

I. Introdução

1. ADENOCARCINOMA COLO-RECTAL

O cancro é uma doença que se caracteriza pelo crescimento e divisão de uma população celular que ocorre sem respeitar os limites normais impostos pelo tecido envolvente. As células tumorais podem espalhar-se para outras partes do organismo através da corrente sanguínea e linfática formando novas colónias, num processo designado por metastização.

Esta doença pode iniciar-se praticamente em qualquer tecido do corpo humano. Deste ponto de vista, existem numerosos tipos diferentes de cancro, sendo os mais comuns, no sexo masculino, pulmão, próstata e adenocarcinoma colo-rectal, e, nas mulheres, pulmão, mama e adenocarcinoma colo-rectal (dados relativos à população dos EUA, em 2008) (Edwards *et al.*, 2010). Em Portugal as estatísticas nacionais mais recentes apontam cancro do cólon e recto como principal causa de morte oncológica (10 pessoas por dia, de acordo com os dados de 2005), o que representa uma fatia de 14% do total das mortes por cancro (Fontelonga e Davide, 2009).

O risco de desenvolver cancro colo-rectal nos Estados Unidos é de aproximadamente seis pessoas em cem. É um tipo de cancro relativamente pouco comum antes dos 50 anos, podendo no entanto ocorrer em qualquer idade. A taxa de incidência aumenta substancialmente a partir da sexta década de vida (Kufe *et al.*, 2003).

Aproximadamente 95% dos tumores colo-rectais malignos são adenocarcinomas. É aceite que a maioria dos adenocarcinomas do intestino deriva de adenomas, formados como consequência de alterações epiteliais. A transformação maligna demora vários anos e resulta da acumulação de numerosas alterações genéticas (Kufe *et al.*, 2003).

O adenocarcinoma colo-rectal caracteriza-se por ser uma patologia genética *multistep* cujo desenvolvimento é influenciado por diversos factores ambientais como a dieta, o estilo de vida e outros factores não genéticos (Arnold *et al.*, 2005). Também o tabaco constitui um factor etiológico de relevo nesta patologia (de la Chapelle, 2004). Assim, alterações na dieta e no estilo de vida poderão ajudar na prevenção desta patologia, para além de que pode trazer outros benefícios para a saúde (Kufe *et al.*, 2003).

O prognóstico do cancro colo-rectal está relacionado com o estadió da doença no momento de diagnóstico. Têm sido usadas várias classificações para caracterizar o adenocarcinoma colo-rectal (Kufe *et al.*, 2003). De acordo com o grau de invasão ou metastização, o desenvolvimento deste carcinoma caracteriza-se por uma sequência de fases que vão do estadió I (T1N0M0), quando o tumor está confinado à parede do intestino, ao estadió IV, quando existem metástases à distância (Watson, 2006).

O adenocarcinoma colo-rectal pode aparecer de forma esporádica, hereditária ou familiar. Na forma esporádica não se verifica qualquer predisposição familiar ou hereditária. Tem cerca de 70% de incidência e é comum em indivíduos com mais de 50 anos, surgindo provavelmente como consequência do factor idade e também de factores ambientais. Esta forma da patologia pode resultar da activação mutacional de oncogenes, da inactivação de genes supressores tumorais, de mutações somáticas em pelo menos quatro ou cinco genes de uma célula e/ou da acumulação de múltiplas mutações genéticas que determinam o comportamento biológico do tumor (Calvert e Frutch, 2002).

O adenocarcinoma colo-rectal familiar desenvolve-se muito frequentemente para ser considerado esporádico mas não de uma forma consistente como uma síndrome hereditária familiar comum. Mais de 25% dos casos de adenocarcinoma colo-rectal

identificam-se como pertencentes a esta categoria, estando associados na maioria das vezes, a uma mutação no gene APC (*adenomatous polyposis coli*) localizado no cromossoma 5 (Calvert e Frutch, 2002). A caracterização genética é fundamental para a despistagem da predisposição para esta patologia, assim como para a compreensão do seu desencadear e desenvolvimento (de la Chapelle, 2004). Alguns estudos demonstram que numerosos erros que ocorrem nas vias que controlam a apoptose acontecem durante o desenvolvimento do adenocarcinoma colo-rectal. Estas anomalias induzem mutações que tornam as células significativamente resistentes à morte por apoptose (Watson, 2006).

