

Jaime Manuel Coelho Mendonça

**Terapia Fotodinâmica no Tratamento de
Neoplasias**



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologias

2015/2016

Jaime Manuel Coelho Mendonça

**Terapia Fotodinâmica no Tratamento de
Neoplasias**

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de: Professora Doutora

Maria de Lurdes dos Santos Cristiano



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologias

2015/2016

Terapia Fotodinâmica no Tratamento de Neoplasias

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright © Jaime Manuel Coelho Mendonça

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Dedicatória

À professora Maria de Lurdes pela paciência e pela sua enorme vontade e dedicação em ajudar e ensinar. É uma verdadeira inspiração.

Aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram (e apoiarão), independentemente da situação.

À Xana por estar comigo nos momentos de maior desespero.

E à música, sem ela nada disto seria possível...

Resumo

O cancro é uma das principais causas de morte no mundo. Em Portugal é responsável por cerca de 25 mil mortes por ano, sendo as principais neoplasias malignas as do estômago, cólon, reto e ânus, traqueia, brônquios e pulmão, e mama. A maioria dos tratamentos convencionais para esta patologia, como a quimioterapia e a radioterapia, acarretam inúmeros efeitos adversos, que podem ser bastante debilitantes. Em casos mais extremos é mesmo necessário recorrer à cirurgia.

A terapia fotodinâmica é uma estratégia terapêutica emergente que consiste na utilização de um composto, o fotossensibilizador, que, quando exposto a radiação de um determinado comprimento de onda, é ativado em meio celular, dando origem a espécies reativas de oxigénio, nomeadamente oxigénio singleto. Estas espécies reativas, por sua vez, desencadeiam mecanismos de oxidação que conduzem à destruição das células, por apoptose, necrose ou autofagia. Para além dos mecanismos de morte celular, também estão envolvidos mecanismos de estimulação imunitária e de destruição vascular. Os fotossensibilizadores utilizados atualmente são seletivos para células tumorais, o que torna a terapia fotodinâmica uma boa estratégia antineoplásica. Apresenta várias vantagens relativamente a outras terapêuticas convencionais, como a grande especificidade tumoral, não é um tratamento invasivo e, comparativamente, apresenta efeitos adversos mínimos.

Nesta monografia são descritos os mecanismos de proliferação tumoral assim como o suporte teórico relativo à terapia fotodinâmica e seus mecanismos. Também são apresentados alguns dos fotossensibilizadores mais utilizados para a terapêutica antineoplásica, assim como as suas aplicações clínicas.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, fotossensibilizador, espécies reativas de oxigénio, oxigénio singleto, oncologia

Abstract

Cancer is one of the main causes of death worldwide. In Portugal, it is responsible for over 25 thousand deaths per year, the stomach, colon, rectum and anus, trachea, bronchi and lung, and breast cancers being the most prevalent. Most of the conventional treatments for this pathology, like chemotherapy and radiotherapy, involve complex side effects. On more extreme cases, surgery is often required.

Photodynamic therapy is an emerging strategy involving the use of a photosensitiser which, when exposed to light of a certain wavelength inside a cancer cell, originates reactive oxygen species such as singlet oxygen. These reactive species trigger cellular mechanisms which lead to apoptosis, necrosis or autophagy. Besides these cell death mechanisms, immune system boosting and vascular destruction mechanisms are also involved. The photosensitisers used are highly selective towards cancer cells, which makes photodynamic therapy a good antineoplastic strategy. This is a non-invasive therapy with, comparatively, very few side effects.

This text describes the tumour proliferation mechanisms and the theory behind photodynamic therapy. The most used photosensitisers are also approached, together with their clinical applications.

Key words: Photodynamic therapy, photosensitiser, reactive oxygen species, singlet oxygen, oncology

Índice

Resumo	iv
Abstract.....	v
Lista de abreviaturas e siglas	viii
1. Introdução.....	1
1.1. Prevalência do cancro em Portugal e no mundo.....	2
1.1.1. Fatores de risco.....	3
1.2. Fisiopatologia do cancro.....	3
1.2.1. Vias anormais de sinalização	4
1.2.2. Insensibilidade aos sinais de inibição de crescimento	5
1.2.3. Anormalidades na regulação do ciclo celular	5
1.2.4. Apoptose e a proteína p53.....	6
1.2.5. Telómeros.....	7
1.2.6. Angiogénese	8
1.2.7. Invasão de tecidos e metástase	9
1.2. Tratamento do cancro	10
1.2.1. Cirurgia.....	10
1.2.2. Radioterapia	10
1.2.3. Quimioterapia.....	11
2. Breve nota histórica sobre a terapia fotodinâmica.....	12
3. Terapia fotodinâmica.....	14
3.1. Mecanismos de morte celular	19
3.1.1. Apoptose.....	20
3.1.2. Autofagia.....	23
3.1.3. Necrose.....	25
3.2. Efeito anti-vascular	26
3.3. Estimulação imunitária	27
4. Fotosensibilizadores.....	29
4.1. Os novos fotossensibilizadores	32
4.1.1. Lipossomas.....	32
4.1.2. Nanopartículas poliméricas biodegradáveis.....	34
4.2. Intervalo fármaco-radiação	34
4.3. A influência do meio biológico	35

4.3.1. O resultado biológico como função das propriedades do fotossensibilizador	37
4.4. Descrição geral de alguns fotossensibilizadores usados na terapia fotodinâmica	39
4.4.1. Derivado da hematoporfirina	39
4.4.2. Foscan®	40
4.4.3. Hipericina	41
4.4.3.1. Efeitos da Hipericina independentes de radiação	43
4.4.3.2. Interação enzimática	43
4.4.4. Protoporfirina IX	44
4.4.5. Rose Bengal.....	45
5. Fontes de radiação	46
6. Utilização clínica da terapia fotodinâmica	49
6.1 Carcinoma baso-celular	49
6.1.1. Prevalência	50
6.1.2 Métodos de tratamento e resultados	50
6.1.3. Limitações	52
6.2 Cancros da cabeça e pescoço	53
6.2.1. Prevalência	53
6.2.2. Métodos de tratamento e resultados	53
6.2.3. Limitações	55
6.3. Cancro do pulmão	55
6.3.1. Prevalência	56
6.3.2. Métodos de tratamento e resultados	56
6.3.3. Limitações	57
7. Outras aplicações clínicas para a terapia fotodinâmica	58
7.1. Aplicação da terapia fotodinâmica em palição	58
7.2. Aplicação da terapia fotodinâmica em patologias resultantes de infecções microbianas	58
7.3. Aplicação da terapia fotodinâmica no tratamento de acne e rosácea.....	59
7.4. Aplicação da terapia fotodinâmica no diagnóstico (<i>photodynamic diagnosis</i> – PDD)	60
8. Conclusão	61
9. Bibliografia.....	64

Lista de abreviaturas e siglas

OMS	Organização Mundial de Saúde
ADN	Ácido desoxirribonucleico
TGF-β	Fator de crescimento transformante β (<i>Transforming Growth Factor β</i>)
CDK	Cinase dependente de ciclina (<i>Cyclin Dependent Kinase</i>)
CKI	Inibidor de cinases dependentes de ciclina (<i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitors</i>)
TNF-R	Recetor de fatores de necrose (<i>Tumour Necrosis Factor Receptor</i>)
PDT	Terapia fotodinâmica (<i>PhotoDynamic Therapy</i>)
PS	Fotossensibilizador (<i>PhotoSensitizer</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
ALA	Ácido 5-aminolevulinico (<i>5-AminoLevulinic Acid</i>)
PpIX	Protoporfirina IX (<i>Protoporphyrin IX</i>)
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade (<i>Low Density Lipoproteins</i>)
ISC	Cruzamento intersistemas (<i>InterSystem Crossing</i>)
PDD	Diagnóstico fotodinâmico (<i>PhotoDynamic Diagnosis</i>)
PCD	Morte celular programada (<i>Programmed Cell Death</i>)
RBAc	<i>Rose Bengal Acetate</i>
RB	<i>Rose Bengal</i>
ATP	Adenosina trifosfato (<i>Adenosine TriPhosphate</i>)
PTP	Poros de transição de permeabilidade (<i>Permeability Transition Pore</i>)
mARN	Ácido ribonucleico mensageiro
DAMP	Padrão molecular associado a danos (<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>)
CDAMP	Padrão molecular associado a morte celular (<i>Cell Death-Associated Molecular Pattern</i>)
VIN	Neoplasia vulvar intraepitelial (<i>Vulvar Intraepithelial Neoplasia</i>)
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
DC	Célula dendrítica (<i>Dendritic Cell</i>)
PEG	PoliEtileno Glicol
PLGA	Co-poli(ácido lático, ácido glicólico)
PAMAM	PoliAMidoAMina
DLI	Intervalo fármaco-irradiação (<i>Drug-Light Interval</i>)

MB	Azul de Metileno (<i>Methylene Blue</i>)
HY	Hipericina (<i>HYpericin</i>)
PTK	Proteína tirosina cinase
BCC	Carcinoma das células basais (<i>Basal Cell Carcinoma</i>)
MAL	Aminolevulinato de metilo (<i>Methyl AminoLevulinate</i>)
LED	Díodos de emissão de luz (<i>Light Emmiting Diode</i>)
HPV	Vírus do papiloma humano (<i>Human Papiloma Virus</i>)
NSCLC	Carcinoma de células não pequenas do pulmão (<i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>)
MPM	Mesotelioma pleural maligno

1. Introdução

O cancro é uma das doenças mais prevalentes e, também, das mais temidas no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012 foram reportados mundialmente cerca de 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes resultantes de cancro.¹

Um conjunto de células torna-se canceroso quando as células normais perdem os seus mecanismos de regulação, ao nível do controlo de crescimento e multiplicação. Estas células descontroladas perdem, muitas das vezes, a sua capacidade de diferenciação, que torna, por exemplo, uma célula epitelial diferente de uma célula hepática.²

Segundo D. Hanahan e R. Weinberg,³ a grande maioria dos cancros apresenta várias características comuns, esquematizadas na figura 1.1.

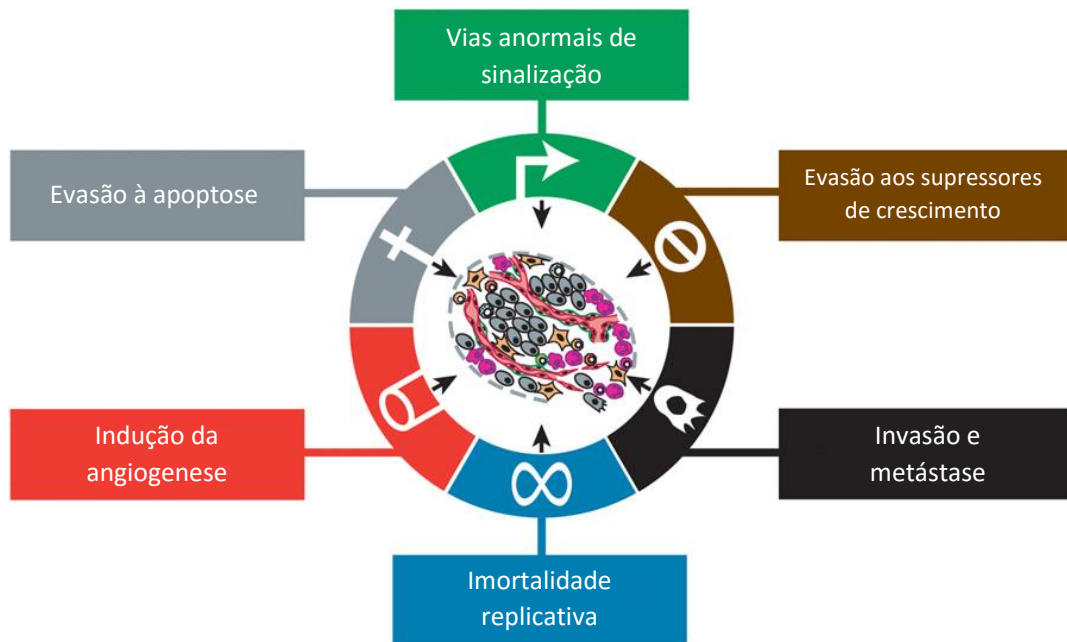


Figura 1.1. Representação das principais características comuns a todos os cancros, resultantes de anormalidades na regulação do ciclo celular: vias anormais de sinalização, insensibilidade aos sinais de inibição de crescimento, invasão de tecidos e metástase, divisão celular ilimitada (imortalidade), desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (angiogénese) e evasão da morte celular programada (apoptose). Adaptado de Hanahan et al, 2011.³

Acredita-se que só em presença da maioria destas condições uma célula defeituosa conseguirá causar um crescimento maligno. Esta situação pode explicar o porquê de os cancros serem mais frequentes numa idade mais avançada. A primeira exposição a um

agente mutagénico, como o amianto ou o pó de carvão, pode causar uma mutação nalgumas células, mas os mecanismos celulares conseguem mantê-las controladas. No entanto, uma exposição prolongada pode resultar em mais danos genéticos, até uma célula se libertar dos mecanismos de salvaguarda e se tornar cancerosa.² Estabelece-se assim a distinção entre um tumor benigno – aquele que está presente num determinado local – e um tumor maligno – aquele que sofreu metástase. Uma metástase acontece quando as células cancerosas invadem novas partes do corpo, formando um novo tumor.²

O grande problema no tratamento do cancro é a existência de dezenas de tipos diferentes de neoplasias, resultantes de diferentes defeitos celulares. Desta forma, a terapêutica tem de ser adaptada à tipologia de cancro.²

1.1. Prevalência do cancro em Portugal e no mundo

Sendo uma das principais causas de morte no mundo, o cancro é um importante problema de saúde pública. Como referido inicialmente, estima-se que em 2012 tenham ocorrido cerca de 14 milhões de novos casos de cancro, a nível mundial, assim como 8,2 milhões de mortes relacionadas com a doença.¹

Segundo a OMS, os cancros mais mortais, em 2012, foram¹:

1. Cancro do pulmão, que causou cerca de 1,59 milhões de mortes;
2. Cancro do fígado, que causou cerca de 745000 mortes;
3. Cancro do estômago, que causou cerca de 723000 mortes;
4. Cancro colo-retal, que causou cerca de 694000 mortes;
5. Cancro da mama, que causou cerca de 521000 mortes;
6. Cancro do esófago, que causou cerca de 400000 mortes.

Em Portugal, no ano de 2014, foram registadas 26165 mortes resultantes de cancro, sendo esta a segunda principal causa de morte, logo a seguir às doenças do aparelho circulatório.⁴ No nosso país, os tipos de cancro conducentes a maior número de óbitos são⁵:

1. Tumor maligno da traqueia, brônquios e pulmão (3927 mortes);
2. Tumor maligno do cólon (2687 mortes);
3. Tumor maligno do estômago (2290 mortes);
4. Tumor maligno da próstata (1787 mortes);
5. Tumor maligno da mama feminina (1660 mortes);
6. Tumor maligno da junção retossigmóide e do reto (1073 mortes).

1.1.1. Fatores de risco

É difícil compreender as causas do desenvolvimento de cancro num determinado indivíduo. No entanto, são estudados fatores que poderão potencialmente aumentar o risco para o seu desenvolvimento. Estes fatores de risco para o cancro incluem a exposição a produtos químicos e outras substâncias, assim como determinados comportamentos. Apesar de muitos destes comportamentos poderem ser evitados, fatores como o envelhecimento e o historial familiar tornam essa tarefa mais difícil. Alguns dos fatores de risco mais estudados são⁶:

- Idade
- Consumo de álcool
- Inflamação crónica
- Alimentação
- Imunossupressão
- Agentes infecciosos
- Radiação
- Consumo de tabaco
- Obesidade

Estima-se que cerca de 30% dos cancros sejam causados pelo consumo de tabaco, enquanto que outros 30% estão relacionados com a alimentação. Produtos carcinogénicos existentes no tabaco, na alimentação e no ambiente podem provocar cancro, ao induzir mutações genéticas ou ao interferir com o normal mecanismo de diferenciação celular.²

Agentes infecciosos, como vírus e bactérias, também são responsáveis por um grande número de mortes resultantes de cancro. Por exemplo, os vírus do papiloma humano (*human papiloma virus* – HPV) são transmitidos sexualmente e podem levar ao desenvolvimento de cancro do colo do útero; a hepatite B é responsável por cerca de 80% dos cancros hepáticos. Os vírus podem causar cancro, por exemplo através da inserção de oncogenes no genoma ou da utilização de promotores para a transcrição de oncogenes celulares.²

1.2. Fisiopatologia do cancro

Um cancro desenvolve-se após o aparecimento de determinadas falhas genéticas que conduzem a anomalias nas funções de controlo celular. Estas alterações ocorrem em genes conhecidos como proto-oncogenes, que codificam enzimas envolvidas no controlo

da divisão celular e diferenciação. Ao serem alterados, ocorre uma desregulação no normal funcionamento da célula e esta pode tornar-se cancerosa. Estes proto-oncogenes passam então a ser definidos como oncogenes.²

No entanto, também existem mecanismos celulares que podem detetar estas alterações no ADN e bloquear a sua replicação. Assim, a célula tem tempo para reparar os danos antes de os transmitir à sua descendência. Caso a reparação não seja possível, ocorre um processo de suicídio celular programado, conhecido como apoptose. O gene TP53 é um exemplo de um gene envolvido na supressão tumoral e verificação, reparação e apoptose, que codifica a proteína p53. Se este gene for danificado, os mecanismos de reparação serão deficientes, aumentando a probabilidade de a célula se tornar cancerosa.²

De forma a melhor compreender o desenvolvimento tumoral, é necessário fazer um estudo mais aprofundado das diversas características das células cancerosas.²

1.2.1. Vias anormais de sinalização

O processo de divisão celular está dependente de diversos sinais que a célula recebe da sua vizinhança, sendo os mais importantes os fatores de crescimento. Estes são mensageiros químicos extracelulares que ativam os recetores de proteínas cinase (*protein kinase receptors*) presentes na membrana celular. Por sua vez, os recetores ativam uma via de transdução de sinais para o núcleo, que ordenam a transcrição de proteínas e enzimas necessárias para a divisão celular. Este processo de sinalização é bastante complexo, pelo que existem vários passos onde podem ocorrer erros.²

A maioria das células cancerosas apresentam danos neste processo de sinalização, tornando-se capazes de crescer e de se dividir na ausência de fatores de crescimento externos. Isto porque adquiriram a capacidade de produzir os seus próprios fatores de crescimento, e libertá-los de forma a estimularem os seus próprios recetores. São exemplos, o fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor* – PDGF) e o fator de crescimento transformante α (*transforming growth factor α* – TGF- α). Outra estratégia destas células é a sobre-expressão de recetores, ou seja, um oncogene muito ativo que codifica um número excessivo de proteínas recetoras. Desta forma, a célula torna-se supersensível, mesmo com baixos níveis de fatores de crescimento.²

Um exemplo concreto de um erro na via de transdução de sinais é a alteração do gene *ras*. A proteína Ras é responsável pela transdução de sinais que levam ao crescimento e divisão celular. No entanto, quando anormal, esta proteína torna-se ativa permanentemente, mesmo na ausência de sinais de crescimento.²

1.2.2. Insensibilidade aos sinais de inibição de crescimento

Outro tipo de hormonas externas, como o fator de crescimento transformante β (*transforming growth factor β* – TGF- β), neutralizam os efeitos dos fatores de crescimento, causando a inibição do crescimento celular e divisão. Uma alteração nos genes que codificam estas hormonas, conhecidos como genes supressores de tumores, aumenta o risco de a célula se tornar cancerosa.²

1.2.3. Anormalidades na regulação do ciclo celular

O crescimento celular depende de um ciclo de decisões que controlam a passagem de uma fase para outra no ciclo celular, sendo as quatro fases celulares conhecidas como G₁, S, G₂ e M. O processo de decisão está dependente do balanço de sinais químicos que promovem ou inibem o crescimento.²

Na fase G₁ (Gap 1) a célula aumenta de tamanho e prepara-se para copiar o seu material genético em resposta a vários sinais de crescimento. Na fase seguinte, fase S (Síntese), ocorre a replicação do ADN. Após a cópia dos cromossomas, há um intervalo durante o qual a célula se prepara para a divisão celular, fase G₂ (Gap 2). Este intervalo é importante para a célula verificar o ADN copiado e reparar quaisquer danos e alterações. Finalmente dá-se a mitose, na fase M, havendo divisão celular que resulta em duas células filhas, cada uma com um conjunto completo de cromossomas. No final, estas últimas podem entrar num novo ciclo celular (fase G₁) ou passar a um estado dormente (G₀).²

Ao longo das várias fases do ciclo existem várias etapas de decisão, antes de a célula passar à fase seguinte, de forma a garantir a integridade do processo. Por exemplo, quando é detetado ADN danificado ao longo da fase G₂, dá-se um atraso que garante tempo suficiente para a célula o reparar ou acionar mecanismos de apoptose.²

