



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

***O CICLO CIRCADIANO NA SUSCETIBILIDADE PARA
PATOLOGIAS ONCOLÓGICAS E NA SUA TERAPÊUTICA***

Alexandra Filipa Sousa Marcos

Dissertação

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de: Professora Doutora Vera Ribeiro

2012



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

***O CICLO CIRCADIANO NA SUSCETIBILIDADE PARA
PATOLOGIAS ONCOLÓGICAS E NA SUA TERAPÊUTICA***

Alexandra Filipa Sousa Marcos

Dissertação

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de: Professora Doutora Vera Ribeiro

2012

O Ciclo Circadiano na Suscetibilidade para Patologias Oncológicas e na sua Terapêutica

Declaração de autoria de trabalho

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

Alexandra Marcos [©]. A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de fazer um agradecimento especial à professora doutora Vera Ribeiro, pela sua disponibilidade, atenção e rigor na orientação da tese.

Quero agradecer também à minha família, pelo apoio e confiança, e aos meus amigos, pelos grandes momentos e sorrisos.

Aos meus orientadores de estágio, Dr^a. Margarida Cavaco e Dr. Hugo Cardoso.

Mas acima de tudo, quero agradecer ao amanhã, à possibilidade de um novo recomeço a cada dia que nasce.

Obrigada!

Resumo

O ciclo circadiano é um ritmo biológico controlado pelo núcleo supraquiasmático presente no hipotálamo e regula, de uma forma rítmica ao longo de vinte e quatro horas, todos os processos homeostáticos dos seres vivos.

A desregulação deste ritmo está associada ao aparecimento de várias patologias, entre elas o cancro, uma vez que a divisão celular, reparação do ADN e apoptose são controladas pela expressão circadiana de genes, os genes *clock*.

Para além de ser um fator importante na suscetibilidade para o desenvolvimento de patologias oncológicas, o ciclo circadiano condiciona ainda a resposta terapêutica aos fármacos antitumorais, pois a célula tumoral apresenta um ciclo com características próprias às quais a terapia se deve ajustar.

De uma forma geral, a eficácia e tolerância dos fármacos antitumorais vai depender da variação circadiana da expressão dos genes *clock* e, a jusante, de genes envolvidos em processos vários relacionados com o metabolismo e transporte dos fármacos administrados. Assim, a cronoterapia assume um papel importante na quimioterapia, pois ao ter em conta estes fatores, a administração dos fármacos é efetuada de forma programada em alturas do ciclo circadiano em que as células tumorais estão mais suscetíveis e as células normais são menos afetadas, aumentando assim a eficácia e reduzindo os efeitos secundários.

Atualmente, já existem equipamentos que permitem a administração cronomodulada de fármacos quimioterápicos, cuja aplicação exhibe melhores resultados comparativamente à quimioterapia clássica.

Palavras-chave: Cancro; Ciclo Celular; Ciclo Circadiano; Cronoterapia; Genes Clock.

Abstract

The circadian cycle is a biological rhythm regulated by the suprachiasmatic nucleus, situated in the hypothalamus and regulates, cyclically over twenty four hours, all the homeostatic processes of living beings.

The disruption of this rhythm is associated to many diseases, including cancer, once cell division, DNA repair and apoptosis are controlled by the circadian expression of specific genes, the clock genes.

Besides playing an important role in the susceptibility and development of cancer, the circadian cycle is also involved in the response to chemotherapy drugs, because each individual shows a characteristic cycle, to which the therapy should be adjusted.

Globally, the efficacy and the tolerance of chemotherapy depend on the circadian expression of clock genes and other genes involved in processes related to the metabolism and transport of the chemotherapy drugs. Thereby, chronotherapy should be an option in cancer therapy because its methodology considers all these factors and chemotherapy is performed when the cancer cells are more susceptible and healthy cells are less affected, increasing efficacy and reducing side effects.

Presently, there exist equipments that are programmed to do chronomodulated chemotherapy and which application displays better results, when compared to classical chemotherapy.

Keywords: Cancer; Cell Cycle; Chronotherapy; Circadian Cycle; Clock Genes.

Índice geral

Índice de Figuras.....	8
Índice de Tabelas.....	10
Lista de Abreviaturas	11
1. <u>O ciclo circadiano</u>.....	13
1.1. ORGANIZAÇÃO E REGULAÇÃO	13
1.2. RELÓGIOS PERIFÉRICOS	14
2. <u>O ciclo celular</u>.....	16
2.1. REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR	18
2.1.1. Checkpoints	18
2.1.2. Ciclinas e proteínas cinases dependentes de ciclinas (Cdk).....	18
2.1.3. Proto-oncogenes e oncogenes	19
2.1.4. Genes supressores de tumor	20
3. <u>Cancro</u>.....	22
3.1. CONCEITO.....	22
3.2. EPIDEMIOLOGIA	22
3.3. FATORES DE RISCO	23
3.4 ESTÁDIOS DO CANCRO	23
<i>Iniciação</i>	24
<i>Promoção</i>	24
<i>Progressão</i>	25
3.5. TERAPIA DO CANCRO.....	25
3.5.1. QUIMIOTERAPIA	25
3.5.1.1. Classificação de antineoplásicos.....	26
Antineoplásicos específicos do ciclo celular	26
Antineoplásicos não-específicos do ciclo celular.....	30
4. <u>O ciclo circadiano e o cancro</u>	32
4.1. ESTILO DE VIDA	33
4.2. OS GENES CLOCK.....	36
4.2.1 Organização	36
4.2.2. Regulação pós-transcricional.....	37
4.2.3. O ciclo celular e os genes clock.....	37
4.2.3.1. Mecanismos de regulação do ciclo celular.....	38
4.2.3.2. Alterações nos genes clock	40

5. <u>Cronoterapia do cancro</u>	44
5.1. CONCEITO DE CRONOTERAPIA	44
5.2. O CICLO CIRCADIANO E A FARMACOCINÉTICA	45
5.3. METODOLOGIA DA CRONOTERAPIA DO CANCRO	46
5.3.1. <i>Metabolização de antineoplásicos</i>	46
5.3.2. <i>Características do cancro</i>	46
5.3.3. <i>Exemplos da aplicação da cronoterapia do cancro</i>	51
5.3.3.1. <i>Cronoterapia de 5-FU e oxaliplatina</i>	51
<i>Cronoterapia de 5-FU</i>	51
<i>Cronoterapia de Oxaliplatina</i>	54
5.3.3.2. <i>Cronoterapia do Irinotecano</i>	59
5.3.3.3 <i>Cronoterapia do cancro coloretal</i>	62
CONCLUSÃO	66
<i>Referências Bibliográficas</i>	67

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Localização do Núcleo Supraquiasmático.....	13
Figura 1.2 - Organização do controlo circadiano.....	14
Figura 1.3 -Variações circadianas de proteínas e compostos dependentes da sua ação.	15
Figura 2.1 - Representação esquemática das fases do ciclo celular.....	16
Figura 2.2 - Representação esquemática das diferentes fases da mitose.....	17
Figura 2.3 -Variação da concentração da cinases dependentes de ciclinas ao longo do ciclo celular.....	19
Figura 3.1 - Incidência mundial de cancro por 100.000 habitantes	22
Figura 3.2 - Evolução esquemática das diferentes fases do cancro.....	24
Figura 3.3 - Estruturas químicas de 5-FU e Metotrexato.....	27
Figura 3.4 - Representação esquemática do mecanismo de ação de 5-FU e do metotrexato.....	27
Figura 3.5 - Estruturas químicas de Irinotecano e SN-38.....	29
Figura 3.6 - Estruturas químicas de Cisplatina, Carboplatina e Oxaliplatina.....	30
Figura 4.1 - Representação esquemática da secreção circadiana da melatonina pela glândula pineal.....	34
Figura 4.2 -Variação da concentração sanguínea de melatonina (pg/mL) ao longo do dia (h).....	34
Figura 4.3 - Representação esquemática da regulação dos genes <i>clock</i>	36
Figura 4.4 - Representação esquemática da regulação do ciclo celular pelos genes <i>clock</i>	38
Figura 4.5 – Determinação de mRNA de <i>Per2</i> por real time PCR em doentes com cancro coloretal.....	40
Figura 4.6 – Expressão do gene <i>Per1</i> em células tumorais (T) comparativamente às células normais (N) nas cinco análises efetuadas.....	42
Figura 5.1 - Representação esquemática das variações circadianas da sintomatologia de várias patologias.....	44
Figura 5.2 - Parâmetros farmacocinéticos com variação circadiana.....	45

Figura 5.3 -Variação circadiana da fração de células nas diferentes fases do ciclo celular.....	48
Figura 5.4. Evolução do tamanho da população de células tumorais de progressão rápida tratadas às 2:00h e de células tumorais de progressão lenta tratadas às 22:00h.....	49
Figura 5.5 - Variação da resposta terapêutica em função de intervalo de administração do fármaco (19.2h, 24h, 28,8h) em células tumorais de progressão rápida e células tumorais de progressão lenta, e da hora de início de administração, t_0 (h).....	50
Figura 5.6 -Esquema do modelo celular para as células sujeitas a 5-FU.....	51
Figura 5.7 - Citotoxicidade de 5-FU em função da hora do pico administração.....	52
Figura 5.8 - Citotoxicidade de 5-FU com pico de às 4:00h e às 16:00h.....	52
Figura 5.9 – Variação temporal da fração de células em fase S com picos de 5-FU às 4:00h e às 16:00h.....	53
Figura 5.10 - Evolução da fração de células em fase S em função do pico das proteínas WEE1 e CDK1 para ciclos celulares com duração de 16h, 22h e 26h.....	54
Figura 5.11 - Esquema representativo do modelo celular para as células sujeitas a oxaliplatina.....	55
Figura 5.12 - Variação circadiana de glutathiona celular (GSHc) e tóis plasmáticos (PBSb).....	55
Figura 5.13 - Variação circadiana da formação de complexos entre glutathiona celular e oxaliplatina e tóis plasmáticos e oxaliplatina com picos de administração de oxaliplatina às 4:00h e às 16:00h.....	56
Figura 5.14 - Comparação entre a seletividade da cronoterapia e da quimioterapia clássica de 5-FU e oxaliplatina.....	57
Figura 5.15 - Citotoxicidade de 5-FU para células com características normais e células com características tumorais.....	58
Figura 5.16 – Metabolismo e ação de CPT-11 e SN-38 nas células.....	59
Figura 5.17 - Variação circadiana da formação de complexos entre CPT-11, ADN e topoisomerase I.....	60
Figura 5.18 - Expressão circadiana dos genes <i>Ces</i> , <i>UGT</i> , <i>ABC_CPT</i> e <i>ABC_SN</i> e Regimes de administração de SN-38 para diferentes máximos de toxicidade (nM de SN-38).....	61
Figura 5.19 – Esquemas posológicos da Cronoterapia e Quimioterapia Clássica do Cancro.....	63
Figura 5.20 - Comparação entre a sobrevivência de doentes submetidos a FOLFOX2 e ChronoFLO4.....	64

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Principais oncogenes e genes supressores envolvidos na regulação do ciclo celular e respetivas funções.....21

Tabela 4.1 – Relação entre a expressão genética dos genes *Per 1*, *Per2* e *BRCA* e os diferentes tipos de cancro da mama.....42

Tabela 4.2 – Associação das diferentes variantes de *Cry2* e o risco de Linfoma não-Hodgkin.....43

Tabela 5.1 – Regimes posológicos da cronoterapia do cancro colon-retal.....65

Lista de Abreviaturas

5-FU - 5-Fluoruracilo

ABC - ATP Binding Cassette

ACTH - Adrenocorticotropic hormone

ADN -Ácido desoxirribonucleico

AMPK - Monophosphate-Activated Protein Kinase

APC - Adenomatous Polyposis Coli

ATP - Adenosine Triphosphate

BCL - B-cell lymphoma

BHE - Barreira hematoencefálica

BMAL1 - Brain and Muscle Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear translocator (ARNT) - Like)

BRCA - Breast Cancer gene

CES - Carboxylesterase

CK1 ϵ - Casein Kinase 1 epsilon

CK2 δ - Casein Kinase 2 delta

CLOCK - Circadian Locomotor Output Cycles Kaput

CPT-11 - Camptothecin-11

GSK3 - Glycogen Syntase Kinase-3

HER - Human Epidermal Growth Factor Receptor

HMGB1 - High-Motility Group Protein

LH - Luteinizing Hormone

LNH - Linfoma Não-Hodgkin

L-OHP - Trans -/- diaminociclohexane oxalatoplatinum

MYC - Myelocytomatosis

NER - Nucleotide Excision Repair

OMS - Organização Mundial de Saúde

OR - Odds Ratio

PCR - Polymerase Chain Reaction

RAS - Rat Sarcoma

RB - Retinoblastoma

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Single Nucleotide Polymorphism

TSH - Thyroid-Stimulating Hormone

UGT - UDP glucuronosiltransferases

XP - Xeroderma Pigmentosum

SN-38 - 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin

1. O ciclo circadiano

1.1. Organização e regulação

O ciclo circadiano (*circa diem*) é um ritmo biológico controlado pelo núcleo supraquiasmático presente no hipotálamo e regula, de uma forma rítmica ao longo de vinte e quatro horas, todos os processos homeostáticos dos seres vivos. (fig.1.1) ^{1,2} No topo da hierarquia do controlo deste ciclo está o cérebro. ³

Cada célula apresenta individualmente o seu próprio relógio ou ritmo que deve estar sincronizado com o das outras células do mesmo tecido e também com o de outros órgãos, para que o organismo funcione como um todo. Para isso, as células necessitam de um sistema de comunicação que ao ser controlado por estímulos externos, como por exemplo as variações de intensidade da luz, vai atuar como coordenador, garantindo a ciclicidade e uniformização da informação. Os estímulos que chegam ao núcleo supraquiasmático são designados por sinais *input* e uma vez recebida a informação, o núcleo interpreta-a e transmite-a a todas as células através de sinais *output*. ³

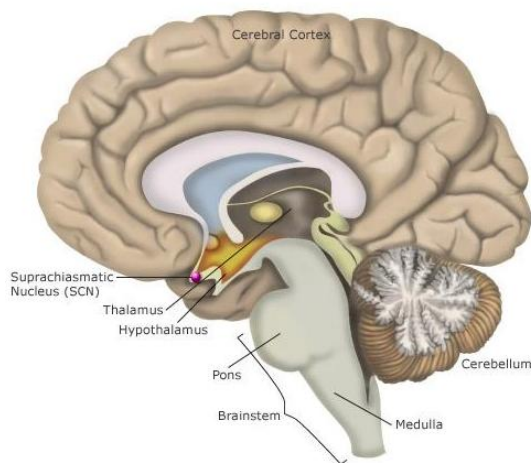


Figura 1.1- Localização do Núcleo Supraquiasmático. ⁴

Tal não implica que o fluxo de informação seja unidirecional. É de extrema importância que a mensagem seja transmitida, mas mais importante é a existência de um *feedback*. Desta forma, também os órgãos periféricos transmitem informação ao cérebro, para que este decida se deve continuar a transmiti-la, ou pelo contrário, cessá-la. ³

O facto de a regulação do ciclo circadiano depender de sinais *input* que são fatores externos como a luminosidade, faz com que este sistema tenha que apresentar uma enorme flexibilidade para poder ajustar tais variações às necessidades do

organismo e assim, conseguir manter o equilíbrio entre estas, pois nem sempre as mensagens são coincidentes.³

A dessincronização deste ritmo pode ocorrer de várias maneiras; ou por erros no *input*, no *output*, ou, de uma forma mais complexa, por um desfasamento entre a informação transmitida pelo meio externo e as necessidades exibidas pelo organismo.³ Como resultado pode ocorrer uma desregulação comportamental e fisiológica do indivíduo, traduzindo-se em patologias.³

1.2. Relógios periféricos

Embora o sistema nervoso central (SNC) possua o seu próprio relógio e ritmo e de ser o maestro que coordena todo o organismo, sabe-se que existem relógios periféricos, que embora controlados indiretamente pelo hipotálamo, apresentam alguma autonomia.⁵ (fig.1.2)

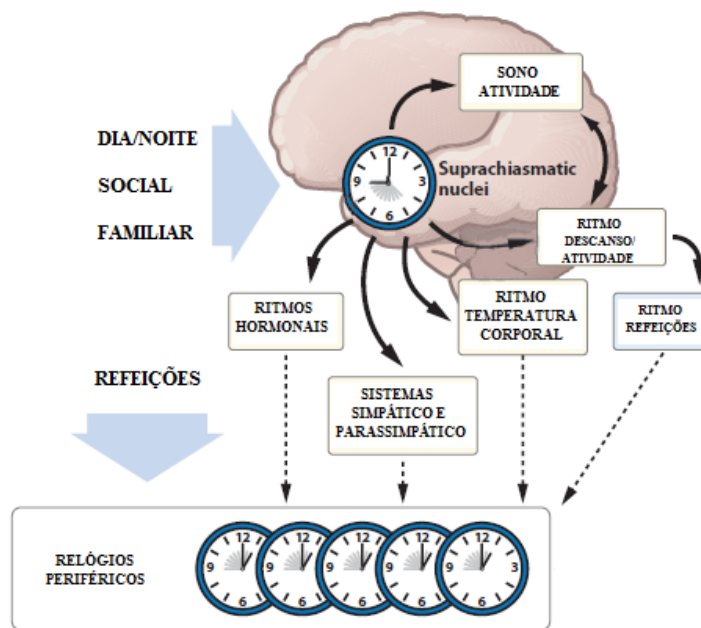


Figura 1.2 - Organização do controle circadiano.

Adaptado de: Lévi. F. *et al.*⁵

Estes relógios periféricos estão presentes em vários órgãos como o fígado, rins e coração. Contrariamente ao que se passa com o SNC, a sincronização destes relógios

não está dependente de estímulos externos, pois não estabelecem qualquer interação direta com o exterior. No entanto, são sensíveis a vários sinais fisiológicos, como a temperatura e glicémia, e desta forma ganham um ritmo próprio, de acordo com as oscilações circadianas destes sinais. É desta forma que o SNC controla estes relógios periféricos, através de sinais aos quais os órgãos vão respondendo, de acordo com a sua função. Por serem cíclicos e constantes, as células destes órgãos “memorizam” estes ciclos, criando assim, o seu próprio relógio interno.^{3,6}

Nos humanos são perceptíveis vários tipos de oscilações circadianas que estão associadas a variações hormonais. Como exemplo temos as hormonas produzidas pela hipófise, glucocorticóides, mineralocorticóides, catecolaminas, hormonas sexuais, insulina e glucagina, compostos que estão não só associados a patologias como a diabetes *Mellitus*, a hipertensão, mas também a processos envolvidos na farmacocinética, como a quantidade de proteínas plasmáticas.⁷ (fig. 1.3)

Embora exibam o seu ritmo biológico próprio, este pode ser alterado por fatores externos. Tomando como exemplo a insulina, apesar de apresentar um pico de libertação perto das 18h, atinge valores igualmente elevados depois das refeições, independentemente das horas a que estas se efetuam.⁷

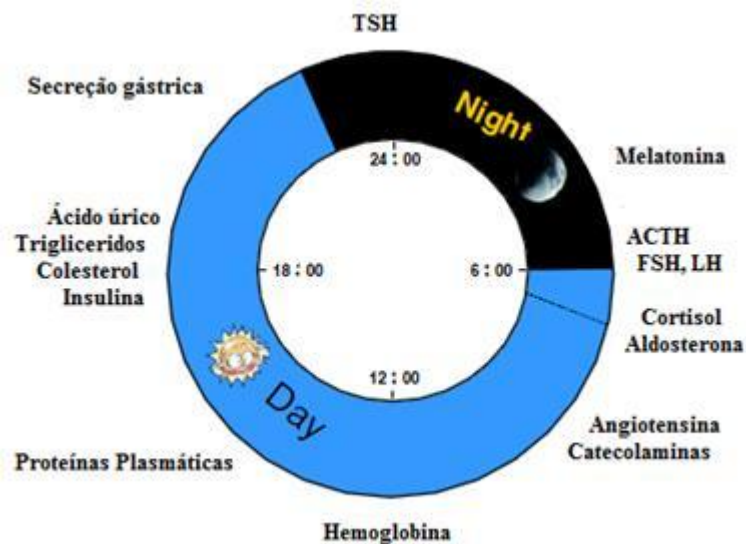


Figura 1.3 - Variações circadianas de proteínas e compostos dependentes da sua ação.