Menos de 10% dos doentes possuem uma predisposição hereditária para este tipo de tumor. As síndromas hereditárias incluem situações em que os pólipos cólicos podem ou não ser a manifestação *major*. As síndromas com polipose estão subdivididas em polipose adenomatosa familiar e em polipose hamartomatosas. As síndromas sem polipose predominante incluem o carcinoma colo-rectal hereditário sem pólipos também designado como síndrome de Lynch I e o carcinoma da síndrome familiar ou síndrome de Lynch II. Cada uma destas síndromas resulta de mutações específicas ocorridas na linha germinativa, geralmente nos genes MMR (*mismatch repair*), mais especificamente hMLH1 (*human MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2*) ou hMSH2 (*human mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1*) (Calvert e Frutch, 2002).

A alteração carcinogénica das células está associada à aquisição de autonomia, de crescimento descontrolado e de insensibilidade a sinais inibitórios, adquirindo capacidade de replicação ilimitada. Para além disto, as células tumorais produzem factores angiogénicos que estimulam a formação de novos vasos que, para além de nutrir e oxigenar o tumor, contribuem para os processos de disseminação e metastização. As células tumorais escapam assim aos mecanismos naturais de controlo,

os quais, em condições normais, conduziriam à morte da célula (Hanahan e Weinberg, 2000; Yu e Zhang, 2004).

Vários autores defendem que o desenvolvimento tumoral ocorre de uma forma gradual, com a progressiva acumulação de alterações genéticas e epigenéticas. Neste processo, prevalecem as células com vantagem no crescimento e/ou na sobrevivência, dando origem a sucessiva expansão clonal da população de células tumorais. São os efeitos acumulados e combinados destas alterações que levam a uma completa conversão tumorigénica (Axelson *et al.*, 2005).

Para o sucesso do tratamento do cancro é essencial que o diagnóstico seja precoce, pois, caso exista evolução do processo de metastização a doença torna-se fatal. As terapêuticas convencionais, como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia são eficazes mas falta-lhes a selectividade necessária para destruir as células tumorais espalhadas pelo organismo, para além do tumor primário. Tanto a quimioterapia como a radioterapia têm consequências ao nível do organismo, e não apenas no tecido tumoral, e por isso têm efeitos secundários relevantes que causam elevado mal-estar aos doentes. O desenvolvimento de novos protocolos de tratamento que envolvam uma discriminação entre as células malignas e os tecidos normais é muito importante. Algumas terapêuticas recentes são a inibição da angiogénese, a terapia génica, a terapia fotodinâmica e outras terapias direccionadas.

2. TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) é uma modalidade terapêutica prometedora, minimamente invasiva, que apesar de ter sido proposta para uso em oncologia há cerca de 25 anos apenas recentemente começou a ser utilizada clinicamente (Agostinis *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2004; Yslas *et al.*, 2007).

A primeira aplicação clínica da PDT foi descrita por *von Tappeiner* e *Jesionek* em 1903, que consistiu na aplicação de eosina seguida de iluminação em doentes com basalioma. No entanto, passaram mais 70 anos até que a possibilidade de tratamento de patologias cancerosas com a PDT fosse reconhecida (Triesscheijn *et al.*, 2006).

Em 1975, *Dougherty et al.* publicaram um estudo que mostrava que a administração de derivados da hematoporfirina (HpD), seguida de iluminação com luz vermelha, podia eliminar o crescimento tumoral em mamas de rato (Triesscheijn *et al.*, 2006). Em 1976, ocorreu outro desenvolvimento importante para a história da PDT. Um urologista investigou o efeito da PDT em tumores da bexiga e demonstrou que células tumorais humanas transplantadas para ratinhos podiam ser destruídas recorrendo à PDT. No entanto, células normais ou células musculares lisas sofriam danos mínimos ou inexistentes. Foi a partir do entusiasmo dos resultados destes estudos animais que se fizeram os primeiros ensaios em doentes em que as terapêuticas convencionais falharam (Mitton e Ackroyd 2008).