O controlo do ciclo celular envolve pelo menos 15 tipos de ciclinas (*cyclins*) e 9 tipos de cinases dependentes de ciclinas (*cyclin dependent kinases* – CDKs), e cada uma tem um papel a desempenhar nas diferentes fases do ciclo. É necessária a ligação de uma ciclina à sua cinase associada para que haja passagem para uma fase seguinte no ciclo celular. Por exemplo, de forma a passar para a fase S, a célula tem de tomar a decisão de começar a copiar o seu ADN, dependendo esta decisão do balanço entre sinais estimulantes e inibitórios. Se o balanço é direcionado para crescimento há um aumento de ciclina D que por sua vez irá ligar-se às CDK4 e CDK6. Os complexos formados irão fosforilar uma molécula inibitória de crescimento, chamada pRB, alterando a sua conformação, de forma a não poder inibir um determinado fator de transcrição, ficando este último livre

para se ligar a regiões específicas do ADN. São então transcritos genes que levam à produção de proteínas importantes na passagem à fase S, como a ciclina E e a tiamidina cinase. Outros complexos ciclina-CDK são importantes em diferentes fases do ciclo celular, como o complexo ciclina A-CDK2, necessário na progressão através da fase S, e o complexo ciclina B-CDK1, necessário para a mitose.²

Vários tipos de cancro estão associados a ciclinas e CDKs superativas, como é o caso do cancro da mama, onde há uma produção excessiva de ciclina D e E, ou do melanoma da pele, onde se verifica perda do gene que codifica a proteína inibitória p16. Em cerca de metade dos cancros verifica-se que a função de uma proteína p53 está diminuída, baixando por sua vez os níveis de uma proteína inibitória p21. Em cancros cervicais associados a vírus verifica-se que tanto a proteína pRb como a p53 estão desativadas.²

Foram reportadas alterações oncogénicas em ciclinas, CDKs, inibidores de cinases dependentes de ciclina (*cyclin-dependent kinase inhibitors* – CKIs) e outros componentes da via da proteína pRB, em cerca de 90% dos cancros humanos, especialmente na fase G₁. Também a produção excessiva de ciclinas ou CDKs, ou a subprodução de CKIs pode levar a alterações nos controlos normais de regulação celular e conduzir a cancro.²

1.2.4. Apoptose e a proteína p53

A apoptose é um mecanismo de destruição celular que protege o organismo contra células anormais. Cada célula é monitorizada através de diferentes sinais químicos e, caso algum esteja ausente, este mecanismo de autodestruição é iniciado. A apoptose também é importante para controlar as células que escapam do seu tecido original. No caso de células metastizadas, este mecanismo encontra-se danificado.²

Estão caracterizadas duas vias para a apoptose:

- Uma via extrínseca, resultante de fatores externos. Pode haver uma diminuição de fatores de crescimento sustentável; existem proteínas que ativam a morte celular, ligando-se a proteínas membranares conhecidas como recetores de fatores de necrose (*tumour necrosis factor receptors* – TNF-R), que ativam um processo de sinalização, iniciando a apoptose; por último, existem linfócitos-T que circulam pelo corpo em busca de células danificadas e, uma vez encontradas, o linfócito perfura a membrana celular e injeta uma enzima (granzima) que inicia a apoptose.²

- Uma via intrínseca que surge de fatores resultantes de danos ao ADN, como a exposição a químicos, medicamentos/drogas ou stress oxidativo. Através dos sistemas de

monitorização, a célula aumenta a produção da proteína supressora de tumores p53, o que pode levar a apoptose.²

É na mitocôndria que os sinais acima descritos convergem, resultando na liberação de citocromo c. Daí resulta a montagem de um grande complexo proteico oligomérico, conhecido como apoptossoma, constituído por várias subunidades de uma proteína chamada Apaf-1. O apoptossoma recruta e ativa a enzima pro-caspase 0, que por sua vez ativa caspases. Estas últimas enzimas são protéases que destroem as proteínas celulares e, conseqüentemente, destroem a célula.²

Este processo é regulado por uma família de proteínas, sendo alguns exemplos as proteínas Bad e Bax, que promovem a apoptose, e as proteínas Bcl-2 e Bcl-X, que a suprimem. O nível destas proteínas depende dos mecanismos de monitorização celular. Por exemplo, danos que resultem num aumento da proteína p53 induzem a apoptose pelo aumento da expressão de Bax.²

Sendo assim, um defeito nestes complexos sistemas que regulam o crescimento, assim como no balanço dos reguladores químicos que promovem ou inibem a apoptose, podem levar a carcinogênese. É o caso do gene que codifica a proteína p53, que apresenta mutações em 30 a 70% dos cancros. Havendo a diminuição desta proteína indutora de apoptose, aumenta a probabilidade de sobrevivência da célula defeituosa, podendo esta tornar-se cancerosa. Também existem vários tumores onde se verifica um aumento na expressão dos genes supressores de apoptose Bcl-2 e Bcl-X.²

1.2.5. Telómeros

Enquanto que nas células normais o ADN pode ser replicado um número limitado de vezes (cerca de 50-60 divisões), nas células cancerosas não há um limite aparente, sendo estas consideradas “imortais”.²

Os telómeros consistem numa região polinucleotídica na região 3' da cadeia de ADN, constituída por vários milhões de repetições de uma sequência curta de 6 pares de bases. Em cada replicação são perdidos cerca de 50-100 pares de bases, porque a enzima ADN polimerase é incapaz de replicar a terminação 3' completamente. Com as repetições deste processo o telómero fica demasiado curto, podendo ligar-se a outra porção de ADN, o que se torna fatal para a célula, ativando a apoptose.²

Ao expressarem uma enzima conhecida como telomerase (ADN polimerase RNA dependente), as células cancerosas conseguem libertar-se desta restrição de multiplicação, mantendo o comprimento dos seus telómeros. A telomerase está presente no embrião e tem como função a criação dos telómeros, mas após o nascimento o gene que codifica esta proteína é suprimido. As células imortalizadas conseguem remover esta supressão, levando novamente à expressão da enzima telomerase, e esta, por sua vez, tem a capacidade de adicionar repetições hexanucleotídicas no final do ADN telomérico, mantendo o seu comprimento. A telomerase está presente em cerca de 85% dos cancros.²

1.2.6. Angiogénese

À medida que um tumor cresce, as células no seu interior começam a ficar cada vez mais isoladas, diminuindo o aporte de nutrientes, como aminoácidos, nucleótidos, hidratos de carbono, oxigénio e fatores de crescimento. De forma a contrariar esta adversidade, as células tumorais libertam fatores de crescimento, como o fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor* – FGF-2), que por sua vez interagem com receptores nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, promovendo a divisão celular, resultando na extensão e ramificação dos capilares já existentes – um processo chamado angiogénese.²

Em situações normais, estes fatores de crescimento celulares só são libertados quando um tecido é danificado, de forma a ajudar na sua reparação, estando este processo controlado por inibidores da angiogénese, como a angiostatina e a trombospondina. Contudo, este controlo encontra-se alterado em células tumorais, permitindo um aporte sanguíneo aumentado. Este processo de angiogénese também aumenta a probabilidade de uma célula cancerosa escapar do seu tecido primário, não apenas pelo aumento de vasos sanguíneos, mas também porque as novas células endoteliais libertam interleucina-6, que estimula a metástase.²

Como consequência do aporte sanguíneo limitado e falta de oxigénio (hipoxia), as células no interior do tumor vêm-se forçadas a reverter a glicólise, de forma a produzir energia. Como resultado, há uma acumulação de subprodutos acídicos, que por sua vez são exportados para o meio extracelular na forma de prótons. Consequentemente, o ambiente em torno do tumor tende a ser mais ácido que num tecido saudável. Muitas terapias do cancro tiram vantagem desta acidez, como é o caso da localização seletiva das porfirinas na terapia fotodinâmica (*photodynamic therapy* – PDT).²

1.2.7. Invasão de tecidos e metástase

Os cancros malignos ameaçam a vida, uma vez que as células envolvidas têm a capacidade de se evadir do tumor primário, viajando através da corrente sanguínea e iniciando um novo tumor noutra parte do corpo. As células normais não o conseguem fazer, pois existem mecanismos de controlo que evitam a sua fuga.²

Existem moléculas de adesão na superfície das células (ex.: E-caderina) que asseguram que uma célula só adere a outra com características semelhantes e a proteínas insolúveis da matriz extracelular. A ancoragem à matriz extracelular é bastante importante, e necessária para a sobrevivência da célula. Caso esta se desligue das proteínas extracelulares, para de receber sinais de crescimento e a apoptose é ativada. Desta forma é prevenida a fuga de células para outros tecidos. Estas moléculas de adesão estão ausentes nas células malignas metastizadas, permitindo a saída do tumor primário, e têm a capacidade de se ancorar independentemente, iniciando tumores secundários. Pensa-se que os oncogenes destas células codificam proteínas que enviam a mensagem de que ainda se encontram ancoradas, evitando a apoptose.²

A maioria dos cancros deriva de células epiteliais, como as que formam a superfície exterior da pele e o revestimento do intestino, pulmões e outros órgãos. Estas crescem numa membrana basal, que atua como barreira física de forma a impedir o movimento das células. Apenas as células cancerosas e os glóbulos brancos conseguem ultrapassar a membrana basal, uma vez que possuem enzimas, chamadas metaloproteínases da matriz (*matrix metalloproteinases* – MMPs), que hidrolisam as proteínas que compõem esta barreira. De forma semelhante entram na circulação sanguínea, atravessando a barreira que reveste os vasos sanguíneos. Geralmente, as células cancerosas circulantes ficam presas na primeira rede de capilares que encontram, sendo esse o local onde surge o tumor secundário. Para a maioria dos tecidos, o tumor secundário surgirá nos pulmões, enquanto que para células originárias do intestino será o fígado.²

De forma a escapar da circulação, a célula cancerosa tem de aderir ao vaso sanguíneo antes de o atravessar. Alguns tipos de cancros conseguem produzir fatores que aglomeram plaquetas em torno das suas células, formando um aglomerado mais pegajoso, facilitando esta ligação e saída. Estima-se que menos de 1 em 10 000 células consigam iniciar um tumor secundário, mas apenas uma célula basta para que aconteça, e o prognóstico de sobrevivência é limitado se ocorre metástase.²

1.2. Tratamento do cancro

Têm sido desenvolvidas várias abordagens terapêuticas para aplicação no tratamento do cancro. Contudo, a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia são as mais utilizadas tradicionalmente,² embora estes tratamentos tenham muitos efeitos adversos conhecidos e frequentes.

1.2.1. Cirurgia

A cirurgia é o principal método de tratamento aplicado na maioria dos cancros sólidos, podendo também ser utilizada como diagnóstico e como medida de prevenção.⁷ Normalmente, na cirurgia de um cancro localizado o objetivo é remover a totalidade da massa tumoral e, em certos casos, os nódulos linfáticos da área, podendo ser a única intervenção necessária para eliminar o cancro. No entanto, quando ocorrem metástases para outras partes do corpo a excisão completa do tumor torna-se impossível. Assim, a cirurgia é apenas ideal para a remoção de pequenos cancros localizados.⁸

A cirurgia pode ser usada no tratamento do cancro com diferentes objetivos, como é o caso da cirurgia preventiva (remoção de tecidos ou órgãos na presença de vários fatores de risco), de diagnóstico (biópsia), curativa (normalmente utilizada conjuntamente com radioterapia ou quimioterapia, de forma a remover a totalidade do cancro), ou paliativa (utilizada em fases mais avançadas do cancro, de forma a corrigir problemas relacionados com o conforto ou incapacidade).⁸

Como todos os procedimentos médicos, a cirurgia também apresenta uma série de potenciais riscos e efeitos secundários. Podem surgir complicações resultantes dos procedimentos cirúrgicos, reações adversas aos medicamentos utilizados (como a anestesia), infeções e outros problemas, como por exemplo pneumonia, especialmente em doentes mais debilitados.⁹

1.2.2. Radioterapia

A radioterapia envolve a utilização de radiação ionizante, numa tentativa de curar ou atenuar os sintomas do cancro. Funciona danificando o ADN das células do tecido canceroso e forçando a sua morte. De forma a poupar os tecidos saudáveis, os feixes de radiação são moldados e apontados de vários ângulos, de modo a que seja no tumor que a maioria da radiação é absorvida. Para além disso, as células normais têm capacidade de se reparar dos danos da radiação, enquanto que as células cancerosas não. Contudo, como

na quimioterapia, diferentes tipos de cancro respondem de maneiras diferentes à radiação.^{10, 7} Para cancros de pele são geralmente usados raios X de baixa energia, enquanto que para cancros internos é utilizada radiação X de alta energia. Esta terapêutica é utilizada conjuntamente com a cirurgia e/ou quimioterapia, sendo raramente utilizada *de per se*.¹⁰

A radioterapia também tem efeitos adversos, que podem não se manifestar em algumas pessoas. Os efeitos mais comuns são fadiga extrema, alterações na pele e perda de apetite. Também é comum a perda de cabelo, tosse e dores de garganta. Muitos destes efeitos adversos podem manifestar-se a nível emocional, sendo muitas vezes uma experiência dificilmente tolerável pelos doentes.¹¹

1.2.3. Quimioterapia

Outro dos tratamentos tradicionalmente utilizados é a quimioterapia, que consiste na administração de compostos químicos com atividade citotóxica e antineoplásica. Os fármacos anticancerígenos podem ser divididos em várias categorias, conforme o seu modo de ação (por exemplo como agentes alquilantes, antimetabolitos, etc). Na sua maioria, os fármacos anticancerígenos atuam em tecidos de divisão celular rápida, como é o caso das células cancerosas,¹² e funcionam melhor em combinação com outros anticancerígenos, sendo utilizados vários regimes de tratamento, geralmente em protocolos de “quimioterapia combinada”.¹³

Enquanto que a cirurgia e a radioterapia conseguem matar células num local restrito do corpo, a quimioterapia consegue atuar ao longo da totalidade do corpo, pois é administrada por via sistémica, o que significa que pode afetar células que se tenham metastizado. No entanto, é costume a quimioterapia ser utilizada em conjunto com as terapêuticas anteriores, uma vez que pode diminuir o tamanho de um tumor, auxiliando na cirurgia, ou destruir células cancerígenas que tenham permanecido no organismo do doente após tratamentos por radioterapia.¹⁴

A maioria dos fármacos anticancerígenos apresenta uma janela terapêutica estreita, em termos de segurança e eficácia, podendo resultar em variados efeitos adversos.¹⁵ Estes fármacos atuam ao longo do organismo, afetando as células de multiplicação rápida, podendo afetar tecidos normais, como é o caso das células sanguíneas em formação na medula óssea, de folículos capilares, de células da boca, do trato digestivo e do sistema reprodutivo.¹⁵

Apesar de a maioria dos efeitos adversos da quimioterapia desaparecer rapidamente após a suspensão da terapêutica, são muito temidos pelos doentes, sendo alguns dos mais comuns a fadiga, perda de cabelo, anemia, náusea e vômitos, obstipação, diarreia, mudanças na libido e função sexual, e problemas de fertilidade.¹⁵

De forma a contrariar as complicações e efeitos adversos resultantes, outras terapêuticas têm vindo a ser estudadas para o tratamento do cancro. É o caso da PDT, que consiste na utilização combinada de um agente químico, que atua como fotossensibilizador (*photosensitizer* - PS), e de radiação de comprimentos de onda padronizados, para produção intracelular de oxigénio singleto, um poderoso oxidante que irá destruir as células cancerosas.² Esta terapêutica será o foco principal desta monografia.

2. Breve nota histórica sobre a terapia fotodinâmica

A PDT requer a presença simultânea de um PS, uma fonte de luz e oxigénio, no tecido danificado. O PS acumula-se nas células alvo e absorve luz de um determinado comprimento de onda. Essa energia é então transferida para o oxigénio e são geradas espécies de oxigénio altamente reativas, principalmente oxigénio singleto. Com a dose certa, estas espécies reativas de oxigénio (*reactive oxygen species* – ROS) provocam danos nas células e tecidos, induzindo necrose ou apoptose ou estimulando indiretamente mediadores inflamatórios.¹⁶

A PDT é uma técnica utilizada há milhares de anos. Existem evidências com cerca de 3000 anos que demonstram que no antigo Egipto, China e Índia já eram feitos tratamentos com um PS e uma fonte de luz, neste caso a luz solar. Eram utilizadas substâncias vegetais para produzir fotorreações na pele, que iriam resultar numa repigmentação, usadas em lesões como o vitiligo, psoríase e outros problemas cutâneos. O composto presente nestas plantas foi recentemente identificado como pertencendo à família dos psoralenos que são utilizados nos dias de hoje em regimes de PDT, para tratar essas mesmas afecções.^{17, 18}

Contudo, foi somente no início do século XX que von Tappeiner descreveu os primeiros factos científicos determinando que certos pigmentos fotossensíveis, em conjunto com uma fonte de luz e oxigénio, poderiam ter um potencial efeito terapêutico. Esta propriedade observada por Tappeiner foi descrita como “ação fotodinâmica”.¹⁷

Em 1900, Raab, um discípulo de von Tappeiner, descobriu o efeito tóxico da acridina em culturas de paramécias. Raab verificou que se durante a exposição à acridina não houvesse também exposição a uma fonte de luz e oxigênio, estes protozoários não morreriam, confirmando a ação fotodinâmica.¹⁹

Mais tarde, em 1902, George Dreyer examinou em Copenhaga os efeitos da luz em bactérias. Testou também em pele animal e pele humana, de forma a comprovar os efeitos fototóxicos. Em 1903 iniciou as suas primeiras experiências em doentes com lúpus, com a injeção de uma solução estéril de eritrosina e iluminação após 4 a 8 horas. Em 1905 estendeu as suas experiências a doentes com cancro da pele e observou a eficácia da PDT utilizando eosina (0,1-5%), aplicada topicamente.¹⁶

Em 1924, Policard reparou pela primeira vez na potencial capacidade de diagnóstico por fluorescência da hematoporfirina. Após administração deste composto e subsequente irradiação do tumor com luz na gama espectral do ultravioleta, observou fluorescência na zona espectral do vermelho em sarcomas de ratinhos de laboratório. Policard formulou a hipótese que esta fluorescência seria associada à acumulação endógena de hematoporfirina.²⁰

Mais tarde, em 1948, Figge e seus colaboradores comprovaram, através de estudos *in vivo* usando modelos animais, que as porfirinas apresentam uma afinidade preferencial para as células de divisão rápida, incluindo células malignas, embrionárias e regenerativas, propondo a sua potencial utilização no tratamento do cancro.²¹

A era moderna da PDT inicia-se com os estudos de Lipson e Schwartz em 1960, em que foi demonstrado que a injeção de preparações de hematoporfirina levam à fluorescência de lesões neoplásicas, que podem ser visualizadas durante as cirurgias.¹⁶

No final da década de 70, Thomas Dougherty iniciou estudos em humanos utilizando um derivado da hematoporfirina (HpD) para o tratamento de metástases de cancro da pele, tratando 113 doentes, com resolução total ou parcial em 111 deles.¹⁷ Mais tarde, em 1980, Dougherty conseguiu curar completamente, pela primeira vez, um carcinoma central de células escamosas em estágio inicial através de PDT broncofibroscópica.²²

Entre 1989 e 1992 foi desenvolvido em 15 instituições um ensaio de fase II da PDT em casos de cancro inicial do pulmão, esófago, estômago, cérvix e bexiga. Os resultados mostraram que esta técnica curou com sucesso pelos menos 50% dos doentes. Também foi estimado o efeito/custo da PDT em comparação com operação e, de acordo com este cálculo, o tratamento com PDT era cerca de 30% menos dispendioso.²²

Em 1990 a PDT foi revitalizada, passando a ser utilizada também em dermatologia, com a introdução do ácido 5-aminolevulinico (*5-aminolevulinic acid* – ALA), um precursor porfirínico que leva à acumulação de um PS endógeno, protoporfirina IX (*protoporphyrin IX* – PpIX), sem revelar fototoxicidade prolongada.¹⁷

Desde então observou-se um grande progresso na utilização da PDT, levando à aprovação do primeiro medicamento PS, Photofrin®, para o tratamento de determinados tumores. Atualmente este método é utilizado clinicamente no Canadá e na Holanda. Nos EUA apenas está aprovado para uso compassivo no tratamento do cancro do esófago. Até hoje, mais de 3000 tumores foram tratados com a PDT em 32 países, sendo o mais comum o cancro do pulmão.²²