Adaptado de: Lin e Kawashima.⁷

Este perfil de libertação hormonal circadiano vai regular toda uma série de processos fisiológicos e o facto de apresentar máximos de concentração faz com que

seja possível uma regulação mais efetiva, pois desta forma o organismo tem a possibilidade de receber um *feedback* e interpretá-lo.

2. O ciclo celular

O ciclo celular (fig. 2.1) é um conjunto de eventos nos quais a célula duplica os seus constituintes e se divide em duas, tendo estas o mesmo número de cromossomas que a célula que lhes deu origem. Este processo está dividido em quatro fases, sendo elas a G_1 , a S, a G_2 e por fim, a mitose.^{8,9}

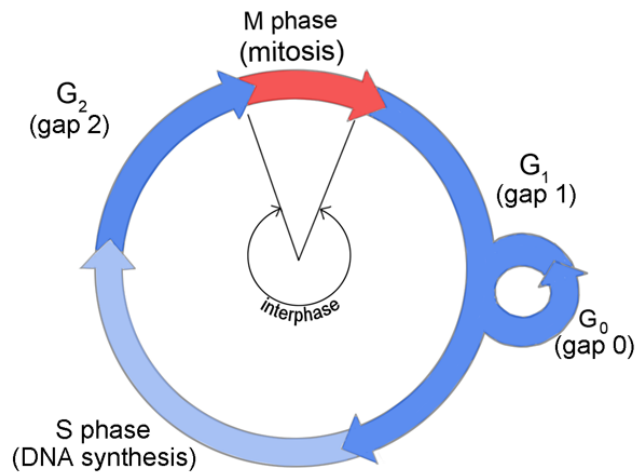


Figura 2.1 - Representação esquemática das fases do ciclo celular.¹⁰

Ao conjunto das fases G_1 , S e G_2 dá-se o nome de interfase. Corresponde à fase em que a célula não se está a dividir, mas sim a sofrer uma série de processos essenciais para uma mitose correta, havendo para isso, um aumento do tamanho da célula e produção de proteínas.^{8,9} As fases têm duração variável, sendo que a G_1 vai de 18h a 30h, a S de 18h a 20h e a G_2 de 2h a 10h.¹¹

Na fase G_1 , a célula aumenta consideravelmente a sua massa e tamanho até ao ponto em que está pronta para a replicação de ADN (fase S). Na fase G_2 a célula certifica-se que tem o tamanho correto e reúne todas as condições para se dividir (mitose). Pode ainda considerar-se uma outra fase, a G_0 , em que a célula está em repouso (célula quiescente), não exibindo qualquer atividade.⁸

A mitose, que consiste na divisão nuclear, pode dividir-se em cinco eventos principais: a Prófase, Prometáfase, a Metáfase, a Anáfase e a Telófase. (fig 2.2). A sua duração vai de 2h a 10h.^{9,11}

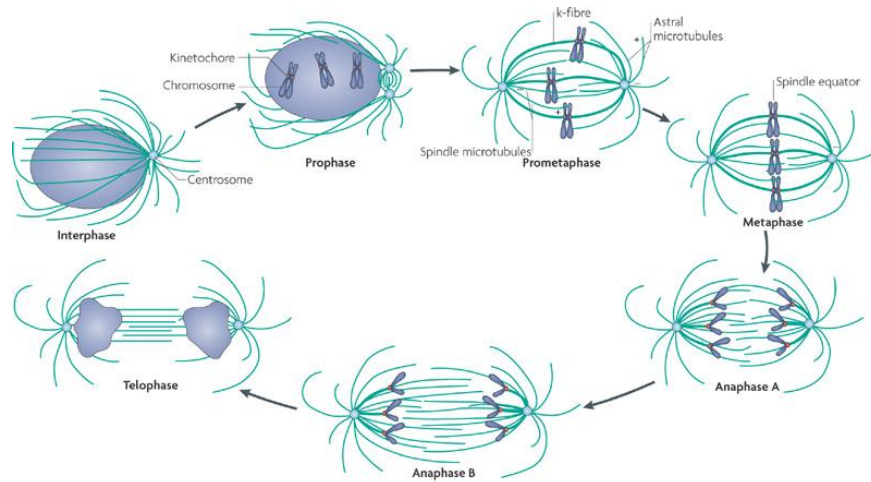


Figura 2.2 – Representação esquemática das diferentes fases da mitose: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase.¹²

A primeira fase da mitose, a prófase, caracteriza-se pela condensação dos cromossomas que juntamente com as histonas formam a cromatina. Devido à migração dos centríolos para os polos das células, inicia-se a formação do fuso mitótico. Na prometáfase dá-se o início da rutura do invólucro nuclear e da ligação dos cromátídeos aos microtúbulos, através do cinetocoros, permitindo assim a sua movimentação. Na metáfase ocorre a disposição dos cromossomas num plano equatorial devido à ação dos microtúbulos. Na fase seguinte, a anáfase, ocorre a migração dos cromátídeos para os polos opostos da célula pela contração dos microtúbulos. Na telófase, ocorre a reconstrução do invólucro nuclear das células-filhas e por fim, ocorre a divisão do citoplasma, a citocinese, completando-se assim, o ciclo celular.^{8,9,13}

2.1. Regulação do ciclo celular

2.1.1. Checkpoints

De forma a garantir uma divisão celular correta, a célula dispõe de vários mecanismos que, ao longo de todo o processo, se certificam que a célula só entra na fase seguinte quando estiverem reunidas todas as condições. Para isso, a célula tem que passar por vários *checkpoints*, que correspondem a alturas críticas do ciclo (passagem entre fases) nas quais se determina o seu seguimento ou interrupção.^{8,14}

Os *checkpoints* podem ser de dois tipos; os relativos ao tamanho da célula e os efetuados por sinais enviados por outras células, por exemplo proteínas.⁸

Os *checkpoints* do tamanho da célula visam verificar se esta já atingiu o tamanho certo antes de passar à fase seguinte, e como tal são efetuados antes das fases G_1 e G_2 , fases em que se dá o crescimento celular. Ainda nesta fase, a G_1 , a célula pode seguir caminhos distintos; ou continua no ciclo, entrando na fase S, ou por outro lado, entra na fase G_0 . Se decidir continuar no ciclo, tem que passar por um *checkpoint*.⁸

O controlo efetuado na fase G_1 é crucial, pois na fase que se segue, a fase S, a quantidade de material genético duplica, sendo por isso de extrema importância que a célula tenha o tamanho correto para acomodar todo esse material. Um fenómeno semelhante ocorre na fase G_2 , uma vez que esta fase precede a mitose. A célula-mãe tem que ter o dobro do tamanho da célula inicial para se garantir que as células-filhas são iguais entre si e à célula que lhes deu origem.^{8,14}

Uma vez terminado o ciclo e passados todos os *checkpoints*, têm-se três tipos de células, as que se encontram em divisão, as diferenciadas e as que estão em repouso.⁸

2.1.2. Ciclinas e proteínas cinases dependentes de ciclinas (Cdk)

O ciclo celular é ainda regulado por um conjunto de enzimas que atuam em alturas críticas do ciclo e cuja atividade vai determinar o seguimento ou interrupção deste.¹⁴

Estas enzimas ativam ou inativam processos responsáveis pela replicação de ADN (fase S) e mitose, através da fosforilação ou desfosforilação de componentes celulares importantes. Neste processo ocorre a transferência de um grupo fosfato do

ATP para um dos aminoácidos que constitui a proteína-alvo e é efetuado pelas cinases, ou o inverso, pelas fosfatases.¹⁴

A atividade e concentração das cinases varia de forma cíclica ao longo do ciclo, exibindo maior atividade em alturas específicas, como no início da fase G₁, na transição da fase G₁ para a fase S, e na transição da fase G₂ para a mitose. Por dependerem da atividade de outras enzimas, as ciclinas, designam-se por cinases dependentes de ciclinas ou cdk. Tal como o nome indica, a concentração das ciclinas varia de forma cíclica e é por isso que as cdk apenas atuam em alturas específicas do ciclo celular.¹⁴

Assim, têm-se três tipos de cinases: as G₁/S-cdks, a S-cdks e as M-cdks, cujo nome deriva da fase do ciclo celular em que vão atuar. (fig. 2.3)

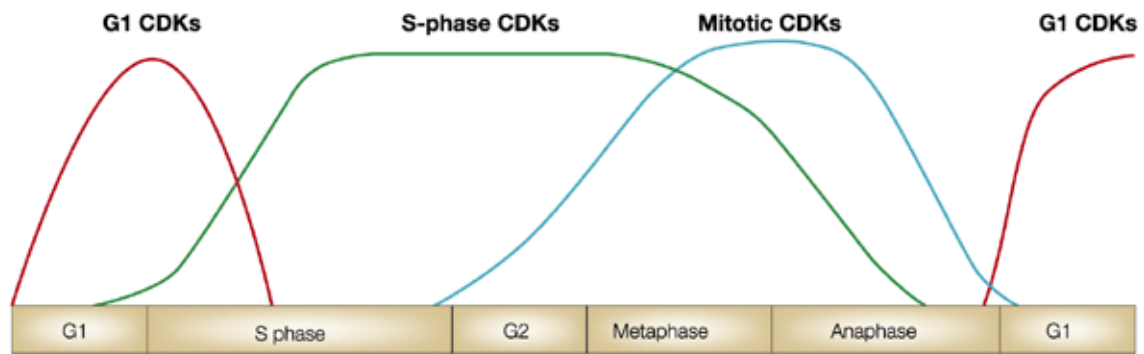


Figura 2.3 – Variação da concentração da cinase dependente de ciclina da fase G₁ (vermelho), da cinase dependente de ciclina da fase S (verde) e da cinase dependente de ciclina da mitose (azul), ao longo do ciclo celular.¹⁵

2.1.3. Proto-oncogenes e oncogenes

Os proto-oncogenes codificam proteínas responsáveis pela indução da proliferação celular e inibição da apoptose. Em células saudáveis têm a função de estimular o crescimento e divisão celular; no entanto, quando apresentam alguma mutação que afete a sua expressão ou atividade, as suas funções normais passam a estar comprometidas. Neste caso, passam a designar-se de oncogenes devido à sua conexão com o desenvolvimento de cancro.^{16,17}

Existem várias categorias de proteínas codificadas por proto-oncogenes que se classificam de acordo com a função que desempenham. São elas: fatores de transcrição, modeladores de cromatina, fatores de crescimento, recetores de fatores de crescimento, transdutores de sinal e reguladores da apoptose.¹⁷

Os fatores de transcrição atuam, geralmente, por ligação à região promotora de um gene, induzindo a sua transcrição. Neste processo não atuam isoladamente, sendo sempre necessário um grande número de fatores a atuarem em conjunto para que efetivamente se inicie a transcrição.¹⁷

O grau de empacotamento da cromatina é determinante para o processo de transcrição, replicação, reparação do ADN e segregação de cromossomas. Responsáveis por este processo estão dois grupos de enzimas: as que alteram a posição dos nucleossomas e as que modificam a parte terminal azotada das histonas. Pode também ser considerado um outro conjunto de proteínas que, não alterando a sua estrutura tridimensional da cromatina, provocam alterações estruturais que a modificam. Entre estes processos estão a acetilação, desacetilação e metilação dos nucleossomas e designam-se de alterações epigenéticas.^{16,17,18}

Os fatores de crescimento, tal como o nome indica, induzem o crescimento celular, sendo por isso, essenciais nas fases G₁ e G₂ do ciclo celular. Estes fatores de crescimento ligam-se a recetores transmembranares que são proteínas com atividade tirosina cinase. As tirosinas cinases são proteínas de membrana responsáveis pela transferência de um grupo fosfato do ATP para outras proteínas alterando assim a sua atividade.¹⁶

Por sua vez, os recetores de fatores de crescimento, que são proteínas transmembranares com atividade tirosina cinase, são responsáveis pela transmissão de informação para o interior da célula aquando da ligação do ligando ao seu domínio. A ligação do ligando ao recetor transmembranar desencadeia um mecanismo de transdução de sinal, isto é, o recetor vai transmitir a informação recebida, ocorrendo a reorganização de algumas proteínas citoplasmáticas. Desta reorganização resulta a chegada da informação ao núcleo, traduzindo-se na expressão de genes envolvidos na proliferação celular.¹⁶

Por fim, os reguladores de apoptose. Existem duas formas de indução deste processo: por stress ou por danos nos recetores celulares. O stress celular está muitas vezes associado a danos nos seus constituintes, à ativação de oncogenes ou à ausência de fatores de crescimento, enquanto os danos nos recetores celulares desencadeiam rapidamente uma atividade proteolítica induzida por caspases.¹⁶

2.1.4. Genes supressores de tumor

Os genes supressores de tumor regulam igualmente o ciclo celular, no entanto, por oposição aos proto-oncogenes, têm como função inibir a proliferação descontrolada da célula.¹⁸ Para tal, são responsáveis por várias funções, entre elas a proteção do genoma de mutações, evitar a sua passagem para a descendência, induzir a apoptose caso os *checkpoints* não tenham

sido executados corretamente e também por inibir a migração celular e conseqüentemente a metastização.¹⁹

Na tabela 2.1 estão resumidos os principais oncogenes e genes supressores de tumor e as respectivas funções.

Tabela 2.1 – Principais oncogenes e genes supressores de tumor envolvidos na regulação do ciclo celular e respectivas funções. Adaptado de Vogelstein e Kinzler.¹⁹

Genes	Tipo de gene	Função
<i>BCL2</i>	Oncogene	Envolvido na apoptose
<i>MYC</i>	Oncogene	Envolvido em interações proteína-proteína e fatores celulares
<i>KRAS, N-RAS</i>	Oncogene	Envolvido na transdução de sinal
<i>BRCA1/2</i>	Supressor tumor	Reparação do ADN e controlo ciclo celular
<i>p16, p21</i>	Supressor tumor	Inibição de cinase dependente de ciclina
<i>TP53 (p53)</i>	Supressor tumor	Fator de transcrição associado à apoptose
<i>APC</i>	Supressor tumor	Regulação transcrição genes
<i>RB</i>	Supressor tumor	Regulação ciclo celular
<i>XPA</i>	Reparação ADN	Reparação do ADN

3. Cancro

3.1. Conceito

Desde o século XIX que se sabe que o cancro é uma doença celular, embora não se conhecessem os mecanismos responsáveis por esta patologia.⁸

Define-se cancro como o crescimento descontrolado de células geneticamente alteradas e com capacidade de invasão de outros órgãos, levando-os à sua destruição.⁸ Esta patologia é, atualmente uma das mais temidas, pois para além de estar fortemente associada à dor, apresenta uma elevada taxa de mortalidade que se deve essencialmente à ausência de tratamento efetivo e à não deteção precoce.⁸ Dependendo do órgão onde se desenvolve e da capacidade de metastização, esta patologia pode ser classificada de diferentes formas e assumir vários graus de gravidade.⁸

3.2. Epidemiologia

Segundo a Liga Portuguesa contra o Cancro, morrem cerca de 42 mil pessoas de cancro por dia em Portugal, sendo uma previsão da OMS que o número continue a crescer tanto a nível nacional como europeu. A nível mundial, a incidência é de cerca de 12,7 milhões de novos casos por ano e morrem diariamente cerca de 7,6 milhões de pessoas.²⁰ Na figura 3.1 encontra-se representada a incidência mundial de cancro por 100.000 habitantes. Afeta indivíduos de qualquer idade, embora se possa afirmar que a incidência aumenta com o aumento desta.⁸

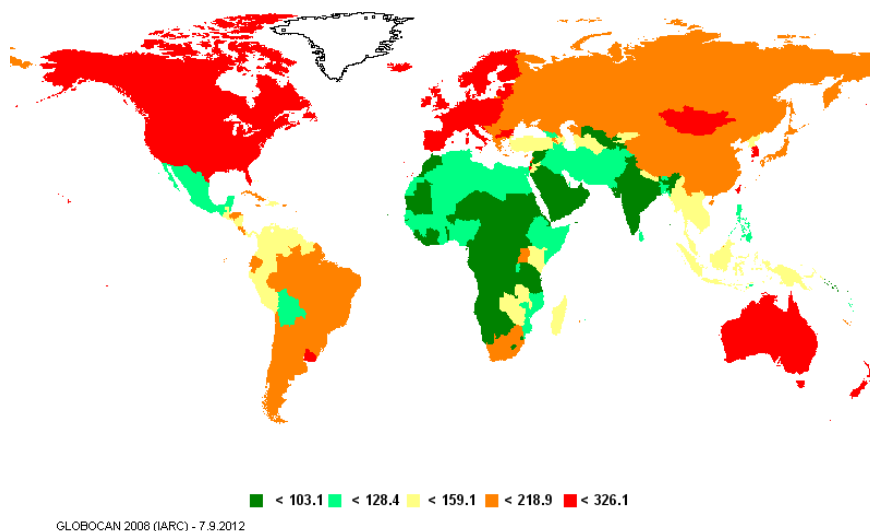


Figura 3.1 - Incidência mundial de cancro por 100.000 habitantes. (Fonte: OMS)

3.3. Fatores de risco

A idade e a genética de cada indivíduo são elementos-chave no aparecimento e evolução desta patologia. No entanto, na grande maioria dos casos, é a exposição a determinados fatores ambientais a responsável pelo desenvolvimento do cancro.⁸

No âmbito desta patologia, considera-se o meio ambiente composto por diferentes vertentes; a geral (ar, água, terra), a ocupacional (profissão), a social e cultural (hobbies) e a de consumo (alimentação e fármacos). Desta forma, embora esteja no meio ambiente o agente iniciador do cancro, é estilo de vida do indivíduo que acaba por ser determinante, pois por vezes, está neste a opção de se expor ou não ao risco. Tal também se aplica à genética. São os fatores genéticos os responsáveis por desencadear o processo neoplásico (suscetibilidade), mas é o meio ambiente (exposição a compostos exógenos) que pode determinar o aparecimento efetivo da patologia.^{8,21} São, assim, necessários vários anos para que ocorra a transformação de uma célula normal em neoplásica e é por isso que a idade também tem um peso considerável no prognóstico desta patologia.⁸

Torna-se, portanto, extremamente importante o conhecimento e a compreensão da biologia molecular do cancro e do estilo de vida de cada indivíduo de forma a prevenir o seu aparecimento e a otimizar a eficácia do seu tratamento.