Tabela I: Fotossensibilizadores aprovados

Nome Comercial	Nome Químico	Potenciais Indicações	Aprovações
Photofrin, Porfimer Sodium	Derivado da hematoporfirina, Poli-hematoporfirina	Displasia de Barrett	Canadá, EUA, UE
		Cancro endobrônquico	Alemanha, Canadá, Dinamarca, EUA, Finlândia, França, Holanda, Irlanda, Japão, Reino Unido
		Cancro do Esófago	Canadá, Dinamarca, EUA, Finlândia, França, Holanda, Irlanda, Japão, Reino Unido
		Cancros Gástricos, Displasia e Cancro do Colo do Útero	Japão
		Cancro da Bexiga	Canadá
Foscan, Temoporfin	Meso-tetrahidroxienil clorina	Cuidados Paliativos de Cancros da Cabeça e Pescoço	Islândia, Noruega, UE
Levulan	Ácido aminolevulinico	Queratose Actínica	EUA, UE
Metvix	Ácido metilaminolevulinico	Basalioma	Austrália, UE
Hexvix	Ácido Hexilaminolevulinico	Cancros da Bexiga	EU
Laserphin Talaporfin Sodium	Mono-L-Aspartil-Clorina e6	Cancro do Pulmão	Japão
Verteporfin, Vysudine	Derivado mono-ácido da benzoporfirina	Basalioma	
Photosense	Ftalocianina sulfonada de alumínio	Cancro da Cabeça e Pescoço	Russia

Os primeiros ensaios clínicos foram realizados com HpD para tratar pacientes com tumores da pele e cancro da bexiga. Depois destes estudos de sucesso, iniciaram-se numerosos ensaios clínicos que envolveram vários tipos de cancro e substâncias fotossensibilizadoras (Triesscheijn *et al.*, 2006).

Em 1993, a PDT baseada em HpD foi aprovada pela primeira vez, no Canadá, para o tratamento de cancro da bexiga, tendo sido posteriormente aprovada também nos EUA e na Europa. Hoje, existem já diversos fotossensibilizadores (FS) aprovados em vários países para diferentes tipos de cancro e também para várias doenças não malignas (Plaetzer *et al.*, 2009), que estão sistematizados na tabela I.

2.1. REACÇÃO FOTODINÂMICA

A PDT baseia-se na administração de uma substância fotossensibilizadora seguida de iluminação local do tumor com luz de comprimento de onda apropriado para activar o fármaco. A activação do fármaco por absorção de luz induz a passagem da molécula de um estado fundamental (^1FS) para um estado excitado ($^1\text{PS}^*$). Neste estado a molécula pode reverter ao estado fundamental com emissão de luz por fluorescência e, neste caso, não existe efeito fotodinâmico, ou se possuir características apropriadas, passar, por cruzamento intersistema, a um estado excitado tripleto ($^3\text{FS}^*$) em que a molécula é capaz de reagir com o oxigénio molecular originando oxigénio singleto (Hopper, 2000; Ortel *et al.*, 2009; Triesscheijn *et al.*, 2006), como mostra o esquema da figura 1. Os fotossensibilizadores assim activados, em presença de oxigénio, podem induzir alterações nas moléculas vizinhas por duas vias designadas reacção fotodinâmica do tipo I e reacção fotodinâmica do tipo II (Plaetzer *et al.*, 2009).

A molécula fotossensibilizadora excitada ($^3\text{FS}^*$) pode reagir com substratos intracelulares formando radicais livres que por sua vez reagem com o oxigénio formando espécies reactivas de oxigénio (ROS) que induzem a morte celular (Triesscheijn *et al.* 2006; Hopper 2000; Ortel *et al.* 2009). Nesta reacção, designada do tipo I, ocorre transferência de electrões ou prótons para moléculas celulares de modo a formar radicais anião (substrato $^{-*}$) ou catião (substrato $^{+*}$), respectivamente. Estes radicais, por sua vez, podem reagir com o oxigénio formando ROS. Esta reacção frequentemente resulta na formação de aniões superóxido (O_2^-) por transferência de um electrão do FS^{-*} para o oxigénio molecular. Os aniões superóxido, em sistemas biológicos, reagem com a água de forma a produzir peróxido de hidrogénio (H_2O_2). O peróxido de hidrogénio pode passar através das membranas celulares, e deste modo

pode provocar danos que não são confinados a um compartimento e, por este motivo, são muito relevantes. Em concentrações mais elevadas o anião superóxido (O_2^-) pode formar radicais hidroxilo (OH^\cdot), altamente reactivos que atacam e oxidam qualquer molécula biológica. Na presença de iões metálicos como o cobre ou o ferro podem também ser produzidos radicais hidroxilo pela reacção de Fenton (Plaetzer *et al.*, 2009; Ortel *et al.*, 2009).

A transferência de energia (não electrões) para o oxigénio molecular, designada tipo II, produz oxigénio singlete, uma espécie altamente reactiva (1O_2) e que é a principal ROS implicada no processo foto-oxidativo da PDT (Hopper, 2000; Ortel *et al.*, 2009; Triesscheijn *et al.*, 2006).

