma (SCC) (1).

AK is a frequent dermatosis, characterized histologically by the proliferation of genetically altered keratinocytes, being a marker of chronic photodamage. Typically, it is located in photoexposed areas such as the face, scalp, forearms and back of the hands, especially in fair-skinned patients (2). Despite presenting low morbidity, it is one of the main causes of seeking dermatological care (3–5).

Exposure to UVR, composed of UVA and UVB radiation, in addition to promoting photoaging, is the main risk factor for the development of AK (2). The UVA spectrum promotes the formation of reactive oxygen species (ROS), leading to oxidative stress and damage to keratinocyte DNA (2,6,7). The UVB spectrum is responsible for the formation of pyrimidine dimers in the keratinocyte DNA, the main ones being the cyclobutane pyrimidine (CBP) and pyrimidine-pyrimidone photo-products (6-4PP)(6).

The diagnosis and treatment of AK is important because it presents a risk of progressing to SCC. Studies have different percentages of risk of transformation, ranging from 0.025 to 16% per AK each year (8).

Generally, multiple AKs occur in the same area of photodamaged skin, which accumulates changes in the keratinocyte genetic material, a concept that defines the cutaneous field cancerization (CFC) (9).

Therapies targeting AK are available and include cryotherapy, laser, surgery (shaving or excision), curettage (10), among others. However, the treatment of CFC should be preferred as it can lead to a reduction in the incidence of AK and SCC (11). Among the treatments for CFC, the most frequently used are 5-fluorouracil (5FU) (12), ingenol mebutate (13), imiquimod (14), tretinoin (15), diclofenac (16), colchicine (17), photodynamic therapy (PDT) (18), and others. There is no specific treatment

recommendation for CFC in current guidelines and in the Cochrane systematic review database (19–21).

Recently, photolyase, a monomeric enzyme not found in the cells of placental mammals, has emerged as an alternative for the treatment of AK and CFC (22–24). The enzyme has the ability to break down the dimers of CBP and 6-4PP by means of visible light, a process called photoreactivation (22,25). Thus, it is able to undo the main genetic changes induced by UVR in the DNA of keratinocytes. Puig et al published a review article that concluded that there is evidence to support the beneficial effects in the treatment of AK and CFC with topical photolyase, promoting clinical, dermoscopic and histological improvement (2).

Considering the indirect damage caused by UVR, through the formation of ROS, studies with antioxidant agents (AOx) have started. Vitamin C (ascorbic acid) is the most prevalent water-soluble AOx in the epidermis (26), has the ability to neutralize free radicals and ROS in the aqueous compartments of the skin and plays an important role in the regeneration of vitamin E (tocopherol) (27). Vitamin E, in turn, is a fat-soluble AOx present in the horny layer, produced from the sebaceous glands. Has the ability to protect the cell membrane from oxidative stress (26).

Murray et al demonstrated that the combination of three AOx (L-ascorbic acid 15%, alpha-tocopherol 1% and ferulic acid 0.5%), when compared to placebo (vehicle), showed a photoprotective effect, by reducing the erythema induced by UVR, significantly reduced the formation of “sunburn cells”, as well as reduced the expression of p53 and the formation of thymine dimers (28).

The aim of this study is to evaluate the therapeutic efficacy of using sunscreen with photolyase compared to sunscreen alone, as well as to compare the combination of topical formulation of antioxidants (L-ascorbic acid 15%, alpha-tocopherol 1% and ferulic acid 0, 5%) versus placebo in the treatment of advanced photodamage characterized by the presence of AK and CFC of the forearms, after an interval of 8 weeks.

METHODS

Type of study

Randomized controlled clinical trial with factorial design, open for sunscreen and sunscreen containing photolyase and double blind for topical antioxidant and placebo cream. The study was approved by the institution's ethics committee (nº 2.529.697 - appendix 1) and registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials (nº RBR-957zf2). The allocation was made in a 1:1 ratio.

Participants

Participants in this study were recruited from a public health service in a Dermatology outpatient clinic at the Medical School of Botucatu - UNESP. Patients of both sexes aged between 60 and 90 years, with a clinical diagnosis of AK in the forearms (3 - 10 lesions) and who had not undergone treatment for AK (except for sunscreen) in the last 6 months were included after signing the informed consent form (appendix 2).

The exclusion criteria were: number of AK below three or above ten; other extensive dermatoses affecting the forearms; current and previous clinical diagnosis or evidence of any medical condition that exposes the patient to increased risks, interferes with the safety or efficacy of the proposed treatment; present hypersensitivity or allergy to any of the substances under study; use of any systemic or topical immunosuppressive substance, oral retinoids, in addition to other local treatments (corticosteroids, anti-inflammatories, retinoids); immunocompromised individuals; coagulation disorders.

Interventions

Included participants were randomized to receive treatment with photolyase sunscreen SPF 99 (EryF), containing photolyase in multilamellar liposomes and using as chemical filters octocrylene, titanium dioxide, avobenzene and tinosorb-S, to be used twice daily with application on both forearms; or common sunscreen SPF 99 using as chemical filters tinosorb-M, tinosorb-S, avobenzene, octyl-triazone and 4-methylbenzylidene camphor, with the same SPF of the product containing photolyase, also to be used twice a day on both forearms. These interventions were not performed

blindly for participants and researchers, as there was no possibility to hide the presentations of the products used (the study used the commercial products for sunscreen with photolyase and common sunscreen, and they had different packages).

The forearms of the participants in each of the groups mentioned above were randomized to apply moisturizing cream (placebo) to a forearm and cream composed of antioxidant agents formulated with L- ascorbic acid 15%, alpha-tocopherol 1% and ferulic acid 0, 5% on the other forearm (AOx), both applied once a day, at night. For these nocturnal interventions, there was blinding for both participants and researchers.

Thus, there was the formation of 4 groups composed of forearms: EryF + AOx, EryF + placebo, SPF + AOx, SPF + placebo (Figure 1). The placebo and AOx were handled in a three-phase emulsion, white in color and without odor. Both products were packaged in identical airless packaging, which prevents oxidation of ascorbic acid contained in one of the formulations. The packages were labeled only with the identification topic 1 and topic 2. After this last randomization, the packages were identified with letters "R" for application of the product on the right forearm and "L" for application on the left forearm, so that the patient could identify which side to apply each product. For each patient, the proposed treatments lasted eight weeks. There was standardization of the areas for counting and evaluating AK lesions and CFC. The evaluated area was limited to a line that crosses the metacarpophalangeal joints as a distal limit, and a line that extends from the antecubital fossa to the lateral epicondyle of the forearms as the proximal limit.

Outcomes

The primary outcomes were the total AK clearance rate, reduction in CFC activity assessed by improving the forearm photoaging scale (FPS) (1) and forearm AK severity score (AKSS) (29) after 8 weeks of treatment.