3.4 Estádios do cancro

O aparecimento do cancro é muitas vezes resultado de uma sucessão de falhas na reparação de alterações genéticas. Assim, existem uma série de etapas pelas quais uma célula tem de passar até se desenvolver um cancro (carcinogénese).⁸ Tendo em conta as características do ciclo celular e a natureza do cancro pode dizer-se que esta patologia pode ocorrer por três vias diferentes; a diminuição do tempo do ciclo celular, a diminuição na taxa de apoptose, ou por fim, pelo aumento do número de células na fase G_0 , levando a um aumento da necessidade de produção de mais células.⁸

A carcinogênese é um processo constituído por três etapas: a iniciação, a promoção e a progressão. (fig 3.2).⁸

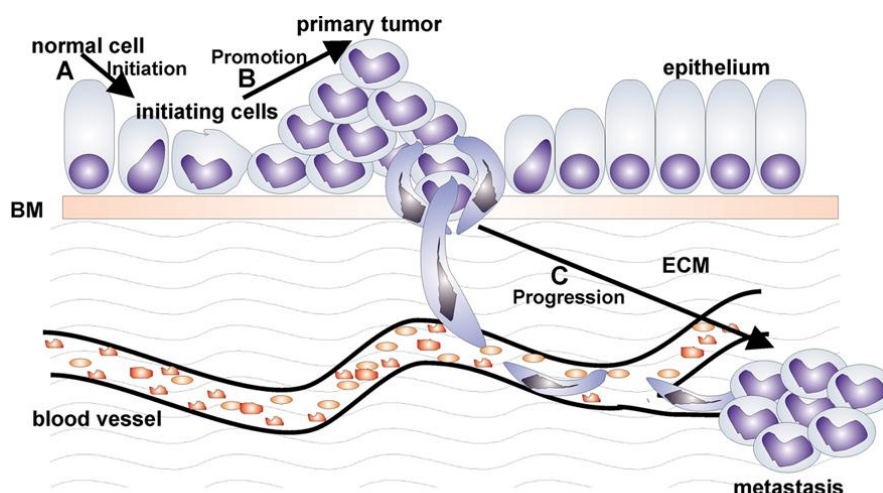


Figura 3.2 - Evolução esquemática do cancro desde a fase de iniciação (A), promoção (B), progressão (C) até à metástase.²²

Iniciação

A iniciação é a primeira fase do desenvolvimento do cancro. Nesta fase a célula está exposta a fatores ambientais potencialmente desencadeadores de um cancro (agentes oncoiniciadores). Entre estes fatores encontram-se as radiações, vírus e compostos químicos mutagénicos. Uma vez que a sua ação altera a estrutura do ADN, cabe ao sistema de reparação de erros do material genético atuar de forma a revertê-los. Quando tal não acontece, a célula divide-se transmitindo às células-filhas informação genética errada. Na maioria das vezes a mutação genética é corrigida, no entanto, o seu efeito aditivo, dificulta a eficácia do sistema de reparação, aumentando consideravelmente a probabilidade de aparecimento de cancro.^{8,21}

Nesta fase não é possível a deteção clínica da patologia.²¹

Promoção

A promoção é caracterizada por uma alteração na expressão genética da célula afetada, o que pode originar um aumento descontrolado da sua proliferação. Tal como na fase da iniciação, a progressão desta fase está dependente da ação de fatores externos (agentes oncopromotores), que podem variar em tipo, intensidade e frequência. Quando cessa a exposição a estes fatores a célula pode regressar ao seu estadio inicial,

mostrando assim a reversibilidade desta fase. Esta é também caracterizada por ter várias etapas lentas e progressivas e não apresentar um efeito cumulativo.^{8,21}

Progressão

Este último estadió apresenta um conjunto de características que resultam, de uma forma irreversível, na migração das células tumorais para outros tecidos e órgãos adjacentes.⁸

Ocorre um aumento significativo da massa tumoral, facilitando a capacidade de invasão e como tal, a metastização.^{8,21} Para isso, as células, individualmente ou em grupo, entram na corrente sanguínea, fixam-se em tecidos distantes, proliferam e originam a metástase.²¹

Esta fase é crítica na medida em que a finalização deste estadió precede a fase clínica, ou seja, a fase da manifestação sintomática da doença.⁸

3.5. Terapia do cancro

Atualmente recorre-se a vários tipos de estratégias para a eliminação do cancro: a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e a imunoterapia. Por vezes, recorre-se à combinação de métodos para aumento da eficácia.^{8,21}

3.5.1. Quimioterapia

Quimioterapia significa utilização de compostos químicos para o tratamento de patologias, no entanto, é mais frequentemente associada ao cancro.¹¹

A quimioterapia tem como principal objetivo a eliminação das células neoplásicas, recorrendo a uma variedade de compostos com mecanismos de ação distintos, na sua maioria com o objetivo de induzir a apoptose dessas células.^{8,21}

Os compostos antineoplásicos direcionam-se preferencialmente às células que se apresentam em rápido processo de proliferação. Os efeitos secundários resultam essencialmente do facto de a quimioterapia afetar também as células normais com estas características. São elas as células da medula óssea, dos folículos pilosos, do trato digestivo e do sistema reprodutor. Desta forma, e em termos gerais, as reações adversas

mais comuns são a mielossupressão, perda de cabelo, diarreia, alterações no paladar, fadiga e perda de peso.¹¹

Contrariamente a muitos fármacos, a janela terapêutica dos antitumorais é estreita, sendo por isso, necessário calcular de uma forma rigorosa a dose ótima de administração, para que esta não seja insuficiente para destruir as células cancerígenas, mas também não provoque efeitos adversos graves.¹¹

A administração da quimioterapia é efetuada em intervalos regulares chamados de ciclos. Uma ou várias doses de fármacos são administradas ao doente, seguindo-se vários dias ou semanas sem tratamento.¹¹

3.5.1.1. Classificação de antineoplásicos

De acordo com a sua especificidade para o ciclo celular, os agentes antineoplásicos podem ser divididos em dois grupos principais: os que são específicos do ciclo celular e os que não são.²¹

1. Antineoplásicos específicos do ciclo celular

1.1. Antimetabolitos

1.1.1. Antagonistas das pirimidinas: 5-fluoruracilo (5-FU)

1.1.2. Análogos do ácido fólico: metotrexato

Tal como o nome indica, os antimetabolitos são compostos análogos de metabolitos envolvidos na síntese de ADN e ARN. Por bloquearem a síntese de ADN são específicos da fase S do ciclo celular.^{8,21,23}

O principal fármaco desta categoria é o 5-FU (fig 3.3) que é um análogo da pirimidina e a sua ação citotóxica ocorre por inibição da enzima timidilato sintetase.

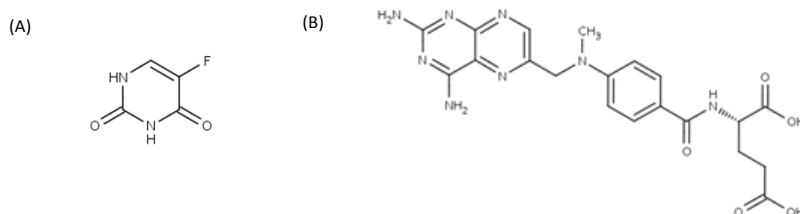


Figura 3.3 - Estruturas químicas de 5-FU (A) e Metotrexato (B) ^{24,25}

Devido à sua semelhança estrutural com a base azotada uracilo, vai interferir com as vias metabólicas, competindo com os componentes celulares pela ligação a várias enzimas ou mesmo por incorporação errônea no material genético.²³

Por ser um pró-fármaco, o 5-FU é convertido no metabolito ativo 5-fluoro-2-desoxiuridina monofosfato (5-FdUMP) e só depois exerce a sua função citotóxica.⁸

O metotrexato é análogo do ácido fólico e ao ligar-se à enzima dihidrofolato redutase (DHFR), ocorre o mecanismo de inibição competitiva. Tal vai refletir-se na ineficiência da replicação celular, pois os folatos reduzidos por esta enzima são a fonte de grupos metilo, essenciais para a síntese de nucleótidos, e como tal, para a correta replicação do ADN.²³ É utilizado em vários tipos de tumores sendo eles as leucemias, os linfomas, cancro da mama, do pescoço e cabeça.

Na figura 3.4 estão esquematizados os mecanismos de ação de 5-FU e do metotrexato.

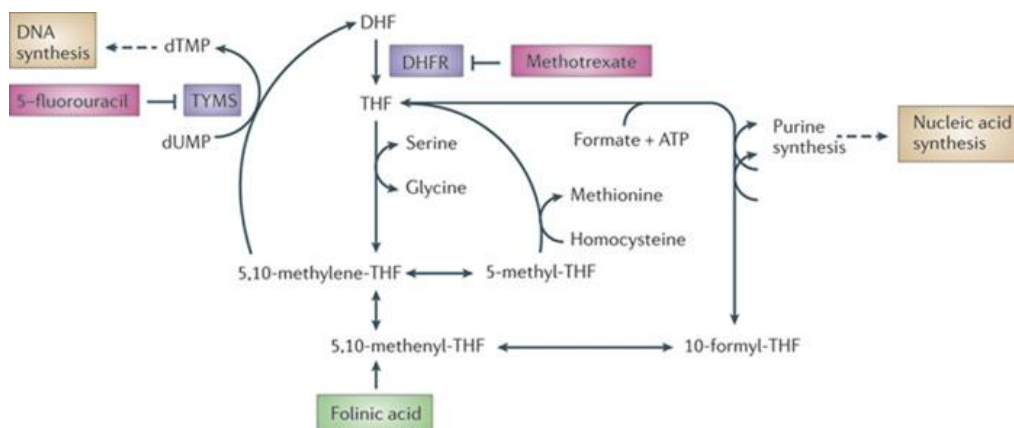


Figura 3.4 – Representação esquemática dos mecanismos de ação de 5-FU e do metotrexato. O 5-FU inibe a timidilato sintetase (TYMS), enzima necessária para produzir timidina utilizada na síntese de ADN pela conversão de deoxitimina monofosfato (dTMP) em deoxiuridina monofosfato (dUMP). O metotrexato inibe a enzima dihidrofolato redutase (DHFR) que converte o dihidrofolato (DHF) em tetrahidrofolato (THF), processo essencial no metabolismo de folatos. Uma vez interrompido este metabolismo a síntese ácidos nucleicos fica comprometida. O ácido fólico antagoniza os efeitos do metotrexato.²⁶

1.2. Alcalóides

1.2.1. Alcalóides de Vinca

1.2.1.1. Vinblastina

1.2.1.2. Vincristina

Os alcalóides de vinca são extraídos da planta *Vinca rosea*. Ao entrarem na célula tumoral ligam-se aos microtúbulos, inibindo a formação do fuso mitótico, e por isso, interrompem o ciclo celular na metáfase.^{8,23}

1.2.2. Podofilotoxinas

1.2.2.1. Etoposido

O etoposido é um derivado semi-sintético das epipodofilotoxinas que são extraídas da planta *Podophyllum peltatum*.²³

Atuam pelo bloqueio das células nas fases S e G₂ por inibição da enzima topoisomerase II. Esta enzima é responsável pelo desenrolamento do ADN, antes da sua replicação, e ao ser inibida, o processo de desenrolamento não ocorre da forma correta, provocando danos no ADN.⁸

Este fármaco é maioritariamente utilizado em leucemias, linfomas, e sarcoma de Kaposi. Como principais reações adversas são observadas alterações hematológicas, náuseas e vômitos^{8,23}

1.2.3. Taxóis

1.2.3.1. Paclitaxel

1.2.3.2. Docetaxel

O paclitaxel e docetaxel são extraídos da planta *taxus brevifolia*. A sua ação citotóxica reside na inibição da formação do fuso mitótico e estabilização dos microtúbulos, bloqueando a divisão celular na fase G₂. Estes compostos são maioritariamente utilizados em carcinomas do ovário, mama e pulmão.²³

São metabolizados a nível hepático e eliminados pela bÍlis e têm como principais efeitos adversos reações de hipersensibilidade, toxicidade hematológica e neuropatia.²³

Por ter um maior poder citotóxico, o docetaxel apresenta uma maior incidência de vômitos e náuseas.²³

1.2.4. Camptotecinas

1.2.4.1. Irinotecano

Estes alcalóides são análogos semi-sintéticos das camptotecinas que derivam da planta *Camptotheca acuminata*. Atuam pela inibição da enzima topoisomerase I, interrompendo a fase de alongação da replicação do ADN.^{8,27}

O irinotecano (CPT-11) é um pró-fármaco que é transformado no metabolito ativo, o SN-38.⁸ Atualmente é a primeira opção no tratamento do cancro colorectal metastático, devido à sua elevada eficácia.²⁸

Na figura 3.5 estão representadas as estruturas químicas do irinotecano e do SN-38.

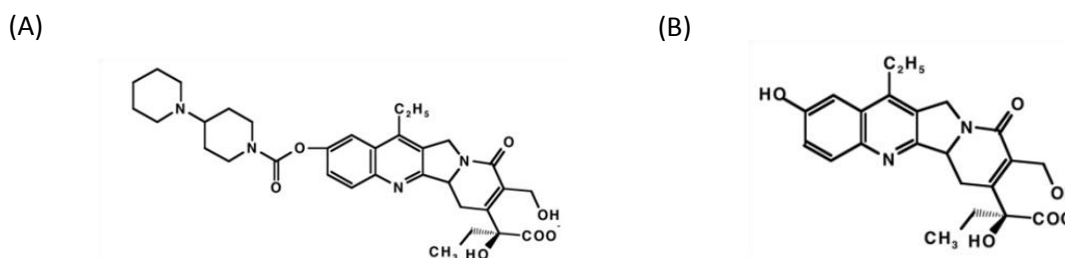


Figura 3.5 - Estruturas químicas de Irinotecano (A) e SN-38 (B).²⁹

1.3. Agentes hormonais

1.3.1. Inibidores da aromatase (Anastrozol)

1.3.2. Estrogénios

1.3.3. Anti-estrogénios (Tamoxifeno)

1.3.4. Anti-androgénios: (Bicalutamida)

Nesta categoria estão incluídas hormonas sexuais e fármacos de ação semelhante a estas hormonas e são utilizadas para alterar a ação das hormonas sexuais femininas ou masculinas. São por isso utilizados em cancros da mama, da próstata e do útero, uma vez que o crescimento das suas células tumorais é efetuado sob a ação destas hormonas fisiológicas. O seu princípio de atuação é assim, distinto dos restantes agentes anti-tumorais, pois este grupo não provoca a apoptose celular, mas sim previne o crescimento das células, impedindo a produção de hormonas ou o seu mecanismo de actuação.¹¹

2. Antineoplásicos não-específicos do ciclo celular

2.1. Complexos de coordenação com platina (agentes intercalantes)

2.1.1. Cisplatina (1ª geração)

2.1.2. Carboplatina (2ª geração)

2.1.3. Oxaliplatina (3ª geração)

Os compostos coordenados de platina intercalam-se no ADN, por formação de adutos e inibindo a sua replicação.^{8,21}

A cisplatina liga-se covalentemente ao azoto na posição 7 da guanosina, formando pontes na própria cadeia de ADN como entre cadeias, impedindo a replicação do material genético. Devido à sua composição em platina apresenta elevada toxicidade a nível renal, provocando também náuseas, vômitos, ototoxicidade e por vezes mielossupressão. O seu espectro de ação inclui o carcinoma do ovário, testicular e carcinomas gástricos e urinários.²³

A carboplatina é um análogo da cisplatina com um grupo dicarboxilato (carboxiciclobutano). Apresenta-se como uma alternativa à cisplatina pois atua sobre o mesmo espectro de cancros que esta, mas liga-se em menor extensão às proteínas plasmáticas e a eliminação é mais rápida, diminuindo a incidência de efeitos adversos.^{8,21}

A oxaliplatina, por ser de 3ª geração tem a vantagem de ser o fármaco que menos toxicidade renal apresenta, no entanto provoca neuropatias graves.²³

Na figura 3.6 estão representadas as estruturas químicas da cisplatina, carboplatina e oxaliplatina.

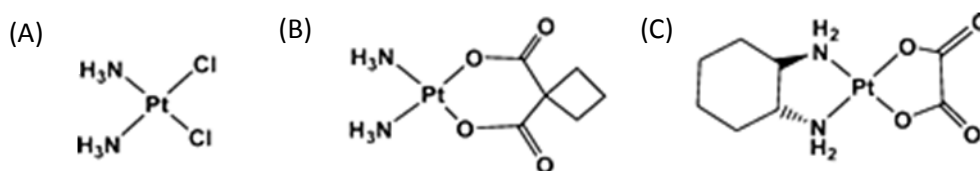


Figura 3.6 - Estruturas químicas de Cisplatina (A), Carboplatina (B) e Oxaliplatina (C)

2.2. Agentes alquilantes

2.2.1. Mostardas azotadas (Ciclofosfamida, Clorambucilo)

2.2.2. Nitrosureias (Carmustina)

Os agentes alquilantes atuam formando ligações covalentes cruzadas, entre si e uma cadeia de ADN ou entre si e duas cadeias de ADN. Estas ligações ocorrem por adição de grupos alquilo a centros eletrofílicos do ADN e proteínas, impedindo assim a sua replicação. Embora a sua ação não seja específica de uma fase do ciclo celular, esta é mais evidente durante a fase S.^{8,23}

As mostardas azotadas tem um espectro de ação muito vasto que vai deste linfomas, leucemias, cancro do pulmão, ovário e testículo e a sua toxicidade ocorre essencialmente a nível hematopoiético embora a mielossupressão seja mais evidente para a ciclofosmamida que no caso do clorambucilo.^{8,23}

No caso específico das nitrosureias, por serem lipossolúveis, passam a barreira hematoencefálica, penetrando no SNC e como tal são usadas no tratamento de tumores que se apresentem nesta localização (tumores cerebrais). Exibem elevada efetividade na destruição de células cancerígenas, mas em contrapartida apresentam uma maior toxicidade a nível hematopoiético (mielossupressão) que os agentes alquilantes clássicos.^{8,23}

2.3. Compostos naturais

2.3.1. Antibióticos naturais

2.3.1.1. Antraciclinas (Daunorrubicina e Doxorrubicina)

Os antibióticos naturais antineoplásicos são substâncias isoladas de microrganismos e que exibem atividade antitumoral. A daunorrubicina é produzida por *Streptomyces coeruleorubidis*, e a doxorrubicina por *Streptomyces peucetius*, e distinguem-se apenas pela presença de um grupo hidroxilo no carbono 14 da daunorrubicina.²³

A atividade citotóxica das antraciclinas é variada, pois atuam de diversas formas e por vezes sem necessitarem de penetrar na célula cancerígena. Neste caso, ligam-se aos fosfolípidos da membrana celular levando à formação de radicais livres que vão interferir com a função das mitocôndrias, obrigando a célula a entrar em apoptose. Têm

também a capacidade de ligar-se covalentemente ao ADN e inibir a topoisomerase I.²³ Por isto, apresentam um espectro de ação vasto, sendo, no entanto, mais efetivas em leucemias. Os seus efeitos secundários ocorrem em grande parte a nível hematológico e cardíaco.^{8,23}

2.3.1.2. Mitomicina C

A mitomicina C é produzida pelo microrganismo *Streptomyces caespitosus* e a sua atividade antitumoral advém da sua ligação às bases azotadas adenina e guanina, formando pontes que levam a uma inibição da replicação do ADN. Promove também a produção de superóxidos, que provocam stress oxidativo e danos no ADN.^{8,23}

A sua toxicidade ocorre essencialmente a nível hematológico (mielossupressão).²³

2.3.1.3. Bleomicina

Este antibiótico antineoplásico é produzido pelo microrganismo *Streptomyces verticillus*. Ao ligar-se ao ADN vai fazer com que as suas cadeias se quebrem. A sua utilização ocorre em carcinomas de localização variada, passando pelo útero, esófago, pele e cabeça.²³

Tem como efeitos secundários característicos a fibrose pulmonar, hiperpigmentação, febre e problemas cardiovasculares.²³

4. O ciclo circadiano e o cancro

Atualmente, a terapia antitumoral debate-se com uma enorme variabilidade na resposta terapêutica tanto a nível intra como interindividual, que resultam efetivamente numa elevada incidência de efeitos adversos, muito deles graves e altamente desgastantes. Existem vários fatores que podem justificar esta baixa efetividade antineoplásica com tratamentos quimioterápicos. São eles a resistência aos fármacos, as características do tumor, a existência de locais inacessíveis à quimioterapia ou “santuários tumorais” e por fim, as próprias características do hospedeiro.⁸

Relativamente à resistência aos fármacos, esta pode ocorrer devido ao estado avançado do tumor, ao desenvolvimento de processos que permitam a célula tumoral

eliminar o fármaco do seu interior ou à administração de doses subterapêuticas. Estes dois últimos fatores estão interligados, pois o facto de as células desenvolverem formas de diminuir a concentração de fármaco intracelular faz com que não se atinjam doses terapêuticas. Para isso, as células cancerígenas foram aperfeiçoando vários mecanismos de forma a diminuir a absorção do fármaco e a aumentar o seu efluxo.⁸

No que toca às características do tumor, o principal fator impeditivo da eficácia da terapêutica é a sua massa considerável, tornando difícil o acesso do fármaco ao seu interior, devido à fraca vascularização.⁸

Os “santuários tumorais” são também locais de difícil acesso para os fármacos, no entanto tal não se deve à fraca vascularização do local mas sim à existência de barreiras físicas, com por exemplo a barreira hemato-encefálica (BHE). Uma vez alojados na BHE a terapêutica fica muitíssimo dificultada, e só conseguem atravessá-la os fármacos que apresentem características lipofílicas e tamanho reduzido. Ainda assim, não é garantido que consigam difundir-se por todo o cérebro e líquido encéfalo-raquidiano.⁸

Finalmente, as características do hospedeiro, que são provavelmente o fator mais imprevisível e com maior variabilidade interindividual. Tal deve-se não só às características intrínsecas do indivíduo, tais como a idade, funcionamento dos órgãos, genes e mesmo a personalidade, mas também às características extrínsecas como o estilo de vida, alimentação, meio ambiente e também à comunicação e sintonia existente entre estes.⁸ O elo comum a estes dois conjuntos de fatores é o ciclo circadiano, que harmoniza as necessidades externas com as internas, e por isso faz todo o sentido estudar de que forma se pode otimizar a resposta terapêutica de fármacos antineoplásicos, tendo em conta as variações dos fatores envolvidos no aparecimento e terapia desta patologia, ao longo de 24 horas.