3. Terapia fotodinâmica

A PDT é uma estratégia de tratamento de tumores que, para ser eficaz, requer a presença simultânea de um PS, luz e oxigénio dentro das células do tecido danificado.^{16,23} Nenhum destes componentes é efetivo por si só, mas em conjunto resultam num efeito fototóxico muito significativo. O PS, administrado por via intravenosa, tópica ou oral, acumula-se nas células alvo e absorve luz de um comprimento de onda adequado, de que resulta uma transferência eletrónica e cruzamento para o estado de tripleto. A espécie fotossensibilizada transfere em seguida energia para o oxigénio celular (no estado eletrónico de tripleto), que se converte em oxigénio singleto, $^1\text{O}_2$, uma espécie altamente reativa capaz de provocar danos irreversíveis em biomoléculas. Com a dose de luz apropriada, é possível a formação de ROS que conduzem a danos diretos nas células e tecidos, induzindo a necrose, apoptose e autofagia, ou estimulando indiretamente mediadores inflamatórios. A figura 3.1. apresenta uma representação esquemática destes eventos.^{16,24,25}

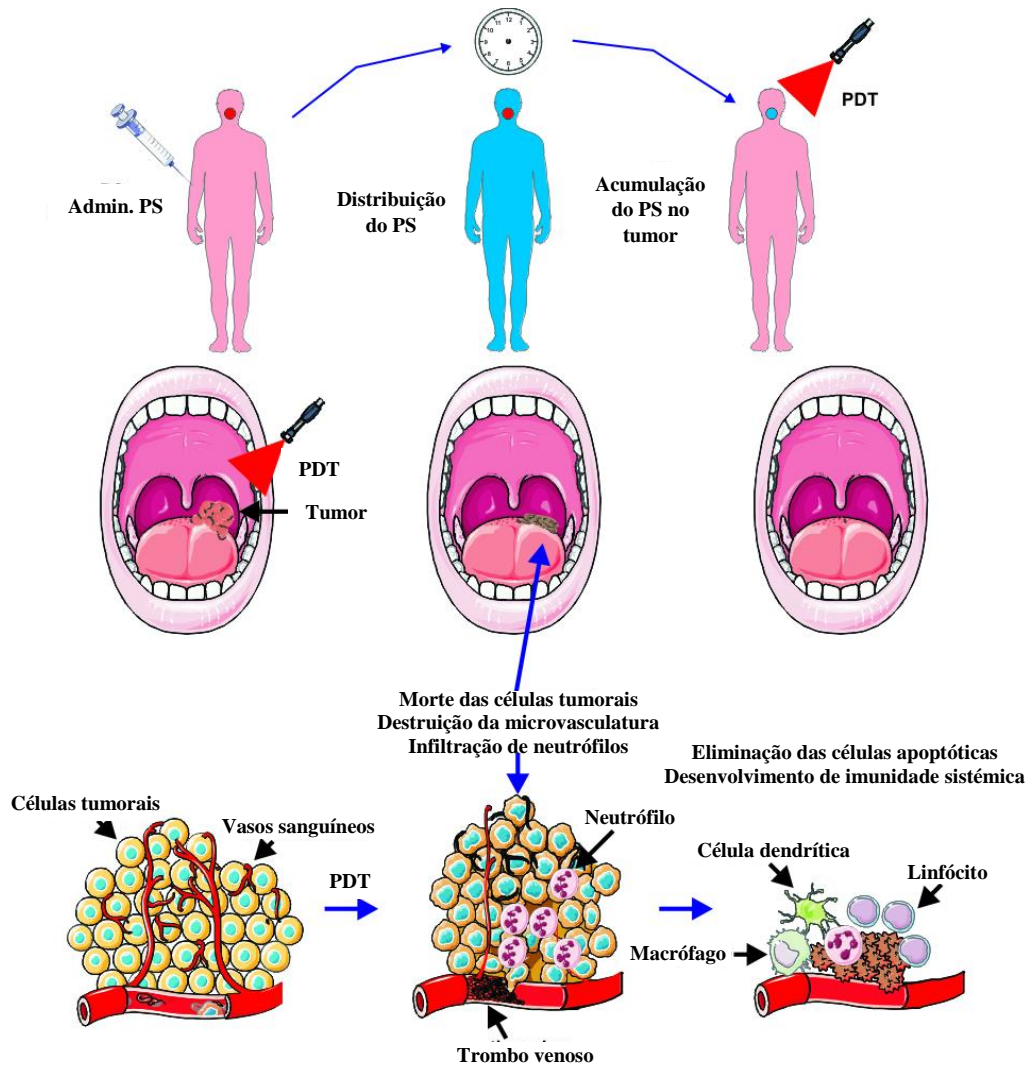


Figura 3.1. Representação esquemática dos princípios em PDT. O PS é administrado sistemicamente ou topicamente. Após um período correspondente à distribuição sistêmica do PS, este acumula-se seletivamente no tumor. A irradiação ativa o PS que, na presença de oxigênio molecular, inicia uma reação fotoquímica que culmina na produção de 1O_2 . São causados danos em macromoléculas celulares, o que conduz à morte das células tumorais, por apoptose, necrose ou autofagia, acompanhada pela indução de uma reação inflamatória local que leva à restauração da normal homeostasia do tecido e, por vezes, desenvolvimento de imunidade sistêmica. Adaptado de Agostinis P. et al, 2011.²⁴

A PDT é frequentemente considerada como um tratamento de especificidade dupla, pois a seletividade pode ser alcançada através da acumulação do PS no tumor, evitando tecidos saudáveis, e a irradiação pode ser circunscrita a um local específico, através da utilização de dispositivos de fibra-ótica flexíveis, incidindo nos tecidos cancerosos.^{16,24} São vários os mecanismos possíveis para promover a acumulação específica do PS nos tecidos tumorais (em relação aos tecidos normais), como a maior frequência proliferativa das células neoplásicas, a menor cobertura pelo sistema linfático e a maior expressão de

recetores de lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoproteins* - LDL) nas células tumorais (muitos PS ligam-se aos LDL), o pH comparativamente mais baixo nos tecidos cancerígenos e a permeabilidade vascular aumentada (facilitadores da absorção celular), infiltração de macrófagos no tumor que funcionam como “armadilhas” para PS hidrofóbicos. A seletividade depende da capacidade do PS para localizar a lesão neoplásica e também da administração precisa de luz nos locais tratados.¹⁶

As reações fotoquímicas intracelulares que envolvem o PS e o oxigénio intracelular constituem a base química da eficácia do tratamento com PDT. Estas reações podem ser agrupadas em vários tipos, classificados consoante os mecanismos fotofísico e fotoquímico (figura 3):¹⁶

- Tipo 1 – o PS pode oxidar diretamente um substrato (membrana celular ou uma biomolécula). O PS reduzido vai então reagir com o oxigénio molecular, formando ROS, como o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais hidroxilo ($\cdot OH$).^{16,24}

- Tipo 2 – o PS no estado tripleto funciona como um fotocatalisador, transferindo diretamente a sua energia para o oxigénio molecular para criar um estado de oxigénio singleto (1O_2) ou transferindo um eletrão para o oxigénio molecular para formar um radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$).^{16,24}

-Tipo 3 – o PS reage diretamente com substratos biológicos na ausência de oxigénio (verifica-se mais em tecidos que se encontram em hipoxia). No entanto, esta reação tem muito pouca importância, visto que, nestas circunstâncias, raramente se verificam alterações na célula após a terapêutica.¹⁶

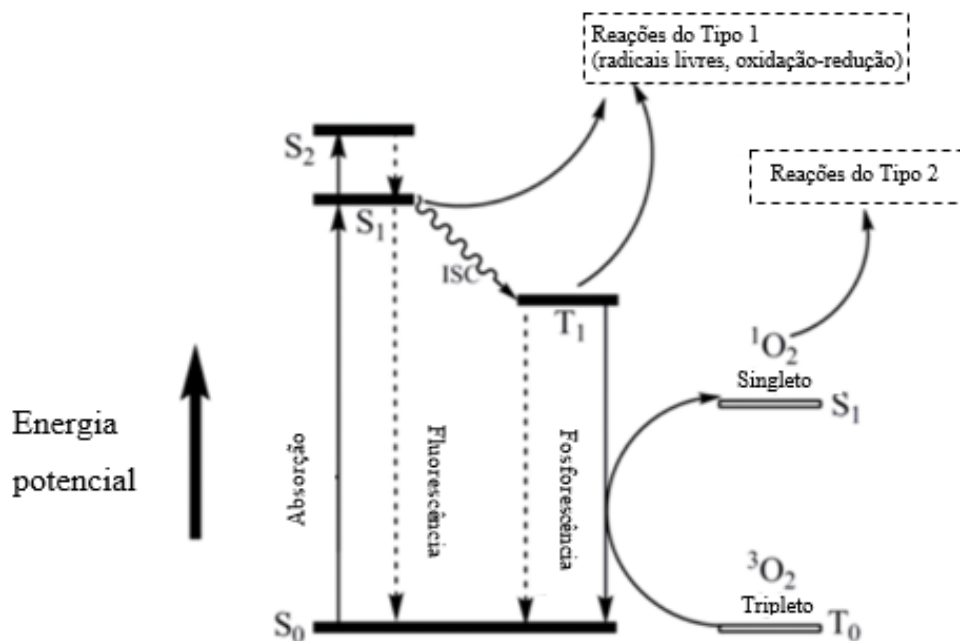


Figura 3.2. Diagrama de Jablonski adaptado que esquematiza os eventos envolvidos nas fotorreações de Tipo 1 e Tipo 2. As bandas pretas representam os níveis de energia da molécula do PS; as bandas preenchidas por branco representam os níveis de energia do oxigénio molecular. S₀ = estado singlete fundamental; S₁ = primeiro estado singlete excitado; S₂ = segundo estado singlete excitado; T₀ = estado tripleto fundamental; T₁ = primeiro estado tripleto excitado; ISC = cruzamento intersistemas (*intersystem crossing*). A absorção e a fluorescência/fosforescência referem-se à absorção e emissão de fótons, respetivamente. Adaptado de Elsaie MLT, 2013.¹⁶

Analisando o diagrama apresentado na figura 3.2., o PS no seu estado S₁ pode emitir um fóton por um fenómeno de fluorescência – que pode ser utilizada para diagnóstico, – diagnóstico fotodinâmico (*photodynamic diagnosis* – PDD) –, reagir com moléculas circundantes, ou passar ao primeiro estado excitado de tripleto (T₁) através de ISC.^{16,26} O ISC é uma transição rápida, adiabática e, por isso, não radiativa, entre dois estados de diferentes multiplicidades. Este cruzamento entre a superfície de energia potencial dos estados singlete, S₁, e tripleto, T₁, permite que este processo ocorra, apesar de proibido pelas regras de seleção, desde que haja compensação noutra componente do sistema. No conjunto, a multiplicidade do sistema deve permanecer constante. Contudo, este estado tripleto (T₁) tem uma menor probabilidade de decair para o estado fundamental, aumentando a probabilidade de reagir com moléculas circundantes e resultando na transferência de eletrões.^{23,26} O PS no estado T₁ pode emitir um fóton por fosforescência, reagir com moléculas circundantes ou interagir especificamente com oxigénio tripleto, excitando-o para o seu primeiro estado excitado de singlete.^{16,25,26}

No estado tripleto, T_1 , o PS excitado pode transferir a sua energia para o oxigénio molecular, um dos raros compostos que existem como tripleto no estado fundamental, e as suas moléculas relaxam para os seus respetivos estados singleto. No estado singleto, 1O_2 , o oxigénio molecular encontra-se excitado e altamente reativo, sendo por isso responsável pela maioria das lesões geradas durante a PDT.^{16,26} Já o PS, ao transferir o excesso de energia, regressa ao seu estado fundamental, para aceitar mais fótons e iniciar um novo ciclo fotorreativo, ou então sofre fotodegradação, num processo conhecido como fotobranqueamento.¹⁶

Alternativamente, o PS excitado pode reagir diretamente com biomoléculas, formando radicais livres que reagem seguidamente com o oxigénio molecular, produzindo anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ou radical hidroxilo ($\cdot OH$). O superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pode reagir com o radical hidroxilo ($\cdot OH$) para formar oxigénio singleto (1O_2), ou com óxido nítrico (NO^{\cdot}) para produzir peroxinitrito ($OONO^{\cdot}$), outra espécie oxidante altamente reativa. Estas ROS são agentes oxidantes que podem reagir diretamente com várias moléculas biológicas.^{16,26}

A única diferença entre a oxidação mediada por radicais ativados pela PDT e outros processos semelhantes que ocorrem naturalmente nas células é a explosão de radicais produzidos pela absorção de luz na PDT. Após este passo, as reações irão seguir caminhos não específicos à PDT, resultando em vários processos e produtos secundários. A situação torna-se ainda mais complexa uma vez que há uma excitação contínua do PS para o estado tripleto, assim como a formação de radicais e oxigénio singleto. Portanto, os passos iniciais das reações de oxidação em PDT estão muito melhor caracterizados do que as restantes reações. Estas últimas incluem um leque de possibilidades que ainda é difícil estudar num cenário biológico real.²³

Como já referido, a presença de oxigénio no tumor é fundamental para o sucesso desta terapêutica, uma vez que é necessário para que ocorram as fotorreações que originam ROS. A concentração intracelular de oxigénio pode variar bastante, de acordo com a região do tumor, sendo dependente da vasculatura tumoral e da taxa de difusão do oxigénio. A falta de oxigénio é um dos principais problemas em tumores sólidos profundos, enquanto que em casos de tumores cutâneos superficiais este não é um fator limitante. Outro problema é a taxa de consumo de O_2 durante a fase de irradiação do PS. Com um feixe de radiação muito intenso, a taxa de consumo de oxigénio será maior que a taxa da sua difusão através do tecido, resultando num esgotamento transitório de O_2 no tumor. Torna-se assim necessário efetuar uma manipulação cuidadosa dos níveis de oxigénio no

ambiente tumoral, através do fracionamento da radiação, para minimizar o consumo de oxigénio. Em alternativa pode concentrar-se intencionalmente a distribuição de PS e radiação nos vasos sanguíneos tumorais, o que promove uma interrupção no aporte de nutrientes, de forma a desenhar um regime fotodinâmico eficaz.²⁷

Resumidamente, existem dois mecanismos que podem ocorrer após a fotoativação do PS. Um envolve a produção de radicais livres (reação fotoquímica do tipo 1) e outro envolve a produção de $^1\text{O}_2$ (tipo 2), o principal responsável pela inativação celular. A reação do tipo 2 tem um efeito bastante importante na morte celular. Os radicais do tipo 1 podem reagir com oxigénio para produzir ROS. As reações dos tipos 1 e 2 podem ocorrer simultaneamente, dependendo a proporção entre estes processos do tipo de PS usado e das concentrações de substrato e oxigénio.¹⁶

O oxigénio singleto é altamente reativo, tem um raio de difusão curto (0,01 μm a 0,02 μm) e um tempo de meia-vida muito curto (10-320 ns). Assim, apenas as estruturas moleculares próximas do local do PS são afetadas por esta terapia e o raio de ação é intracelular. O efeito tumoricida é devido sobretudo à citotoxicidade do oxigénio singleto, mas este não é o único responsável pela eliminação das células malignas. O sucesso da PDT depende de três mecanismos de resposta biológica induzidos pela terapêutica:^{16,24}

1. Morte celular após stress oxidativo^{16,24}
2. Oclusão da vasculatura tumoral^{16,24}
3. Ativação ou incremento da resposta imunológica^{16,24}

A contribuição de cada um destes mecanismos para a redução da massa tumoral depende de vários fatores, como o tipo de PS, a localização do tumor, a sua vascularização e a presença de leucócitos no tumor.^{16,24}

3.1. Mecanismos de morte celular

Após a formação de ROS e dos danos celulares resultantes do stress oxidativo, as células tumorais respondem através de várias vias de morte celular geneticamente programada (programmed cell death - PCD), incluindo apoptose (PCD tipo 1), autofagia (PCD tipo 2) e necrose (PCD tipo 3).^{16,24} A apoptose é geralmente a principal modalidade de morte celular em resposta à PDT.^{24,28}

Diferentes tipos celulares, diferentes PS e diferentes condições de irradiação e incubação podem alterar os resultados da PDT. A forma como a PDT induz estas vias de

morte celular é governada sobretudo pelo local onde o PS se localiza, uma vez que as ROS têm um período de meia-vida curto e atuam no local da sua geração. A localização subcelular depende da natureza química do PS (peso molecular, lipofilicidade, anfifilicidade, carga iônica e características de ligação a proteínas) e da sua concentração no sangue, do tempo de incubação e do fenótipo da célula alvo. Após a exposição das células cancerosas ao stress fotodinâmico, várias cascatas de sinalização são ativadas concomitantemente e, dependendo do local subcelular da geração das ROS e da intensidade dos danos oxidativos, ditam se a célula sobrevive a este stress ou se morrerá.¹⁶

Os principais alvos dos PS na PDT tendem a ser as mitocôndrias, os lisossomas, o citoplasma e as membranas intracelulares, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático. Uma vez que a maior parte destas moléculas não se acumulam no núcleo da célula existe um risco muito reduzido de danos no ADN, mutação ou carcinogénese, comparativamente com a radiação X aplicada em doses semelhantes. Os PS que se acumulem nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático tendem a promover a apoptose, enquanto que aqueles que têm como alvo a membrana plasmática ou lisossomas tendem a bloqueá-la, aumentando a predisposição para necrose.¹⁶

Testes *in vitro* revelaram uma correlação entre o tipo de morte celular e a concentração de PS, a dose de radiação e tempo pós-irradiação. Estudos realizados por vários autores sugerem que existe uma transição entre a morte por apoptose e necrose, onde concentrações mais elevadas de espécies tóxicas resultam em necrose. No entanto, doses muito baixas podem resultar no desenvolvimento de tolerância em tratamentos subsequentes.^{16,28}

3.1.1. Apoptose

A PDT consegue matar células tumorais diretamente através da indução de apoptose, tanto em cultura como *in vivo*. A capacidade das células fotossensibilizadas para iniciarem a maquinaria de apoptose depende principalmente da linha celular, da dose de radiação e do tipo e concentração do PS.¹⁶

O desenrolar da apoptose depende particularmente do local onde o dano ocorre e da localização específica do PS. São potenciais alvos as mitocôndrias, os lisossomas, a membrana plasmática e o núcleo das células tumorais, assim como a sua vasculatura. PS que se localizem nas mitocôndrias, como compostos porfirinogénicos e os derivados de ftalocianina, iniciam a apoptose num limiar preciso de stress oxidativo, que é dependente da dose de radiação e da concentração intracelular de PS. Os que têm como alvo o retículo

endoplasmático danificam as bombas de cálcio, estimulando o aumento da concentração intracelular deste catião logo após a fotoativação. Os que estão associados a lisossomas danificam a membrana lisossomal, resultando na libertação de enzimas hidrolíticas, como as catepsinas, que ativam a apoptose mitocondrial.^{16,25}

A apoptose é um processo de suicídio celular altamente regulado onde são ativadas séries de cascatas de sinalização e são feitas séries de modificações morfológicas e bioquímicas que culminam na morte da célula. Uma desregulação neste processo está na base de várias doenças. Por exemplo, a morte de vários neurónios como consequência de agregados proteicos tóxicos e stress oxidativo pode originar as doenças de Alzheimer ou Parkinson, enquanto que falhas na execução da apoptose levam a aterosclerose, inflamação crónica e cancro.¹⁶

A apoptose consiste em 4 passos:¹⁶

1. Decisão de ativação da via¹⁶
2. Suicídio celular¹⁶
3. Fagocitose por células imunitárias especializadas¹⁶
4. Degradação da célula fagocitada¹⁶

A apoptose celular é definida por um padrão de traços morfológicos que envolvem a condensação da cromatina, a clivagem do ADN cromossomal em fragmentos internucleossomais, com diminuição do tamanho da célula, evaginações da membrana plasmática e desintegração final da célula em vários corpos apoptóticos. Este processo é facilmente observável *in vitro*, mas raramente *in vivo*, uma vez que estas células são rapidamente reconhecidas, fagocitadas e processadas por células como os macrófagos, células dendríticas (*dendritic cells* – DCs), células endoteliais ou fibroblastos, antes de evoluírem para as últimas fases do processo apoptótico.¹⁶

Ao nível bioquímico, a apoptose leva à ativação sequencial de caspases iniciadoras e efetoras, uma família de proteases cisteína-dependentes aspartato-específicas, atuando tanto na desmontagem da célula (efetoras) como na iniciação desta desmontagem em resposta a sinais pro-apoptóticos (iniciadoras). Na maioria dos casos, é suficiente a ativação das caspases para ocorrer uma apoptose induzida por PDT, mas não é necessária para a fase de execução. Existem vias independentes de caspases que provocam a morte das células fotossensibilizadas. É o caso da PDT com *Rose Bengal Acetate* (RBAC) que é capaz de induzir a apoptose em células HeLa através de vias dependentes e independentes de caspases.¹⁶