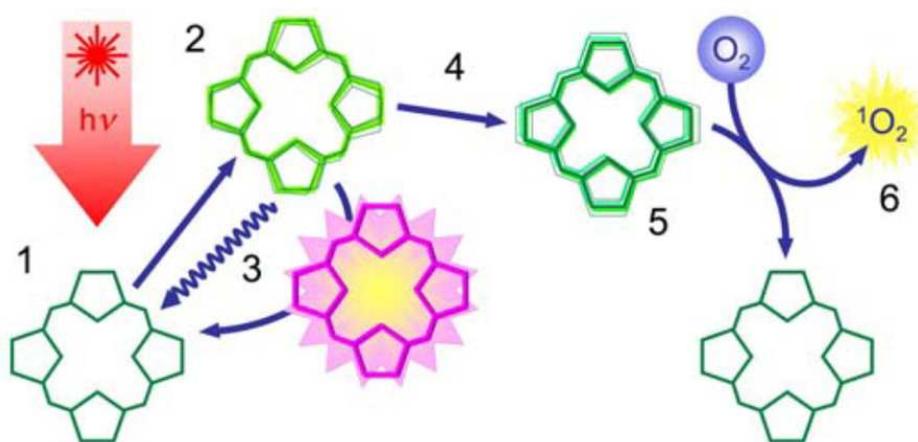


Figura 1: Esquema simplificado da reacção de fotossensibilização da PDT. O fotossensibilizador no estado fundamental (1) absorve luz ($h\nu$) e entra no primeiro estado excitado singlete (2). Esta espécie de vida curta pode libertar energia na forma de luz fluorescente ou na forma de energia vibracional (3) quando o fotossensibilizador volta ao estado basal. O fotossensibilizador no estado excitado singlete também pode passar ao estado excitado tripleto (4). O estado excitado tripleto do fotossensibilizador pode transferir energia (5) para o oxigénio molecular formando oxigénio singlete (6). Retirado de Ortel *et al.*, 2009.

Estas reacções (tipo I e II), que estão todas representadas no esquema da figura 2, ocorrem em paralelo e a sua extensão depende de factores como o fotossensibilizador e a concentração de oxigénio na célula. Para a maior parte dos fotossensibilizadores a reacção do tipo II é dominante (Ortel *et al.*, 2009).

Durante todo este processo, a substância fotossensibilizadora regenera-se podendo funcionar de forma catalítica, ou seja, podem produzir-se vários ciclos de formação de oxigénio singlete por cada molécula de sensibilizador (Brown *et al.* 2004). A formação de oxigénio singlete através activação do fármaco pela luz apenas junto aos alvos de tratamento minimiza os efeitos secundários dos fármacos sistémicos comuns, assim como da radiação ionizante utilizada em radioterapia (Jiménez-Banzo *et al.*, 2008).

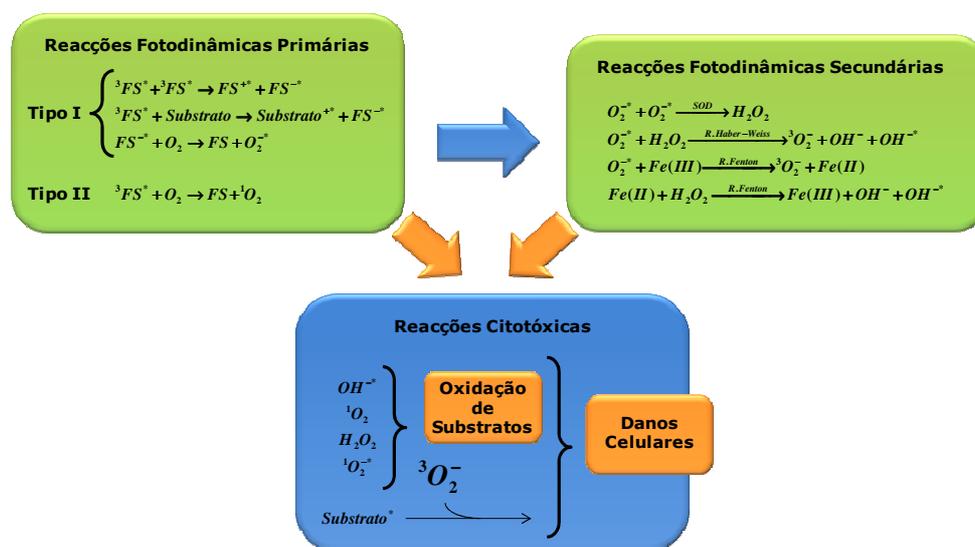


Figura 2: As reacções fotodinâmicas da PDT. Várias reacções, primárias e secundárias, têm como produto ROS e danos celulares que dependem da extensão dessas reacções. H_2O_2 , peróxido de hidrogénio; 1O_2 , oxigénio singlete; ${}^3O_2^-$, oxigénio tripleto, estado basal; $O_2^{\bullet -}$, anião superóxido; OH^{\bullet} , radical hidroxilo; SOD, superóxido dismutase; $X^{-/+}$, espécies anião/catião; X^{\bullet} , espécies radicalares. Adaptado de Plaetzer *et al.*, 2009.