Secondary outcomes were a reduction in the AK count, a partial clearance rate (reduction of 50% or more), adverse effects related to treatment, tolerability and the appearance of non-melanoma skin tumors.

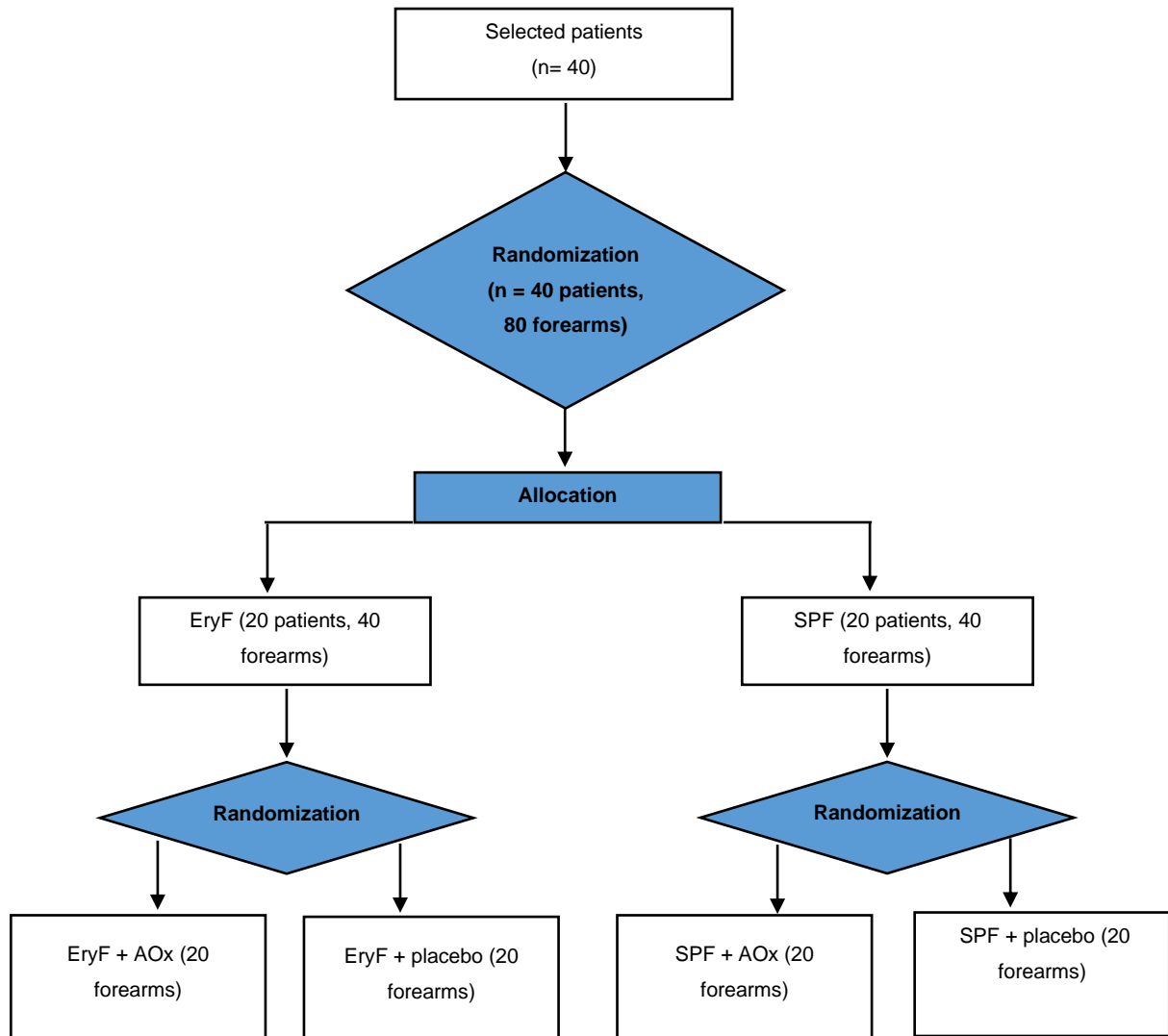


Figure 1. Flowchart of randomization

Sample calculation

The sample was dimensioned in order to detect a reduction in difference of more than 10% between the groups and equivalent standard deviation of the differences. The power of 0.9, alpha of 0.05, and dropout estimate of 10% were adopted, resulting in 40 patients (80 forearms).

Randomization and evaluations

Participants and forearms were randomized into blocks by computer simulation. After computational randomization, the combinations of treatments generated were separated individually in sealed envelopes. The envelopes were kept

with the researcher and, at the time of inclusion, an envelope was randomly selected to guide the patient's treatment.

The participants were evaluated in two moments: T0 - inclusion, randomization, clinical evaluation and beginning of treatments; T60 (after 8 weeks of treatment) - clinical evaluation, evaluation of adverse effects and tolerability.

In the inclusion, the AKs were counted and marked with pen for each forearm, respecting the anatomical limits considered above, the evaluation form was filled, the forearm photoaging scale (appendix 3) and the forearms AK severity score (appendix 4) were applied.

The forearm photoaging scale takes into account the number of superficial and hypertrophic AKs, amount and severity of wrinkles, solar lentiginosis, visible purple, starred atrophic scars, elastosis and loss of elasticity. All of these parameters are classic findings of a photoaged skin. Each parameter and its degree of severity is assigned a value from zero to four. All parameters are added and the higher the total value, the greater the photodamage.

The forearm AK severity scale, on the other hand, takes into account the number of lesions and the following characteristics: degree of erythema, hyperkeratosis, infiltration and diameter (measured in millimeters) of the AKs. Each of the criteria is graded from zero to three. The lesions are characterized individually and the values are added to obtain the total in the studied area. The higher the total value, the greater the severity of the AKs and CFC.

The evaluations of patients at both times were performed by the same evaluator who was unaware of the treatment indicated for the patient regarding the use of topical antioxidant and placebo. Patients were also unaware of which formula was a placebo and topical antioxidant. At the end of the study, blinding was revealed.

Statistical analysis

All participants included in the study and randomized are part of the ITT (intention to treat) population. Data analysis was performed for the ITT population using a generalized mixed effects linear model that deals with the missing data in its analytical structure (30).

As for the description of the groups, the categorical variables were presented through absolute number and percentage. Continuous variables were assessed for normality by the Shapiro-Wilk test and represented by means and standard deviations, or medians and quartiles (p25-p75).

The number of AKs, the forearm photoaging scale and the forearm AK severity score were compared for time and groups (over time) using the generalized linear model of mixed effects, robust covariance structure, covariance matrix autoregressive type 1, post-hoc comparison with Sidak comparison and negative gamma or binomial probability adjustment, when indicated.

The effect size was calculated by the difference in the averages of each variable at T60 and T0 and the confidence interval using the bootstrap technique with a thousand resamples.

Data were tabulated in Microsoft Excel 2019 and statistical analysis was performed on IBM SPSS 22.0. P value <0.05 being considered significant.