A apoptose pode ocorrer por via extrínseca (ativação de recetor para morte) e intrínseca (mitocondrial), onde as caspases-8, -9 e -10 iniciadoras ativam diretamente as pro-caspases-3 e -7 efetoras. A via extrínseca é iniciada quando o recetor para morte da superfície celular (Fas, TNF-RI, recetor TRAIL) é ativado através da ligação a um ligando extracelular específico para morte (FasL, TNF, TRAL). O conseqüente agrupamento dos recetores para morte induz a formação de um complexo de sinalização indutor de morte (*Death-Inducing Signaling Complex – DISC*), que recruta pro-caspases-8 e -10 iniciadoras, resultando na ativação induzida por dimerização que por sua vez leva à proteólise das principais caspases-3 e -7 efetoras. A PDT mediada por Pc 4 induz a apoptose em células A432 através da via do recetor de superfície Fas, resultando na multimerização da proteína Fas que leva à sua ativação. O sistema Fas/FasL também suporta este programa apoptótico em células CNE2 e TW0-1 fotossensibilizadas com Hipocrelina A e B.^{16,25}

A mitocôndria é o principal organelo na via apoptótica intrínseca. A apoptose que está usualmente, mas não exclusivamente, associada à ativação de caspases converge nas mitocôndrias para induzir a permeabilização da membrana mitocondrial, responsável pela libertação de várias proteínas apoptogénicas no citoplasma. Dentro destas, o citocromo c atua como ativador de caspases, ligando-se ao fator ativador da apoptose Apaf-1 e, na presença de adenosina trifosfato (*adenosine triphosphate – ATP*) e desoxiadenosina trifosfato (*deoxyadenosine triphosphate – dATP*), possibilita a ativação da pro-caspase-9 através da formação de um apoptossoma. No mecanismo da libertação do citocromo c há um papel decisivo desempenhado pelo poro de transição de permeabilidade (*Permeability Transition Pore – PTP*) mitocondrial, um canal formado no local de contacto entre as membranas mitocondriais internas e externas. Um PTP que dure tempo suficiente leva à dissipação do gradiente de prótons na membrana mitocondrial interna, com a conseqüente perda do potencial transmembranar mitocondrial e turgescência osmótica, resultando na destruição da membrana mitocondrial externa. Esta rutura leva à libertação de fatores apoptóticos e a uma diminuição drástica dos níveis de ATP, ativando a morte celular. Em células LY-R tratadas com Pc 4, a libertação de citocromo c não está relacionada com a perda do potencial transmembranar que, dependendo da dose de PDT e do tempo pós tratamento, ocorre apenas em células tratadas com doses altas de PS. De igual forma, a translocação de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma é induzida sem nenhuma alteração no potencial transmembranar, em células HeLa fotossensibilizadas com Verteporfina.¹⁶

Para além da formação de um PTP ocorre outro mecanismo relacionado com a permeabilização da membrana mitocondrial que envolve proteínas Bcl-2, reguladoras da morte celular. A família de proteínas BCL-2 inclui membros pro (Bax, Bak, Bid, Bad) e anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w) e é o rácio entre estes dois conjuntos que contribui para a morte ou não da célula. De facto, a inserção de Bax na membrana mitocondrial externa, devido a um estímulo apoptótico, forma aberturas supramoleculares, quer individualmente quer em conjunto com outros membros pro-apoptóticos como a Bak ou tBid (Bid truncada). Estas aberturas causadas por Bax/Bak e/ou Bax/tBid medeiam a libertação de proteínas pro-apoptóticas (como o citocromo c, Smac/Diablo e AIF) do espaço intermembranar mitocondrial para o citoplasma. Em células HeLa, devido ao complexo de abertura do poro na membrana mitocondrial externa, as proteínas pro-apoptóticas promovem a perda do potencial de membrana mitocondrial e a consequente libertação para o citoplasma de citocromo c, levando à cascata das caspases 9 e 3.^{16,24}

A PDT conduz tanto à ativação de membros pro-apoptóticos como à danificação de Bcl-2 e de outras moléculas anti-apoptóticas. Na terapêutica com ALA, há uma diminuição significativa na expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mARN) de Bcl-2 e existe um aumento nos níveis do mARN de Bax, em linhas celulares de cancro do cérvix e esofágico. De igual forma, no tratamento de células de adenocarcinoma mamário com Hipericina (HY) há uma diminuição em Bcl-XL e um aumento em Bax. A proteína anti-apoptótica Bcl-2 é altamente sensível aos danos fotodinâmicos - tanto por efeitos diretos das ROS como pela sub-regulação nas cascatas de transdução, devido aos danos causados noutras moléculas.¹⁶

A caspase 12 está localizada na face citoplasmática do retículo endoplasmático e é clivada pela protease m-calpaína dependente de Ca^{2+} . Uma vez clivada, a caspase 12 ativa a caspase 9 sem a formação de um apoptossoma ou pode interagir com a proteína pro-apoptótica Bap31 que se associa à caspase 8. Uma via dependente de caspase 12 é induzida em células HeLa, após PDT com RBAC. Esta via apoptótica é ativada por stress do retículo endoplasmático. Este stress é um ponto de controlo crítico em várias vias apoptóticas, resultando numa sobrecarga de Ca^{2+} ou numa perturbação da homeostasia.^{16,25}

3.1.2. Autofagia

A autofagia é um processo de auto-degradação e reciclagem de organelos danificados ou agregados proteicos, através do sistema endossomal-lisossomal.^{16,24} Enquanto

que a apoptose e a necrose conduzem irreversivelmente à morte celular, a autofagia pode eliminar certos fatores de stress celular e facilitar a sobrevivência da célula, promovendo reações catabólicas para manter o equilíbrio energético celular. Este processo envolve a sequestração de material celular dentro de vacúolos, denominados autofagossomas, e a sua subsequente degradação após a sua fusão com lisossomas.¹⁶

Apesar de ser considerada um mecanismo de sobrevivência celular, também está ligada a PCD através de colapso metabólico e bioenergético. A autofagia persistente conduz ao esgotamento de organelos celulares e proteínas importantes, levando a morte celular independente de caspases. Em determinadas situações, a autofagia pode funcionar como mecanismo de defesa, causando a morte celular quando a apoptose está inibida. No paradigma da PDT, a autofagia pode ser estimulada de forma a resolver os danos resultantes do stress oxidativo.^{16,28}

A autofagia tem a particularidade de ocorrer de forma independente da apoptose, servindo com um mecanismo de proteção. Em células sem pro-caspase-3 ou Bax, induzidas por PDT, com *Pc-4*, a morte não ocorre nem por necrose nem por apoptose. Em fibroblastos embrionários de ratinhos *bax-/- bak-/- double knockout (DKO)*, a PDT com HY protege da apoptose, no entanto mata as células através de uma via autofágica independente de caspases.¹⁶

Algumas das proteínas reguladoras do processo autofágico são alvos das ROS criadas pela PDT, como por exemplo o recetor inositol trifosfato (*inositol triphosphate – IP3*) associado ao retículo endoplasmático, que é danificado pelo PS *Pc 4*. A autofagia induzida por PDT está relacionada com PS que se acumulam preferencialmente nos endossomas/lisossomas, retículo endoplasmático e mitocôndrias.¹⁶

O papel da autofagia como resposta da PDT é complexo. Vários estudos examinam a autofagia no cancro como um processo pro-morte e também como um processo pro-sobrevivência. Parece possível que a autofagia seja iniciada numa tentativa de remover os organelos danificados por oxidação ou para remover grandes agregados de proteínas interligadas, reduzidos e fotodanificados, que não foram removidos pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Contudo, a autofagia pode ocorrer independentemente da apoptose em protocolos de PDT. Parece ter um papel pro-sobrevivência em células apoptose-competentes e pro-morte em células apoptose-incompetentes.^{16,24}

Dentro do tumor sólido, as concentrações de oxigénio podem variar bastante. Numa situação de hipoxia moderada, a autofagia vai funcionar como um mecanismo pro-sobrevivência, enquanto que numa situação de hipoxia severa vai influenciar a indução

de uma morte por necrose. Apesar de ainda não ter sido validado experimentalmente *in vivo*, parece possível que a combinação de PDT com um inibidor da autofagia possa resultar num melhor resultado terapêutico.¹⁶

3.1.3. Necrose

Durante muito tempo a necrose terá sido considerada um mecanismo de morte celular acidental e descontrolado, caracterizado pela vacuolização do citoplasma, turgescência e quebra da membrana celular, com a libertação do conteúdo celular. Agora sabe-se que este tipo de morte celular poderá ser altamente regulado, como parte de uma via de transdução de sinais. De facto, as células necróticas iniciam cascatas de sinalização pro-inflamatórias, ao libertarem ativamente citocinas inflamatórias e outros fatores imunomoduladores que conduzem ao seu reconhecimento e fagocitose e subsequente resposta imunológica.^{16,25}

Os traços característicos de necrose, como turgescência, danos irreversíveis na membrana plasmática, destruição de organelos assim como degradação aleatória de ADN, são importantes para a sua função fisiológica. Em caso de necrose, o conteúdo extravasado para o meio extracelular funciona como “sinal de perigo” e conseqüentemente está associado a inflamação. No entanto, isto não é suficiente para que sejam ativados macrófagos. As células necróticas aumentam também a secreção de citocinas pro-inflamatórias, como a citocina IL-6. A secreção desta citocina IL-6 por células necróticas e não por células apoptóticas comprova que este mecanismo de morte celular é um mecanismo controlado e ativado pelas células.¹⁶

Fatores que promovem a necrose incluem a localização extramitocondrial do PS para PDT com doses altas e a escassez de glucose. A PDT pode induzir a necrose de várias formas. PS que atuam na membrana plasmática, como o Photofrin® ou o complexo Zinco (II) -Ftalocianina (zinc(II) phtalocyanine), conduzem a morte por necrose devido à perda de integridade na membrana, com a conseqüente falência no fluxo de iões devido ao rápido esgotamento de ATP. De forma semelhante, PS que desestabilizem lisossomas levam à libertação de proteases que conduzem a necrose.¹⁶

Algumas porfirinas catiónicas são capazes de se deslocar da membrana plasmática para o citoplasma durante a irradiação e causam a fotoinativação das pro-caspases -9 e -3. Esta inibição de caspases é um sinal de mudança de tipo de morte celular em favor da necrose. Sendo assim, a utilização de um PS que medeia a inativação das caspases pode resultar na ativação e propagação de uma via de morte celular por necrose. Assim, esta

pode ser uma estratégia com a capacidade de matar células que conseguem escapar à apoptose.¹⁶

3.2. Efeito anti-vascular

Pensa-se que o efeito direto das ROS nas células cancerosas pode não ser suficiente para as eliminar. Neste caso, o colapso vascular induzido pela PDT tem um papel muito importante, contribuindo para a hipoxia e défice no aporte de nutrientes para este tecido. Por sua vez, estes vasos sanguíneos também estão dependentes dos fatores de crescimento produzidos pelas células tumorais, que sem oxigénio e nutrientes não os produzem.¹⁶

W. M. Star e seus associados realizaram um estudo em ratos implantados com tumor mamário de forma a observar a microcirculação no tecido tumoral e em tecido saudável, antes, durante e após várias sensibilizações via PDT, usando hematoporfirina como PS. O branqueamento e a vasoconstrição inicial dos vasos tumorais foram seguidos por várias respostas heterogêneas, incluindo a completa estase no fluxo sanguíneo, hemorragia e, em alguns vasos maiores, a formação de agregados plaquetares.²⁴

Outros estudos demonstram que as células tratadas com PDT *in vivo* são clonogênicas, se forem removidas imediatamente do hospedeiro. No entanto, esta clonogenicidade é perdida com o aumento do tempo dentro do hospedeiro após o tratamento. Esta progressão corresponde ao tempo deixado em hipoxia induzida pela PDT. Foi identificada hipoxia suficiente para matar células tumorais em doses consideradas sub-terapêuticas.²⁴

Cavarga e colaboradores¹⁶ apresentam uma abordagem no fracionamento de HY de modo a melhorar esta resposta. A administração de HY, 1 e 6 horas antes da irradiação, pode produzir uma melhor resposta terapêutica do que uma só administração. Estes estudos mostram que a toxicidade celular e vascular contribui para o resultado global da terapêutica. Esta contração vascular, formação de trombos e inibição do crescimento tumoral é o mecanismo de ação mais comum na maioria dos PS mais utilizados. No entanto, apesar da destruição da vasculatura tumoral poder ser uma modalidade de tratamento efetiva, a libertação de fatores de crescimento agiogénicos e citocinas derivados deste stress, como consequência da situação de hipoxia no tecido tumoral, pode diminuir a eficácia da PDT e promover o crescimento do tumor.¹⁶

3.3. Estimulação imunitária

Para além dos mecanismos referidos anteriormente, a PDT pode induzir reações inflamatórias e imunes, que medeiam a destruição tumoral através do recrutamento de células imunitárias, nomeadamente macrófagos, CD e granulócitos, para o local da neoplasia.^{16,24,28} Esta reação inflamatória, observável como um edema localizado, é uma consequência do stresse oxidativo induzido. Este insulto é interpretado pelo organismo com um trauma agudo localizado, o que ativa uma série de ações de proteção de forma a resolver a integridade do tecido e a homeostasia do local afetado. Esta resposta inflamatória tem como principal objetivo conter o distúrbio devido à homeostasia, assegurar a remoção das células danificadas e promover a cura local e a restauração das funções normais do tecido.²⁴

A inflamação iniciada pela PDT é um processo antigénio tumoral não-específico orquestrado pelo sistema imunitário inato. As células tumorais atingidas pelo insulto causado pela terapêutica são vistas como “alteradas”. A PDT parece ser particularmente efetiva ao gerar rapidamente uma abundância de sinais de perigo, também conhecidos como padrões moleculares associados a danos (*damage-associated molecular patterns* – DAMPs) ou padrões moleculares associados a morte celular (*cell death-associated molecular patterns* – CDAMPs), que podem ser detetados pelo sistema imune inato.²⁴

O início da inflamação induzida pela PDT é marcado por alterações dramáticas na vasculatura tumoral, que se torna permeável a proteínas sanguíneas e células inflamatórias. Este efeito ocorre até mesmo com PS que têm como alvo as células tumorais em vez das células vasculares, sendo o processo inflamatório iniciado por sinais derivados do stress oxidativo em regiões perivasculares. As células inflamatórias, inicialmente neutrófilos, mas seguidamente mastócitos e monócitos/macrófagos, rapidamente invadem o tecido tumoral. A sua primeira missão é neutralizar a fonte dos DAMPs/CDAMPs, eliminando os resíduos que comprometam o tecido, incluindo células danificadas e mortas. Dentro das citocinas que regulam o processo inflamatório, as mais importantes neste paradigma são as IL-1 β e IL-8. Bloquear a função de várias moléculas de adesão também diminui a resposta à PDT. Por outro lado, a inibição de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β pode aumentar a sua taxa de sucesso.²⁴

Numerosos estudos têm demonstrado que a PDT pode influenciar o sistema imunitário adaptativo de várias maneiras diferentes: alguns regimes podem potenciar a imunidade inata, enquanto que outros levam à imunossupressão. O mecanismo preciso e os

fatores que o determinam ainda são desconhecidos. Contudo, parece que o efeito resultante da PDT no sistema imunitário está dependente do tipo de tratamento, da área afetada e do PS utilizado. A imunossupressão está relacionada com regimes fotodinâmicos cutâneos e transdérmicos que envolvem grandes superfícies.²⁴

A eficácia da PDT parece estar dependente da indução da imunidade anti-tumoral. Verifica-se que a resposta a longo prazo está diminuída ou ausente em ratinhos imunocomprometidos e que a reconstituição destes animais com medula óssea ou células T de ratinhos imunocompetentes resulta num aumento da eficácia desta terapêutica.²⁴

Clinicamente, a eficácia da PDT também parece estar dependente da imunidade anti-tumoral. Doentes com neoplasia vulvar intraepitelial (*vulvar intraepithelial neoplasia* – VIN) que não respondem ao tratamento com ALA têm uma maior probabilidade de possuírem tumores sem moléculas do complexo maior de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) do que doentes que respondem ao mesmo tratamento. O reconhecimento do MHC-I é muito importante para a ativação de células T CD8⁺ e células que não tenham MHC-I são resistentes às reações imunes anti-tumorais mediadas por células. Verificou-se também que os doentes com VIN que respondem à terapêutica fotodinâmica têm um maior número de células T CD8⁺ infiltradas no tumor tratado, comparativamente com os doentes que não respondem.^{24,29}

Outros estudos também demonstraram que os efeitos direcionados a tumores de ratinhos incluem a criação de imunidade de memória. Foi verificado clinicamente que a PDT anti-tumoral também aumenta a imunidade anti-tumoral. A PDT utilizada no angiossarcoma multifocal da cabeça e pescoço resulta num aumento da infiltração das células imunitárias em tumores distantes não tratados, acompanhada de regressão tumoral.^{24,29}

A PDT ativa tanto a imunidade humoral como a imunidade anti-tumoral mediada por células, apesar da importância da resposta imunitária humoral não ser clara. A eficácia deste tratamento é reduzida em ratinhos e humanos, na ausência da ativação das células T CD8⁺ e/ou infiltração tumoral. É claro que a indução de imunidade anti-tumoral após PDT é dependente da indução da inflamação. Inflamação aguda, local e sistêmica, induzida pela PDT, culmina na maturação e ativação de DCs. DCs maduras são importantes na ativação de células T CD8⁺ assim como na indução da imunidade anti-tumoral. A geração de células T CD8⁺ efectoras e de memórias está frequentemente, mas nem sempre, dependente da presença e ativação de células T CD4⁺. A imunidade anti-tumoral induzida

pela PDT pode ou não ser dependente de células CD4⁺ e pode ser aumentada por células *natural killer*.^{24,30}

O aprimoramento da imunidade anti-tumoral mediado pela PDT é causado, em parte, pela estimulação de DCs por células tumorais mortas ou a morrer, sugerindo que, *in vitro*, células tumorais tratadas com PDT podem servir como vacinas anti-tumorais. Esta hipótese foi comprovada em vários estudos, utilizando uma grande variedade de PS e modelos tumorais, tanto em situações preventivas como terapêuticas.^{24,30}

Estudos mecanísticos mostram que a incubação de DCs imaturas com células tumorais tratadas com PDT leva a um melhoramento da maturação e ativação e também a uma maior capacidade de estimular as células T pelas DCs. A PDT em células tumorais resulta em morte celular e stress celular e crê-se que a ativação das DCs pelas células tratadas com PDT resulta num reconhecimento de DAMPs/CDAMPs libertados pelas células a morrer. A HSP70 é uma DAMP bem caracterizada que interage com recetores de sinais de perigo, os recetores do tipo *Toll (Toll-like receptors – TLRs) 2 e 494*, e é induzida pela PDT. Os níveis de expressão de HSP70 em tumores tratados com PDT correlacionam-se com a capacidade de estimular a maturação das DCs e iniciar a inflamação. Para além disso, a opsonização de células tumorais tratadas com proteínas do complemento aumenta a eficácia das vacinas geradas pela PDT. A PDT induz múltiplos sinais de perigo capazes de desencadear a ativação da apresentação de antígenos e imunidade anti-tumoral.^{24,29}

As implicações da imunidade anti-tumoral induzida pela PDT e a efetividade das vacinas geradas são significantes e fornecem uma possibilidade para a utilização da PDT no tratamento de metástases e também como adjuvante, em combinação com outras modalidades de terapia contra o cancro.²⁴

4. Fotosensibilizadores

Como foi exposto na secção anterior, o PS constitui um dos três principais pilares em PDT. Este é o componente de maior interesse no campo farmacêutico, químico e medicinal, pois é possível criar novas moléculas fotossensibilizadoras e otimizar as existentes, assim como desenvolver os seus transportadores.¹⁶

Genericamente, os PS são compostos que promovem reações fotoquímicas após excitação com radiação. O PS ideal na terapêutica contra o cancro deverá apresentar as seguintes características^{16,24,25}:

1. Síntese simples, económica e verde^{16,24,25}
2. Toxicidade residual na ausência de radiação^{16,24,25}
3. Ausência de mutagenicidade e/ou carcinogenicidade^{16,24,25}
4. Bom comportamento farmacocinético (alta seletividade para o tecido tumoral e eliminação fácil do organismo)^{16,24,25}
5. Ativação consistente num comprimento de onda apropriado^{16,24,25}
6. Administração versátil^{16,24,25}
7. Disponibilidade comercial^{16,24,25}
8. Segurança^{16,24,25}
9. Absorção na gama espectral do vermelho, para penetração mais profunda nos tecidos^{16,24,25}

Estas características são limitadas¹⁶:

1. Pela capacidade de geração de oxigénio singlete¹⁶
2. Pelas propriedades óticas dos tecidos biológicos¹⁶
3. Pelas interações com os sistemas biológicos¹⁶
4. Pela seletividade tumoral¹⁶