O mecanismo de acção da PDT é dependente de vários factores incluindo o tipo celular, os níveis de ATP, a potência e a energia total recebida da luz ou a localização intracelular do fotossensibilizador (O'Connor *et al.*, 2009).

Na prática clínica, o fotossensibilizador é injectado e distribui-se por todo o organismo acumulando-se preferencialmente no tumor. Os mecanismos responsáveis por esta acumulação preferencial não estão completamente esclarecidos, no entanto, vários trabalhos apontam para algumas hipóteses explicativas, que são discutidas mais à frente. Após um período subsequente à injeção, ideal à retenção no tumor, enquanto o resto do organismo elimina o fotossensibilizador mais rapidamente, é realizada a irradiação. A irradiação é feita preferencialmente com luz vermelha de modo a permitir maior penetração nos tecidos. O tumor é destruído e o tecido regenera-se com alguma cicatrização (Ortel *et al.*, 2009). A figura 3 representa um esquema deste processo.

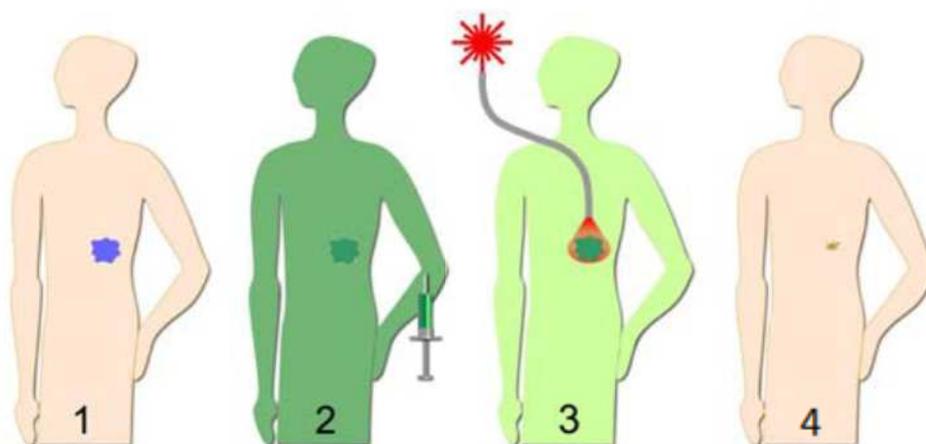


Figura 3: A PDT na clínica. Um paciente com um tumor maligno sólido (1) recebe uma injeção intravenosa com o fotossensibilizador (2) que se distribui por todo o organismo e localiza preferencialmente no tumor. Durante o período de espera o fotossensibilizador é eliminado da maior parte do organismo mas é retido pelas células tumorais. Após exposição à luz (3) o tumor regride ao longo do tempo com mínima cicatrização (4). Adaptado de Ortel *et al.*, 2009.

A dupla selectividade desta terapêutica, captação e retenção preferencial do fotossensibilizador no tumor associada à administração localizada da luz, permite minimizar os danos nos tecidos adjacentes. A PDT não é genotóxica e a repetição do tratamento não resulta em toxicidade cumulativa. Para além disso nem o fotossensibilizador nem a irradiação interferem com outros fármacos anti-neoplásicos, podendo realizar-se em combinação com outras metodologias de tratamento, o que aliás tem vindo a ser crescentemente sugerido ao nível da investigação pré-clínica (Gomer *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2007).

2.2. VANTAGENS E LIMITAÇÕES

A PDT tem várias vantagens em relação às terapêuticas convencionais. É um tratamento menos invasivo, que requer uma única administração e uma única iluminação. Esta terapia, em vários casos, pode ser realizada em regime de ambulatório. O mesmo acontece com a radioterapia ou a quimioterapia, no entanto, os períodos de tratamento são muito mais longos.