4.1. Estilo de vida

O estilo de vida de um indivíduo é a componente que mais diz acerca do seu ciclo circadiano.

Atualmente existem vários exemplos de que o estilo de vida pode estar associado ao aparecimento de cancro, não só pela exposição direta a compostos carcinogénicos, como no caso do cancro do pulmão, mas por desregulação do ciclo circadiano. Tal desregulação ocorre porque existe um desfasamento entre a mensagem externa e os relógios internos do indivíduo. Existem vários fatores que estão associados

a tal desfasamento, mas é a profissão que tem um papel preponderante devido ao elevado número de horas que ocupa no dia-a-dia do indivíduo.

Vários estudos têm vindo a ser desenvolvidos de forma a estabelecer alguma relação entre o estilo de vida e o cancro e é a melatonina que surge como ponto de conexão. Esta hormona está fortemente associada aos padrões de sono, no entanto, sabe-se que tem também um poder antioxidante, antimitótico e antiangiogénico, atuando em recetores de membrana relacionados com o crescimento e proliferação celular. É produzida pela glândula pineal e a sua produção é inibida pela presença de luz.³⁰ (fig. 4.1)

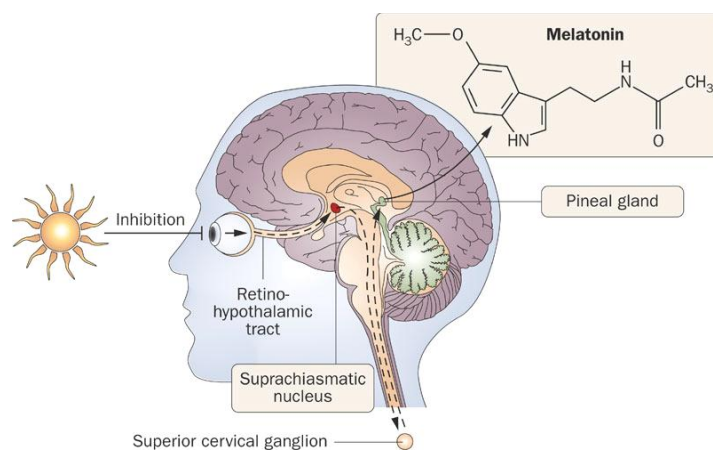


Figura 4.1 - Representação esquemática da produção circadiana da melatonina pela glândula pineal controlada pelo núcleo supraquiasmático.³¹

Desta forma, vai ocorrer uma variação na concentração sanguínea de melatonina ao longo do dia, aumentando significativamente à noite, com pico às 2:00h. (fig. 4.2)

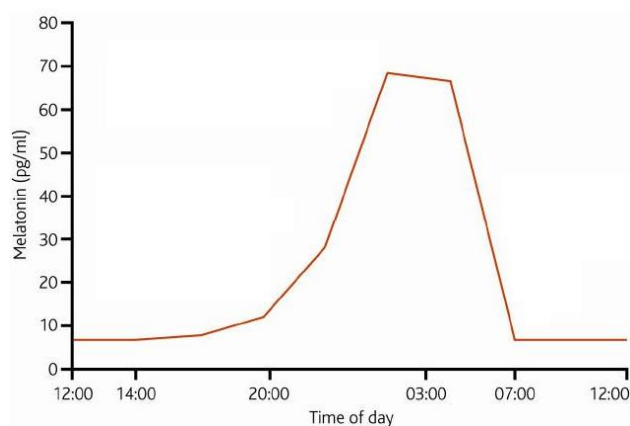


Figura 4.2 – Variação da concentração sanguínea de melatonina (pg/mL) ao longo do dia (h).³² (Adaptado)

Indivíduos cuja profissão exija trabalho em turnos noturnos ou diferentes fusos horários estão num grupo de maior vulnerabilidade para que ocorra uma alteração dos padrões de libertação da melatonina, pois o facto de o individuo estar exposto à luz em períodos noturnos altera o padrão de secreção desta hormona diminuindo as suas propriedades oncostáticas.^{31,33}

Atualmente sabe-se que a incidência de cancro da mama é superior em mulheres que trabalham em turnos.³³ Num estudo desenvolvido por Schernhammer *et al*³³, com enfermeiras trabalhadoras em turnos noturnos, estabeleceu a relação entre este padrão de trabalho e o aparecimento de cancro da mama. Das 78562 senhoras acompanhadas ao longo de 10 anos, cerca de 2441 desenvolveram cancro mamário. Neste estudo verificou-se ainda que a incidência aumenta com o aumento de número de anos de trabalho em turnos. Num outro estudo, Deming *et al*³⁴ verificaram a existência de um polimorfismo num dos recetores da melatonina em muitas das doentes com cancro da mama.

No caso dos homens, a melatonina tem também um papel importante no aparecimento de patologias oncológicas. O cancro da próstata surge mais frequentemente em pilotos aviadores cujas viagens são de longo curso ou em trabalhadores por turnos.^{35,36}

Para além de condicionar o desenvolvimento de cancro, o estilo de vida pode ainda influenciar a resposta terapêutica. Os dois fatores que, para além da profissão ocupam muito do dia de um individuo e exibem uma rotina são o tempo de sono e as refeições. A rotina das refeições foi um parâmetro analisado por Li *et al*³⁷. Nesse estudo em ratinhos com adenocarcinoma pancreático, a diminuição de crescimento tumoral, mesmo sem tratamento farmacológico, foi de cerca de 40% em ratinhos alimentados sempre às mesmas horas comparativamente àqueles que não apresentavam rotinas de alimentação.

4.2. Os Genes *Clock*

4.2.1 Organização

O ciclo circadiano é regulado por estímulos externos que posteriormente se vão traduzir na expressão circadiana de determinados genes e respetivas proteínas. Estes genes regulam muitos processos fisiológicos e estão também envolvidos na regulação direta do ciclo celular, ou em mecanismos que interfiram com este.⁶

Os genes *clock* são os protagonistas desta regulação e estão agrupados em duas famílias: Period e Cryptochrome. As respetivas proteínas são a Per1, Per2, Per3, Cry1 e Cry2 e atuam tanto a nível da transcrição, como pós-transcricional, induzindo ou inibindo determinados processos, de forma cíclica e organizada.⁶

Desta regulação fazem ainda parte os fatores de transcrição: o CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) e BMAL1 (Brain-Muscle Arnt-Like protein 1), que formam heterodímeros e ao ligarem-se à região promotora dos genes *Per* e *Cry*, induzem a sua expressão. Estas proteínas produzidas no citoplasma vão posteriormente entrar no núcleo e, por um mecanismo de *feedback* negativo vão inibir a transcrição dos genes que codificam os heterodímeros. Uma outra função destes heterodímeros é induzir a transcrição de dois recetores nucleares, os retinoic acid related orphan nuclear receptors, Rev-Erba e RORα. Estas proteínas vão depois competir pela ligação a RRE presente na região promotora do BMAL1: a RORα induzindo a transcrição de BMAL1 e Rev-Erba inibindo.⁶ Na figura 4.3 está esquematizada a regulação circadiana dos genes *clock*.

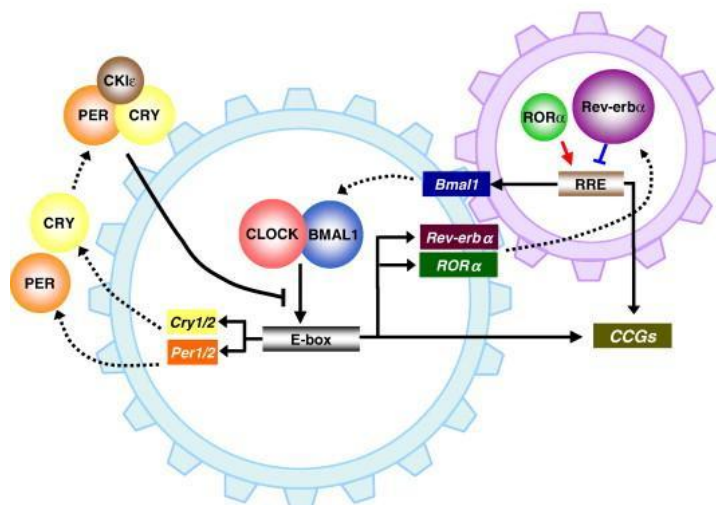


Figura 4.3 – Representação esquemática da regulação dos genes *clock*.³⁸

CCGs – clock controlled genes

Aquando do estímulo externo pela chegada de luz à retina a informação vai desencadear uma série de eventos coordenados que resultam na transcrição circadiana de determinados genes e inibição da transcrição de outros.⁶

4.2.2. Regulação pós-transcricional

A regulação pós-transcricional dos genes *clock* é feita por acetilação, fosforilação, ubiquitilação e SUMOilação, sendo as proteínas responsáveis por este processo também reguladas pelo ciclo circadiano. São elas a caseína cinase 1 epsilon (CK1ε), a caseína cinase 2 delta (CK2δ), a glicogénio sintetase cinase-3 (GSK3) e a proteína cinase activada por monofosfatos (AMPK) e são responsáveis pela fosforilação das proteínas codificadas pelos genes *clock*, levando à sua degradação. Para além de facilitar a degradação proteica, a fosforilação é ainda necessária para ligação de ligases de ubiquitina, que levam à poliubiquitilação das proteínas facilitando ainda mais a sua degradação no proteassoma.⁶

Uma outra alteração pós-transcricional é a SUMOilação, que é uma modificação na qual uma proteína semelhante à ubiquitina (SUMO) é ligada a resíduos de lisina. É no fator de transcrição BMAL1 que esta modificação tem maior importância, resultando num aumento da duração do ciclo circadiano.⁶

4.2.3. O ciclo celular e os genes *clock*

Uma vez verificada a associação entre o estilo de vida (ciclo circadiano desregulado) e o desenvolvimento do cancro (desregulação do ciclo celular) faz todo o sentido analisar em pormenor os mecanismos moleculares por de trás desta conexão.

O ciclo circadiano e o ciclo celular estão inteiramente ligados e como tal apresentam algumas semelhanças entre si, nomeadamente a especificidade para cada tipo de célula, mas acima de tudo, ambos são regulados da mesma forma, tendo com base sempre a mesma sequência, a transcrição, a tradução, transformações pós-transcricionais e degradação proteica.⁶

O ciclo circadiano controla a expressão de genes relacionados com o ciclo celular, no entanto, é completamente independente deste. Por isso, é de extrema importância que a mensagem que chega a cada célula seja inteiramente cumprida por esta.⁶

Existem essencialmente três proteínas que controlam o ciclo celular e cuja ação está dependente de proteínas expressas por genes *clock*. São elas a WEE1, a C-MYC e a Ciclina D1. Estas proteínas estão envolvidas, respetivamente, na transição entre as fases, G₂ e M, G₀ e G₁ e G₁ e S, do ciclo celular.^{6,39}

A interação entre os genes *clock* e as proteínas que regulam o ciclo celular reside no facto de estas serem controladas a jusante por proteínas codificadas por esses genes. Esse controlo é maioritariamente efetuado pelo heterodímero CLOCK-BMAL1. Uma vez ligado à zona promotora do gene *wee1* vai induzir a sua transcrição inibindo o complexo CDC2-ciclina B1, impedindo a transição da célula da fase G₂ e S. No caso do gene *c-Myc*, a ligação do heterodímero NPAS-BMAL1 inibe a transição da célula da fase quiescente para a G₁. A relação entre a ciclina D1 e os fatores de transcrição circadianos não é tão direta, isto é, a sua transcrição não depende da ligação destes fatores, mas a sua ação está condicionada pela ação dos genes *clock* *Per1*. Em caso de dano no ADN, forma-se um complexo proteico que só na presença da proteína PER1 é que se inibe a ciclina D1, impedindo a passagem para a fase S.^{6,39}

Na figura 4.4 está representada a regulação do ciclo celular pelos genes *clock*.

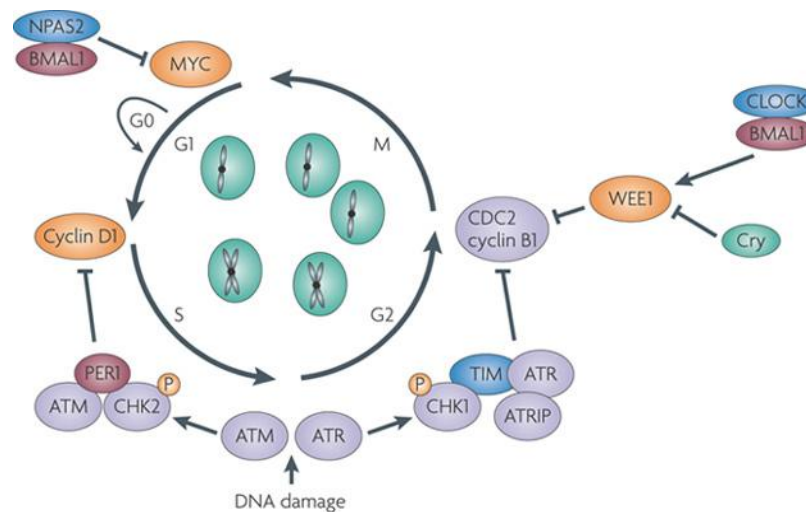


Figura 4.4 – Representação esquemática da regulação do ciclo celular pelos genes *clock*.⁴⁰

Uma vez demonstrada a relação entre os genes *clock* e proteínas que controlam fases críticas do ciclo celular, é de esperar que uma desregulação na expressão destes genes, ou a ocorrência de outros mecanismos que levem à sua sub- ou sobre-expressão esteja associada a uma maior suscetibilidade para esta patologia.

4.2.3.1. Mecanismos de regulação do ciclo celular

Existem vários mecanismos na regulação do ciclo celular que podem, no caso de não funcionarem corretamente, levar ao aparecimento de mutações que se forem sucessivas, conduzirão ao desenvolvimento de uma patologia oncológica. Tais mecanismos podem estar associados, tanto ao aparecimento efetivo da patologia como à sua progressão. São eles a reparação do ADN, a proliferação celular e silenciamento epigenético de genes *clock*.^{6,17,39}

A reparação do ADN é um ponto extremamente importante uma vez que, na ocorrência de uma mutação, em alguma das fases do ciclo celular, é a maquinaria responsável por este processo que tem a função de corrigir o erro e evitar que este se transmita às células-filhas. Responsáveis por este processo estão vários mecanismos e proteínas. Um desses processos é o da reparação por excisão de nucleótidos (nucleotide excision repair, NER) que tem como função corrigir mutações que ocorrem diariamente e são induzidas por radiação UVA. Kang *et al*⁴¹, verificaram que este mecanismo em cérebros de ratinhos está mais ativo ao final da tarde, e menos ativo de madrugada e início da manhã. Tal é expectável, pois é durante o dia que as células estão expostas a este tipo de radiação.

Duas proteínas que também têm uma função importante na reparação do ADN são a Tip60 e a HMBG1. A principal função de Tip60 é a acetilação da cromatina de forma a ativar a transcrição do material genético. No entanto, Ikura *et al*⁴² associaram-na também à reparação de ADN e posteriormente, Miyamoto *et al*⁴³ efetuaram um estudo em que concluíram que TIP60 é regulada pelo fator de transcrição CLOCK.

Relativamente a HMGB1 ou *high-motility group protein*, esta é uma citocina secretada pelos macrófagos, quando ativos, estando por isso associada à inflamação. Num estudo, Yuan *et al*⁴⁴ concluíram que esta citocina está também envolvida na reparação de erros de complementaridade entre nucleótidos durante a replicação celular. Hoppe *et al*⁴⁵ verificaram que esta proteína apresenta expressão circadiana na retina de ratinhos.

Quanto à proliferação celular, a elevada velocidade de proliferação é uma característica do cancro. Desta velocidade resulta inevitavelmente uma diminuição da duração do ciclo celular e conseqüentemente das suas fases. Em células saudáveis, uma desregulação da velocidade de proliferação celular pode ser propícia para o desenvolvimento de erros genéticos. Assim, os mecanismos e proteínas que regulam a

velocidade do ciclo celular têm um papel fundamental na manutenção de um ciclo celular controlado.¹⁷

As modificações epigenéticas dos genes *clock* podem ser uma forma de silenciamento destes genes, com resultado semelhante ao observado quando ocorre uma diminuição da sua transcrição.¹⁷

4.2.3.2. Alterações nos genes *clock*

Tal como um estilo de vida não sincronizado com as oscilações circadianas externas pode levar a uma maior probabilidade de aparecimento de cancro, também mutações genéticas nos genes *clock*, o seu silenciamento, ou outros processos que alterem a expressão destes genes podem resultar nesta patologia.

São vários os estudos em que demonstram uma relação entre diferentes tipos de cancro e alguma alteração na expressão nestes genes.

Num desses estudos, Wang *et al*⁴⁶ investigaram o padrão e expressão de *Per2* em doentes com cancro coloretal (n=38). A expressão dessa proteína nas células cancerígenas foi comparada com a de células normais do próprio indivíduo. A análise imunohistoquímica revelou que cerca de 60% dos doentes (n=24) apresentava uma forte coloração para *PER2* em células normais, comparativamente às tumorais que apresentavam uma fraca coloração ou mesmo ausente. A expressão de *Per2* foi avaliada por real time PCR. Os resultados obtidos encontram-se na figura 4.5.

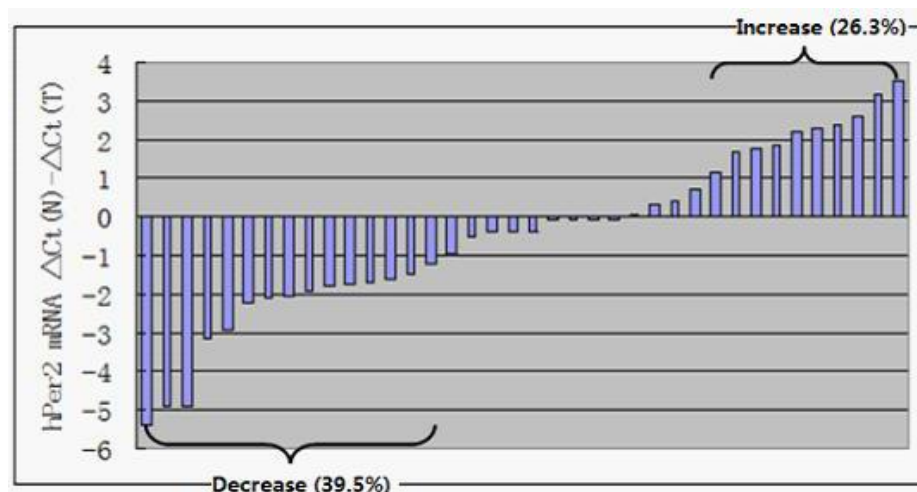


Figura 4.5 – Determinação de mRNA de *Per2* por real time PCR em doentes com cancro coloretal. O valor $\Delta C_t(N) - \Delta C_t(T)$ representa a diferença entre a quantidade de mRNA de *Per2* em células normais e tumorais do mesmo indivíduo. Valor ≤ -1 significa que a quantidade mRNA é menor nas células tumorais; Valor ≥ 1 significa que a quantidade de mRNA é maior nas células tumorais.

Os resultados revelam que 39.5% dos 38 indivíduos analisados apresentavam uma diminuição da expressão de *Per2*, relativamente às células normais. Apenas 26,3% dos doentes apresentam uma quantidade de *Per2* superior nas células tumorais.

Uma outra conclusão deste estudo foi que a expressão de *Per2* em células tumorais diferenciadas assemelha-se à das células normais. Tal indica que a gravidade, ou agressividade de tumores coloretais está também associada à expressão de *Per2*.