Foram descritos vários PS desde os primeiros estudos sobre a utilização de PDT para o tratamento de neoplasias. Estes PS são genericamente classificados como porfirinóides e não-porfirinóides, consoantes a sua estrutura química.¹⁶

A estrutura química dos PS não-porfirinóides é variada, partilhando apenas a presença de múltiplas ligações π conjugadas. Esta classe de PS inclui vários tipos de moléculas, incluindo alguns corantes, como as cianinas e corantes fenotiazínicos, e compostos naturais, como quinonas policíclicas. Os PS não-porfirinóides apresentam características interessantes em PDT. Contudo, o seu desenvolvimento para aplicações em oncologia encontra-se consideravelmente atrasado relativamente ao atingido por alguns compostos porfirinóides.¹⁶

Os PS porfirinóides têm em comum um ciclo de carbonos com cerca de 18 a 22 ligações π conjugadas. Esta classe inclui as moléculas sensibilizadores mais importantes que são utilizadas em PDT nos dias de hoje. Desde os primeiros estudos com hematoporfirina – o primeiro PS porfirinóides descrito na literatura –, vários investigadores descobriram outros PS com propriedades otimizadas e com aplicação em PDT. De acordo com

as suas características e data de descoberta, os PS porfirinóides são classificados como de primeira, segunda e terceira geração.^{16,24,27}

Os PS porfirinóides de primeira geração são, entre outros, a hematoporfirina e alguns dos seus derivados e a Photofrin®. Todos eles são obtidos a partir de misturas de porfirinas extraídas do sangue, seguindo-se a purificação e modificação química para ajuste de propriedades. Nesta classe de PS, a Photofrin® é bastante importante, não só por questões históricas, mas também porque é considerada o *gold-standard* em PDT. A Photofrin® está aprovada como PS para o tratamento de diversos tipos de cancro.^{16,24,27}

Apesar da boa resposta terapêutica, os PS de primeira geração apresentavam algumas limitações, nomeadamente¹⁶:

1. Falta de pureza química, uma vez que eram constituídos por uma mistura variável de diversos compostos¹⁶
2. Tempos de meia-vida longos e retenção dérmica intensa, responsável por uma fotossensibilização dérmica prolongada (2 a 3 meses)^{16,24,27}
3. Baixos coeficientes de extinção molar¹⁶
4. Pico de absorção em comprimentos de onda curtos (cerca de 630 nm)^{16,24,27}
5. Baixos rendimentos quânticos de produção de oxigénio no estado de singlete

Estas limitações conduziram ao desenvolvimento de novas moléculas PS que apresentam melhores características farmacológicas em comparação com os PS de primeira geração. No entanto, os PS de segunda geração ainda são bastante hidrofóbicos e pouco seletivos para os tumores. Este problema de seletividade fez com que os investigadores se focassem no desenvolvimento de transportadores para libertação controlada dos PS.^{16,24}

A maioria dos PS atuais, de terceira geração, contêm estruturas porfirinóides, incluindo derivados da hematoporfirina, ftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas, que exibem propriedades fotoquímicas e fotofísicas diferentes, com implicações no seu mecanismo de ativação e ação. Estes PS podem ser administrados por via exógena ou endógena e produzem metabolitos fotossensíveis (ex.: PpIX a partir do ALA). A maioria dos PS são hidrofóbicos e formam agregados num ambiente biológico, tornando-se difícil a administração intravenosa e reduzindo a eficácia da PDT. De forma a ultrapassar este problema, os PS são geralmente formulados em sistemas de transporte coloidais, como lipossomas, micelas e nanopartículas biodegradáveis ou polímeros hidrofílicos.¹⁶

As propriedades químicas dos PS, como a carga iônica, o grau de hidrofobicidade e de assimetria da molécula, determinam a sua localização subcelular assim como o tipo de dano efetuado. De um modo geral, os PS hidrofóbicos com uma ou duas cargas negativas acumulam-se no plasma e membranas intracelulares, enquanto que os PS hidrofílicos são transportados para o interior da célula por endocitose e pinocitose. Após irradiação, os primeiros induzem a foto-oxidação de lípidos e proteínas, ativando fosfolipases de membrana e, conseqüentemente, a rápida degradação dos fosfolípidos conduz a mudanças na fluidez, perda da integridade celular, inativação de enzimas e recetores assim como despolarização celular e colapso do balanço iônico. Já os segundos induzem a libertação de enzimas lisossomais no citoplasma.¹⁶

4.1. Os novos fotossensibilizadores

Como referido anteriormente, a maioria dos PS são moléculas hidrofóbicas. Apesar desta ser uma importante característica para a penetração nas membranas celulares e para a acumulação nas células, conduz a uma agregação imediata após injeção num meio aquoso, como o sangue, diminuindo a eficácia do PS. Desta forma, tornam-se necessários sistemas de transporte solúveis em meio aquoso, de forma a garantir os resultados em PDT.¹⁶

O desenvolvimento de PS de terceira geração utilizados em PDT é relativamente recente. A incorporação dos PS em nanoestruturas surgiu há cerca de 20 anos, mas a publicação de novos artigos aumentou exponencialmente apenas nos últimos cinco. De entre todas as nanoestruturas, são os lipossomas e os polímeros biodegradáveis as bases mais utilizadas para o desenvolvimento de novos PS.^{16,24}

4.1.1. Lipossomas

Lipossoma é um termo genérico usado para designar vesículas lipídicas cujo tamanho varia entre 20 e 1000 nm e que consistem numa ou mais bicamadas fosfolipídicas concêntricas que contêm um meio aquoso. Uma característica interessante dos lipossomas é a sua natureza anfifílica, permitindo a incorporação tanto de moléculas hidrófilas como de hidrofóbicas na sua estrutura. As moléculas hidrófilas ficam retidas no núcleo enquanto que as hidrofóbicas podem intercalar nos lípidos da membrana lipossómica.¹⁶

Os fosfolípidos utilizados nestas formulações podem ser sintéticos ou derivados de compostos naturais. A principal característica destes lípidos é a presença de uma cabeça polar associada a um corpo longo e hidrofóbico composto por cadeias de carbonos.

Podem ser adicionados ao lipossoma outros lípidos, como o colesterol, de forma a modificar as suas características e melhorar a sua estabilidade. Geralmente, são utilizados lípidos estabilizadores, como o polietileno glicol (PEG), de modo a prolongar o tempo de meia-vida em circulação no sangue. Esta incorporação é importante, uma vez que os lipossomas simples são rapidamente fagocitados por macrófagos após a sua administração intravenosa.¹⁶

A incorporação dos PS em lipossomas pode alterar as suas propriedades fotofísicas, como a fluorescência e absorção, o rendimento quântico da fluorescência, o tempo de meia-vida dos estados excitados e o rendimento da geração de oxigénio singlete. Esta última alteração é a mais importante, uma vez que pode afetar diretamente a eficácia do tratamento.¹⁶

Por enquanto apenas um PS lipossómico está aprovado para uso médico, mas não é indicado em PDT para o cancro. Esta formulação, conhecida como Visudyne®, contém Verteporfina e é usada contra a degeneração macular associada ao envelhecimento.¹⁶

Relativamente a formulações em testes pré-clínicos, existe uma formulação lipossómica de 5,10,15,20-tetraquis(m-hidroxifenil)clorina (m-THPC, Foscan®) incorporada em lipossomas de dipalmitoil fosfatidilcolina/dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPC/DPPG), conhecida como Foslip®. Comparativamente com o Foscan®, o Foslip® apresenta diversas melhorias, destacando-se a maior eficácia e seletividade assim como menos efeitos adversos.¹⁶

Também estão a ser estudadas formulações lipossómicas de ftalocianinas. Estas moléculas têm características fotofísicas e fotoquímicas muito atrativas para a utilização em PDT. Por exemplo, absorvem fortemente radiação a comprimentos de onda de 700 nm, apresentam um estado tripleto excitado muito estável, ficam retidas por períodos prolongados em células cancerígenas e são, comparativamente, bastante fotoestáveis. Contudo, as ftalocianinas são bastante hidrofóbicas, o que pode conduzir à sua agregação em meio aquoso, resultando em efeitos adversos e em decréscimo de acumulação no tecido alvo e de eficácia. Uma solução para estes problemas poderia passar pelo desenvolvimento de uma formulação que mantivesse as boas características hidrofóbicas das ftalocianinas e que melhorasse a sua farmacocinética para terapêutica anti-tumoral. É neste contexto que surgem as formulações lipossómicas com ftalocianinas.¹⁶

Os lipossomas também permitem a inclusão de moléculas que possibilitem direcionamento e distribuição controlada na sua superfície. Estas moléculas podem ser adicionadas antes ou depois da formação das vesículas. Esta estratégia está baseada no facto

de a maioria das células neoplásicas apresentarem um excesso de alvos moleculares associados aos mecanismos de desenvolvimento do tumor, como recetores para vitaminas, glicoproteínas ou certos antigénios de superfície.¹⁶

4.1.2. Nanopartículas poliméricas biodegradáveis

As nanopartículas poliméricas, como as nanoesferas e as nanocápsulas, apresentam características que as tornam boas candidatas como sistemas de transporte de PS em PDT. Podem ser consideradas como alternativa aos lipossomas, quando as formulações lipossômicas não apresentam as características desejadas. Algumas destas partículas poliméricas permitem o controlo da libertação do medicamento, a manutenção da atividade fotodinâmica de PS hidrofóbicos no meio aquoso, a incorporação de concentrações elevadas de PS e a fácil modificação da sua superfície. Alguns dos sistemas mais estudados são baseados em co-poli(ácido láctico, ácido glicólico) (PLGA).¹⁶

Os dendrímeros podem ser considerados como os “blocos de construção” mais versáteis, tanto ao nível de composição como estrutural, podendo ser controlados sinteticamente à nanoescala. Apresentam um elevado nível de uniformidade molecular, capacidade de carregamento, biocompatibilidade e uma superfície altamente funcional que facilita a modificação da solubilidade dos medicamentos incorporados, ajudando a selecionar os alvos terapêuticos ou a ajustar o perfil terapêutico do agente. São exemplos os dendrímeros baseados em poliamidoamina (PAMAM).¹⁶

O PS meso-tetra(4-hidroxifenil)porfirina (p-THPP) pode ser incorporado em nanopartículas de PLGA com um diâmetro inferior a 130 nm. Este diâmetro permite que as nanopartículas se acumulem passivamente no interior dos tumores. Quando comparado com a p-THPP livre, o sistema com nanopartículas apresenta uma fototoxicidade *in vitro* significativamente maior. Desta forma, as nanopartículas de PLGA poderiam libertar o PS em compartimentos intracelulares específicos, onde a indução da morte celular seria mais eficaz.¹⁶

4.2. Intervalo fármaco-irradiação

A distribuição do PS no tumor pode ser modulada pelo intervalo fármaco-irradiação (*drug-light interval* - DLI) que corresponde ao tempo que separa a administração do PS do início da irradiação. A distribuição do PS pela microvasculatura tumoral ou pelo seu corpo tumoral depende da farmacocinética e das propriedades de ligação do PS às células e tecidos.¹⁶ São observáveis danos na vasculatura quando o tecido é irradiado com o um

DLI curto, uma vez que é aí que se localizará maioritariamente o PS. Do mesmo modo, para um DLI mais longo serão observados danos diretos e destruição de células tumorais, uma vez que a concentração de PS vai ser maior no tumor.¹⁶

Vários estudos comprovaram que ter como alvo unicamente a vasculatura ou as células tumorais nunca resulta numa destruição completa do tumor. Desta forma, deverá ser efetuada uma dupla administração do PS, com DLIs diferentes, de forma a obter níveis elevados de PS tanto no compartimento celular como no compartimento vascular do tumor. Usando uma abordagem terapêutica baseada nesta lógica, Garrier e colaboradores conseguiram uma taxa de cura de 100% em tumores tratados com mTHPC, seguindo um protocolo de injeção antecedendo 24 e 3 horas a irradiação.¹⁶

4.3. A influência do meio biológico

Uma área de investigação que atrai crescente interesse é a pesquisa de novos PS com atividade melhorada. Uma forma de avaliar a atividade dos PS é através da medição do rendimento quântico de geração de oxigénio singleto numa solução isotrópica. Uma vez que o oxigénio singleto é tido como a principal espécie com interesse em PDT, os PS com maior rendimento quântico de produção de oxigénio singleto serão considerados os mais promissores. Contudo, muitos estudos comprovam que o rendimento quântico não é o único determinante da eficácia do PS, já que as propriedades deste podem ser afetadas pela interação com o ambiente biológico e as células são sistemas heterogêneos e complexos.²³

Um dos efeitos mais simples, observáveis em PS com o mesmo rendimento de geração de oxigénio singleto, é o facto de os PS que interagem mais com biomoléculas (como os lípidos nas bicamadas lipídicas) conduzirem a danos fotodinâmicos mais extensos. Outro efeito é a localização da geração das ROS nos diferentes espaços subcelulares, o que afeta os seus tempos de vida, quando comparados com os observados na solução isotrópica.²³

As vias de desativação do estado excitado tripleto e, do mesmo modo, a eficiência da geração de oxigénio singleto, também vão ser alteradas em meio biológico, em comparação com as soluções isotrópicas. Os PS podem transferir eletrões ou energia, desde que o estado tripleto excitado do PS tenha energia suficiente para sensibilizar a formação de oxigénio singleto e os potenciais de oxidação-redução sejam compatíveis com os substratos existentes. A probabilidade relativa de ocorrência de cada processo vai depender de fatores como a concentração de oxigénio ou a concentração e natureza química dos

substratos no meio circundante, e também das interações intermoleculares entre moléculas do PS, ou destas com outras moléculas de outras substâncias. Todos estes fatores vão depender do nano-ambiente onde o PS se encontra: as membranas lipídicas, por exemplo, contêm mais oxigénio do que a solução circundante. O caminho seguido pelo estado excitado tripleto no processo de relaxação também pode ser alterado ao longo da irradiação, devido a alterações fotoquímicas do PS, assim como da disponibilidade de novos substratos, como moléculas foto-oxidadas, da presença de espécies redutoras e do consumo de reagentes iniciais (como o oxigénio e outros substratos).²³

Sabe-se que a interação dos PS com biomoléculas altera as suas vias fotoquímicas e fotofísicas, podendo ou não interferir com a sua capacidade de agregação. Dependendo da polaridade do PS e da composição dos lípidos, as membranas lipídicas podem estabilizar as formas monoméricas ou agregadas dos PS, afetando a geração de ROS. Para PS que se agregam num meio aquoso e que têm bons rendimentos quânticos em solventes que previnem a agregação, a utilização de lipossomas de lecitina conduz a uma maior geração de oxigénio singlete. Por outro lado, também deve ser esperado um aumento dos processos de transferência de eletrões, uma vez que a ligação a membranas aumenta a concentração de possíveis substratos.²³

Os PS também se podem ligar a proteínas, tanto de forma específica como inespecífica, alterando as suas propriedades fotossensibilizantes. Este efeito varia de acordo com o tipo de proteína, PS e as suas concentrações relativas. Quando os complexos PS-proteína são excitados, são favorecidas as reações diretas proteína-PS levando à diminuição do rendimento de oxigénio singlete e à formação de adutos. Para além de interferir com os equilíbrios de agregação, as proteínas também podem diminuir a probabilidade de relaxamento não-radioativo dos PS, com o subsequente aumento da sua fotoreatividade. Este efeito foi observado no caso de corantes baseados em triarilmetano, na presença de albumina sérica bovina (*Bovin Serum Albumin* - BSA).²³

Desta forma, torna-se clara a influência do meio onde se localiza o PS nas suas características fotoquímicas e fotofísicas. Este conhecimento pode, então, ser utilizado para aumentar a eficiência fotodinâmica, desenhando formulações que regulem estes aspetos do PS através da modulação do equilíbrio de agregação, controlando a força iónica ou estabilizando as espécies mais ativas do PS.²³

Contudo, os estudos diretos sobre as características fotofísicas e fotoquímicas dos PS nas células são escassos. A técnica de microscopia de fluorescência em tempo real (fluorescence lifetime imaging microscopy – FLIM) tem sido utilizada para observar as

variações no tempo de fluorescência dos PS consoante a sua localização subcelular. Estes estudos têm demonstrado que o estado singleto excitado dos PS é afetado pelas interações com o ambiente intracelular. Por enquanto ainda não existem metodologias capazes de estudar os estados tripleto excitados em amostras biológicas. Não obstante, são espectáveis alterações no rendimento de geração do estado tripleto e seu tempo de vida nestas condições.²³

4.3.1. O resultado biológico como função das propriedades do fotossensibilizador

Quando as células são tratadas com um PS, são necessários vários passos até se atingir a morte celular. Nomeadamente, o PS tem de ser internalizado pela célula, acumular-se em localizações subcelulares, sofrer fotoexcitação e só depois oxidar biomoléculas. Da mesma maneira, a radiação tem de atingir o PS, assim como é necessária a presença de oxigénio.²³

Todos estes passos são decisivos para a eficácia da PDT, mas a previsibilidade do impacto e extensão de cada um deles é difícil. No caso dos tumores, alguns PS afetam as células tumorais de forma indireta, exercendo danos na sua vasculatura, o que bloqueia o aporte de oxigénio e de nutrientes. Este efeito está associado à ligação de PS hidrófilos à albumina do soro, que medeia a acumulação do PS no estroma vascular ou a sua ligação a estruturas ou constituintes vasculares, como o colagénio. Por outro lado, os PS hidrofóbicos atuam principalmente por interações diretas com o tumor, uma vez que são transportados para o interior do corpo tumoral em associação a LDLs, que os conseguem conduzir a locais intracelulares.²³

De forma a aumentar a seletividade, foram desenhados PS direcionáveis e nano-transportadores, explorando as características bioquímicas específicas dos tumores. Normalmente os tumores apresentam maiores taxas de glicólise e maior utilização de albumina sérica, além de sobre-expressão de LDL e de recetores para fatores de crescimento. Por esta razão, os PS têm sido acoplados a açúcares, albuminas séricas, LDL e fatores de crescimento. Para além disso, também têm sido estudados conjugados de PS com anticorpos, ligandos peptídicos ou proteínas. Outra estratégia é o desenvolvimento de PS que sejam ativados em resposta à maior acidez das células cancerosas, assim como PS ativados pela glutatona, uma vez que a concentração desta é mais elevada em células tumorais.^{23,24}

Para além das estratégias que visam melhorar a distribuição do PS, também têm sido desenvolvidas abordagens de forma a ultrapassar as baixas concentrações de oxigénio ou as dificuldades em fazer a radiação alcançar o PS. A excitação do PS requer a irradiação com uma fonte de luz que corresponda ao máximo de absorção do PS. Em células de melanoma, a melanina absorve grande parte da luz na região visível do espectro, competindo com o PS na absorção da radiação, diminuindo assim a eficiência da terapêutica. Uma abordagem para ultrapassar esta dificuldade consiste na utilização de PS ou nanomateriais que convertam os fótons com energia correspondente à região vermelha do espectro (menos absorvidos pela melanina) em fótons de maior energia.²³

Outra dificuldade no tratamento de tumores sólidos com PDT é o fraco aporte de oxigénio nalgumas regiões do tumor. Uma solução é o desenvolvimento de formulações que consigam produzir oxigénio no local. Outras abordagens incluem a utilização de sais inorgânicos, uma vez que têm a capacidade de gerar radicais através de um mecanismo independente de oxigénio.²³

O mecanismo de captação do PS pela célula vai depender de vários fatores, nomeadamente o grau de lipofilicidade, o tipo e número de cargas e o grau de assimetria da estrutura molecular. A maioria dos PS consiste num cromóforo com cadeias laterais acopladas. Como é esperado, a presença destas cadeias laterais lipofílicas em torno do cromóforo aumenta a lipofilicidade do PS. O grau de lipofilicidade do PS pode ser utilizado como um indicador na previsão da sua tendência para interagir com as membranas biológicas. No entanto esta interação nem sempre pode ser prevista apenas com base na lipofilicidade da molécula, uma vez que a assimetria das cadeias laterais e as suas cargas podem afetar a interação com os lípidos das membranas. As cadeias alquílicas longas podem conduzir a agregação e supressão da captação pela célula, diminuindo a eficiência do PS. Em porfirinas anfifílicas catiónicas, a presença de duas cargas positivas adjacentes (isómero *cis*) conduz a uma maior captação e eficiência fotodinâmica do que no isómero com cargas opostas (*trans*), uma vez que a estrutura em *cis* permite uma maior penetração em membranas lipídicas.²³

O parâmetro mais importante para o resultado final em PDT será a localização subcelular do PS. Uma maneira de prever esta localização será através da carga do PS. Por exemplo, porfirinas, fenotiazinas, triarilmetanos e cianinas, com carga positiva, acumulam principalmente nas mitocôndrias uma vez que são atraídos pela carga negativa do potencial eletroquímico de membrana. Contrariamente, os PS aniónicos, como a clorina

e a 6 mono-L-aspartil meso-tetra-(*p*-sulfofenil)porfirina, tendem a localizar-se nos lipossomas após captação pela célula por endocitose.²³