A natureza localizada do tratamento fotodinâmico deve ser reconhecida, uma vez que se por um lado contribui para as suas limitações, na medida em que não permite tratar doença disseminada, por outro lado pode também ser uma oportunidade de estabelecer uma terapêutica de sucesso contra o cancro uma vez que, a actuação da terapêutica apenas na região do tumor a tratar, minimiza os efeitos secundários típicos das terapêuticas convencionais. Apesar de ser limitado o tratamento da doença avançada, disseminada pelo organismo com esta terapêutica, mesmo nestes casos, a PDT pode melhorar a qualidade de vida e a sobrevivência dos doentes. Por outro lado,

para a doença inicial, a PDT é uma terapêutica com numerosas vantagens, nomeadamente a sua selectividade minimiza os efeitos secundários e um único procedimento pode resultar na extinção do tumor (Brown *et al.* 2004).

A principal limitação da PDT é a necessidade dos pacientes permanecerem em luz fraca durante algum período de tempo e evitar a exposição directa aos raios solares durante alguns dias. No entanto para evitar a fotossensibilidade da pele e minimizar outros efeitos secundários é importante ter em conta a concentração do fotossensibilizador, a potência e a energia total da luz administrada (Plaetzer *et al.*, 2009).

O tratamento fotodinâmico é aplicável mesmo em áreas previamente expostas a radiação ionizante, pode tratar várias lesões em simultâneo e o tempo de recuperação do tratamento é reduzido.

Outra vantagem da PDT é que o tratamento pode ser repetido em caso de recorrência ou formação de um novo tumor primário numa área previamente tratada, sem risco de dano dos tecidos normais circundantes ou de desenvolvimento de resistência à terapia. Este segundo tratamento torna-se complicado tanto para a cirurgia como para a quimio e/ou radioterapia (Triesscheijn *et al.*, 2006; Hopper, 2000).

Vários ensaios clínicos têm demonstrado que a PDT pode obter baixa taxa de morbilidade, para além de bons resultados funcionais e estéticos/cosméticos (Hopper, 2000). A PDT poupa a arquitectura dos tecidos porque não danifica elementos celulares como o colagénico e a elastina, preservando a matriz que serve de suporte à regeneração do tecido, permitindo também a recuperação sem formação de cicatriz (Grant *et al.* 1997; Verrico *et al.* 2001). Uma vantagem da limitada penetração da luz é a protecção dos tecidos normais circundantes em relação à fototoxicidade. Os comprimentos de onda utilizados na terapêutica podem induzir morte celular num raio máximo de 10mm

da zona iluminada (Triesscheijn *et al.*, 2006). Em contraste, a cirurgia e a radioterapia podem ser altamente mutiladoras das estruturas circundantes da área a tratar.

Foram realizados vários estudos relativos à PDT e esta terapêutica provou ter resultados comparáveis, e um custo/benefício positivo, em relação às terapêuticas convencionais (Mitton e Ackroyd, 2008). A PDT pode ainda ser utilizada em combinação com outras terapias, nomeadamente após remoção cirúrgica (Triesscheijn *et al.*, 2006).

Um dos aspectos mais promissores da PDT é a constatação que em modelo animal, muitas das substâncias fotossensíveis são retidas nos tumores em concentrações mais elevadas do que nos tecidos normais. Por outro lado, em casos de baixa selectividade dos fotossensibilizadores existem já algumas propostas para ultrapassar este problema. Foram propostos fotossensibilizadores imunoconjugados que consistem na combinação com um anticorpo monoclonal específico para um marcador celular sobre-expresso no tecido. Alguns estudos *in vitro* já demonstraram a utilidade dos fotossensibilizadores imunoconjugados e a lista de marcadores continua a expandir-se, incluindo o antigénio carcinoembrionário, o antigénio CD20 (*B-lymphocyte antigen CD20*), EGFR (*epidermal growth factor receptor*), HER-2 (*human epidermal growth factor receptor 2*), várias interleucinas e fragmento específico de tumor scFv (*single-chain variable fragment*). No entanto, ainda não existem estudos clínicos utilizando estes fotossensibilizadores (Qiang *et al.*, 2007).

Entre a reacção fotodinâmica inicial e a resposta terapêutica ocorre uma sequência de efeitos moleculares que determinam a resposta imediata ao nível do tecido e o resultado terapêutico a longo prazo. Estes eventos afectam a expressão genética, a neovascularura, as vias de morte, e a imunidade tumoral (Ortel *et al.*, 2009). As vias de actuação da PDT no tumor estão esquematizadas na figura 4.