RESULTS

Between January 2019 and January 2020, 40 participants were eligible and randomized for the study. Twenty forearms were part of the EryF + AOx group and the EryF + placebo group. Twenty forearms were part of the SPF + AOx group and the SPF + placebo group. There were 2 dropouts in the EryF group, as patients did not return for reevaluation on the scheduled date, even after rescheduling (Figure 2).

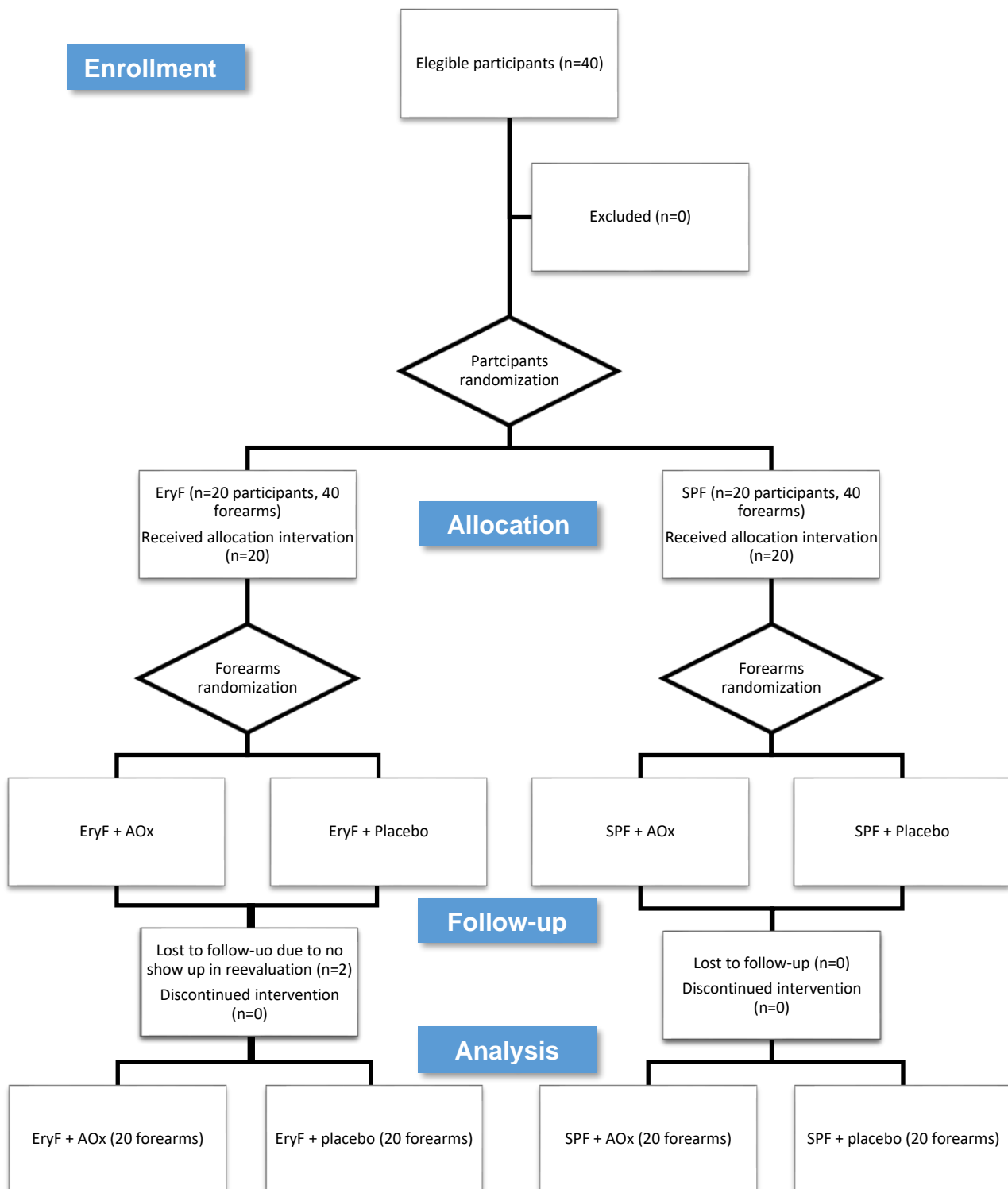


Figure 2. CONSORT flow diagram (ITT evaluation)

The main clinical and demographic data of the 40 participants at baseline (T0) are described in table 1. There was no statistical difference between groups for any of the variables, including AK count, forearms photoaging scale and forearms AK severity score.

Table 1. Main demographic characteristics of the participants in the inclusion (T0) according to the randomized group.

Variable	SPF	EryF	Total	p-value
Sex – n (%)				0,519
Male	9 (45)	7 (35)	16 (40)	
Female	11 (55)	13 (65)	24 (60)	
Fototype – n (%)				0,08
I	- (-)	1 (5)	1 (3)	
II	9 (45)	13 (65)	22 (55)	
III	11 (55)	6 (30)	17 (43)	
Age (years)*	73 (7)	73 (9)	73 (8)	0,938
Scholarity – n (%)				0,742
Illiterate	2 (10)	2 (10)	4 (10)	
Elementary	15 (75)	16 (80)	31 (78)	
High School	3 (15)	2 (10)	5 (13)	
FPS**	105 (93-114)	110 (78-118)	107 (91-116)	0,391
AK Count (T0)**	7 (6-9)	7 (6-8)	7 (6-9)	0,321
AKSS (T0)**	76 (46-100)	70 (52-91)	72 (51-95)	0,459

SPF: Conventional sunscreen group; EryF: Sunscreen group with photolyase; AK: Actinic keratosis; FPS: Forearms photoaging scale; AKSS: Forearms AK severity score.

* mean (standard deviation); ** median (p25-p75).

There was no statistical difference for primary and secondary outcomes when comparing the SPF and EryF groups (Table 2). Total clearance was achieved by three forearms treated with AOx (7.9%; 95% CI 2.6 - 13.2) and one forearm treated with placebo (2.6%; 95% CI 0 - 7.9%), not reaching statistical significance. ($p = 0.997$). Partial clearance (50% or more reduction in AQ) was achieved by 18 forearms treated with AOx (47.4%; 95% CI 34.2 - 60.5) and nine forearms treated with placebo (23.7%; 95% CI 13, 2 - 34.2) ($p = 0.018$).

Table 2. Main clinical outcomes resulting from treatments.