Uma vez no interior do organelo alvo, os PS devem produzir alguma quantidade de espécies reativas de forma a exercer a foto oxidação das biomoléculas. Desta forma, a tendência para o fotobranqueamento, agregação e redução pelo ambiente intracelular são fatores a ter em consideração. Alguns parâmetros fotoquímicos que podem ser usados para avaliar estas propriedades são os rácios de fotobranqueamento, o potencial de redução do PS e as constantes de agregação. Por exemplo, o PS Azul de Metileno (*Methylene Blue* – MB) é reduzido no interior das mitocôndrias, formando um radical semi-reduzido que posteriormente se transforma em leuco-MB. Uma vez que nem a forma semi-reduzida nem a forma leuco-MB absorvem radiação no visível, não se comportam como PS, diminuindo a eficácia da PDT.²³

É importante ter em consideração que apesar de todos os esforços para se estabelecer uma relação entre a estrutura química do PS e a sua atividade biológica, ainda é difícil obter correlações com níveis aceitáveis de fiabilidade. Isto acontece devido à dificuldade em correlacionar resultados de experiências simples com comportamentos em sistemas biológicos mais complexos, pois é muito difícil mimetizar estes no desenho e condução daquelas. Por enquanto é importante ter em conta dois passos fundamentais no planeamento em PDT: a escolha do organelo alvo que conduz a um tipo específico de morte celular e a escolha de um PS que tenha como alvo essa estrutura subcelular e que seja capaz de conduzir à sua oxidação. Deverá então ser avaliado se a fotoquímica e fotofísica do PS pode resultar, nas circunstâncias consideradas, e se o PS tem características adequadas para a utilização em PDT.²³

4.4. Descrição geral de alguns fotossensibilizadores usados na terapia fotodinâmica

4.4.1. Derivado da hematoporfirina

O derivado da hematoporfirina (HpD), um porfímero sódico, mais conhecido pelo seu nome comercial Photofrin® (figura 4.1.), é um dos PS mais utilizados em PDT. Por norma, este PS é administrado por via intravenosa, numa dose de 2 mg/kg. 40 a 50 horas após a sua administração procede-se à irradiação da área tumoral com luz de comprimento de onda de 630 nm. A radiação é administrada através de um difusor de fibra ótica, normalmente com uma dose entre 130 a 300 J/cm². É frequentemente feita uma segunda irradiação com uma dose mais baixa, 96 a 120 horas após a injeção.⁵² Este PS é utilizado

no tratamento dos câncros do pulmão, esôfago, bexiga e cervical, e em doenças de pele malignas e não malignas.²⁵

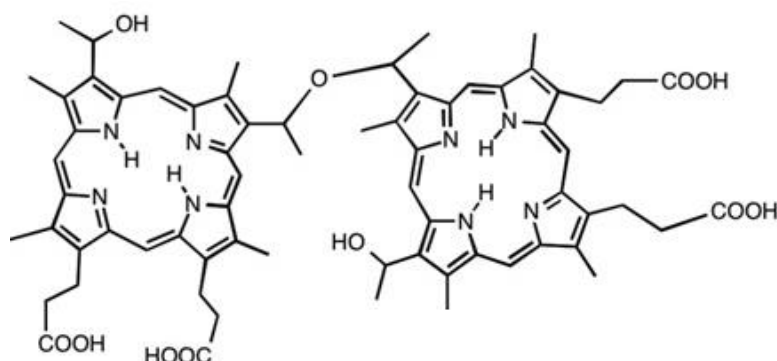


Figura 4.1. Representação esquemática da estrutura química do PS Photofrin®.⁵³

4.4.2. Foscan®

Um dos PS de segunda geração mais potentes é a mesotetra(hidroxifenil)clorina (mTHPC) desenvolvida e aprovada para o tratamento paliativo dos câncros da cabeça e pescoço e designada clinicamente por Foscan® (figura 4.2.).¹⁶

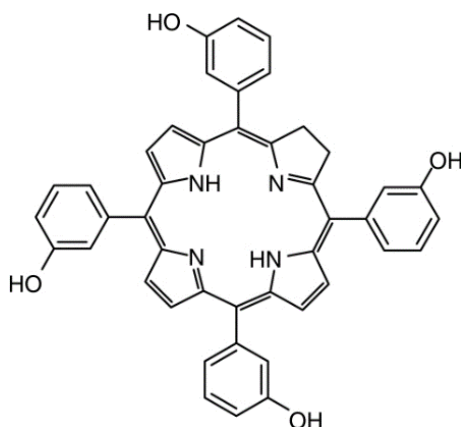


Figura 4.2. Representação esquemática da estrutura química do PS Foscan® (mTHPC).⁵⁴

Recorre-se à incorporação de mTHPC em transportadores lipídicos, para melhorar a sua farmacocinética, reduzir efeitos adversos sistêmicos e melhorar a especificidade do medicamento. São utilizadas duas formulações, uma com lipossomas convencionais (Foslip®) e outra com lipossomas baseados em PEG (Fospeg®).¹⁶

No entanto existem poucos estudos sobre a utilização de Foslip® e Fospeg® *in vivo*. Buchholz e colaboradores¹⁶ compararam a utilização de Foscan® e Foslip® em modelos de carcinoma espontâneo de células escamosas de felinos, em termos dos parâmetros farmacocinéticos, no tumor, pele e plasma. Verificaram que as formulações lipossômicas de mTHPC apresentam uma intensidade de fluorescência, raios de fluorescência e biodisponibilidade no tumor 2 a 4 vezes superiores às exibidas pela mTHPC livre. Mais uma vez, estes resultados comprovam que as formulações lipídicas podem melhorar as propriedades farmacocinéticas dos PS, melhorando assim como os resultados em PDT.¹⁶

Noutro estudo, verificou-se que o tratamento do carcinoma do colon humano xenotransplantado em ratinhos utilizando Foscan® e Fospeg® conduz à indução da regressão do tumor, 72 horas após a injeção. Contudo, o tempo de meia-vida em circulação e o raios de mTHPC em células tumorais vs. células normais revelaram-se mais favoráveis com a utilização de Fospeg®. Foi também verificado através de estudos de microscopia de fluorescência que a acumulação preferencial de Fospeg® é mais próxima dos vasos tumorais enquanto que a formulação Foscan® tem uma maior distribuição dentro do tecido tumoral. Este estudo confirma a possibilidade de melhorar a farmacocinética dos PS, através da introdução em lipossomas ou da polietileno glicolização, mas os resultados em PDT são imprevisíveis em relação à sua distribuição intratumoral.¹⁶

4.4.3. Hipericina

A HY (1,3,4,6,8,13-hexahidroxi-10,11-dimetilfenantro[1,10,9,8-opqra]perileno-7,14-dione) (figura 4.3.), um PS natural, é uma naftodiantrona produzida por plantas da espécie *Hypericum* (Hipericão). A HY apresenta uma eficácia elevada na produção de oxigênio singlete e aniões superóxido, após a irradiação com luz de comprimentos de onda em torno de 600 nm, e exibe muito baixa toxicidade na ausência de radiação. A HY fotoativada conduz a apoptose e a alterações a nível vascular em várias linhas celulares, incluindo em células T CD8⁺. Ao nível celular, a ativação da HY conduz a vários eventos, como peroxidação da membrana lipídica, aumento da atividade da enzima superóxido dismutase, diminuição da concentração de glutatona ou danos nas mitocôndrias. Apesar dos efeitos vasculares induzidos pela HY em PDT (HY-PDT) serem os mais eficazes em vários modelos animais, a combinação da destruição vascular e celular é ainda mais poderosa. A apoptose é considerada o modo principal de morte celular induzida pela HY-PDT. Contudo, a desregulação das vias de sinalização e alteração para outros tipos de morte celular é frequente.¹⁶

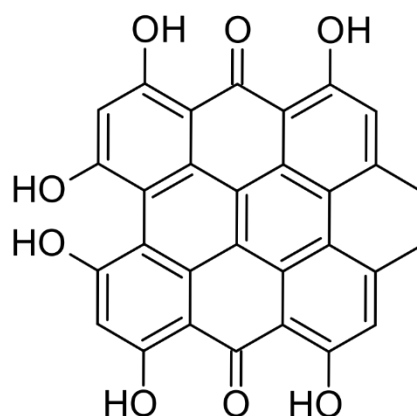


Figura 4.3. Representação esquemática da estrutura química do PS HY.⁵⁵

O efeito anti-vascular da HY-PDT depende da sua distribuição pelos tecidos, verificando-se que a eficácia é mais dependente da concentração plasmática de PS do que do nível do PS no tumor. Nem a hipoxia do tumor, nem o aumento da oxigenação tumoral parecem resultar numa grande variação na eficácia terapêutica destes protocolos. Estes resultados sugerem que os danos na vasculatura tumoral são o principal mecanismo de ação da HY-PDT.¹⁶

Apesar de a abordagem tendo como alvo somente a vasculatura tumoral ser promissora, também foi estudada uma outra abordagem, envolvendo o fracionamento da dosagem da HY. Verificou-se que a administração de HY, 1 e 6 horas antes da irradiação, produz uma resposta terapêutica melhorada em relação ao regime de administração única. Estes resultados sugerem que para além de toxicidade vascular também ocorrem danos a nível celular. Embora a destruição da vasculatura tumoral afete diretamente o aporte de oxigénio e nutrientes, também pode conduzir à ativação de vários mecanismos de resistência. Assim, a destruição celular do tumor deve ser o último passo, de forma a obter um resultado terapêutico bem-sucedido.¹⁶

Os efeitos citotóxicos da HY são dependentes de oxigénio e da radiação. Por exemplo, o fracionamento da dose de radiação não produz alteração significativa em comparação com dosagem única. No entanto, a hiperoxigenação traduz-se numa grande destruição celular, através da indução da apoptose na região oxigenada e irradiada. Contrariamente, num ambiente de hipoxia ocorre a eliminação do efeito fototóxico da HY assim como ausência de alterações nas funções mitocondriais.¹⁶

A lipofilicidade e a interação com proteínas do soro afeta significativamente a localização subcelular da HY e também a eficácia da terapêutica. Comparativamente com

derivados da HY com lipofilicidade aumentada, a HY tem uma afinidade preferencial para as LDL, enquanto que os análogos com maior lipofilicidade têm tendência a ligar-se às lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoproteins* – HDL). Verifica-se que a acumulação no interior das células é maior no caso da HY ligada às LDL e verifica-se também uma maior captação da HY em células que tenham um elevado número de receptores para LDL.¹⁶

4.4.3.1. Efeitos da Hipericina independentes de radiação

Para além da ação fotodinâmica da HY dependente de radiação, também existe alguma ação antimetastática na sua ausência. Num ensaio em ratinhos com adenocarcinoma mamário ou carcinoma das células escamosas, a administração fracionada de HY, em 6 doses, conduziu a um aumento da sobrevivência dos animais a longo prazo. Apesar de não exercer nenhum efeito anti-tumoral na ausência de radiação, a HY pode funcionar como um agente antimetastático. A avaliação histológica neste ensaio revela a destruição de metástases pulmonares 72 horas após o tratamento com HY.¹⁶

Outro mecanismo de ação atribuído à HY na ausência de radiação é a inibição de passos fundamentais da angiogénese, incluindo a proliferação de células endoteliais, a formação tubular, a degradação da matriz extracelular, a migração e a invasão.¹⁶

4.4.3.2. Interação enzimática

Outro mecanismo relacionado com a citotoxicidade da HY é a interação com a atividade e expressão de algumas enzimas. De entre as várias enzimas que desempenham um papel importante na tumorigénese, a HY inibe a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), a proteína cinase C (PKC) e a proteína tirosina cinase (PTK) do recetor do fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor* – EGFR). Mas a inibição após fotossensibilização da HY não é apenas restrita aos recetores da PTK, uma vez que as proteínas cinase Ser/Thr também se mostraram bastantes suscetíveis a HY. A inibição de algumas destas enzimas torna-se irreversível após irradiação.¹⁶

Uma vez que a ação fotodinâmica da HY é baseada na indução de stress oxidativo, a inibição *in vivo* de enzimas antioxidantes também é interessante. A inibição da enzima glutatona redutase é independente de radiação enquanto que a inibição das enzimas glutatona S-transferase e superóxido dismutase é dependente da radiação, mesmo em concentrações micromolares.¹⁶

o ALA como o seu metil-éster, aminolevulinato de metilo (MAL, figura 4.5.), são PS de segunda geração.^{4,16}

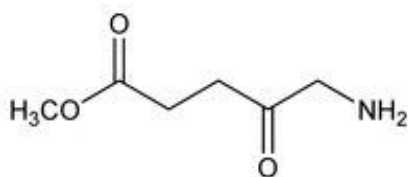


Figura 4.5. Representação esquemática da estrutura química do PS MAL.⁵⁶

A maioria das células humanas conseguem metabolizar o ALA e o MAL em porfirinas fotoativáveis, como a PpIX, mas os níveis variam bastante entre os vários tecidos e tipos celulares. O ALA atravessa a membrana celular e a sua conversão para PpIX ocorre no interior da célula. Contudo, os ésteres do ALA, como o MAL, são primeiro hidrolisados em ALA no citoplasma, só então ocorre a conversão em PpIX. Este passo extra torna o período de incubação do MAL mais longo.^{4,27}

O MAL parece ter uma maior lipofilicidade e uma penetração melhorada na pele, quando comparado com o ALA. Contudo, não existe uma diferença estatística na eficácia entre o ALA e o MAL, no tratamento de BCC. Em teoria, o MAL poderá ser mais seletivo que o ALA devido à sua afinidade para ambientes mais lipofílicos.⁴

4.4.5. Rose Bengal

O PS *Rose Bengal* (RB, figura 4.6.) é um PS hidrófilo com um coeficiente de absorção alto na região visível, a 552 nm, com um bom rendimento quântico para a produção de oxigénio singleto. Apesar do seu potencial em PDT para tumores, a sua tendência para se agregar em condições fisiológicas compromete o seu rendimento de produção de ROS. Desta forma, torna-se essencial a utilização de uma formulação com sistema de transporte. Este sistema de transporte deverá ser biodegradável, exibir toxicidade negligenciável, incorporar o PS sem diminuir ou alterar da sua capacidade sensibilizadora e ser capaz de entregar o PS numa forma monomérica. Mais importante será a acumulação seletiva do PS no tecido danificado em concentrações terapêuticas, sem afetar as células saudáveis.¹⁶

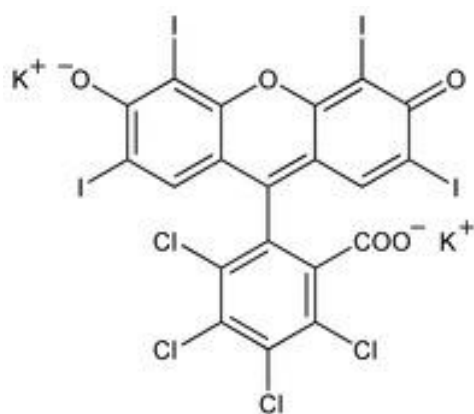


Figura 4.6. Representação esquemática da estrutura química do PS RB.⁵⁷

Como é esperado, um sistema de transporte à nanoescala, carregado ou ligeiramente lipofílico, pode ser utilizado em PS hidrófilos. A utilização de nanotransportadores baseados em dendrímeros foi considerada como um método promissor para a entrega específica deste PS. As estruturas dendríticas de PAMAM podem efetivamente transportar este PS para as células cancerosas e melhorar a sua eficácia fotodinâmica.¹⁶

5. Fontes de radiação

Em PDT, após a administração do PS segue-se o passo de ativação do mesmo, através da utilização de radiação num determinado comprimento de onda, normalmente na zona espectral do visível ou infravermelho. A interação desta radiação com os tecidos biológicos é bastante importante, uma vez que os fótons que atravessam o tecido estão sujeitos a uma série de eventos, como absorção, reflexão, refração, dispersão, transmissão e fluorescência, que interferem na eficácia da terapêutica. De entre todos estes processos, a absorção e a dispersão são os mais importantes nesta terapêutica.^{16,25}

A absorção é um fenómeno ótico governado pela lei de Lambert-Beer, que ocorre quando um fóton com uma determinada energia iguala a energia necessário para a transição entre dois níveis de energia de uma molécula. É a presença de diversos cromóforos endógenos, como a hemoglobina e a melanina, que define a “janela ótica do tecido”, sendo no intervalo espectral de comprimentos de onda entre 630 e 1300 nm que a penetração é mais profunda.^{16,24} Contudo, apenas a radiação até 800 nm tem a capacidade de gerar $^1\text{O}_2$, uma vez que comprimentos onda maiores, na zona espectral dos infravermelhos, correspondem a uma energia insuficiente para iniciar a reação fotodinâmica.^{24,27}

A dispersão é um fenômeno ótico definido pela teoria de Rayleigh-Gans, ocorrendo quando um feixe de fótons, ao penetrar no tecido, se espalha em múltiplos feixes com diferentes direções, definidas pelo fator anisotrópico.¹⁶

A previsão da distribuição espacial da radiação no tecido fotossensibilizado é muito importante, uma vez que esta vai ser afetada pelo tipo de tecido, geometria e comprimento de onda utilizado. Os tecidos biológicos não são homogêneos, devido à presença de macromoléculas, organelos celulares, estruturas celulares e camadas intersticiais, tornando-os turvos. Um dos principais fatores limitantes nesta fase, em PDT, é a profundidade da penetração no tecido, devido à dispersão da radiação, que vai influenciar a taxa de fluência da radiação. A taxa de fluência é definida como a quantidade de energia aplicada por área de tecido e serve para descrever a dose de radiação do tratamento. Para além disso, o PS também pode absorver radiação num processo de auto-blindagem, limitando a penetração no tecido, ou então ser destruído, num processo conhecido como fotobranqueamento.¹⁶

A dose ideal de radiação em PDT deverá causar efeitos letais adequados para o tratamento da área tumoral, minimizando os danos na área saudável adjacente. Contudo, determinar esta “dose ótima” é difícil, devido à complexidade dos mecanismos em PDT, sendo necessário ter em consideração, para além da dose de radiação, os PS e a disponibilidade de oxigénio. A maioria dos ensaios realizados atualmente são conduzidos de forma empírica, estando ainda sob investigação modelos matemáticos de dosimetria.¹⁷

Várias fontes de radiação podem ser utilizadas em PDT. A escolha destas depende das propriedades do tumor (localização e geometria), dose de radiação e PS.^{16,24} Estas fontes de radiação podem ser distinguidas como fontes não-coerentes (ex.: lâmpada de tungsténio) e coerentes (ex.: laser), fazendo parte de três grupos: lâmpadas de largo espectro, díodos e lasers.^{16,25,32} Para além destas, também estão a ser desenvolvidas formas de aplicação da luz solar na terapêutica.³²

As fontes de radiação não-coerentes podem ser lâmpadas de halogénio, díodos de emissão de luz (*light-emitting diode* – LED) e luz pulsada de alta intensidade (*intense pulsed light* – IPL). Estas podem ser utilizadas com uma vasta variedade de PS, sendo são seguras, fáceis de manusear e relativamente pouco dispendiosas. Para além disso também podem ser utilizadas conjuntamente com fibras óticas, de modo a assegurar um compri-

mento de onda determinado. As principais desvantagens das fontes de radiação não-coerente reside na presença de efeito térmico, baixa intensidade da radiação e uma dose de radiação não controlada.^{16,17}

Os LEDs são uma fonte de radiação não-coerente emergente, uma vez que têm a capacidade de gerar radiação com energia elevada no comprimento de onda desejado e podem ser construídos em várias formas e tamanhos. Os LEDs são uma fonte luminosa direcional com o máximo de radiação emitida perpendicular à fonte emissora.^{16,24} Apresentam também outras vantagens, como a portabilidade e altas taxas de fluência.²⁷

Em contraste com as fontes de radiação não-coerente, os lasers têm a capacidade de emitir radiação monocromática de alta energia num comprimento de onda específico, com uma pequena largura de banda, para um PS específico. Os lasers apresentam uma grande precisão focal, permitindo o tratamento de pequenas lesões com danos mínimos para os tecidos circundantes.^{16,17}

No entanto, as fontes de radiação não-coerente são mais confiáveis, simples e baratas, e geralmente apresentam resultados semelhantes, quando comparados com a radiação laser. Desta forma, estas fontes de radiação representam o *Gold Standard*, em PDT utilizando PS derivados da protoporfirina.^{16,27}

Relativamente à utilização da luz solar, foram realizados alguns estudos, aplicados ao tratamento de queratose actínica.³² As principais vantagens apresentadas foram a diminuição da dor, uma vez que a fotoativação ocorre num período prolongado de tempo, e o facto de a terapia não requerer equipamentos especializados para a emissão da radiação. Embora estes estudos não tenham incidido na terapêutica do cancro, poderão ter aplicações futuras nesta área.³²