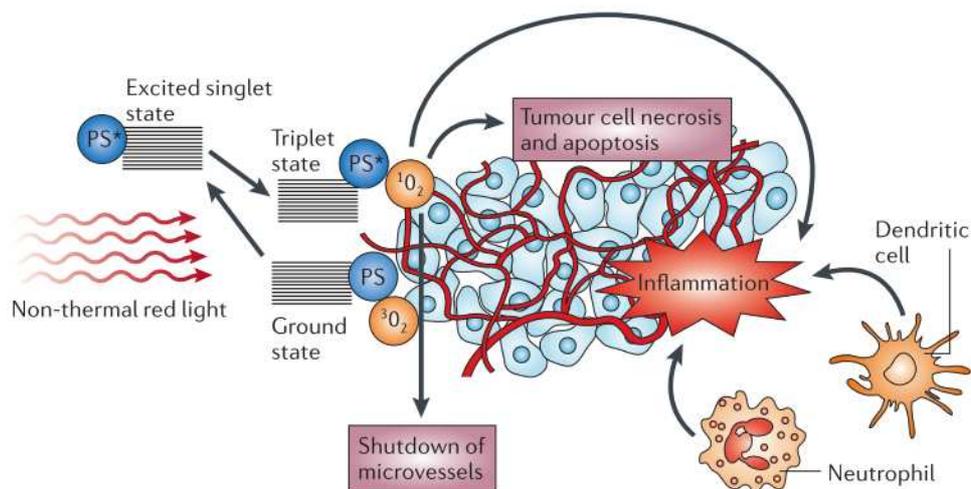


Figura 4: Acção da PDT no tumor. O fotossensibilizador absorve luz e passa ao estado tripleto. O fotossensibilizador no estado tripleto transfere energia para o oxigénio, produzindo oxigénio singleto (1O_2). O 1O_2 que pode induzir morte nas células tumorais directamente por apoptose ou necrose ou pode destruir a vasculatura e produzir resposta inflamatória aguda que atrai leucócitos para o local. Retirado de Castano *et al.*, 2006.

2.3. MORTE CELULAR

A PDT direccionada para o cancro resulta na destruição de células num processo dependente de radicais oxidativos que é capaz de activar as vias de morte celular (Huang *et al.*, 2008). A consequência desejada da PDT é a citotoxicidade letal que pode terminar na morte celular por diversas vias: apoptose, autofagia e necrose (figura 5). A via que predomina depende das características do tratamento, principalmente do fotossensibilizador, da sua concentração, da potência e da energia total recebida da luz (Ortel *et al.*, 2009). No entanto, vários outros factores, tais como o genótipo celular, a localização subcelular do fotossensibilizador e a pressão de oxigénio também podem ser determinantes (Huang *et al.*, 2008).

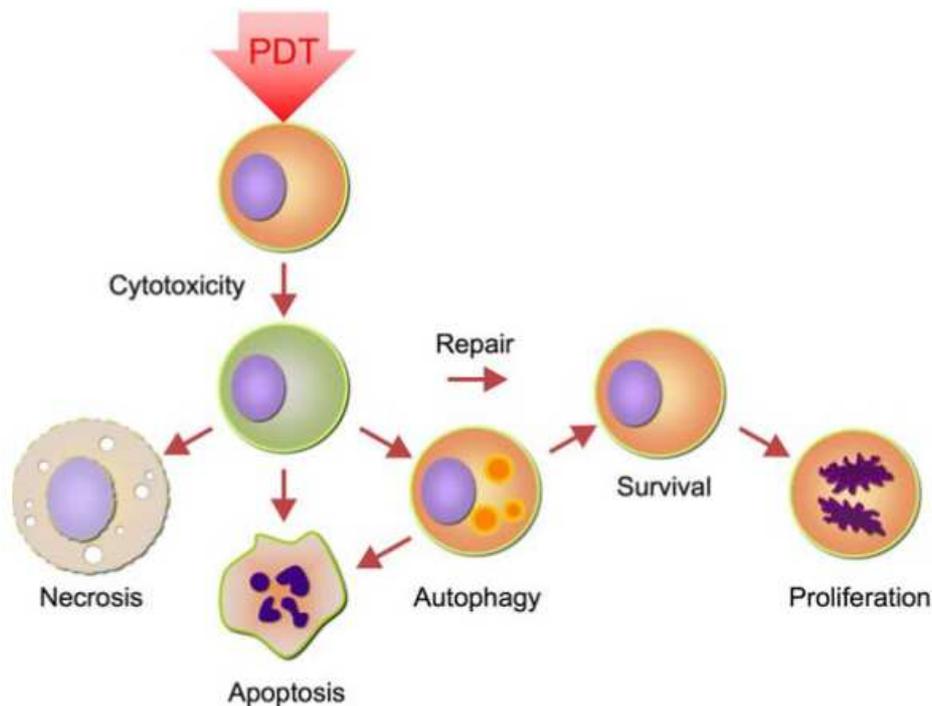


Figura 5: Vias de morte celular. A exposição à PDT provoca danos celulares que podem resultar na indução de vias de morte. Na prática pode ser encontrada uma combinação destas vias. Retirado de Ortel *et al.*, 2009.