Esta diminuição na expressão de *Per2* vai levar um conjunto de circunstâncias ideais para o desenvolvimento do cancro. São elas a não inibição da ciclina D1 e consequentemente, o estímulo da passagem das células da fase G_1 para a S. Tal não seria problemático se fosse uma alteração pontual, no entanto, a ausência constante das PER torna a maquinaria de reparação de ADN insuficiente para corrigir todos os erros.

O papel dos genes *Per* foi também investigado no cancro da mama, tanto familiar como esporádico num estudo levado a cabo por Winter *et al*⁴⁷. Neste estudo com 34 doentes foram recolhidas amostras de células de tipos diferentes de cancro mamário e de células normais e quantificado o mRNA de genes *Per* por real time PCR.

Os resultados obtidos encontram-se expressos na tabela 4.1 e revelam uma forte associação entre a expressão dos genes *Per1* e *Per2* e a patologia. Relativamente a *Per1*, existe uma acentuada diminuição da sua expressão tanto no cancro mamário familiar ($P < .00001$) como esporádico ($P < .00001$). Quanto ao gene *Per2*, a sua associação é mais forte relativamente ao cancro mamário familiar ($P < .00001$).

Tabela 4.1 – Relação entre a expressão genética dos genes *Per 1*, *Per2* e *BRCA* e os diferentes tipos de cancro da mama.⁴⁷

Name of Gene	Tissue Type	Mean Expression*	Significance (P)
<i>BRCA1</i>	Normal	0.9	
	Sporadic	0.6	.01
	Familial	1.0	.77
<i>Per1</i>	Normal	4.0	
	Sporadic	1.8	< .00001
	Familial	0.9	< .00001
<i>Per2</i>	Normal	4.9	
	Sporadic	3.6	.005
	Familial	2.6	< .00001

*Razão de expressões entre *gene/HPRT-1*

Num outro estudo desenvolvido por Cao *et al*⁴⁸, uma baixa expressão de *Per1* foi associada a cancro da próstata. Recorrendo a uma base de dados procederam a 5 análises comparativas entre a expressão de *Per1* em amostras de doentes com cancro da próstata e saudáveis.

Os resultados foram obtidos por análise de *microarrays* e encontram-se representados na fig 4.6. As diferentes análises revelam um subexpressão deste gene em todas as análises efetuadas nas amostras de doentes ($P \leq 0.01$).

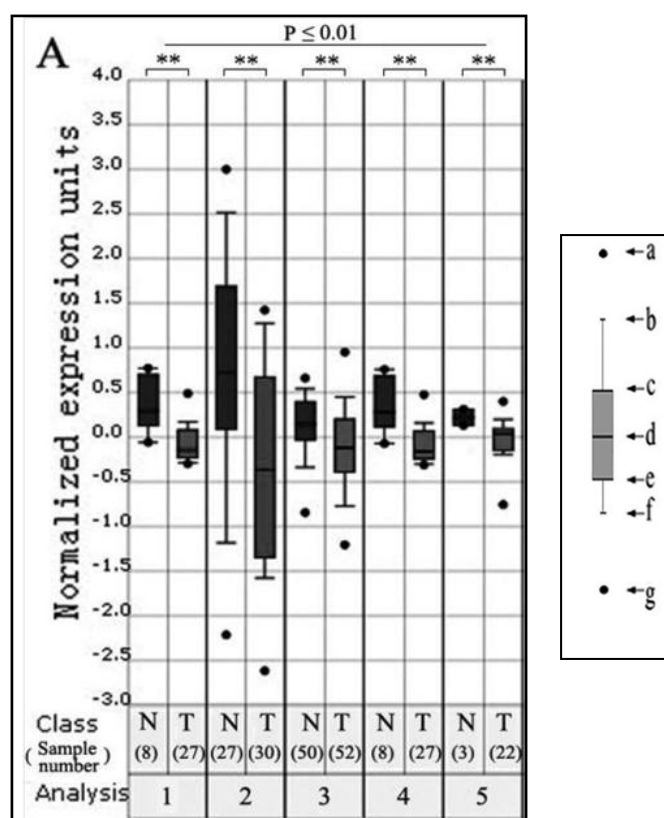


Figura 4.6 – Expressão do gene *Per1* em células tumorais (T) comparativamente às células normais (N) nas cinco análises efetuadas. Os pontos **a** e **g** correspondem aos máximos e mínimos unitários de expressão, respetivamente. Os pontos **b**, **c**, **d** e **e** e **f** correspondem aos percentis 90, 75, 50, 25 e 10 respetivamente.⁴⁸

Por outro lado, também os genes *Cry* parecem ter um papel importante no desenvolvimento de patologias oncológicas, estando fortemente associados a leucemias e linfomas. Num estudo de Hoffmant *et al*⁴⁹ foram utilizadas 455 amostras de ADN de doentes com linfoma não-Hodgkin e 527 controlos e estabeleceu-se a relação entre o risco para esta patologia e polimorfismos no gene *Cry2*. Foram encontradas três regiões

polimórficas deste gene com as quais se estabeleceu uma relação com o linfoma não-Hodgkin. São essas regiões a rs11038689, a rs7123390, e a rs1401417.

Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.2 e verifica-se para a região rs11038689 que a presença de um SNP em ambos os alelos, isto é, o genótipo G/G, está fortemente associado a LNH ((OR): 2.34, P = 0.006), sendo que o mesmo se passa na região rs7123390 (OR: 2.40, P = 0.002) e na rs1401417 (OR: 2.97, P =0.001).

Tabela 4.2 – Associação das diferentes variantes de *Cry2* e o risco de Linfoma não-Hodgkin. ⁴⁹

Genotype	All		
	Cases <i>n</i>	Controls <i>n</i>	OR* (95% CI)
rs11038689			
A/A or A/G	408	495	—
G/G	33	17	2.34 (1.28–4.27)
<i>P</i>	—	—	0.006
rs11605924			
A/A or A/C	327	365	—
C/C	114	151	0.82 (0.62–1.10)
<i>P</i>	—	—	0.182
rs2292912			
C/C or C/G	418	489	—
G/G	23	29	1.00 (0.55–1.82)
<i>P</i>	—	—	0.990
rs7123390			
G/G or G/A	396	491	—
A/A	41	21	2.40 (1.39–4.13)
<i>P</i>	—	—	0.002
rs1401417			
G/G or G/C	409	503	—
C/C	34	14	2.97 (1.57–5.63)
<i>P</i>	—	—	0.001

*Odds Ratio

Devido ao papel importante que os genes *clock* exibem na regulação do ciclo celular, seria expectável que uma alteração na sua expressão levasse ao aparecimento de falhas em todo o seu processo. Falhas estas que levam a que este apresente características propícias para ao desenvolvimento de uma patologia oncológica. Os genes *Per* e *Cry* são genes cruciais, pois regulam transições entre fases críticas do ciclo celular. Uma diminuição na sua expressão leva a um aumento da transição das células da fase G₁ para a S, originando uma replicação de ADN desregulada e propícia a erros genéticos.

Assim, o cancro pode ser considerado como uma patologia associada ao ciclo circadiano, em que os genes *clock* assumem um papel de supressores de tumor, pois quando trabalham corretamente, e em conjunto, previnem uma desregulação do ciclo celular e consequentemente o aparecimento desta patologia.

5. Cronoterapia do cancro

5.1. Conceito de cronoterapia

A cronoterapia envolve a coordenação entre os ritmos biológicos de um indivíduo e a administração temporal da terapia de determinada patologia, considerando as variações circadianas de muitos dos processos implicados na resposta terapêutica em prol da eficácia do tratamento.⁷

São várias as patologias que apresentam exacerbação de sintomas em determinada altura do dia e tal é resultado de uma junção de acontecimentos que torna mais propícia determinada fase do ciclo circadiano para tal. (fig. 5.1). Nesta representação gráfica estão presentes muitas patologias crónicas, tais como a asma, problemas cardíacos, epilepsia e mesmo rinite.⁷ Por serem comuns e por terem uma terapêutica continuada torna-se imperativo utilizar todos os meios de forma a otimizar a eficácia da medicação e a cronoterapia é um deles.

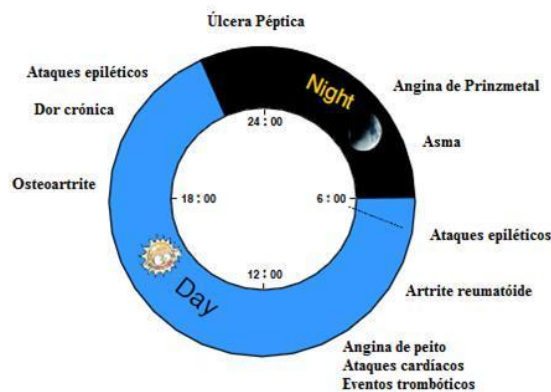


Figura 5.1 - Representação esquemática das variações circadianas da sintomatologia de várias patologias.

Adaptado de Lin *et al.*⁷

Atualmente já existem várias tecnologias que através de diferentes metodologias, exibem perfis de libertação pulsáteis adequados à patologia a que

destinam e são várias as patologias nas quais são utilizadas, entre elas a diabetes *Mellitus* tipo II, hipertensão, asma, depressão, Parkinson, esquizofrenia, entre outras.⁷

5.2. O ciclo circadiano e a farmacocinética

Um dos principais fatores tidos em conta na cronoterapia é a variação da biodisponibilidade de determinado fármaco dependendo da hora de administração, isto é, de que forma o ciclo circadiano influencia os fenómenos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação dos fármacos. A farmacocinética de um fármaco é fortemente afetada por estas variações, uma vez que, em cada um destes passos estão envolvidos diferentes processos que variam em atividade ao longo do dia.⁷ (fig 5.2)

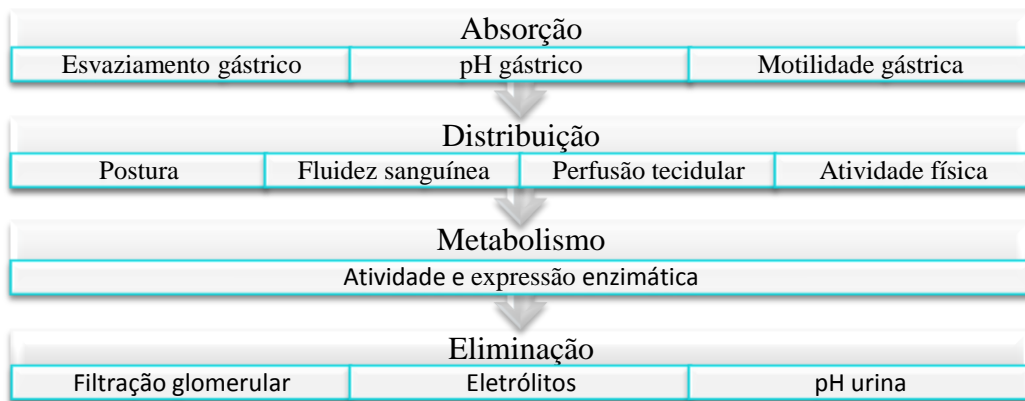


Figura 5.2 - Parâmetros farmacocinéticos com variação circadiana.⁷

Relativamente à absorção, esta vai depender de vários processos circadianos, nomeadamente os que estão associados ao estômago, sendo que o pH gástrico parece exibir o papel mais significativo. Por sua vez, a distribuição está intimamente ligada à atividade física e à capacidade do sangue transportar o fármaco até aos tecidos, sendo por isso, mais efetiva durante a fase do dia em que o indivíduo está mais ativo. O ciclo circadiano apresenta também um papel importante na regulação da transcrição de genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos, entre eles, fármacos, e é por isso que o metabolismo é o processo que exibe maior variabilidade entre doentes. Tal deve-se, não só às diferenças no perfil circadiano de cada indivíduo, mas também a polimorfismos existentes nas enzimas de metabolização. E por fim, a eliminação que também tem um papel importante, pois depende da filtração glomerular, de eletrólitos e do pH da urina.⁷

5.3. Metodologia da cronoterapia do cancro

A cronoterapia tem como objetivo melhorar a tolerância e eficácia dos medicamentos, tendo em conta o ritmo biológico de cada indivíduo. A nível oncológico, a aplicação deste conceito faz todo o sentido, visto que se tratam de tratamentos extremamente agressivos, com efeitos adversos graves e por vezes fraca efetividade.^{7,18}

Os pontos a considerar na definição de um protocolo cronoterápico para o cancro são as variações do ADME, com principal interesse no processo de metabolização, e visto tratar-se de uma doença celular, as diferenças circadianas do ciclo celular das células normais e tumorais, pois afetam diretamente a efetividade do antineoplásico utilizado, especialmente os específicos de alguma das fases.⁷

5.3.1. Metabolização de antineoplásicos

Os fármacos antineoplásicos, tal como vários compostos endógenos e xenobióticos, são metabolizados maioritariamente no fígado. Neste órgão estão presentes várias enzimas com funções e características distintas, capazes de provocar alterações químicas e estruturais nas moléculas, de forma torná-las mais fáceis de eliminar. Estas enzimas são designadas de enzimas de fase I e de fase II, de acordo com a função que desempenham.⁵⁰

As enzimas de fase I são as responsáveis, essencialmente, por três fenómenos, a oxidação, redução e hidrólise. Já as de fase II são responsáveis pela adição de um grupo funcional.⁵⁰

No grupo das enzimas de fase I, temos como principal interveniente, as enzimas que constituem o Citocromo P450, capazes de oxidar uma variedade enorme de substratos, incluindo os fármacos antineoplásicos.⁵⁰

5.3.2. Características do cancro

Atualmente, a eficácia de um citostático é dada pelo produto da fração do número de células sensíveis ao fármaco e a fração de células mortas por este. No entanto, a fração de células que são sensíveis vai depender da classe de fármaco administrada e da fase do ciclo celular em que as células se encontram. Por outras

palavras, a citotoxicidade de um fármaco que atua numa fase específica do ciclo celular vai depender do número de células que se encontram nessa fase, quando este atinge o seu máximo de concentração. Por sua vez, esse número vai depender da hora de administração, pois o ciclo celular é regulado por proteínas com expressão circadiana.⁵¹

Assim a cronoterapia deverá ter em conta três fatores principais⁵¹:

1. Fase do ciclo circadiano;
2. Ciclo circadiano das células saudáveis e das tumorais;
3. Ciclo circadiano das células de diferentes tecidos.

O ponto 1 é baseado no facto de o ciclo circadiano de cada individuo estar dependente das suas atividades, comportamento, e estilo de vida, fazendo por isso que exista uma enorme variação interindividual neste parâmetro.⁵¹

O ponto 2 está relacionado com o facto de existirem diferenças significativas entre os ciclos celulares de células saudáveis e tumorais sendo que as últimas apresentam uma taxa de proliferação bastante elevada e por isso, terão certamente ciclos celulares mais curtos.⁵¹

Finalmente, o ponto 3 que está relacionado com as diferenças circadianas do ciclo celular entre células de diferentes tecidos. Tal acontece tanto nas células normais como em células tumorais. No caso das células normais, devido à existência de relógios periféricos, e no caso das células tumorais, devido à sua característica dessincronização circadiana.⁵¹

Assim, o conhecimento acerca das variações destes fatores ao longo do ciclo circadiano vai permitir que se faça a administração do citostático numa altura em que se tenha simultaneamente, na fase-alvo do fármaco, o máximo de células tumorais e o mínimo de células saudáveis, pois só assim se minimizam os efeitos secundários, aumentando simultaneamente a eficácia.

Bernard *et al*⁵¹ levaram a cabo um estudo que tinha como objetivo determinar quais as diferenças observadas entre os ciclos celulares de células normais e células tumorais. Para isso efetuou uma série de comparações entre células com três fenótipos distintos: células saudáveis e células tumorais com velocidades de crescimento tumoral lento ou rápido. O interesse do estudo da velocidade está relacionado com o facto de muitos citostáticos atuarem na fase S.⁵¹

A primeira fase consistiu exatamente em verificar como varia, ao longo do tempo, a fração de células nas diferentes fases do ciclo celular, para os diferentes fenótipos. Os resultados obtidos por Bernard *et al*⁵¹ (fig 5.3) ilustram que o padrão obtido ao longo do tempo pelo número de células em cada fase é cíclico. Ilustram também que existem diferenças significativas entre células saudáveis e tumorais.

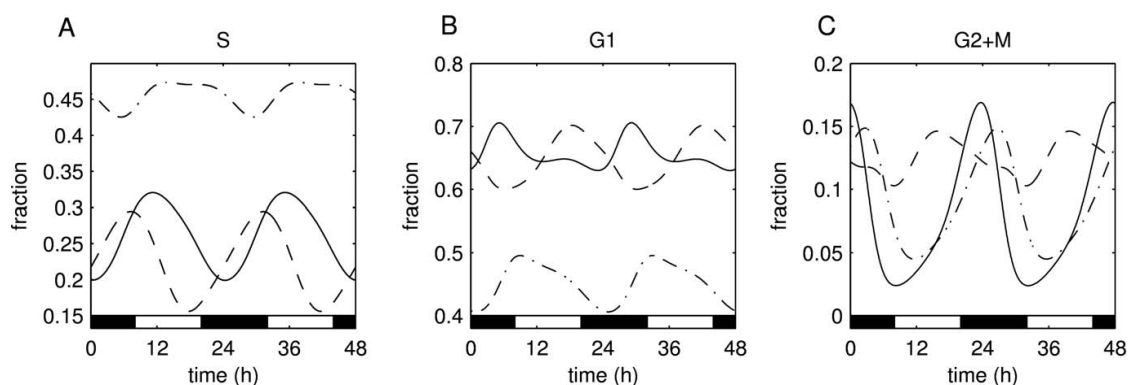


Figura 5.3 -Variação circadiana da fração de células nas diferentes fases do ciclo celular: fase S (A), fase G₁ (B) e fases G₂+M (C). A linha contínua representa a variação das células normais, a linha tracejada, das células tumorais de progressão rápida e a linha tracejada com pontos, a das células tumorais de progressão lenta.

Na fig.5.3-A, os resultados mostram que a fração de células em fase S é significativamente maior para as células tumorais de progressão lenta. Para além disso, essa fração oscila pouco ao longo do dia, exibindo pouca amplitude. Daqui advém que a quimioterapia de um cancro de progressão lenta com um citostático que atue na fase S tem uma forte possibilidade de ser bem-sucedido, pois o número de células tumorais em fase S é relativamente constante, surtindo efeito independentemente da hora do dia. Ainda assim, têm que se ter em conta os vales das células normais em fase S, para se minimizarem os efeitos secundários. Tal ocorre por volta das 00:00h. Quanto às células normais e tumorais de fase S curta, verificou-se que a amplitude de fração de células em fase S é semelhante com padrões quase coincidentes tornando a determinação de um perfil quimioterápico efetivo mais complexa.⁵¹

Na fig. 5.3-B é nítida a diferença entre picos e valores de frações de células em fase G₁. As células tumorais de proliferação lenta apresentam um fração de células em fase G₁ bem menor que a exibida tanto pelas células normais como pelas tumorais de crescimento rápido. De salientar ainda que as células tumorais com progressão rápida e as células normais apresentam picos em alturas opostas do ciclo circadiano, facilitando a definição de um regime cronoterápico. Na fig 5.13-C, existe uma forte semelhança

entre o padrão de oscilação exibido pelas células normais e as tumorais de progressão lenta, o que significa que a quimioterapia que tem como alvo esta fase em tumores de progressão lenta será pouco seletiva.⁵¹

Assim, Bernard *et al*⁵¹ concluíram que o fenótipo das células tumorais em termos de velocidade de progressão interfere no seu ciclo celular, tanto na quantidade de células em cada fase do ciclo, como na altura do ciclo circadiano em que ocorrem as fases.

Uma vez assinaladas estas diferenças, Bernard *et al*⁵¹ determinaram quais as melhores alturas do ciclo circadiano para se efetuar a administração de citostáticos que atuem na fase S. Os resultados obtidos encontram-se na figura 5.4.