	SPF		EryF	
	AOx	Placebo	AOx	Placebo
T0				
AK Count*	7 (6-10)	7 (7-9)	7 (6-9)	6 (6-8)
FPS*	105 (94-114)	105 (94-114)	113 (73-117)	108 (78-117)
AKSS*	81 (46-95)	69 (46-111)	70 (53-92)	70 (52-89)
T60				
Total Clearance **	2 (10)	1 (5)	1 (5)	- (-)
FPS*	79 (66-93) ^a	78 (68-93) ^a	81 (68-94) ^a	85 (74-95) ^a
AKSS*	34 (13-51) ^a	38 (18-62) ^a	20 (11-30) ^a	32 (22-43) ^a
AK Count*	4 (3-6) ^{a,b}	5 (4-7) ^a	4 (2-5) ^{a,b}	5 (3-7)
Partial Clearance **	8 (40) ^b	5 (25)	10 (50) ^b	4 (20)

SPF: Conventional sunscreen group; EryF: Sunscreen group with photolyase; AOx: Group with topical antioxidant; FPS: Forearms photoaging scale; AKSS: Forearms AK severity score.

* median (p25-p75; ** n (%); ^a p <0.05 (T0 vs. T60); ^b p <0.05 (AOx vs. Placebo)

There was a reduction in the AK count in all groups over time (p <0.05). In addition, there was a reduction in the AK count in the groups that used AOx (SPF + AOx and EryF + AOx) in relation to those who used placebo, with statistical significance (p <0.05).

The forearm photoaging scale decreased for all groups over time (p <0.05), regardless of the treatment group. There was no statistically significant difference between the other interventions for this outcome.

Likewise, there was a reduction in the severity score of the AKs for all groups over time (p <0.05), this reduction being greater in the groups that used AOx (SPF + AOx and EryF + AOx), but not reaching statistical significance.

Graphical representations of the findings described above are found in Appendices 5, 6 and 7.

The effect size for the outcomes is shown in Table 3. The difference in the AKSS means was higher in the groups that used AOx compared with the groups that used placebo. Better results of partial clearance were also obtained in the groups that used AOx.

Table 3. Difference in means and 95% confidence intervals for the studied outcomes.

	SPF		EryF		Total
	AOx	Placebo	AOx	Placebo	
Total Clearance **	10 (0-25)	5 (0-15)	6 (0-17)	- (-)	5 (1-11)
FPS*	22 (15-29)	20 (14-26)	22 (12-31)	17 (8-26)	20 (17-24)
AKSS*	45 (32-59)	32 (21-42)	53 (42-65)	34 (27-41)	41 (35-47)
AK Count*	2,9 (1,8-4,0)	2,0 (1,2-2,8)	3,6 (2,6-4,6)	1,1 (0,4-1,8)	2,4 (1,9-2,9)
Partial Clearance **	40 (25-60)	25 (10-40)	56 (39-72)	22 (11-33)	36 (26-45)

SPF: Conventional sunscreen group; EryF: Sunscreen group with photolyase; AOx: Group with topical antioxidant;

FPS: Forearms photoaging scale; AKSS: Forearms AK severity score.

* average of the differences; ** percentage of clearance.

Safety and tolerability

With regard to adverse effects, itching was described with the use of AOx and placebo by one participant; another participant described itching with the use of sunscreen containing photolyase. There were no reports of erythema, edema, ulceration or blisters, and the proposed treatments were well tolerated. There was a basal cell carcinoma (BCC) on the left forearm of one of the participants, where he was applying EryF and AOx. Another participant developed a squamous cell carcinoma (SCC) on the left forearm, where he was applying SPF and AOx.

DISCUSSION

This study indicated that there was no difference in the treatment of advanced photodamage (AK and CFC) when comparing the use of sunscreen with photolyase and sunscreen without photolyase. However, the use of an antioxidant formula demonstrated a reduction in the AK count, which reflects a reduction in CFC activity. Although AOx are frequently used as anti-age products, our study showed improvement in AK count, without a significant change in other aspects of the forearm photoaging scale.

AKs are the main clinical manifestation of CFC, and most researchers consider their count as a marker of their activity (31). Although subjective and subject to errors, the AKs count is still the most studied outcome in clinical trials to determine the effectiveness of the proposed treatments.

When interventions were analyzed for time, all outcomes showed a statistically significant improvement. The reduction or resolution of AKs can occur in up to 21% of

patients within one year (32). In our clinical trial, all participants used at least SPF, with reduction or resolution of the AKs in the forearms of 38.7%. In addition, two articles indicated that regular use of sunscreen can reduce the AK count by up to 25% in immunocompetent patients, and 50% in transplanted solid organs. (33,34).

In a recent review article, Puig et al analyzed the evidence available in the last ten years of using sunscreen containing photolyase. The authors analyzed 11 studies, totaling 228 participants, only three of which were randomized clinical trials, and concluded that there is evidence that supports the use of the substance in the treatment of AK and CFC (2).

One of the clinical trials analyzed in the review was that of Moscarela et al, which compared the use of sunscreen with photolyase and sunscreen SPF 50 in patients with four or more AKs on the face and scalp. The study included 50 participants, but had 14 dropouts, resulting in 17 participants who used sunscreen with photolyase and 19 sunscreen SPF 50. After 6 months of follow-up, there was a reduction in the AK count in both groups, not reaching statistical significance. When evaluating the subgroup of participants with up to ten AKs ($n = 20$), the sunscreen group with photolyase proved to be superior in reducing the AK count. Also in this subgroup, 14% of participants who used sunscreen with photolyase had new lesions versus 54% in those who used sunscreen SPF 50 (35). In our study, only one patient in the EryF group presented new AKs versus none in the SPF group.

Eibenschutz et al conducted a clinical trial with 30 participants to evaluate the effectiveness of sunscreen with photolyase versus sunscreen in the treatment of AK and CFC of the face and scalp after one session of MAL-PDT. The AKs were counted 2 weeks after PDT and reassessed after 9 months of treatment. An increase in the number of AKs was observed in the participants who used sunscreen, while there was a reduction in the AKs in those who used sunscreen with photolyase ($p = 0.001$) (36).

Puig et al developed a prospective, controlled, non-randomized study with 13 participants with AKs in exposed areas to evaluate the effectiveness of sunscreen with photolyase versus sunscreen for 4 weeks in the treatment of AKs and CFC. The groups were formed by nine participants in the sunscreen with photolyase group and three in the sunscreen group. The study analyzed the following outcomes: clinical improvement (reduction of erythema, desquamation and follicular plugs), dermatoscopy, immunohistochemistry and the appearance on confocal microscopy. There was a

statistically significant improvement in all the outcomes studied in the group that used sunscreen with photolyase, but there was no improvement in the group that used sunscreen. However, this is a non-randomized study, with a low number of participants, and the AK count was not analyzed as an outcome, in addition to presenting a disproportionate distribution between the groups, which compromises the data validity. (22).

Our randomized clinical trial did not show superior efficacy of sunscreen containing photolyase in the treatment of AKs of the forearms of immunocompetent patients, therefore with opposite results to the previous studies cited.

The use of antioxidant substances associated with sunscreen has become frequent, since several studies have demonstrated a photoprotective effect by reducing erythema induced by UVR, reducing the expression of p53, reducing the formation of “sunburn cells” and decreasing the expression of immunosuppressive cytokines (28).