De forma a ocorrer um efeito terapêutico, o espectro da radiação utilizada deverá incluir luz de comprimentos de onda correspondentes aos máximos de excitação do PS utilizado. Por exemplo, o PS PpIX tem duas bandas de absorção intensas, com máximos a 404-420 nm e a 635 nm, correspondendo a regiões de comprimento de onda no azul e vermelho do visível, respetivamente. Quando maior o comprimento de onda utilizado, maior será o poder de penetração da radiação na pele. Assim sendo, apesar da radiação azul penetrar na pele o suficiente para o tratamento de queratose actínica, a radiação vermelha penetra mais profundamente, podendo ser eficaz para tratamento de lesões mais profundas, como as lesões nas glândulas sebáceas.^{27,32}

Para lesões ainda mais profundas é possível a utilização de instrumentos auxiliares, como fibras e balões, de forma a atingir o órgão pretendido. Deste modo, é possível implantar uma fonte de radiação no interior de um tumor sólido. São exemplos desta tecnologia a utilização de fibras e lasers para difundir radiação no interior da bexiga ou no trato digestivo.^{24,27}

6. Utilização clínica da terapia fotodinâmica

6.1 Carcinoma baso-celular

O carcinoma baso-celular³⁷ (*basal cell cancer* – BCC), ou basalioma³⁷, é o cancro de pele mais comum em indivíduos de pele clara, sendo reportado um número crescente de casos. Este tipo de cancro corresponde a 80% dos cancros de pele não-melanoma. Muitas vezes é mal diagnosticado, pois apresenta uma cor pálida e ausência de sintomas, podendo desenvolver-se lentamente, durante meses, ou mesmo anos. Contudo, as metástases são extremamente raras (cerca de 0,0028 a 0,55%). No entanto, o crescimento maligno das células basais pode ser bastante invasivo, destruindo cartilagem e osso ou mesmo atingindo estruturas vitais (como vasos sanguíneos ou o sistema nervoso central).^{33,34,35,36}

A terapia *standard* para o tratamento deste tipo de neoplasia é a excisão cirúrgica.^{33,34} A radioterapia é geralmente usada como alternativa, para situações inoperáveis ou para quadros clínicos em que os resultados pós-operatórios seriam desfigurantes ou afetariam a funcionalidade.^{33,36} A MAL-PDT pode constituir uma opção terapêutica quando o BCC é considerado de difícil tratamento, pela sua dimensão e localização (periorifical, região nasal, pavilhão auricular) ou pelo potencial de desenvolver complicações cirúrgicas (situações de terapêutica anticoagulante ou risco cardiovascular significativo).³⁵

O local mais afetado por BCC é a região cutânea cronicamente exposta ao sol, como a cabeça e o pescoço, mas também é frequente a presença de BCC no tronco. Para além do tipo de pele e exposição a radiação ultravioleta (UV), outros fatores de risco incluem imunossupressão, exposição a radiação ionizante, exposição a arsénio, cicatrizes e fatores hereditários.^{33,34,36}

Através de critérios clínicos e histológicos, podem-se distinguir subtipos de BCC nodular (que corresponde a cerca de 50% das lesões), subtipos de BCC infiltrativos (BCC

esclerodermiforme e BCC micronodular), e o subtipo superficial multicêntrico (que representa cerca de 25% das lesões). Representando cerca de 1% dos BCCs estão as variantes de BCC pigmentado e as formas agressivas, ulcerativas e destrutivas.^{33,34,35} Dependendo da localização e do padrão de crescimento podem ser selecionados vários tratamentos.^{33,35}

6.1.1. Prevalência

São diagnosticados anualmente cerca de 2 milhões de tumores, sendo o BCC um dos tumores malignos mais comuns nas pessoas de pele clara. É uma tipologia de tumor cada vez mais presente em populações jovens (<40 anos), apesar de a média de idades de diagnóstico ser os 60 anos.^{33,36} Em Portugal, apesar de não existir uma base de dados estatística, os números disponíveis permitem fazer uma estimativa de incidência de cerca de 70 novos casos por ano, em 100 000 habitantes.³⁸

6.1.2 Métodos de tratamento e resultados

A utilização de PDT é geralmente recomendada como uma opção de tratamento para BCC superficial e BCC nodular com espessura inferior a 2mm. Contudo, pode ser aceitável uma espessura de 2 a 3 mm, se a PDT for combinada com uma raspagem antes do tratamento. A figura 6.1. ilustra a evolução do BCC após tratamento com PDT.^{36,32}



Figura 6.1. Evolução do BCC na axila antes (esquerda) e depois (direita) de tratamento com PDT.³³

O tratamento fotodinâmico é feito com ALA ou com o seu metil-éster, MAL, associado a radiação de comprimentos de onda na zona espectral do vermelho. Um creme à base de ALA/MAL é aplicado topicamente na área do tumor e a zona tratada é tapada durante três horas. Durante este período, o PS é convertido em PpIX nas células tumorais. Quando estimulado pela radiação vermelha, o PpIX forma ROS citotóxicas. Para o adequado tratamento de BCC, a PDT deve ser repetida após 1-4 semanas.^{33,34,35}

Num ensaio clínico de PDT, utilizando Photofrin® aplicado sistemicamente, que envolveu 1440 casos de BCC superficial e nodular, obteve-se uma taxa de resposta de 92%, com uma taxa de recorrência inferior a 10% nos primeiros 4 anos. Noutro ensaio conduzido na mesma instituição, envolvendo 330 doentes com BCC, mas utilizando ALA-PDT topicamente, foi também obtida uma taxa de resposta de 92% em casos de BCC superficial. Contudo, a resposta foi de apenas 71%, numa amostra de 75 doentes de com BCC nodular.^{24,33,36}

Num ensaio comparativo entre a utilização de MAL-PDT e a utilização de crioterapia, foram obtidas taxas de resposta de 97% e 95%, e taxas de recorrência após 5 anos de 22% e 20%, respetivamente. No mesmo estudo, os resultados cosméticos obtidos foram de 89% para a MAL-PDT e de apenas 50% para a crioterapia.^{24,32}

Contudo, quando comparada com cirurgia, a PDT tópica, com ALA ou com MAL, apresenta uma maior taxa de recorrência de BCC, tanto para o subtipo superficial como para o subtipo nodular. Um ensaio aleatório de MAL-PDT vs. excisão cirúrgica em 196 doentes com BCC superficial, apresentou os resultados de 9,3% de taxa de recorrência para a PDT vs. 0% para a cirurgia. No entanto, os resultados cosméticos são de 94% para a PDT e de 60% para a cirurgia. Resultados semelhantes foram obtidos em ALA-PDT vs. cirurgia, em BCC nodular, com taxas de recorrência de 14-30% e 5%, respetivamente. Os resultados cosméticos são consistentemente mais favoráveis em PDT.²⁴

Um estudo retrospectivo publicado por Christensen,³⁵ efetuado em doentes com BCC, utilizando ALA-PDT, mostrou remissão completa das lesões em 81% dos casos, 68% com um único tratamento e 91% com duas sessões.³⁵

Num outro estudo também se comprovou que a ALA-PDT não é uma opção eficiente para a forma nodular do BCC, apresentando resultados de recorrência de 2,3% em caso de cirurgia, comparativamente com 30,3% no caso da PDT.³⁵

Relativamente à MAL-PDT, Soler e colaboradores³⁵ publicaram um estudo onde foi aplicado MAL numa concentração de 160mg/g, 3 horas antes de irradiação com uma lâmpada de halogéneo, com uma taxa de fluência no intervalo 50-200 J/cm². Após o tratamento, verificaram que 89% dos casos apresentavam uma remissão completa. Os resultados cosméticos foram considerados de bons a excelentes em 98% dos casos.^{35,36}

Um outro estudo³⁵ revelou que a espessura da lesão diminui a eficácia deste procedimento, estando o fenómeno relacionado com a capacidade de a radiação penetrar na pele. Neste trabalho foi utilizada MAL-PDT e radiação na zona espectral do vermelho, a 633 nm, com uma taxa de fluência de 339 J/cm³. Os resultados obtidos permitiram estratificar a resposta da lesão como: (i) completa, para uma espessura da lesão inferior a 1,3 mm; (ii) parcial, para uma espessura entre 1,3 e 1,8 mm; (iii) ausência de resposta, quando a espessura excede 1,8 mm.^{35,36}

Para BCC superficial, os resultados com PDT são semelhantes aos da cirurgia ou crioterapia, conduzindo a melhores resultados cosméticos.^{27,34,35} Contudo, para BCC nodular a PDT é menos eficaz.^{27,32}

A MAL-PDT é utilizada na Europa para o tratamento do BCC, mas o protocolo ainda não está otimizado.²⁷

6.1.3. Limitações

A dor é um dos principais efeitos adversos em PDT, sendo um fator limitante nesta terapia. A dor pode ser devida à combinação simultânea de calor e estimulação nervosa intensa. Neste contexto, tem sido descrito que a terapia com MAL é menos dolorosa do que com ALA. A dor associada está relacionada com a extensão da área de tratamento e com a quantidade de terminações nervosas.³⁴

Outra limitação é a espessura tumoral, estando descrito que tumores com uma espessura superior a 0,4 mm têm um maior risco de recorrência. Por outro lado, A PDT não é aconselhada em BCC nodular com uma profundidade superior a 2 mm.³⁴

A presença de pigmentos é um fator limitante em BCC, uma vez que a radiação também é absorvida pela melanina. Do mesmo modo, a existência de uma grande densidade de colagénio e células no tecido conectivo limita a penetração do PS.³⁴

6.2 Cancros da cabeça e pescoço

Este grupo de neoplasias tem geralmente início nas células escamosas das mucosas localizadas no interior da cabeça e pescoço. Inclui carcinomas na boca, faringe, laringe, glândulas salivares e ouvido medio.^{39,40}

Cerca de 75% dos cancros da cabeça e pescoço estão relacionados com o consumo de álcool e tabaco, sendo este o principal fator de risco para o desenvolvimento desta patologia. Outro fator de risco está associado à infeção pelo HPV, particularmente no caso dos cancros na orofaringe, nas amígdalas ou na língua.^{40,41}

Os sintomas desta patologia incluem o aparecimento de uma tumefação ou caroço que não desaparece, irritação no local, dificuldade em engolir e alterações na voz. São sintomas ambíguos, o que torna o diagnóstico difícil.⁴⁰

6.2.1. Prevalência

Mais de 90% destes tumores ocorre em pessoas de idade superior a 40 anos, sendo, contudo, cada vez mais comum em camadas mais jovens. Um dos principais problemas é o diagnóstico tardio, o que acaba por comprometer o prognóstico.⁴¹

O cancro da cabeça e do pescoço é relativamente comum. Apresenta cerca de metade da incidência do cancro do pulmão, mas é duas vezes mais comum que o cancro do colo do útero. Em 2012 foram diagnosticados mais de 150 mil novos casos na Europa.⁴²

Já em Portugal, os dados mais recentes (2012) relativos à incidência do carcinoma da cabeça e pescoço apontam para 50 homens e 16 mulheres, em 100 mil habitantes, com taxas de mortalidade a rondar os 19 e 3, em 100 mil habitantes, respetivamente.⁴³

6.2.2. Métodos de tratamento e resultados

A PDT tem sido utilizada com sucesso no tratamento de carcinomas na cavidade oral, faringe e laringe, num estado inicial da doença, preservando a função normal do tecido e as funções de fala, deglutição e paladar.^{24,27} O protocolo terapêutico mais comum envolve a administração de 2mg/kg de Photofrin®, 48 horas antes da irradiação a 630nm. As taxas de fluência utilizadas variam entre 50 e 75 J/cm², para a cavidade oral, nasofaringe e lesões na pele, e são geralmente de 80 J/cm² para tumores na laringe.²⁴

Um estudo aleatório comparando a Photofrin®-PDT com a quimioterapia (usando os fármacos 5-FU e cisplatina) para o tratamento de carcinomas na nasofaringe, revelou uma resposta mais eficaz utilizando PDT. Este estudo baseou-se numa amostra de 300

doentes com várias lesões, como carcinoma das células escamosas na cavidade oral, faringe ou laringe, sarcoma de Kaposi, melanoma e carcinoma das células escamosas na área da cabeça e pescoço.²⁴

Dentro deste grupo, 133 doentes que apresentavam carcinomas na laringe foram eficazmente tratados com PDT. Após apenas uma sessão, os doentes foram acompanhados durante 96 meses, e a taxa de cura ao fim de 5 anos foi de 90%. Um segundo grupo de 138 doentes com carcinoma das células escamosas, submetido ao mesmo tratamento, apresentou resultados semelhantes. Neste grupo, verificou-se uma taxa de cura de 100%, ao fim de 5 anos.²⁴

Os PS de segunda geração, como o ALA, mTHPC e o Foscan®, também têm sido aplicados nos tumores da cabeça e pescoço. Um estudo importante incidiu na utilização de Foscan®-PDT para o tratamento de estados avançado da doença. No âmbito deste estudo, 128 doentes com cancros da cabeça e pescoço foram tratados com uma única sessão de PDT. Os doentes selecionados para este estudo não haviam obtido resultados favoráveis na sequência da administração de terapêuticas convencionais, ou a sua condição física não era adequada para propiciar tais tratamentos. O método utilizado consistiu na fotossensibilização, 96 h após a administração de Foscan®. Verificou-se eliminação total da massa tumoral em 43% das lesões e nos restantes casos houve uma redução da massa tumoral em pelo menos 50%. Um outro estudo, feito em condições semelhantes mas usando ALA, revelou resultados de eficácia inferiores aos observados com Foscan®.²⁴

Para neoplasias na laringe (cordas vocais), em fase inicial, a Photofrin®-PDT é eficaz em cerca de 91% dos casos, podendo a eficácia atingir os 100% após o tratamento das recorrências. Adicionalmente, a PDT é uma estratégia muito menos mutilante do que a laringectomia.²⁷

Um outro estudo centrou-se no tratamento de 137 doentes com cancro da nasofaringe, usando como protocolo terapêutico a administração de HpD numa dose de 3-5 mg/kg, 48 e 72 horas antes da irradiação com laser de argon (488 e 514,5 nm) ou laser de corante (630 nm). Os resultados mostraram uma resposta marcada, em cerca de 90% dos casos.³⁹

Em 1996, Kulapaditharom reportou resultados de um estudo envolvendo 5 doentes com cancro da nasofaringe recorrente ou residual, tratados com PDT. Três destes pacientes apresentavam o tumor na fase T1, sem metástase distante, os outros dois na fase T3 sem metástase. Foi utilizada Hematoporfirina numa dose de 3 mg/kg, seguida de irradiação a 630 nm, com uma taxa de fluência entre 50 e 100 J/cm². Os doentes com tumor na fase T1 obtiveram uma resposta completa ao tratamento enquanto que os em fase T3 apresentaram uma resposta parcial.³⁹

6.2.3. Limitações

Os efeitos adversos descritos para este tratamento incluem edema, dor e fotossensibilidade. Estes efeitos podem conduzir a cessação do tratamento. Outros efeitos descritos incluem dores de cabeça fortes, que podem permanecer entre 3 e 8 meses, e efusão no ouvido médio.³⁹

6.3. Cancro do pulmão

A acumulação de modificações genéticas nas células do pulmão pode conduzir a irregularidades como potencial metastático, invasão de tecidos e crescimento descontrolado. São vários os sintomas, que se podem confundir com sintomas de outras doenças respiratórias, como tosse excessiva, dores no peito, desconforto e perda de peso. Por vezes, uma situação metastática pode ser assintomática.⁴⁴

Existem dois tipos de cancro do pulmão: o carcinoma de células pequenas do pulmão (*small cell lung cancer* - SCLC) e o carcinoma de células não pequenas do pulmão (*non-small cell lung cancer* - NSCLC). O primeiro é caracterizado por um crescimento tumoral muito rápido e é uma doença mais homogénea, com predisposição para se metastizar. O prognóstico raramente é favorável.⁴⁴

Cerca de 70-80% dos doentes de cancro de pulmão apresenta o tipo NSCLC. Quando não existem metástases, a cirurgia é o tratamento de primeira linha. Apesar dos progressos na investigação deste tipo de carcinomas, a taxa de sobrevivência é inferior a cinco anos após o diagnóstico, em 15% dos doentes. Podem ser utilizadas novas terapias, como a PDT, de forma a melhorar o prognóstico e a taxa de sobrevivência.⁴⁴ A utilização de PDT para o cancro do pulmão é particularmente útil em estágios avançados da doença, como tratamento paliativo, e em fases iniciais, em doentes que não têm condições para serem submetidos a cirurgia.²⁴

6.3.1. Prevalência

O cancro do pulmão é uma das principais causas de morte por cancro no mundo, e mais de 50% das mortes resultantes do cancro do pulmão ocorrem numa população não fumadora.⁴⁴ Em 2008 foram registados 1,61 milhões de novos casos de cancro do pulmão, e nesse mesmo período morreram cerca de 1,38 milhões de doentes devido a esta patologia. Relativamente a distribuição por género, tem-se verificado uma diminuição na incidência de cancro de pulmão no homem, registando-se, contudo, um aumento de casos na mulher.⁴⁵

Em Portugal, esta é a 4ª principal causa de cancro, sendo ultrapassado pelos cancros da mama, próstata e colo-retal. Em 2001 foram registados pelo Registo Oncológico Nacional 28,1 casos por cada 100 000 habitantes. Em Portugal, este é o tipo de cancro com a maior taxa de mortalidade.⁴⁵

6.3.2. Métodos de tratamento e resultados

O tratamento com Photofrin® administrado sistemicamente, seguido de irradiação distribuída através de um broncoscópio, tem mostrado eficácia no tratamento do carcinoma das células escamosas. A aplicação no tratamento do mesotelioma na cavidade torácica revelou resultados promissores. Neste caso, o espaço interpleural é preenchido com um fluido translúcente que distribui a radiação para todos os tecidos afetados nesta área. É um tratamento eficaz para formas de cancro que não poderiam ser tratadas usando outras abordagens terapêuticas.²⁷

A PDT já foi usada em doentes numa fase inicial de cancro do pulmão, para situações em que a cirurgia não é possível. Num estudo de fase II, 54 doentes com 64 lesões tumorais foram submetidos a um tratamento de Photofrin®-PDT, obtendo-se uma resposta correspondente a eliminação total do tumor em 85% dos casos e uma taxa de insucesso de apenas 6,5%, num período de seguimento de 20 meses. Outros estudos suportam estes resultados, com uma média de respostas correspondente a eliminação total do tumor em 73% dos casos, numa amostra constituída por 359 doentes.²⁴

Para o cancro do pulmão não detetável através de radiografia, os resultados são igualmente satisfatórios, existindo um estudo que conduziu a uma taxa de resposta correspondente a eliminação total do tumor em 94% dos casos, e controlo local de 80%, num período de 5 anos.²⁴

Um outro estudo incidiu na utilização de PDT em 133 doentes que apresentavam NSCLC (89 casos), lesões metastáticas nas vias aéreas (31 casos), carcinoma de células pequenas do pulmão (4 casos), tumores benignos (7 casos), e outros dois casos com outras condições pulmonares. A maioria dos doentes foi submetida a 2 tratamentos, durante um internamento de 3 dias, e regressaram 2 semanas mais tarde para outras duas sessões de PDT. Os autores deste estudo concluíram que a PDT pode ser utilizada de forma segura e efetiva neste tipo de patologias, com melhorias consideráveis para os doentes.²⁴

O mesotelioma pleural maligno (MPM) é um cancro da pleura que, como no NSCLC, tem uma distribuição pela pleura, e que atualmente não tem opções de tratamento curativas. Num estudo de fase II, utilizando Photofrin®-PDT após pneumectomia extrapleural, doentes com MPM em estágio I e II apresentaram uma média de sobrevivência de 36 meses, com uma taxa de sobrevivência aos 2 anos de 61%, enquanto que em doentes nos estágios III e IV observou-se uma média de sobrevivência de 10 meses. Ambos os resultados representam melhorias significativas, quando comparados com a cirurgia, isoladamente.²⁴

Relativamente ao NSCLC, são poucos os estudos e ensaios clínicos realizados de forma a poderem ser tiradas conclusões relativamente à segurança e eficácia da PDT nestas situações.²⁴ Num estudo pré-clínico, encontrou-se uma terapêutica para o NSCLC disseminado em ratinhos, onde a PDT é administrada por difusão de luz através da cavidade torácica para tratar vários nódulos tumorais espalhados.²⁷

6.3.3. Limitações

Apesar de já se ter estabelecido que a PDT é, de uma forma geral, uma boa estratégia na terapêutica anti-tumoral, ainda não foram desenhados PS específicos para o tratamento do cancro do pulmão.⁴⁴

Para além das situações apresentadas, existem muitos outros estudos e ensaios relativos à aplicação de PDT no tratamento de outras neoplasias, como por exemplo carcinomas cerebrais, do trato digestivo e do sistema genito-urinário, demonstrando que a PDT é uma área com muito potencial na terapêutica antineoplásica.