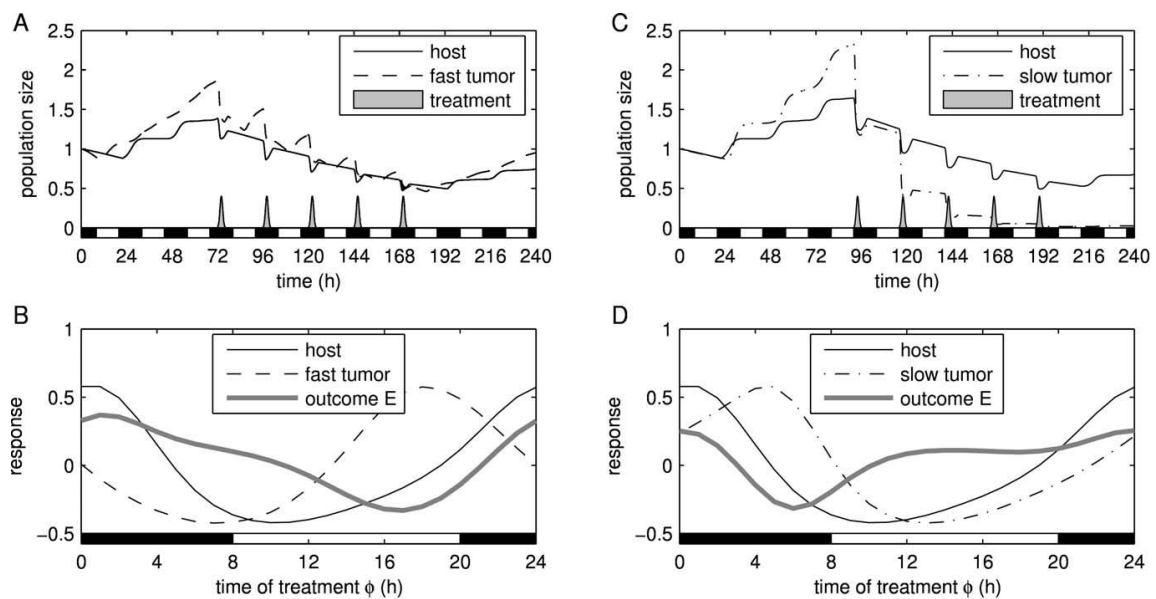


Figura 5.4. Evolução do tamanho da população de células tumorais de progressão rápida tratadas às 2:00h (A), e de células tumorais de progressão lenta tratadas às 22:00h (C). Variação circadiana da resposta terapêutica (Outcome) E de câncros de progressão rápida (B), e de câncros de progressão lenta (D), ao longo de 24h. As horas 2:00h e 22:00h correspondem às horas ótimas de administração, obtidas pelos autores na figuras 5.3 (A).⁵¹

Nas figuras 5.4-A e C verifica-se que quando ocorre a administração da terapêutica há uma diminuição simultânea do número de células normais e tumorais. No entanto, no caso dos tumores de progressão lenta, verifica-se que existe uma diminuição significativa de células tumorais enquanto que a população de células normais se mantém num número considerável, demonstrando a eficácia deste regime posológico.⁵¹

Nas figuras B e D, está representada a variação da resposta terapêutica ao longo dia. A hora da melhor resposta é definida pelo Outcome, que resulta da maximização do

número de células tumorais mortas e minimização do número de células normais. Para os tumores de progressão rápida, a hora de administração que mostra maior eficácia é pelas 2:00h. Para os tumores de progressão lenta, o pico de administração deve ocorrer por volta das 22:00h.⁵¹

Bernard *et al*⁵¹ investigaram ainda as diferenças de resposta de células tumorais tratadas com fármacos que atuam na fase S, com diferentes intervalos entre administrações. (Fig5.5)

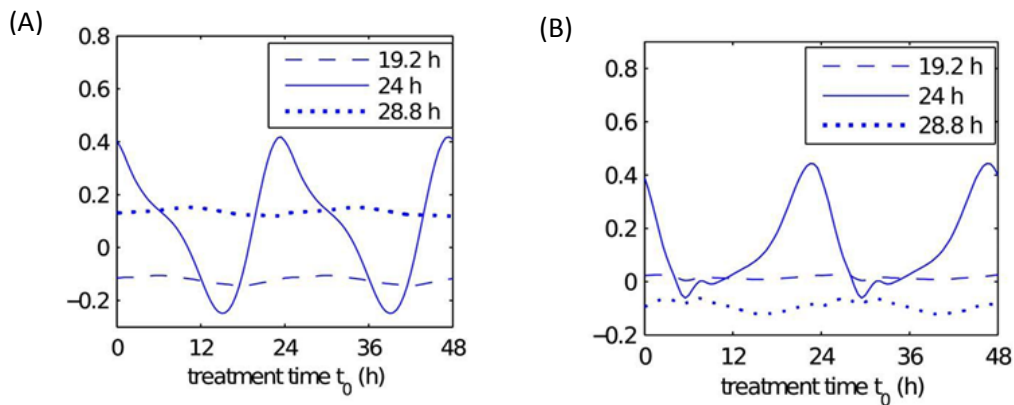


Figura 5.5- Variação da resposta terapêutica em função de intervalo de administração do fármaco (19.2h, 24h, 28,8h) em células tumorais de progressão rápida (A) e células tumorais de progressão lenta (B) e da hora de início de administração, t_0 (h).⁵¹

Seria previsível que tumores de progressão rápida respondessem melhor a intervalos entre administrações mais curtos. No entanto, Bernard *et al*⁵¹ verificaram que estes têm picos de resposta quando a administração é feita de 24 em 24h e não de 19.2h em 19.2h. (fig 5.5) Como tal, também neste intervalo ocorrem picos de ineficácia, e por isso, é mais seguro efetuar administrações de fármaco em intervalos de administração de 28h em 28h, pois a resposta é igualmente eficaz e independente da hora que se inicie o tratamento. Para os cancros de progressão lenta, verificaram que a melhor opção consiste na administração de citostáticos de 24 em 24h, com picos de eficácia consideráveis comparativamente às restantes opções.⁵¹

Em suma, com este estudo, Bernard *et al*⁵¹ estabeleceram uma relação de dependência entre as características do tumor, em termos de velocidade de progressão e a otimização da cronoterapia oncológica.

5.3.3. Exemplos da aplicação da cronoterapia do cancro

5.3.3.1. Cronoterapia de 5-FU e oxaliplatina

As condicionantes da cronoterapia de 5-FU e oxaliplatina são bastante distintas, uma vez que se tratam de citotóxicos de classes diferentes. O 5-FU é um fármaco específico do ciclo celular, mais precisamente da fase S, enquanto a oxaliplatina atua nas diversas fases do ciclo celular.

- **Cronoterapia de 5-FU**

Devido à larga utilização do 5-FU, a determinação de um regime cronoterápico surge como uma prioridade. Altinok *et al*⁵² investigaram os mecanismos responsáveis pela cronotolerância e cronoeficácia de 5-FU e oxaliplatina de forma a permitir a otimização da administração destes fármacos. Recorreram para isso, a modelos computacionais que através de cálculos matemáticos permitiram uma aproximação do ciclo celular de mamíferos.

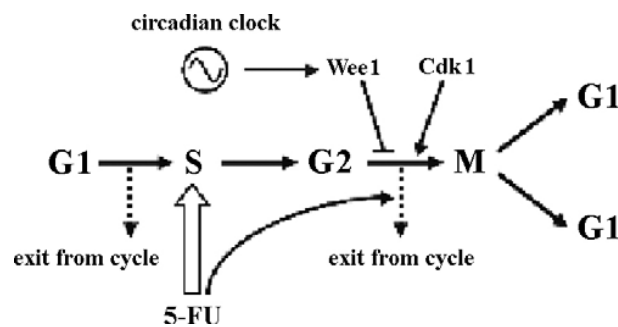


Figura 5.6 - Esquema representativo do modelo celular para as células sujeitas a 5-FU.⁵²

No modelo para o 5-FU, representado na figura 5.6, são consideradas as diferentes fases do ciclo celular e respetivas durações, às quais adicionaram uma componente aleatória de forma a compensar o facto de nem todas as células se encontrarem na mesma fase do ciclo. Outra condicionante adicionada foi a concentração de fármaco administrada, que poderia levar ou não à saída da célula do ciclo celular. São ainda consideradas as ações das proteínas Wee1 e Cdk1.⁵²

Atualmente está padronizada a cronoadministração de 5-FU com pico às 4:00h e Altinok *et al*⁵² verificaram que quando a administração é efetuada a esta hora, o número de células mortas é baixo comparativamente a outras horas do dia, isto é a citotoxicidade é menor. (fig.5.7)

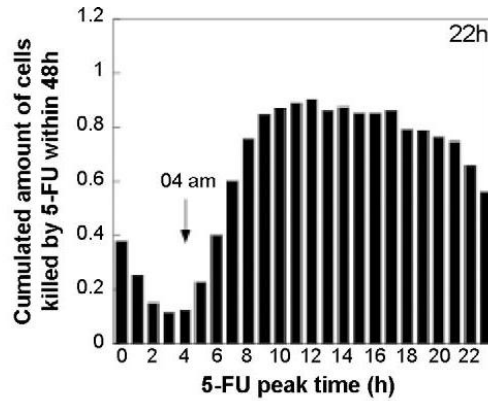


Figura 5.7 – Citotoxicidade de 5-FU em função da hora do pico de administração.⁵²

O máximo de células mortas apresenta-se por volta das 10:00h, se o ciclo celular for de cerca de 22h. Este resultado indica que a citotoxicidade de 5-FU depende do ciclo circadiano.⁵²

Outro ponto importante foi a comparação efetuada entre a evolução do número de células mortas em diferentes situações de administração de 5-FU. A comparação foi feita entre o pico às 4:00h e pico às 16:00h, por oposição circadiana. Neste caso Altinok *et al*⁵² verificaram que quando o pico de concentração de 5-FU ocorre às 4:00h, tal como indicam os protocolos médicos, a redução do número de células é gradual. No entanto, se a administração tiver como máximo as 16:00h, o número de células cai a pique.⁵² (fig 5.8)

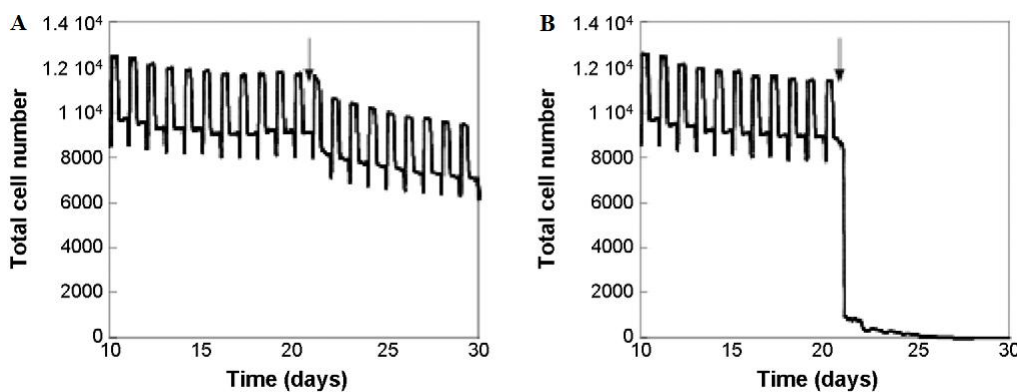


Figura 5.8 - Citotoxicidade de 5-FU com pico de administração às 4:00h (A) e às 16:00h (B).⁵²

Tal indica que o máximo às 16:00h está associado a uma elevada citotoxicidade, devendo ser evitado, pois teria com resultado efeitos adversos gravíssimos. Os resultados obtidos corroboram o esquema de cronoterapia que atualmente se efetua com 5-FU, devido à baixa probabilidade de ocorrência de reações adversas. A justificação para tal diferença reside no número de células em fase S, fase alvo do 5-FU, na hora do máximo de concentração do fármaco. Tal torna-se evidente quando Altinok *et al*⁵² estabeleceram uma relação entre o número de células em fase S e os picos de 5-FU às 4:00h e 16:00h. (Fig 5.9) Na figura 5.9-A, o máximo da concentração de 5-FU corresponde exatamente a um mínimo de células em fase S, e é por isso que este pico apresenta uma menor citotoxicidade: o 5-FU têm poucas células-alvo onde atuar. O contrário se passa quando se tem um pico de 5-FU à 16:00h. Os picos de células em fase S e o pico de 5-FU são coincidentes e como tal estão reunidas todas as condições para o citostático atuar, destruindo massivamente todas as células em fase de replicação celular.⁵² (Fig.5.9-B)

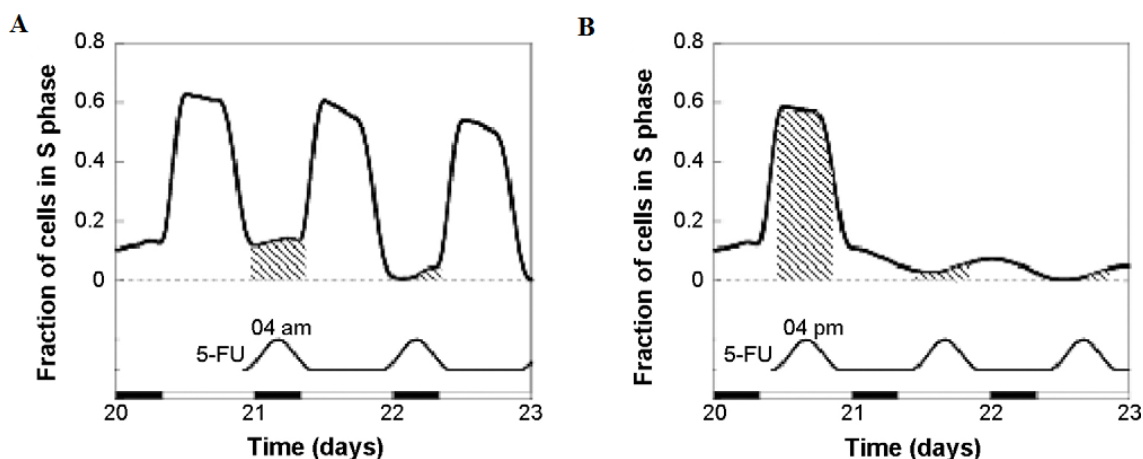


Figura 5.9 – Variação temporal da fração de células em fase S com máximos de 5-FU às 4:00h (A) e às 16:00h (B).⁵²

Já Bernard *et al*⁵¹ tinham verificado que existiam diferenças na resposta das células à quimioterapia entre células de fase S longa ou lenta. Neste estudo Altinok *et al*⁵² determinaram também que ocorrem variações nas respostas das células à quimioterapia quando se comparam células com diferentes durações de ciclo celular. Tal interesse advém do facto de esta ser uma das características das células tumorais. Foram analisadas várias durações de ciclo celular, 16h, 18h, 20h, 22h, 24h e 26h. Altinok *et al*⁵² estabeleceram a relação entre o número de células mortas ao fim de 48h, com a duração do ciclo celular e o pico de 5-FU e concluíram que para ciclos de 16h e

26h, quase não existem diferenças entre as diferentes horas de máximo na concentração de 5-FU. No entanto, quando o ciclo celular tem como duração 18h a 24h, a hora do pico de 5-FU já se torna uma condicionante do sucesso terapêutico.⁵²

Altinok *et al*⁵² compararam ainda as variações na concentração das enzimas WEE1 e CDK1, com os picos de 5-FU e a fração de células na fase S para diferentes durações de ciclo celular. (fig 5.10)

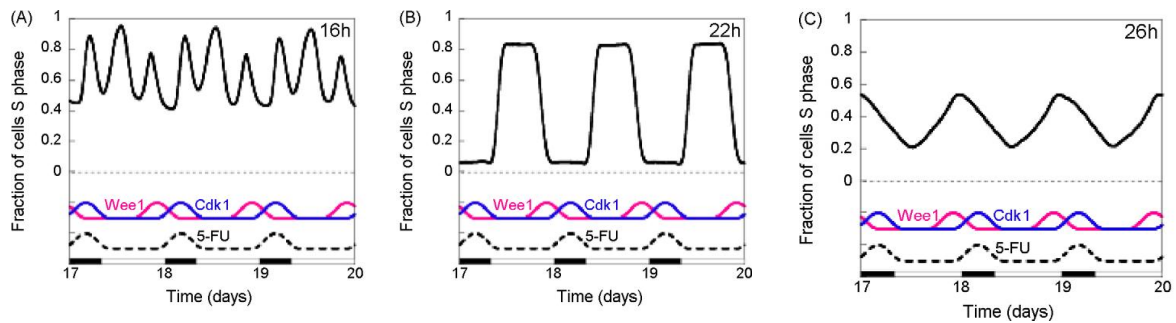


Figura 5.10 – Evolução da fração de células em fase S em função do pico das proteínas WEE1 e CDK1 para ciclos celulares com duração de 16h (A), 22h (B) e 26h (C). Não é tida em conta ação do 5-FU no número de células. Encontram-se representados os seus picos para se avaliar o potencial citotóxico.

Na figura 5.10-A verificaram que como os ciclos são relativamente curtos, a fração de células em fase S varia bruscamente mas com pouca amplitude, por isso, a hora de administração de 5-FU quase não interfere com o número de células mortas ao fim de 48 horas. Quando o ciclo aumenta para 22 horas já ficam bem definidas as fases do ciclo celular, com alturas em que quase não existem células em fase S, correspondentes à ação das enzimas. Quando o ciclo é de 26 horas, a variação de células em fase S ao longo do tempo já não está tão bem definida, como em células com ciclos de 22h. Nestas diferenças observadas verifica-se que cronocitotoxicidade de 5-FU é menor em células com ciclo celular de 22h, pois como é bem visível na figura 5.10-B, o pico de 5-FU corresponde exatamente com a fase em que menos células estão em fase S.⁵²

- **Cronoterapia de Oxaliplatina**

Tal como para o 5-FU, Altinok *et al*⁵² definiram também as condicionantes para a progressão do ciclo celular na presença de oxaliplatina. Como se trata de um citostático que não é específico de uma fase do ciclo celular, pode atuar em qualquer

fase do ciclo, havendo uma certa probabilidade de que a célula, na fase seguinte, saia do ciclo e entre em apoptose.⁵² (fig 5.11)

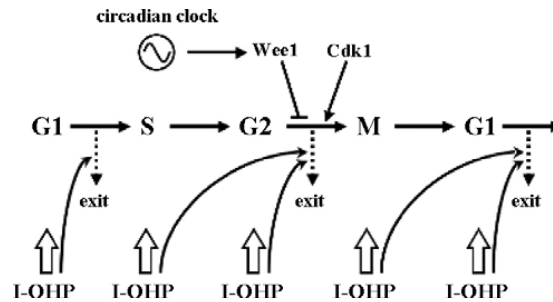


Figura 5.11 - Esquema representativo do modelo celular para as células sujeitas a oxaliplatina.

L-OHP - Oxaliplatina

À partida, o ciclo circadiano não deveria ter qualquer interferência na eficácia desta classe de citostáticos. No entanto, a oxaliplatina forma complexos com tióis plasmáticos (PSH) e com a glutatona celular (GSH). Estes complexos não possuem qualquer atividade citostática. No entanto, Altinok *et al*⁵² verificaram que a formação de ambos apresenta variação circadiana e por isso a eficácia da oxaliplatina vai depender da concentração destes compostos no momento em atinge o seu pico de concentração.⁵² (Fig 5.12)

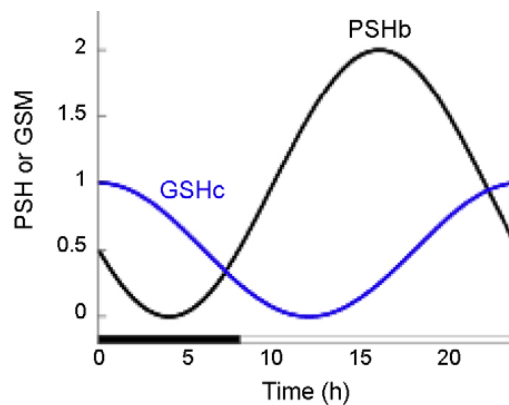


Figura 5.12 - Variação circadiana das concentrações de glutatona celular (GSHc) e tióis plasmáticos (PSB).⁵²

À semelhança com o que se passou com o 5-FU, concluíram que o efeito citotóxico da oxaliplatina depende da hora de administração e da duração do ciclo celular.