Vitamin C (ascorbic acid) is a water-soluble AOx and is the predominant AOx in the skin (26). It has the ability to neutralize free radicals in the aqueous compartments of the skin, in addition to playing an important role in the regeneration of vitamin E (tocopherol) (27). Vitamin E is a fat-soluble AOx, found in greater concentration in the deep layers of the stratum corneum, being produced by the sebaceous glands. The main function of vitamin E is to protect the cell membrane from oxidative stress (26).

The association of L-ascorbic acid at 15% with alpha-tocopherol at 1% demonstrated that they have a synergistic effect on the skin. When alpha-tocopherol neutralizes oxidative stress in lipids, its oxidized products can be regenerated by L-ascorbic acid. This interaction helps to renew the antioxidant protection in the tissues. The formulation containing the two products doubled the UV protection for the skin when compared to L-ascorbic acid alone (38). Lin et al demonstrated that the addition of 0.5% ferulic acid, a vegetable antioxidant, increased both the stability of the formula and doubled the UV protection for the skin. It is postulated that the substance protects L-ascorbic acid and alpha-tocopherol serving as a “sacrifice” substrate, undergoing oxidation before the others in the formula (39).

To date, there have been no studies evaluating the use of AOx for the treatment of AK and CFC. Our study demonstrated a beneficial and safe effect of the

combination of L-ascorbic acid 15%, alpha-tocopherol 1% and ferulic acid 0.5% in reducing the number of AKs and, consequently, controlling CFC activity.

One of the limitations of this study was that it did not directly compare the SPF and EryF groups, making this comparison inferior to the AOx versus placebo comparison. In addition, the study included only patients with AK count between three and ten, and the results may not apply to those patients with a greater number of lesions, as well as immunosuppressed patients, to whom the results may also not be applicable. Also, the sunscreens used did not have the same chemical filters, although they had the same SPF.

We acknowledge that the 60-day follow-up interval might be related to the poor results of photolyase in the treatment of advanced photodamage with actinic keratosis and cutaneous field cancerization. Perhaps to achieve better results with photolyase, its use should be prolonged. However, further studies must be carried out to prove this hypothesis. In addition, as demonstrated by Eibenschutz et al (36) it is possible that photolyase has its best indication in preventing the recurrence of actinic keratoses treated by other methods.

Also, we consider that prolonged use of AOx might be able to improve other signs of photoaging, since studies showed reduction in the transcription of matrix metalloproteinase-1 e inhibit timine dimer formation, reducing the collagen breakdown process and carcinogenesis, respectively (40).

The strength of our study was the possibility of evaluating the effects of three interventions in a factorial study design, in a group of immunocompetent patients who frequently present AK in their forearms.

CONCLUSIONS

The SPF 99 sunscreen containing photolyase was not superior to the SPF 99 sunscreen for the studied outcomes.

The use of the topical antioxidant formula (L - ascorbic acid 15%, alpha tocopherol 1% and ferulic acid 0.5%), in addition to being safe and tolerable, has shown to be effective in reducing the AK count in the forearms when associated with sunscreen with or without photolyase. Despite not reaching statistical significance, it is noted that the forearms that used AOx showed a greater reduction in the AK severity score when compared to the other interventions.

FINANCIAL SUPPORT

This study received financial support from the Sao Paulo State Dermatology Support Fund - Sebastião Sampaio (FUNADERSP).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest with any pharmaceutical products, brands or laboratories.

References

1. Guimarães COZ, Bagatin E, Guadanhim LRS, Sternberg F, Picosse FR, Nunes G, et al. Development and validation of a clinical scale for the evaluation of forearm skin photoaging. *J Cutan Med Surg*. 2015;19(4):380–7.
2. Puig S, Granger C, Garre A, Trullàs C, Sanmartin O, Argenziano G. Review of Clinical Evidence over 10 Years on Prevention and Treatment of a Film-Forming Medical Device Containing Photolyase in the Management of Field Cancerization in Actinic Keratosis. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2019;9(2):259–70.
3. Dergham AP, Muraro CC, Ramos EA, Mesquita LAF, Collaço LM. Distribution of diagnosis of neoplastic and pre neoplastic skin lesions at Evangelical Hospital in Curitiba . *An Bras Dermatol*. 2004; 79(5):555-59.
4. Nashan D, Meiss F, Müller M. Therapeutic strategies for actinic keratoses - A systematic review. *Eur J Dermatol*. 2013;23(1):14–32.
5. Nelson C. Diclofenac gel in the treatment of actinic keratoses. *Ther Clin Risk Manag*. 2011;7:207-11.
6. Rodust PM, Stockfleth E, Ulrich C, Leverkus M, Eberle J. UV-induced squamous cell carcinoma - A role for antiapoptotic signalling pathways. *Br J Dermatol*. 2009;161 Suppl. 3:107–15.
7. Nishigori C. Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci*. 2006;5(2):208–14.
8. Martin GM. Impact of interval and combination therapies on the management of actinic keratosis: Review and clinical considerations. *J Dermatolog Treat*. 2011;22(5):288–97.
9. Szeimies RM, Torezan L, Niwa A, Valente N, Unger P, Kohl E, et al. Clinical, histopathological and immunohistochemical assessment of human skin field cancerization before and after photodynamic therapy. *Br J Dermatol*. 2012;167(1):150–9.
10. Dianzani C, Conforti C, Giuffrida R, Corneli P, di Meo N, Farinazzo E, et al. Current therapies for actinic keratosis. *Int J Dermatol*. 2020;59(6):677-84.
11. Ulrich M, Maltusch A, Röwert-Huber J, González S, Sterry W, Stockfleth E, et al. Actinic keratoses: Non-invasive diagnosis for field cancerisation. *Br J Dermatol*. 2007;156 Suppl. 3:13–7.
12. Hagele T, Levender MM, Davis SA, Williford PM, Feldman SR. Practice Trends