7. Outras aplicações clínicas para a terapia fotodinâmica

Para além das suas múltiplas aplicações do tratamento antineoplásico, a PDT pode ser utilizada para outros fins, de entre os quais se destaca a deteção e o diagnóstico de tumores, o tratamento de determinadas afeções cutâneas e o tratamento de infeções microbianas. Nesta secção será feita uma breve exposição sobre estas aplicações da PDT.

7.1. Aplicação da terapia fotodinâmica em palição

Os cuidados paliativos assumem um impacto crescente na sociedade, pois representam a assunção pelos estados do compromisso de melhorar a qualidade de vida dos doentes que enfrentam uma doença grave, com prognóstico limitado ou mesmo incurável. Esta palição é feita através da prevenção e alívio de sofrimento, tanto a nível físico como ao nível psicológico, facilitando a vivência do doente e do meio familiar que o envolve e mitigando assim os efeitos das doenças graves na sociedade.⁴⁶

Considerando algumas das características vantajosas associadas à PDT, como a seletividade e a capacidade para induzir necrose em tecidos neoplásicos, esta terapêutica tem sido utilizada como uma medida paliativa no colangiocarcinoma não operável, em conjugação com a utilização de um *stent* biliar (instrumento que desobstrui e facilita a drenagem biliar). A conjugação da PDT com a utilização do *stent* melhora bastante a qualidade de vida, refletindo-se na drenagem biliar e no tempo de sobrevivência de doentes com colangiocarcinoma em estado avançado.⁴⁷

7.2. Aplicação da terapia fotodinâmica em patologias resultantes de infeções microbianas

A PDT foi descrita como agente antimicrobiano há mais de 100 anos, quando se observou, *in vitro*, a morte de microrganismos, na sequência de exposição a um PS inofensivo e posterior irradiação com luz na zona espectral do visível. Pensa-se que o mecanismo de ação é semelhante ao descrito para o tratamento de neoplasias, ou seja, ocorre a excitação do PS para o estado tripleto que, na presença de oxigénio, dá origem a ROS. Estes, por sua vez, irão interferir com biomoléculas em todas as espécies de microrganismos conhecidas, como bactérias, vírus, leveduras e outros parasitas, inativando-as e comprometendo a proliferação, ou mesmo a sobrevivência, dos organismos unicelulares.^{48,49}

O interesse na aplicação da PDT a patologias provocadas por infeções microbianas tem aumentado nos últimos tempos, devido à crescente seleção de resistências aos fármacos em uso, por exemplo aos antibióticos, por parte dos agentes patogénicos. Nesta

área, o foco da investigação está concentrado na formulação de um PS cujas propriedades moleculares tenham a capacidade de serem seletivos apenas para as células microbianas, com efeitos mínimos nas células do hospedeiro, controlando deste modo a toxicidade.^{48,49}

Os PS utilizados para este fim têm geralmente a possibilidade de protonar, formando um centro carregado positivamente, ou exibem já uma carga positiva, normalmente conferida por um grupo amina básico com um pKa que permita que a molécula protone aos valores de pH bacterianos, ou por átomos de azoto já quaternizados por alquilação de aminas terciárias. Alguns dos PS patenteados ligam-se a conjugados moleculares presentes na superfície dos microrganismos, exercendo a sua função fotodestruidora após irradiação. Os testes envolvendo PS e radiação que têm sido realizados mostraram-se eficazes no tratamento de estirpes multirresistentes de espécies bacterianas com elevado poder infetante, como *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. Coli*. Os testes foram realizados num ambiente semelhante às condições fisiológicas, onde sangue, soro e outros fluídos corporais estão presentes.⁴⁸

7.3. Aplicação da terapia fotodinâmica no tratamento de acne e rosácea

A acne é uma das principais doenças dermatológicas e tem como principal causa a obstrução das glândulas sebáceas, levando à proliferação de bactérias, como por exemplo *Propionibacterium acnes*. *P. acnes* produz porfirinas naturalmente (como a PpIX), o que faz com que a irradiação por si só tenha um efeito terapêutico. Para além disso, após administração tópica de ALA ou MAL, estes PS são preferencialmente absorvidos pelas unidades pilosebáceas.³²

A ALA-PDT e a MAL-PDT são utilizadas como tratamentos *off-label* para a acne. O objetivo, neste caso, é a acumulação do PS na glândula sebácea, de forma a diminuir a inflamação e promover a destruição da mesma, após a fase de irradiação. Uma das principais terapêuticas instituídas consiste na aplicação tópica de MAL, com um período de incubação de cerca de 180 minutos, para maximizar a produção de PpIX nas glândulas sebáceas, seguindo-se a irradiação com luz cujo comprimento de onda se situe na zona espectral do vermelho. A figura 7.1. ilustra os resultados obtidos após aplicação de MAL-PDT.³²



Figura 7.1. Melhorias visíveis numa mulher de 27 anos com pápulas inflamatórias na cara: antes do tratamento (A) e três meses após tratamento com MAL-PDT e irradiação no espectro do vermelho (B).³²

A rosácea, apesar de apresentar um aspeto semelhante à acne, tem uma fisiopatologia diferente. O tratamento com MAL-PDT e subsequente irradiação com luz cujo comprimento de onda se situe na zona espectral do vermelho conduz a resultados melhorados relativamente à aparência da rosácea, principalmente em lesões papulares. Contudo, ao contrário da acne, os resultados curativos da utilização desta terapêutica na rosácea revelaram-se inconclusivos.³²

7.4. Aplicação da terapia fotodinâmica no diagnóstico (*photodynamic diagnosis – PDD*)

Quando administrado, o ALA é incorporado pelas células e é convertido em PpIX. Este, por sua vez, quando excitado por luz de comprimento de onda na zona espectral do azul (375-475 nm), emite fluorescência vermelha (figura 7.2). Esta propriedade pode ser utilizada para identificar com precisão células neoplásicas. Esta é uma aplicação relativamente recente e tem como base a acumulação específica do 5-ALA em células tumorais.³¹



Figura 7.2. Comparação de ALA-PDD com métodos convencionais no diagnóstico de metástases de cancro gástrico. O nódulo branco aparentemente inespecífico (esquerda) fluoresce a vermelho quando induzido pelo ALA (direita, seta).³¹

Os sistemas de imagiologia através de PDD existentes estão preparados para a deteção de lesões malignas no cérebro, pulmões e esófago. A utilização de ALA permite a deteção do tumor com eficácia e segurança, uma vez que ALA é um substrato seguro para uma série de cancros e apresenta um baixo risco de efeitos adversos.³¹

As metástases peritoneais são a principal forma de metástases distantes de um cancro gástrico principal. A utilização de ALA-PDD é uma forma segura e eficaz de diagnosticar as metástases peritoneais, através de laparoscopia.³¹ Em dermatologia, a mesma técnica pode ser utilizada para a deteção de BCC. Se a deteção e eliminação de lesões pré-malignas for feita o mais cedo possível, poderá ser evitado o desenvolvimento de tumores cutâneos.⁵⁰

8. Conclusão

Apesar de a utilização de PDT já ter sido descrita no início do século XX, a sua entrada na prática clínica tem sido relativamente lenta. Mesmo quando é utilizada, surge como uma alternativa, um tratamento paliativo ou é usada num ensaio clínico. Isto deve-se a dificuldades na utilização das tecnologias que a terapêutica envolve, como lasers e aplicadores, assim como nos cálculos necessários para a dosimetria.^{24,25} Outra limitação para a utilização mais frequente da PDT é a escassez de ensaios clínicos de fase III, que poderiam potencialmente demonstrar a superioridade desta terapêutica, relativamente a

outras. Os efeitos prolongados de fotossensibilidade resultantes dos PS de primeira geração também contribuíram, limitando o uso destes fármacos a cenários paliativos. Contudo, uma melhor compreensão e controlo da dosimetria, LEDs e de outras tecnologias laser com interfaces simplificadas, associados ao desenvolvimento de novos PSs que garantam uma menor duração de efeitos adversos e a novos estudos mecanísticos, que confirmem fiabilidade e reprodutibilidade aos tratamentos, contribuirão para que o potencial da PDT possa ter aproveitamento global na comunidade oncológica.²⁴ Foram desenvolvidos PSs de 3ª geração, em formulações utilizando nanopartículas biocompatíveis, tanto orgânicas como inorgânicas, assim como novos transportadores para os PSs. Para além disso, as modificações que envolvem a associação de ligandos com alvos específicos podem aumentar ainda mais a seletividade, promovendo a acumulação dos PSs no tecido desejado.^{25,36,50}

No futuro, é esperado um grande avanço do conhecimento no campo da resposta imune anti-tumoral resultante da PDT. Isto deve-se ao esforço de várias equipas de investigação na área da imunologia tumoral, no sentido de elucidar as diferentes vias que os tumores usam para “fugir” à resposta imune, assim como as formas de ultrapassar estas dificuldades.⁵¹ Existe também a necessidade de desenvolver dispositivos orientados para a PDT que sejam mais compactos e acessíveis, incluindo lasers dedicados, fontes de radiação e dispensadores de radiação, que sejam precisos e simples de usar, assim como instrumentos para uma administração alternativa em PDT.^{29,50}

Seria interessante explorar a PDT não só como uma modalidade de monoterapia, mas também em combinação com outras terapêuticas, como a cirurgia, radioterapia, imunoterapia e quimioterapia.^{29,50} Por exemplo, foram observadas, em determinadas circunstâncias, sinergias resultantes da utilização de PDT e quimioterapia.⁵⁰

Uma perspetiva futura é a utilização da luz solar como fonte de radiação (*daylight photodynamic therapy* – DL-PDT). Este tratamento já foi testado em doentes com BCC, que receberam dois tratamentos com uma semana de intervalo, atingido 90% de resposta clínica completa ao fim de três meses. Contudo, 6 dos 21 doentes apresentavam recorrências ao fim de 12 meses.³⁶

Em conclusão, a PDT é uma estratégia anti-tumoral considerada promissora. Contudo, o seu verdadeiro potencial ainda não foi descoberto, antevendo-se, contudo, a possibilidade de um grande leque de aplicações, “*standalone*” ou em combinações com outras terapêuticas.^{24,29} Vários estudos demonstraram que a PDT tem a capacidade de eliminar tumores de uma forma direta ou indireta, pela estimulação da resposta imunitária. As vantagens da PDT sobre terapêuticas convencionais, como a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, são a redução do tempo de morbidade a longo prazo e o facto de esta terapia não comprometer a utilização futura de outras terapêuticas, para o tratamento de recorrências ou eliminação residual de tecidos neoplásicos.²⁴

Devido à inexistência de mecanismos naturais para a eliminação de oxigénio singlete e ao facto do mecanismo de mutações que conferem resistência à radioterapia e à quimioterapia não afetarem a eficácia anti-tumoral da PDT, pode proceder-se à utilização repetida desta estratégia terapêutica sem comprometer os seus resultados. A maioria dos tratamentos convencionais para o tratamento de neoplasias tem o risco de conduzir a imunossupressão. Contrariamente, a PDT tem a capacidade de induzir a resposta imunitária com excelente atividade anti-tumoral e de forma a que ocorra uma destruição efetiva de metástases.²⁴

A interdisciplinaridade da PDT inspira especialistas nos ramos da física, química, biologia e medicina, que trabalham em parceria no desenvolvimento de novas aplicações da PDT. O âmbito apenas será limitado pela imaginação dos membros destas equipas multidisciplinares.²⁴

9. Bibliografia

1. World Health Organization. *Cancer*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (acedido a 17 março 2016)
2. Patrick GL. *An introduction to medicinal chemistry*. 4th ed. New York: Oxford University Press Inc; 2009
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74
4. Pordata – Base de Dados Portugal Contemporâneo. *Óbitos de residentes em Portugal por algumas causas de morte em Portugal*. <http://www.pordata.pt/Portugal/%C3%93bitos+de+residentes+em+Portugal+por+algumas+causas+de+morte-156> (acedido a 17 março 2016)
5. Miranda N, Nogueira PJ, et al. *Portugal; doenças oncológicas em números*. Direção geral de saúde. 2015
6. National Cancer Institute. *Risk Factors for Cancer*. <http://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk> (acedido a 17 março 2016)
7. American Cancer Society®. *Types of Cancer Treatment*. <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/> (acedido a 17 março 2016)
8. American Cancer Society®. *How is surgery used for cancer?* <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/surgery/surgery-how-is-surgery-used-for-cancer> (acedido a 17 março 2016)
9. American Cancer Society®. *What are the risks and side effects of cancer surgery?* <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/surgery/surgery-risks-and-side-effects> (acedido a 17 março 2016)
10. American Cancer Society®. *Questions about radiation therapy*. <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/radiation/radiationtherapy-whatitishowwithhelps/radiation-therapy-what-it-is-questions-about-rad-therapy> (acedido a 17 março 2016)
11. American Cancer Society®. *What about radiation side effects?* <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/radiation/radiationtherapy-whatitishowwithhelps/radiation-therapy-what-it-is-side-effects> (acedido a 17 março 2016)
12. Lind MJ. Principles of cytotoxic chemotherapy. *Medicine*. 2008;36(1):19-23
13. Cancer Network. *Principles of oncologic pharmacotherapy*. <http://www.cancer-network.com/articles/principles-oncologic-pharmacotherapy> (acedido a 17 março 2016)
14. American Cancer Society®. *How is Chemotherapy Used to Treat Cancer?* <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/how-is-chemotherapy-used-to-treat-cancer> (acedido a 17 março 2016)
15. American Cancer Society®. *Chemotherapy Side Effects*. <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/chemotherapy-side-effects> (acedido a 17 março 2016)
16. Elsaie MLT. *Photodynamic Therapy: New Research*. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2013

17. Zhao B, He Y. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2010;10(11):1797-809
18. Bethea D, Fullmer B, et al. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *Journal of dermatological science*. 1999;19(2):78-88
19. Gold MG. *Photodynamic Therapy in Dermatology*. New York: Springer; 2011
20. Policard A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood. *Comptes Rendues Hebdomadaires des Séances Mémoires la Société Biologie ses Filiales*. 1924;91:1423-4
21. Figue FH, Weiland GS, Manganiello LO. Studies on cancer detection and therapy; the affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissue for porphyrins, metalloporphyrins, and radioactive zinc hematoporphyrin. *The Anatomical record*. 1948;101(4):657
22. Kato H. History of photodynamic therapy – past, present and future. *Cancer & chemotherapy*. 1996;23(1):8-15
23. Bacellar I, Tsubone T, Pavani, et al. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(9): 20523-20559
24. Agostinis P, Berg K, Cengel K, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(4): 250-81
25. Debele T, Peng S, Tsai H. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(9): 22094-136
26. Diogo P, Gonçalves T, Palma P. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy for Root Canal System a sepsis: A Narrative Literature Review. *International Journal of Dentistry*. 2015;2015(2015): 26. doi: 10.1155/2015/269205 (acedido a 9 setembro 2016)
27. Anad S, Ortel B, Pereira S, et al. Biomodulatory Approaches to Photodynamic Therapy for Solid Tumors. *Cancer Letters*. 2012;326(1): 8-16
28. Panzarini E, Inguscio V, Dini L. Immunogenic Cell Death: Can It Be Exploited in Photodynamic Therapy for Cancer? *BioMed Research International*. 2012; 2013(2013): 18. doi: 10.1155/2013/482160 (acedido a 9 setembro 2016)
29. Brackett C, Gollnick S. Photodynamic Therapy Enhancement of Anti-Tumor Immunity. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2011;10(5): 649-52
30. Gollnick S, Brackett C. Enhancement of Anti-Tumor Immunity by Photodynamic Therapy. *Immunologic Research*. 2010;46(1-3) 216-26
31. Namikawa T, Yatabe T, Inoue K. Clinical Applications of 5-Aminolevulinic Acid-mediated Fluorescence for Gastric Cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;21(29): 8769-75
32. Wan M, Lin J. Current Evidence and Applications of Photodynamic Therapy in Dermatology. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2014;7: 145-63
33. Berking C, Hauschild A, Kölbl O, et al. Basal Cell Carcinoma-Treatments For The Commonest Skin Cancer. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2014;111(22):389-95

34. Lucena SR, Salazar N, Gracia-Cazaña T, et al. Combined Treatments With Photodynamic Therapy For Non-Melanoma Skin Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(10):25912-33
35. Matei C, Tampa M, Poteca T, et al. Photodynamic Therapy In The Treatment OF Basal Cell Carcinoma. *Journal of medicine and life*. 2013;6(1):50-4
36. Savoia P, Deboli T, Previgliano A, et al. Usefulness of Photodynamic Therapy As A Possible Therapeutic Alternative In The Treatment of Basal Cell Carcinoma. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(10):23300-17
37. Sociedade Portuguesa de Dermatologia Doenças. *O Cancro de Pele*. <http://www.spdv.com.pt/script/?id=10&det=49> (acedido a 17 agosto 2016)
38. Associação Portuguesa de Cancro Cutâneo. *Carcinoma Baso-celular e Espinocelular*. <http://www.apcancrocutaneo.pt/index.php/saiba-mais/artigos-de-opinioao/18-carcinoma-basocelular-e-espinocelular-do-diagnostico-ao-tratamento-por-manuel-sereijo> (acedido a 17 agosto 2016)
39. Wildeman MA, Nyst HJ, Karakullukcu B, et al. Photodynamic Therapy In The Therapy For Recurrent/Persistent Nasopharyngeal Cancer. *Head & Neck Oncology*. 2009;1:40
40. National Cancer Institute. *Head and Neck Cancers*. <http://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet> (acedido a 18 agosto 2016)
41. Instituto CUF de Oncologia. *Cancro da cabeça e pescoço*. <https://www.sau-decuf.pt/oncologia/o-cancro/cancro-da-cabeça-e-pescoco> (acedido a 18 agosto 2016)
42. Make Sense Campaign. *Informações sobre o cancro da cabeça e pescoço*. <http://make-sensecampaign.eu/pt-pt/informacoes-sobre-cancro> (acedido a 18 agosto 2016)
43. Serviço Nacional de Saúde. *Portugal regista cerca de 2.500 novos casos/ano de cancro da cabeça e pescoço*. <http://www.ipoportugal.pt/portugal-regista-cerca-de-2-500-novos-casosano-de-cancro-da-cabeça-e-pescoco/> (acedido a 18 agosto 2016)
44. Crous AM, Abrahamse H. Lung Cancer Stem Cells And Low-Intensity Laser Irradiation: A Potential Future Therapy? *Stem Cell Research & Therapy*. 2013;4(5):129
45. Grupo de Estudo do Cancro do Pulmão. *O que é o cancro do pulmão*. <http://www.gecp.pt/cancro-do-pulmao/o-que-e-o-cancro-do-pulmao> (acedido a 24 agosto 2016)
46. Associação Portuguesa de Cuidados Paliativos. *O que são cuidados paliativos?* <http://www.apcp.com.pt/faq.html> (acedido a 31 agosto 2016)
47. Aljiffry M, Walsh MJ, M Molinari. Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma: 1990-2009. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;15(34):4240-4262
48. Dai T, Huang Y, Sharma SK et al. Topical Antimicrobial for Burn Wound Infections. *Recent patents on anti-infective drug discovery*. 2010;5(2): 124-51
49. Kiesslich T, Gollmer A, Maisch T et al. A Comprehensive Tutorial on *In Vitro* Characterization of New Photosensitizers for Photodynamic Antitumor Therapy and Photodynamic Inactivation of Microorganisms. *BioMed Research International*. 2013;2013:840417

50. Zhao B, He YY. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. *Expert review of anticancer therapy*. 2010;10(11): 1797-809
51. Mroz P, Hashmi JT, Huang YY et al. Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Expert review of clinical immunology*. 2011;7(1):75-91
52. Breskey JD, Lacey SE, BJ Vesper et al. Photodynamic therapy: occupational hazards and preventative recommendations for clinical administration by healthcare providers. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2013;31(8): 398-407
53. Silva ZS, Bussadori SK, Fernandes KP et al. Animal models for photodynamic therapy (PDT). *Bioscience reports*. 2015;35(6)
54. Hofman JW, Carstens MG, van Zeeland F et al. Photocytotoxicity of mTHPC (temoporfin) loaded polymeric micelles mediated by lipase catalyzed degradation. *Pharmaceutical research*. 2008;25(9): 2065-73
55. Budavari S (ed.). *Merck Index*. 11th ed. New Jersey: Merck & Company, Incorporated; 1989
56. The Merck Index Online. *Methyl Aminolevulinate*. <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m7360/methyl%20aminolevulinate?q=unauthorize> (acedido a 7 setembro 2016)
57. The Merck Index Online. *Rose Bengal*. <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m9663/rose%20bengal?q=unauthorize> (acedido a 7 setembro 2016)