Sabendo como varia a concentração destes compostos no organismo Altinok *et al*⁵² investigaram como varia, ao longo do ciclo circadiano, a formação desses complexos de oxaliplatina. Os resultados obtidos na figura 5.13 são esclarecedores da menor citotoxicidade quando se tem um pico à 16:00h, hora definida por protocolos médicos, comparativamente com a administração às 4:00h, por oposição circadiana.⁵²

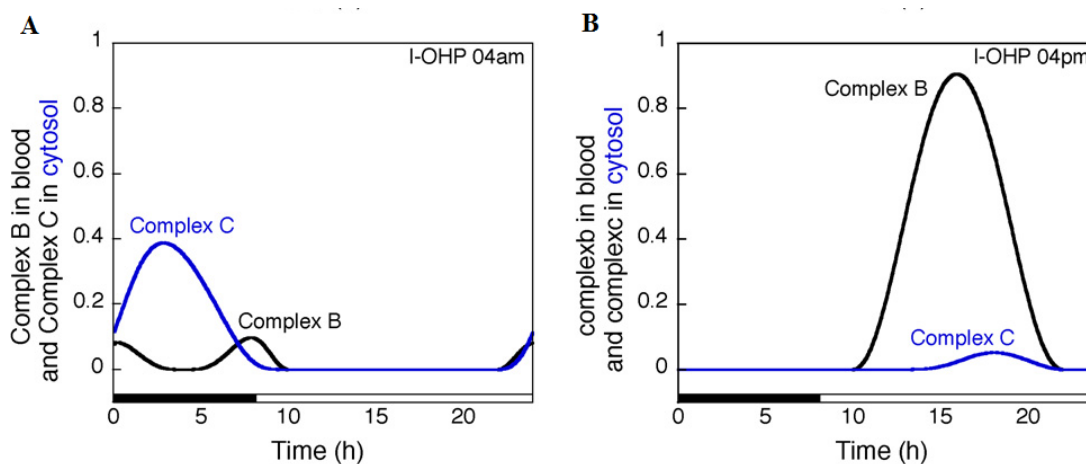


Figura 5.13- Variação circadiana da formação de complexos entre glutatona celular e oxaliplatina (complexo C) e tióis plasmáticos e oxaliplatina (complexo B) com picos de administração de oxaliplatina às 4:00h (A) e às 16:00 (B).⁵²

A esta hora ocorre a formação do complexo B em elevada quantidade, fazendo com que a quantidade do fármaco disponível para atuar diminua. Por outro lado, quando se tem um pico às 4:00h (fig 5.13-A), existem menos tióis plasmáticos em circulação e uma menor quantidade de glutatona nas células, fazendo aumentar a biodisponibilidade do fármaco, aumentando a sua citotoxicidade.⁵²

Sendo o objetivo da cronoterapia do cancro proteger as células normais e maximizar o número de células tumorais mortas é importante analisar como respondem, simultaneamente, grupos de células saudáveis e células tumorais, que apresentam características heterogêneas, tais como diferentes durações de ciclo celular e ciclos celulares dessincronizados. Altinok *et al*⁵² fizeram essa análise, considerando três grupos distintos de populações celulares tendo em conta duas condicionantes: o controlo celular pelo ciclo circadiano (E), efetuado pela ação das proteínas WEE1 e CDK1 e a variabilidade (V), diferentes durações de fases do ciclo. Tal foi efetuado de forma a aproximar as características das células em estudo com as das células tumorais, sendo que as normais são caracterizadas por estarem sincronizadas com o ciclo circadiano e apresentarem alguma variabilidade, enquanto as células tumorais não estão sincronizadas com o ciclo circadiano e exibem elevada variabilidade.⁵²

No caso do 5-FU verificaram que quando V é elevado e as células não são controladas pelo ciclo circadiano a diferença entre células normais e tumorais mortas é tanto maior quanto maior a variabilidade V (fig. 5.14-A). Quer isto dizer que a cronoterapia de 5-FU que está atualmente a ser utilizada destrói o máximo de células tumorais poupando as normais. No caso da quimioterapia clássica as diferenças entre as diferentes células não foram significativas, resultado da fraca seletividade terapêutica. (fig 5.14-B). Resultado semelhante foi obtido para a oxaliplatina, não se observando diferenças assinaláveis tanto na quimioterapia clássica como na cronoterapia. (fig. 5.14-C e D)⁵²

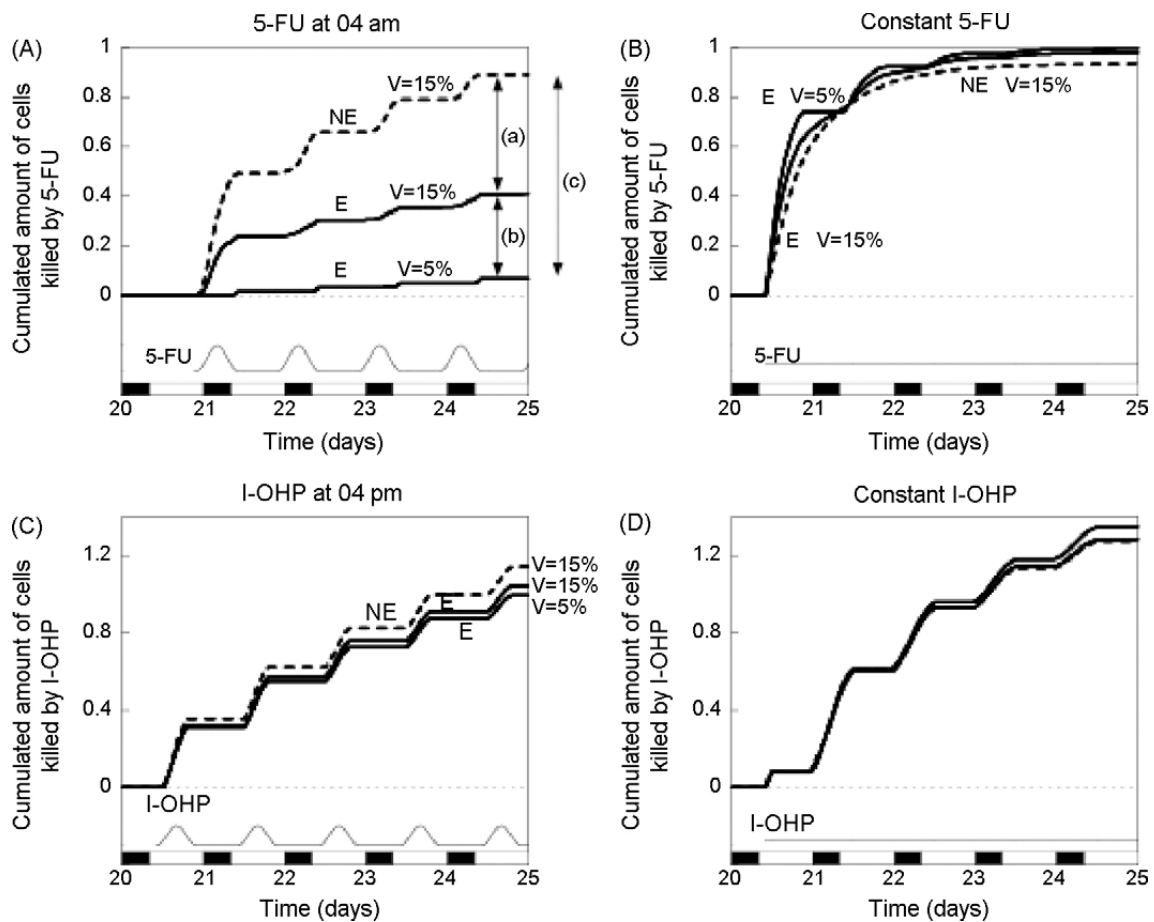


Figura 5.14 – Comparação entre a seletividade da cronoterapia e da quimioterapia clássica de 5-FU (A) e (B) e oxaliplatina (C) e (D).⁵²

V – Variabilidade celular de fases do ciclo celular
E - Sincronização das células com o ciclo circadiano

Outro ponto do qual se pode retirar partido no caso das células tumorais é o facto de elas apresentarem uma duração de ciclo celular mais curta devido à sua rápida proliferação. Quando acrescentada às variáveis anteriores (variabilidade de fases de ciclos celulares e a não sincronização com o ciclo celular exibidas pelas células

tumorais), a diferença de duração do ciclo celular, 22h para as células normais e 18h para as tumorais, Altinok *et al*⁵² obtiveram resultados esclarecedores, pois o regime cronoterápico padrão parece ter pouco efeito nas células normais (fig 5.15-A), mas destrói de uma forma efetiva grande parte das células tumorais (fig 5.15-B), embora de uma forma mais evidente no caso do 5-FU.

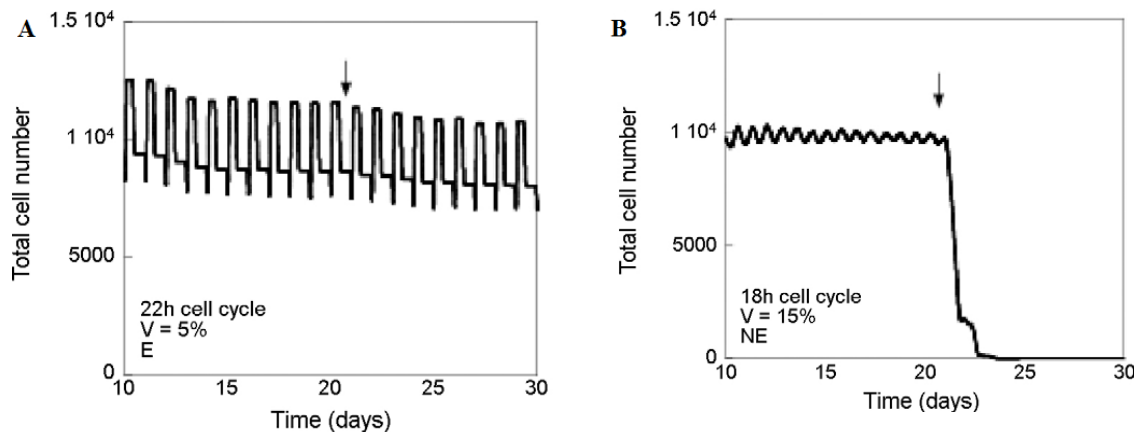


Figura 5.15- Citotoxicidade de 5-FU para células com características normais (A) e células com características tumorais (B).

V – Variabilidade celular de fases do ciclo celular
E - Sincronização das células com o ciclo circadiano

Desta forma parece pertinente que o mesmo regime de administração 5-FU atinja simultaneamente os dois objetivos pretendidos. No entanto, é de salientar que as características das células são bastante distintas sendo por isso previsível a obtenção de respostas distintas. Assim, faz todo o sentido que se tire partido delas para otimizar a quimioterapia do cancro.

5.3.3.2. Cronoterapia do Irinotecano

O irinotecano (CPT-11) apresenta-se como um desafio para a cronoterapia, pois a sua efetividade e toxicidade estão dependentes de várias condicionantes, que correspondem à atividade de enzimas responsáveis pela sua ativação metabólica e transportadores de membrana responsáveis pela sua entrada e saída da célula tumoral.

Ativação metabólica e transportadores de membrana

Na figura 5.16 estão representados todos os processos pelos quais o CPT-11 passa desde a sua entrada em circulação até exercer a sua função citotóxica. A entrada de CPT-11 nas células é efetuada por transportadores de efluxo ABC (ATP-Binding Cassette).⁵³

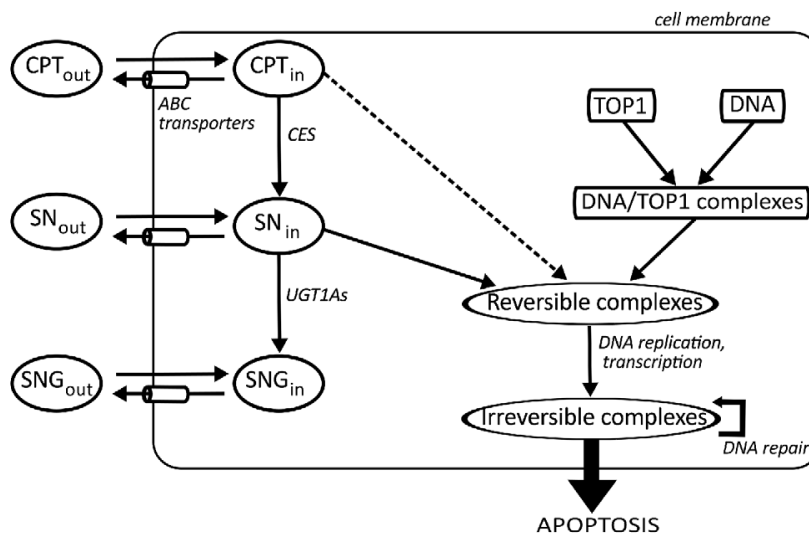


Figura 5.16 – Metabolismo e ação de CPT-11 e SN-38 nas células. No transporte estão envolvidos transportadores de influxo e efluxo (transportadores ABC) e na metabolização, as enzimas UGT e na ativação metabólica a enzima CES. Quando SN-38 forma complexos irreversíveis com o ADN e a topoisomerase I, a célula entra em apoptose.⁵³

Uma vez no interior das células, o CPT-11 é ativado pela enzima CES (carboxilesterase), sendo convertido em SN-38, o fármaco ativo. Este composto pode seguir destinos diferentes. Ou é eliminado da célula sem sofrer qualquer metabolização, ou é metabolizado pela enzima de fase II (UGT1A1), sofrendo glucuronidação e depois eliminado da célula através de transportadores ABC. Em ambos os casos o fármaco

torna-se inativo, não exercendo qualquer efeito a nível da topoisomerase I.⁵³ Por isto, estes transportadores de efluxo estão muitas vezes associados a resistência a fármacos.

No entanto, o fármaco pode ainda escapar a estes fenómenos e atuar sobre a topoisomerase I. Da sua ação podem resultar dois tipos de complexos entre o ADN, topoisomerase I e o SN-38; os reversíveis e os irreversíveis. São estes últimos que levam efetivamente a célula à apoptose.⁵³

O facto de a ação do CPT-11 depender da expressão de tantas enzimas, torna a otimização da sua eficácia através da cronoterapia um desafio.

Ballesta *et al*⁵³ desenvolveram um modelo matemático para a otimização da ação citotóxica do CPT-11 em células tumorais caco-2, células modelo para cancro colorectal, e minimização dos efeitos secundários em células normais. Este modelo teve em conta a expressão circadiana das principais enzimas envolvidas na metabolização de CPT-11 e transporte. Inicialmente obtiveram um gráfico em que se verifica a variação circadiana da formação de complexos entre o ADN, a topoisomerase I e o irinotecano em células sincronizadas com o ciclo circadiano, que correspondem às células normais. O pico obtido ocorre por volta das 20h.⁵³ (fig 5.17)

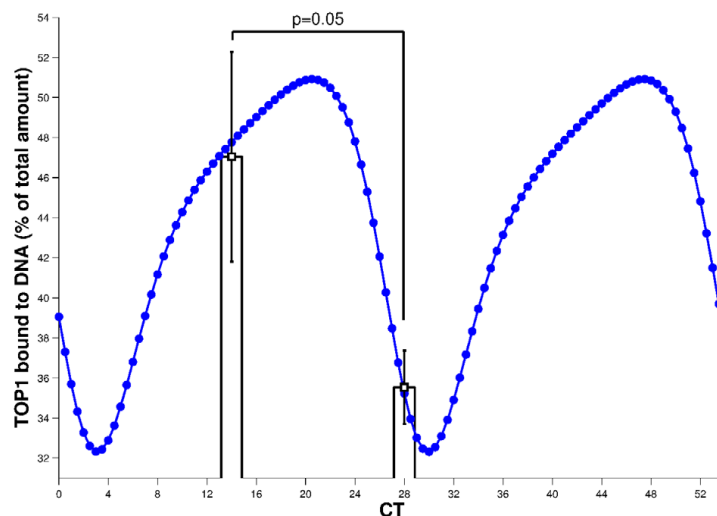


Figura 5.17 – Variação circadiana da formação de complexos entre CPT-11, ADN e topoisomerase I.⁵³

A expressão circadiana foi também verificada para UGT1A1, CES e transportadores ABC. Ao serem considerados todos estes parâmetros, Ballesta *et al*⁵³ concluíram que para se obter um maior efeito citotóxico em células tumorais, a administração de CPT-11 teria de ter uma duração entre 1:50h e 7:40h. Sem qualquer restrição na hora da administração uma vez que estas células não exibem qualquer ritmo

circadiano. Já no que se refere à minimização dos efeitos secundários em células normais, Ballesta *et al*⁵³ obtiveram um resultado de melhor tolerância com administração entre as 2:10h e 2:30h, que correspondem a cerca de 1:30-1:50 horas antes do mínimo circadiano da proteína CES, enzima responsável pela ativação metabólica de CPT-11.⁵³ (Fig 5.18-A)

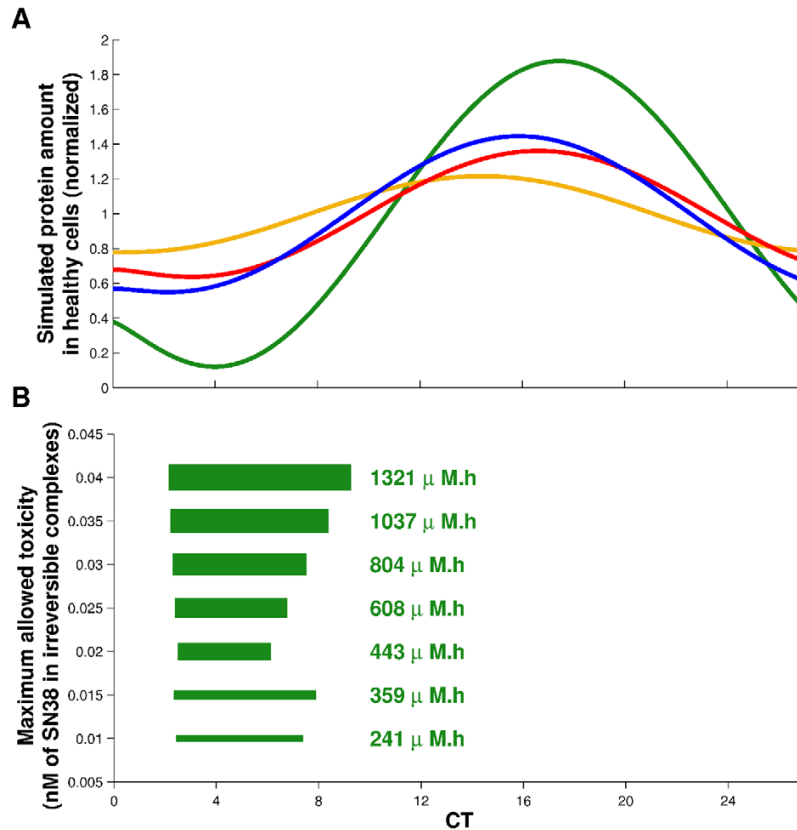


Figura 5.18 – Expressão circadiana dos genes *Ces* (verde), *UGT* (AZUL), *ABC_CPT* (vermelho) e *ABC_SN* (laranja) em (A) e Regimes de administração de SN-38 para diferentes máximos de toxicidade (nM de SN-38). A verde estão assinaladas as doses cumulativas (µ M.h) para cada máximo (B).⁵³

No entanto, o regime determinado não se baseia apenas no mínimo da CES sendo a administração de CPT-11 prolongada por várias horas, altura em que os transportadores de efluxo e a enzima de metabolização exibem maior quantidade.⁵³

Tendo em conta estes condicionantes, Ballesta *et al*⁵³ efetuaram a representação gráfica da relação entre o limiar de toxicidade permitida, as doses acumuladas de CPT-11 e a hora ótima de administração. (Fig 5.18-B)

No caso do irinotecano não se tem em conta a fase em que a citotoxicidade é maior para as células tumorais, ao contrário do 5-FU e oxaliplatina, uma vez que como se trata de um fármaco quimioterápico não específico do ciclo celular, a sua ação não vai ter variação circadiana significativa.⁵³

5.3.3.3 Cronoterapia do cancro coloretal

O cada vez maior conhecimento acerca da variação circadiana de vários parâmetros que condicionam a eficácia e tolerância de citotóxicos tem despertado o seu interesse prático, principalmente no caso do cancro do coloretal, pois trata-se de um de um cancro com elevada taxa de mortalidade.