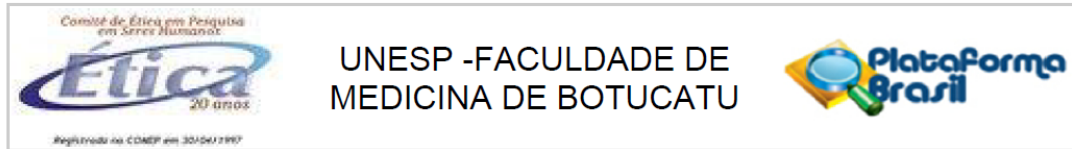
-
- in the Treatment of Actinic Keratosis in the Cryotherapy plus Fluorouracil Are Underused despite Evidence of Benefit. *J Cutan Med Surg.* 2012;16(2):107–14.
13. Lebwohl M, Swanson N, Anderson LL, Melgaard A, Stat MS, Xu Z, et al. Ingenol Mebutate Gel for Actinic Keratosis. *N Engl J Med.* 2012;366(11):1010–9
 14. Gerster F, Wagner L, Reiter J, Miller L, Testerman TL, Gibson SJ, et al. Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod. *J Leukoc Biol.* 2017;58(3):365–72.
 15. Ianhez M, Fleury Junior LFF, Miot HA, Bagatin E. Retinoids for prevention and treatment of actinic keratosis. *An Bras Dermatol.* 2013;88(4):585–93.
 16. Wolf JE Jr, Taylor JR, Tschen E, Kang S. Topical 3.0 % diclofenac in 2.5 % hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol.* 2001;40(11):709–13.
 17. Grimaître M, Etienne A, Fathi M, Piletta P-A, Saurat J-H. Topical colchicine therapy for actinic keratoses. *Dermatology.* 2000;200(4):346–8.
 18. Morton CA, Szeimies RM, Sidoroff A, Braathen LR. European guidelines for topical photodynamic therapy part 2: Emerging indications - Field cancerization, photorejuvenation and inflammatory/infective dermatoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;27(6):672–9.
 19. de Berker D, McGregor JM, Mohd Mustapa MF, Exton LS, Hughes BR. British Association of Dermatologists' guidelines for the care of patients with actinic keratosis 2017. *Br J Dermatol.* 2017;176(1):20–43.
 20. Werner RN, Stockfleth E, Connolly SM, Correia O, Erdmann R, Foley P, et al. Evidence- and consensus-based (S3) Guidelines for the Treatment of Actinic Keratosis - International League of Dermatological Societies in cooperation with the European Dermatology Forum - Short version. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(11):2069–79.
 21. Gupta AK, Paquet M, Villanueva E, Brintnell W. Interventions for actinic keratoses. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;
 22. Puig S, Puig-Butillé JA, Díaz MA, Trullas C, Malvehy J. Field Cancerisation Improvement with Topical Application of a Film-Forming Medical Device Containing Photolyase and UV Filters in Patients with Actinic Keratosis, a Pilot Study. *J Clin Exp Dermatol Res.* 2014;5(3):220.
 23. Carducci M, Pavone PS, De Marco G, Lovati S, Altabas V, Altabas K, 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. Navarrete-Dechent C, Molgó M. The use of a sunscreen containing DNA-photolyase in the treatment of patients with field cancerization and multiple actinic keratoses: A case-series. *Dermatol Online J*. 2017;23(1):4–7.
 25. Jans J, Schul W, Sert Y, Rijkssen Y, Rebel H, Eker APM, et al. Powerful Skin Cancer Protection by a CPD-Photolyase Transgene. *Curr Biol*. 2005;15(2):105–15.
 26. Thiele JJ, Traber MG, Packer L. Depletion of human stratum corneum vitamin E: An early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation. *J Invest Dermatol*. 1998;110(5):756–61.
 27. Fisher G, Datta S, Talwar H, Wang Z, Varani J, Kang S. Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. *Nature*. 1996;335–9.
 28. Murray JC, Burch JA, Streilein RD, Iannacchione MA, Hall RP, Pinnell SR. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59(3):418–25.
 29. Dirschka T, Pellacani G, Micali G, Malveyh J, Stratigos AJ, Casari A, et al. A proposed scoring system for assessing the severity of actinic keratosis on the head: actinic keratosis area and severity index. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31(8):1295–302.
 30. Miot HA. Valores anômalos e dados faltantes em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc Bras*. 2019;18:1–7.
 31. Ianhez M, Junior LFFF, Bagatin E, Miot HA. The reliability of counting actinic keratosis. *Arch Dermatol Res*. 2013;305(9):841–4.
 32. Harvey I, Frankel S, Marks R, Shalom D, Nolan-Farrell M. Non-melanoma skin cancer and solar keratoses. I. Methods and descriptive results of the South Wales skin cancer study. *Br J Cancer*. 1996;74(8):1302–7.
 33. Thompson S, Jolley D, Marks R. Reduction of solar keratosis by regular sunscreen use. *N Engl J Med*. 1993;329:1147–51.
 34. Ulrich C, Jürgensen JS, Degen A, Hackethal M, Ulrich M, Patel MJ, et al. Prevention of non-melanoma skin cancer in organ transplant patients by regular

-
- use of a sunscreen: A 24 months, prospective, case-control study. *Br J Dermatol.* 2009;161 Suppl. 3:78–84.
35. Moscarella E, Argenziano G, Longo C, Aladren S. Management of cancerization field with a medical device containing photolyase: a randomized, double-blind, parallel-group pilot study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;37(9):401–3.
 36. Eibenschutz L, Silipo V, De Simone P, Buccini PL, Ferrari A, Carbone A, et al. A 9-month, randomized, assessor-blinded, parallel-group study to evaluate clinical effects of film-forming medical devices containing photolyase and sun filters in the treatment of field cancerization compared with sunscreen in patients after successful photodynamic therapy for actinic keratosis. *Br J Dermatol.* 2016;175(6):1391–93.
 37. Njus D, Kelley PM. Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo. *FEBS Lett.* 1991;284(2):147–51.
 38. Steenvoorden DPT, Beijersbergen Van Henegouwen GMJ. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B.* 1997;41(1–2):1–10.
 39. Lin F, Lin J, Gupta RD, Tournas JA, Burch JA, Angelica M, et al. Ferulic acid stabilizes a topical solution containing vitamins C and E and doubles its photoprotection for skin. *J Invest Dermatol.* 2005;125(4):826–32
 40. Ricciarelli R, Maroni P, Özer N, Zingg JM, Azzi A. Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by α -tocopherol via protein kinase C inhibition. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(7–8):729–37.

APPENDICES

Appendix 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Uso da fotoliase e antioxidantes tópicos no tratamento da queratose actínica e do campo de cancerização cutâneo: um ensaio clínico randomizado.

Pesquisador: BRUNO AUGUSTO ALVARES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 83473718.0.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.529.697

Apresentação do Projeto:

O estudo "Uso da fotoliase e antioxidantes tópicos no tratamento da queratose actínica e do campo de cancerização cutâneo: um ensaio clínico randomizado" é um estudo clínico e randomizado, sendo a dissertação de mestrado do aluno Bruno Alvares sob orientação do professor Hélio. São 40 sujeitos que serão randomizados em 2 grupos para análise após 6 meses da terapia de fotoliase e antioxidantes tópicos.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é o de avaliar a eficácia e segurança da fotoliase e antioxidantes tópicos no tratamento da queratose actínica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos e como efeito adverso possível tem-se a intolerância/alergia possível à componentes utilizados na formulação dos cremes. Os benefícios são o de melhor conhecimento clínico desse tipo de terapia dermatológica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com grande interesse científico, exequível, excelente desenho metodológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão corretamente postados (TCLE, carta EAP, cronograma execução etc.)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