Vários estudos têm vindo a ser feitos de forma a avaliar a aplicabilidade deste conhecimento.

Já em 1999, Lévi *et al*⁵⁴ desenvolveram um estudo em 90 doentes com cancro coloretal metastático. Neste estudo os doentes foram tratados com oxaliplatina, 5-FU e leucovorina, seguindo um regime cronoterápico para todos os fármacos administrados, e verificaram um aumento de cerca de 50% da sobrevivência comparativamente à terapia padrão com irinotecano.

Mais recentemente Giacchetti *et al*⁵⁵ efetuaram um estudo randomizado multicêntrico em que compararam a administração cronodelada de 5-FU, leucovorina e oxaliplatina durante 4 dias (ChronoFLO4) com a terapia convencional com os mesmos fármacos (10 ciclos com intervalo de 2 semanas). No total participaram 564 doentes (282 para a cronoterapia e 282 convencional) e a comparação entre as terapias foi efetuada por avaliação da incidência de efeitos adversos e tempo de sobrevivência.

A terapia cronomodulada do cancro consistiu na administração de oxaliplatina das 10h às 22h, com pico às 16h, do 5-FU e da leucovorina das 22h às 10h, com pico às 4:00h, durante 4 dias (fig 5.19-A). Já a quimioterapia convencional, no dia 1, a oxaliplatina é administrada em simultâneo com a leucovorina das 10 às 14h, seguidas de 5-FU das 14h às 10h. Já no dia 2, administrou-se leucovorina das 10h às 14h, seguida de 5-FU das 14h até às 10h.⁵⁴ (fig 5.19-B).

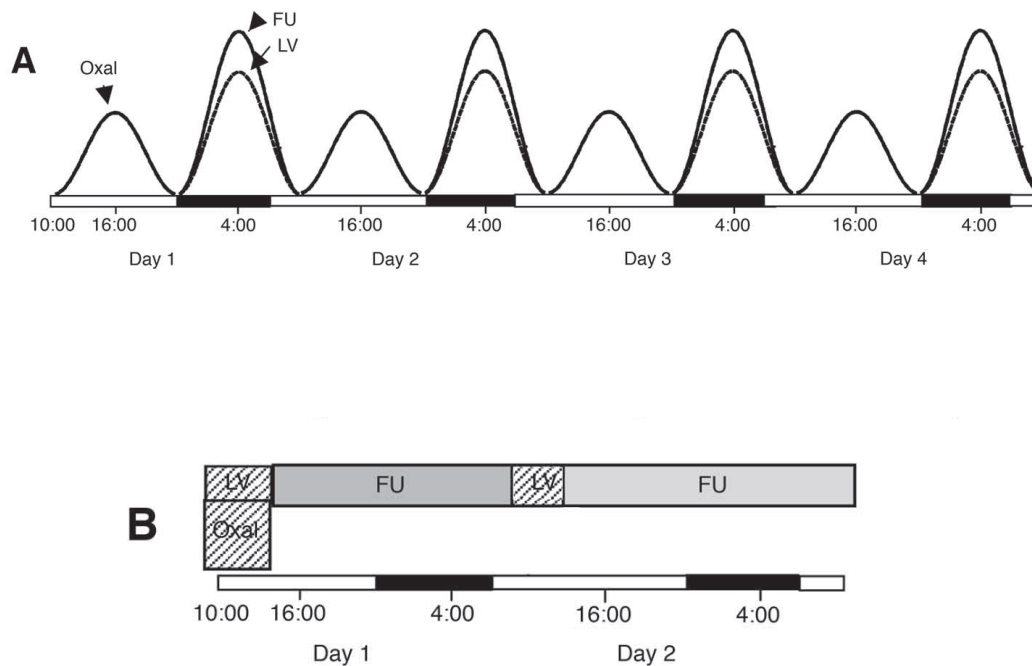


Figura 5.19 – Esquema posológico da cronoterapia (A) e quimioterapia clássica (B) do Cancro.⁵⁵

Oxaliplatina (Oxal); 5-FU (FU); Leucovorina (LV)

Os resultados obtidos relativamente aos efeitos adversos revelam que a cronoterapia apresenta toxicidade hematológica significativamente menor ($P < 0.001$), no entanto, a diarreia ocorreu em cerca de 29.5% dos doentes, valor muito superior ao exibido pela quimioterapia clássica.⁵⁵

Outra conclusão deste estudo está relacionada com as diferenças observadas ao nível da sobrevivência com as diferentes metodologias. (fig 5.20)

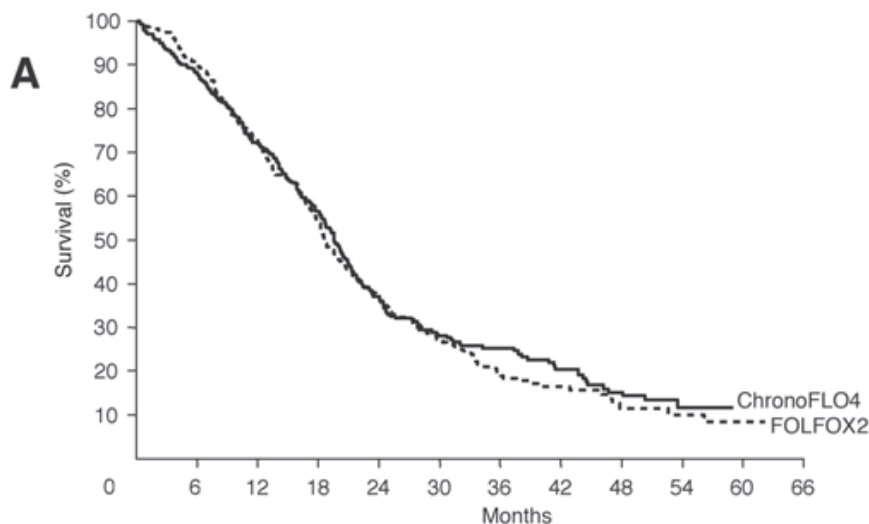


Figura 5.20 - Comparação entre a sobrevivência de doentes submetidos a FOLFOX2 e ChronoFLO4. ⁵⁵

Em geral, a sobrevivência obtida para ChronoFLO4 foi maior com cerca de 19,6 meses comparativamente aos 18,7 meses obtidos na quimioterapia clássica. Registou-se também, uma diferença significativa entre géneros. No caso dos homens, a cronoterapia diminuiu o risco de morte em 25%, enquanto nas mulheres este aumentou 38%, sendo que o tempo de sobrevivência para FOLFOX2 foi de 19,3 meses e de ChronoFLO4 de 16,3. ⁵⁴

Esta discrepância entre géneros pode ser justificada pelas diferenças existentes na enzima de metabolização de 5-FU, dihidroxi pirimidina desidrogenase, entre homens e mulheres. Um polimorfismo que provoque a diminuição da atividade desta enzima é preditiva de uma baixa tolerância ao fármaco com forte incidência de efeitos adversos, e a sua predominância ocorre no sexo feminino. ⁵⁴

Este resultado não invalida o potencial terapêutico da cronoterapia do cancro. Aliás, a presença desta diferença significativa entre homens e mulheres acentua ainda mais a forte influência que as enzimas de metabolização têm na resposta terapêutica e especialmente se estiverem reguladas pelo ciclo circadiano. ⁵⁴

Contrariamente a Giacchetti *et al* ⁵⁵, em 2009, Bouchahda *et al* ⁵⁶, obtiveram resultados de tolerância à cronoterapia superiores aos obtidos na quimioterapia clássica.

A amostra era significativamente menor (n=29) e utilizaram irinotecano e excluíram a leucovorina.

Os ciclos de quimioterapia ocorriam de 21 em 21 dias de acordo com os dados representados na tabela 5.1

Tabela 5.1 – Regimes posológicos da cronoterapia do cancro colorretal.

Fármaco	Dose diária (mg/m ²)	Dias de Tratamento	Horas do Dia	Pico de Concentração de Fármaco
Irinotecano	160	1	2:00h- 8:00h	5:00h
Oxaliplatina	20	2-5	10:00h- 22:00h	16:00h
5-FU	600	2-5	22:00h-10:00h	4:00h

A administração dos fármacos foi efetuada por infusão arterial hepática, pois era o órgão que apresentava metástases. Simultaneamente, a administração de fármacos diretamente nesta artéria permite uma maior seletividade uma vez que é por ela que as células tumorais são irrigadas, enquanto as células normais são irrigadas pela veia porta.⁵⁵

Neste estudo, a incidência de efeitos adversos foi baixa, especialmente a nível hematológico e embora observados não apresentavam gravidade significativa.

CONCLUSÃO

O cancro é uma patologia que envolve alterações profundas no ciclo celular e o seu desenvolvimento está muitas vezes associado a uma desregulação dos mecanismos que controlam este ciclo e que exibem atividade circadiana. Desta forma, o ciclo circadiano está envolvido tanto na suscetibilidade para o aparecimento de patologias oncológicas como na resposta terapêutica a fármacos antineoplásicos.

Este ciclo regula a expressão de um conjunto de genes, os genes *clock*, e cuja subexpressão foi associada a vários tipos de cancro. A eficácia e tolerância terapêuticas dos fármacos antineoplásicos estão igualmente dependentes das oscilações circadianas das fases do ciclo celular, das enzimas de metabolização e de transportadores de influxo e efluxo, condicionando assim, a biodisponibilidade do fármaco e o número de células-alvo.

A cronoterapia demonstra eficácia na otimização da terapia do cancro, pois ao ter em conta estas variações, a administração do fármaco é efetuada numa altura do dia em que destrói o máximo de células tumorais e afeta o mínimo de células normais. No entanto, está longe ser um tema fácil e uniforme, dada a sua especificidade, personalização e minúcia. Não se pode restringi-la apenas a dois tipos de metodologia, a de antineoplásicos específicos do ciclo celular, e a de não específicos do ciclo celular, ainda assim, os resultados dos estudos que se têm vindo a desenvolver neste tema são indicadores de um forte potencial terapêutico.

Referências Bibliográficas

- [1] Ohdo, S.; Koyanagi, S.; Matsunaga, N.; Hamdan, A. (2011). Molecular Basis of Chronopharmaceutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **100**: 3560-3575.
- [2] Ohdo, S.; Koyanagi, S.; Matsunaga, N.; Hamdan, A. (2010). Chronopharmacological strategies: Intra- and inter-individual variability of molecular clock. *Advanced Drug Delivery Review*. **62**: 885–897.
- [3] Albrecht, U. (2012). Timing to Perfection: The Biology of Central and Peripheral Circadian Clocks. *Neuron*. (74) 246-260.
- [4] Healthy Sleep - <http://healthysleep.med.harvard.edu/image/200#> (Acedido a 10 Fevereiro de 2012)
- [5] Lévi, F.; Okyar, A.; Dulong, S; Innominato, P. et al. (2010). Circadian Timing in Cancer Treatments. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**: 377–421.
- [6] Rana, S. e Mahmood, S. (2010). Circadian rhythm and its role in malignancy. *Journal of Circadian Rhythms*. **8**:3.
- [7] Lin, S. e Kawashima, Y. (2011). Current status and approaches to developing press-coated chronodelivery drug systems. *J. Control. Release*. 157(3):331-53.
- [8] Pollock, R.E., Doroshow, J.H., Khayat, D., Nakao, A. e O’Sullivan, B. (2006). *Manual de Oncologia Clínica da UICC*. 8º Edição. WILEY. São Paulo.
- [9] Junqueira, L., e Carneiro, J. *Histologia Básica*. (2004). 10º Edição. GUANABARA KOOGAN. São Paulo.
- [10] Universidade de Harvard - <http://cyberbridge.mcb.harvard.edu/> (Acedido a 12 Março 2012)
- [11] American Society of Cancer <http://www.cancer.org/Treatment/TreatmentsandSideEffects/TreatmentTypes/Chemotherapy/index> (Acedido a 2 de Abril de 2012)
- [12] Walczak, C.; Cai, S.; e Khodjakov, A. (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **11**, 91-102.
- [13] Nature Education - <http://www.nature.com/scitable/topicpage/replication-and-distribution-of-dna-during-mitosis-6524841> (Acedido a 21 Fevereiro de 2012)
- [14] Alberts, R., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts e Walter, P. (1998) *Essential Cell Biology: an introduction to the molecular cell biology of the cell*. Garland Publishing, Inc. New York.

- [15] Bardin , A. J. e Amon, A. (2001). MEN and SIN: what's the difference?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2**: 815-826.
- [16] D'Aura swanson, C.; Paniagua, R.; Lindstrom , T. et al. Tyrosine kinases as targets for the treatment of rheumatoid arthritis. (2009). *Nat. Rev. Rheumatol*. **5**: 317–324.
- [17] Croce, Carlo. (2008). Molecular origins of cancer: Oncogenes and Cancer, *N Engl J Med*. **358**:502-511.
- [18] American Cancer Society
<http://www.cancer.org/Cancer/CancerCauses/GeneticsandCancer/OncogenesandTumoSuppressorGenes/index> (Acedido a 5 Maio de 2012)
- [19] Vogelstein, B. e Kinzler, K. (2004).Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.*; **(8)**:789-99.
- [20] Liga Portuguesa Contra o Cancro
<http://www.ligacontracancro.pt/noticias/detalhes.php?id=242> (Acedido a 22 Abril de 2012).
- [21] Almeida, V.; Leitão, A.; Reina, L. et al. (2005) Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim.Nova*. **(28)**:118-129.
- [22] Bachmeier et al. (2010). Novel aspects for the application of Curcumin in chemoprevention of various cancers. *Frontiers in Bioscience*. **S2**: 697-717.
- [23] González, I.; Saez, R.; Rodilla, E. et al. (2000). Hypersensitivity reactions to chemotherapy drugs. *Alergol Immunol Clin*. **15**:161-181.
- [24] DrugBank - <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00544>
(Acedido a 6 Maio de 2012)
- [25] DrugBank - <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00563>
(Acedido a 6 Maio de 2012)
- [26] Heiden, M. (2011). Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature Reviews Drug Discovery*. **10(9)**:671-84.
- [27] Nozawa, T. ; Minami, H.; Sugiura, S. *et al.* (2004). Role of organic anion transporter oatp1b1 (oatp-c) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metabolism and Disposition*; **33(3)**:434-439.
- [28] DrugBank - <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00762>
(Acedido a 6 Maio de 2012)

[29] Weathe, N. ; Taleb, R.; Krause-Heuer, A. et al. (2007). Novel platinum(II)-based anticancer complexes and molecular hosts as their drug delivery vehicles . *Dalton Trans.* (43):5055-64.

[30] Viswanathan, A. e Schernhammer, E. (2009). Circulating Melatonin And The Risk Of Breast And Endometrial Cancer In Women. *Cancer Lett.* 281(1): 1–7.

[31] Koch , B.; Nagtegaal , J.; Kerkhof, G. et al. (2009). Circadian sleep–wake rhythm disturbances in end-stage renal disease. *Nature Reviews Nephrology.* 5: 407-416.

[32] The Professional channel for Doctors - <http://www.epgonline.org>
(Acedido a 9 de Maio de 2012)

[33] Schernhammer, E.; Laden , F.; Speizer, F. et al. Rotating Night Shifts and Risk of Breast Cancer in Women Participating in the Nurses' Health Study. *J Natl Cancer Inst.* 93(20):1563-1568.

[34] Deming, S. ; Lu, W.; Beeghly-Fadiel, A. et al. (2011). Melatonin pathway genes and breast cancer risk among Chinese women. *Breast Cancer Res Treat.* 132(2):693-9.

[35] Pukkala, E.;Aspholm, R.; Auvinen , A. et al. (2003). Cancer incidence among 10211 airline pilots: a Nordic study. *Aviat Space Environ Med.*74:699–706.

[36] Zhu, Y.; Stevens, R.; Hoffman, A. et al. (2009) Testing the circadian gene hypothesis in prostate cancer: a population-based case-control study. *Cancer Res.* 69 (24): 9315–9322.

[37] Li, X., Delaunay , F., Dulong, S. et al. (2010). Cancer Inhibition through Circadian Reprogramming of Tumor Transcriptome with Meal Timing. *Cancer Res.*;70(8):3351-60.

[38] Chung, S., Son, GH. e Kim , K. (2011). Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: Its regulation and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 1812(5):581-591.

[39] Jonhson, C. (2010). Circadian clocks and cell division. What's the pacemaker?. *Cell Cycle.* 9 (19): 3864-3873;

[40] Sahar, S. e Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nature Reviews Cancer* 9, 886-896;

[41] Kang, TH.; Reardon, JT.; Kemp, M., e Sancar A.(2009). Circadian oscillation of nucleotide excision repair in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA.*106 (8):2864-2867.

[42] Ikura, T.; Ogryzko, V.; Grigoriev , M. et al . (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell.*102(4):463-73.

- [43] Miyamoto, N.; Izumi, H.; Noguchi, T. et al. (2008) Tip60 is regulated by circadian transcription factor clock and is involved in cisplatin resistance. *J Biol Chem.* 283(26):18218-26.
- [44] Yuan, F.; Gu, L.; Guo, S. et al. (2004) Evidence for Involvement of HMGB1 Protein in Human DNA Mismatch Repair. *J Biol Chem.* **279**: 20935-20940.
- [45] Hoppe, G.; Rayborn, M e Sears, J. (2007) Diurnal rhythm of the chromatin protein Hmgb1 in rat photoreceptors is under circadian regulation. *J Comp Neurol.*; **501**: 219-230.
- [46] Wang, Y.; Hua, L.; Lu, C. et al. (2011). Expression of circadian clock gene human Period2 (hPer2) in human colorectal carcinoma. *World J Surg Oncol.* **9**:166.
- [47]- Winter, S.; Bosnoyan-Collins, L.; Pinnaduwege, D. et al. (2007). Expression of the Circadian Clock Genes Per1 and Per2 in Sporadic and Familial Breast Tumors. *Neoplasia* . 9 (10): 797 – 800.
- [48] Cao, Q.; Gery, S.; Dashti, A. et al. (2009). A role for the clock gene, Per1 in prostate cancer. *Cancer Res.*; 69(19): 7619–7625.
- [49] Hoffman, E.; Zheng, T.; Stevens, R. et al. (2009). Clock-Cancer Connection in Non-Hodgkin's Lymphoma: A Genetic Association Study and Pathway Analysis of the Circadian Gene Cryptochrome 2. *Cancer Res.* **69**:3605-3613.
- [50] Zmrzljak, U. e Rozman, D. (2012) Circadian regulation of endobiotic and xenobiotic detoxification pathways: the time matters. *Chem Res Toxicol.* 25(4):811-824.
- [51] Bernard, S., Bernard, B., Lévi, F., Herzel, H. (2009). Tumor Growth Rate Determines the Timing of Optimal Chronomodulated Treatment Schedules. *PLoS Comput Biol* 6(3): e1000712. doi:10.1371/journal.pcbi.1000712.
- [52] Altinok A.; Lévi, F. e Goldbeter, A.(2009). Identifying mechanisms of chronotolerance and chronoefficacy for the anticancer drugs 5-fluorouracil and oxaliplatin by computational modeling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **36**: 20–38.
- [53] Ballesta A; Dulong, S.; Abbara, C.; Cohen, B. et al. (2011) A Combined Experimental and Mathematical Approach for Molecular-based Optimization of Irinotecan Circadian Delivery. *PLoS Comput Biol* 7(9): e1002143.
- [54] Lévi, F.; Zidani, R.; Brienza, S. et al. (1999). A multicenter evaluation of intensified, ambulatory, chronomodulated chemotherapy with oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin as initial treatment of patients with metastatic colorectal carcinoma. International Organization for Cancer Chronotherapy. *Cancer*; 85(12):2532-2540.

[55] Giacchetti , S., Bjarnason, G., Garufi, et al . (2006) Phase III Trial Comparing 4-Day Chronomodulated Therapy Versus 2-Day Conventional Delivery of Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin As First-Line Chemotherapy of Metastatic Colorectal Cancer: The European Organisation for Research and Treatment of Cancer Chronotherapy Group. *J Clin Oncol.*;24(22):3562-3569.

[56] Bouchahda, M., Adam , R., Giacchetti, S. (2009). Rescue Chemotherapy Using Multidrug Chronomodulated Hepatic Arterial Infusion for Patients With Heavily Pretreated Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer*; **115**:4990–4999.