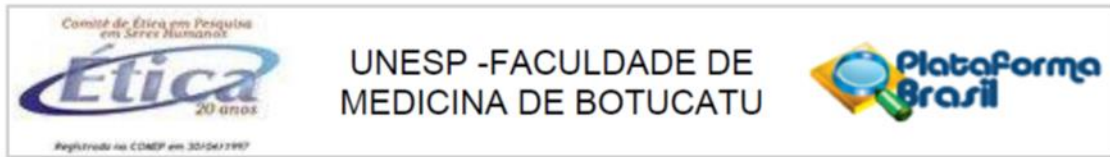
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.529.697

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 05 de março de 2018, o projeto encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

No entanto, informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "Notificação", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1060918.pdf	05/02/2018 21:35:47		Aceito
Orçamento	OrcamentoEstimado.docx	05/02/2018 21:14:47	BRUNO AUGUSTO ALVARES	Aceito
Outros	AnuenciaHCFMB.pdf	05/02/2018 21:05:11	BRUNO AUGUSTO ALVARES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaEAP.pdf	05/02/2018 21:02:48	BRUNO AUGUSTO ALVARES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoFinalBRUNOALVARES.docx	05/02/2018 21:00:28	BRUNO AUGUSTO ALVARES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	05/02/2018 20:57:14	BRUNO AUGUSTO ALVARES	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	05/02/2018 20:56:32	BRUNO AUGUSTO ALVARES	Aceito
Folha de Rosto	PlataformaBrasil6BrunoAugustoAlvares.Pdf	05/02/2018 20:42:50	BRUNO AUGUSTO ALVARES	Aceito

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

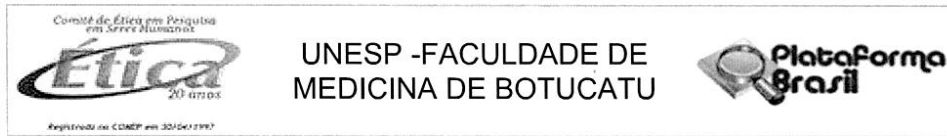
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.529.697

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 07 de Março de 2018

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)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br

Appendix 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

RESOLUÇÃO 466/2012

(Participante maior de 18 anos)

CONVIDO o Senhor (a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Uso de filtro solar contendo fotoliase e antioxidantes tópicos no tratamento da queratose actínica e do campo de cancerização cutâneo: um ensaio clínico randomizado”, que será desenvolvido por mim Bruno Augusto Alvares, médico, com orientação do profissional médico Luciana Patrícia Fernandes Abbade e Professora da Faculdade de Medicina de Botucatu –UNESP.

A pesquisa consta em avaliar seus antebraços e submetê-los à tratamentos tópicos para comparação de resultados. Ambos os tratamentos são efetivos, sendo assim você estará em tratamento de qualquer forma. Não haverá necessidade de biópsia, a avaliação consta apenas na avaliação visual dos antebraços antes e após o tratamento proposto.

Para o tratamento com os produtos ISDIN Eryfotona AK-NMSC ou Episol SEC FPS 99 serão realizadas duas aplicações em ambos os antebraços diariamente.

Para alguns participantes também será oferecido o tratamento com creme composto de L-acido ascórbico 15%, alfa-tocoferol 1% e ácido ferúlico 0,5% para aplicação uma vez à noite. Outros pacientes receberão creme composto de base hidratante (placebo) para aplicação, na mesma posologia que o anterior. Este creme não apresenta o componente para o tratamento, porém não apresenta outras substâncias que possam piorar o quadro ou causar outro tipo de reação adversa. A indicação do creme placebo ou com componentes ativos será aleatória e cega, ou seja, nem o médico e nem o paciente saberão qual tubo contém componente ou placebo.

Após 8 semanas de tratamento (60 dias) você será submetido à nova avaliação clínica dos antebraços para comparar a eficácia de cada tratamento.

Solicito também seu consentimento para consultar seu prontuário médico para coletar outras informações lá contidas como comorbidades referentes a consultas feitas anteriormente pelo (a) Senhor (a).

Seu benefício em participar será auxiliar os pesquisadores na obtenção do conhecimento dos resultados da pesquisa, podendo auxiliar o tratamento futuro de outros indivíduos.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, sendo que uma via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, desde que minha identidade não seja revelada.

Botucatu, ___/___/_____

Pesquisador

Participante da Pesquisa

Nome (Pesquisador): Bruno Augusto Alvares

Endereço: Rua Professor Mário Cacace, 162 - Botucatu/SP

Telefone: (14) 98105-2222

E-mail: brunoalvares_91@hotmail.com

Nome (Orientador): Luciana Patricia Fernandes Abbade

Endereço: Rubião Júnior - Botucatu/SP - CEP 18618-970

Telefone: (14) 3880-1267

E-mail: dermato@fmb.unesp.br

Appendix 3

Forearm photoaging scale

Time	Right Forearm	Left Arm
T0		
T60		

Item	Severity Index					Multiplier Factor
	0	1	2	3	4	
Actinic keratosis (superficial)	None	1-2	3-5	6-10	>10	x 4
Actinic keratosis (hypertrophic)	None	1	2	3	> 3	x 1
Wrinkles	None	Rare and thin	Multiple and thin	Multiple, thin and deep, yet localized	Multiple, deep and diffuse	x 9
Lentiginosis	0-4	5-10	11-20	21-25	>25	x 4
Visible purple	None	Sim	x	x	x	x 2
Atrophic scars	None	Sim	x	x	x	x 4
Elastosis	Absent	Localized	Diffuse	x	x	x 8
Loss of elasticity	Absent	Localized	Diffuse	x	x	x 16

Reference

Guimarães COZ, Bagatin E, Guadanhim LRS, Sternberg F, Picosse FR, Nunes G, et al. Development and validation of a clinical scale for the evaluation of forearm skin photoaging. *J Cutan Med Surg.* 2015;19(4):380–7

Appendix 4

Actinic keratoses severity score of the forearms

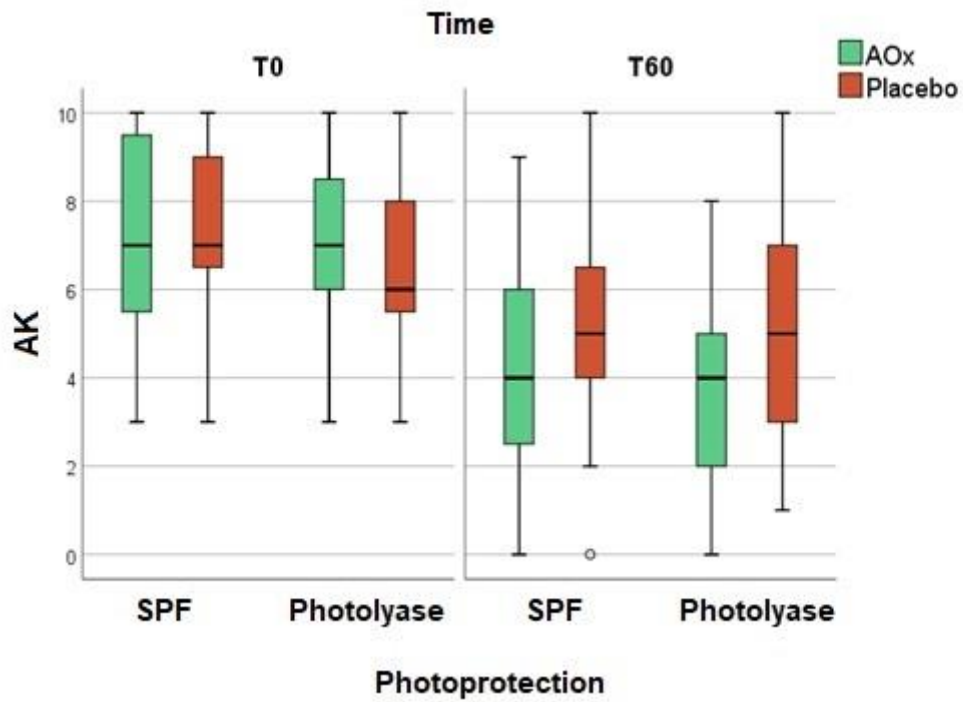
L	E D	E E	H D	H E	I D	I E	Dm D	Dm E	Score (E+H+I)*D T0
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
TOTAL									

Subtitle and graduation: Erythema (E), Hyperkeratosis (H), Infiltration (I) and Diameter (Dm) measured in millimeters with a ruler, each of the criteria being graded between 0 (absent), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (intense).

Reference

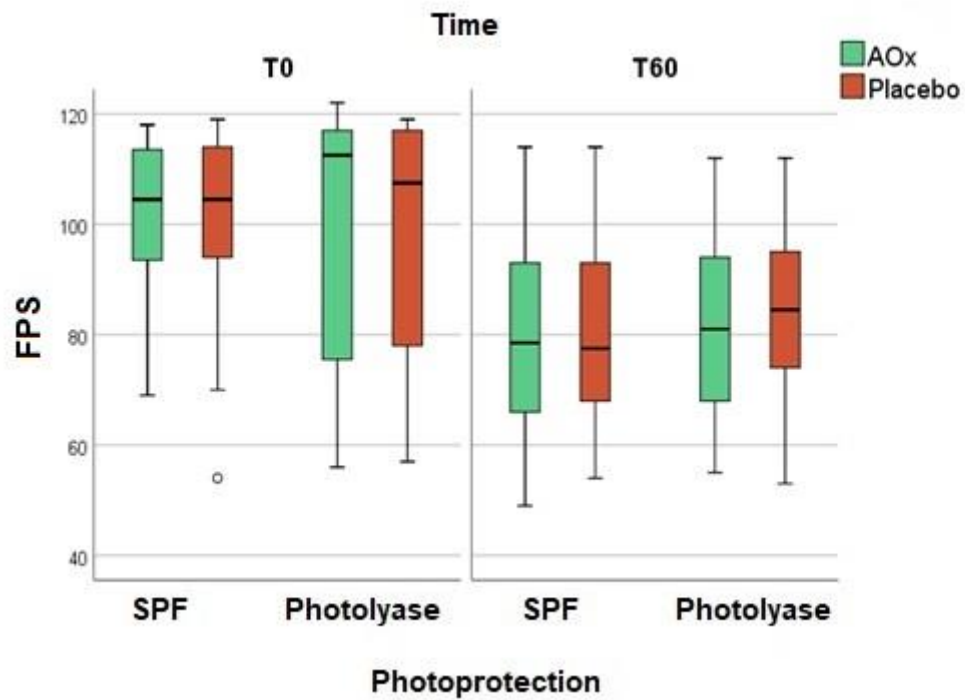
Dirschka T, Pellacani G, Micali G, Malveyh J, Stratigos AJ, Casari A, et al. A proposed scoring system for assessing the severity of actinic keratosis on the head: actinic keratosis area and severity index. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31(8):1295–302

Appendix 5



AK - actinic keratosis; SPF - SPF 99 sunscreen; Photolyase - SPF 99 sunscreen containing photolyase
AK count at T0 and T60, after each treatment.

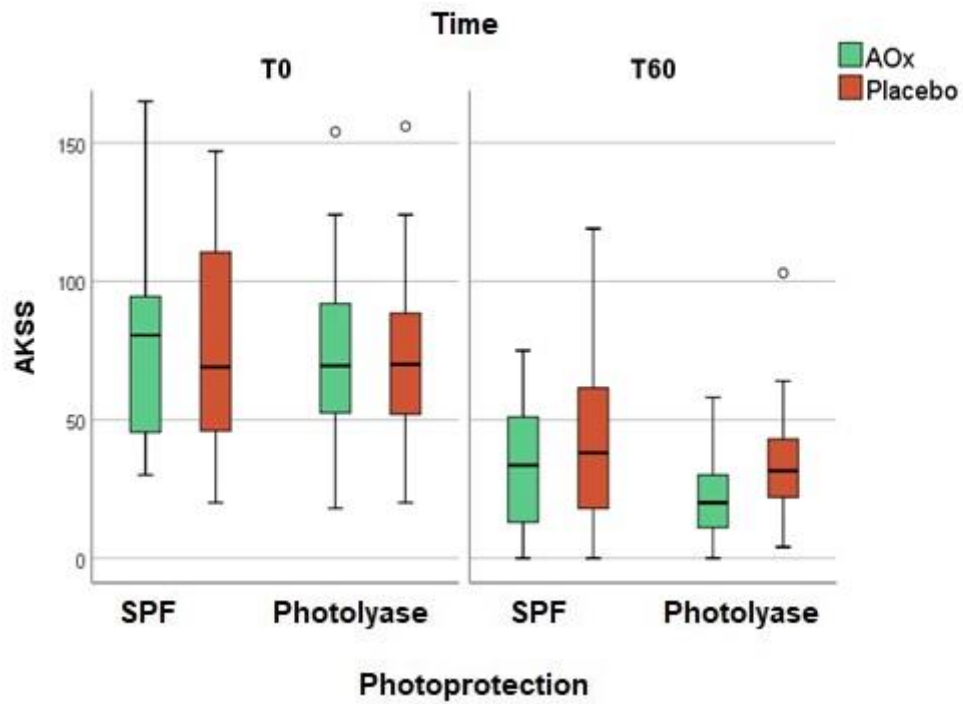
Appendix 6



FPS – Forearms photoaging scale; SPF - SPF 99 sunscreen; Photolyase - SPF 99 sunscreen containing photolyase

Evolution of the forearm photoaging scale at T0 and T60, after each treatment.

Appendix 7



AKSS – Actinic keratosis severity score; SPF - SPF 99 sunscreen; Photolyase - SPF 99 sunscreen containing photolyase

Evolution of the AK severity score at T0 and T60, after each treatment.