Em geral o tipo de morte alterna entre apoptose e necrose quando a intensidade do tratamento fotodinâmico é excessiva, produzindo rápida lise celular em vez de morte celular organizada e programada (Dougherty *et al.*, 1998; Leist e Nicotera, 1997; Robertson *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 1993).

Nos últimos anos, houve um aumento da compreensão do papel da sinalização intracelular em resposta à PDT, e particularmente nas vias de indução de apoptose. Ambas as vias apoptóticas, a extrínseca, que envolve receptores celulares e a caspase 8, e a intrínseca, em que a função mitocondrial é perturbada, podem ser activadas (Kolárová *et al.*, 2007; Kuimova *et al.*, 2007; Moor, 2000). Recentemente demonstrou-se que a autofagia poderá ser outra via de morte celular induzida por PDT,

particularmente, quando os fotossensibilizadores se localizam no retículo endoplasmático (Kessel e Reiners, 2007; O'Connor *et al.*, 2009).

Para além de activar a maquinaria celular responsável por vias de morte, a PDT pode ainda iniciar reacções metabólicas que protegem as células dos danos oxidativos. Assim, sugeriu-se que o controlo destes mecanismos poderia melhorar a citotoxicidade mediada por PDT nas células alvo (Verma *et al.*, 2007).

No geral, evidências experimentais mostram uma larga heterogeneidade entre os mecanismos que levam à morte celular mediada pela PDT. Os avanços na compreensão da biologia molecular da PDT contribuem para a racionalização dos protocolos de tratamento e escolha dos fármacos, no entanto, a avaliação destes parâmetros depende principalmente na resposta clínica da lesão à terapêutica (Huang *et al.*, 2008).

2.3.1. APOPTOSE

A apoptose é um tipo de morte celular altamente estudado que tem um papel fundamental no desenvolvimento, na homeostase celular e no cancro. Uma falha ao nível das vias apoptóticas pode levar a danos irremediáveis e existem vias redundantes para preservar esta função celular crítica (Lodish *et al.*, 2000; Ortel *et al.*, 2009).

Tendo em conta as suas características, a indução de apoptose é o objectivo da maior parte dos regimes usados em PDT. A apoptose pode ser activada quer por via extrínseca, que envolve receptores da membrana celular, quer por via intrínseca onde a mitocôndria desempenha um papel central, como podemos ver no esquema da figura 6. Ambas as vias convergem num passo crítico de activação das caspases, uma família de

proteases específicas de aspartato dependentes de cisteína, que são executoras da apoptose (Buytaert *et al.*, 2007; Plaetzer *et al.*, 2005).

A via extrínseca depende de receptores da membrana celular, nomeadamente o receptor para o TNF (*tumor necrosis factor*), o TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*) ou o Fas (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*) que após activados interagem com um complexo oligomérico iniciador das pró-caspases 8/10 resultando em activação por clivagem proteolítica. As caspases 8/10 activadas clivam as pró-caspases 3/7 que executam o programa apoptótico. Simultaneamente a caspase 8/10 pode activar a proteína bid (*BH3 interacting domain death agonist*) da família Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma*) que activa a via intrínseca da apoptose (Ortel *et al.*, 2009).

A via dominante de actuação da apoptose mediada por PDT é a intrínseca. Os primeiros eventos incluem perda do potencial de membrana mitocondrial, libertação do citocromo-C e sua associação com Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*) com formação do apoptossoma heptamérico que integra a pró-caspase 9, levando à sua clivagem e activação. A caspase 9 cliva e activa as caspases 3/7 e a via termina no mesmo destino metabólico que a via extrínseca (Ortel *et al.*, 2009).

A proteína anti-apoptótica Bcl-2 demonstrou propriedades protectoras em relação à apoptose induzida pela PDT e a utilização de agonistas da Bcl-2 associados ao tratamento fotodinâmico mostrou aumentar a eficiência da indução de apoptose (Xue *et al.*, 2008; He *et al.*, 1996).

As proteínas Smac/DIABLO (*Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with low isoelectric point*) interferem com a inibição exercida por uma família de proteínas designadas inibidores da apoptose (IAP), como é o caso da inibição da survivina sobre a pró-caspase 9, tornando-a disponível

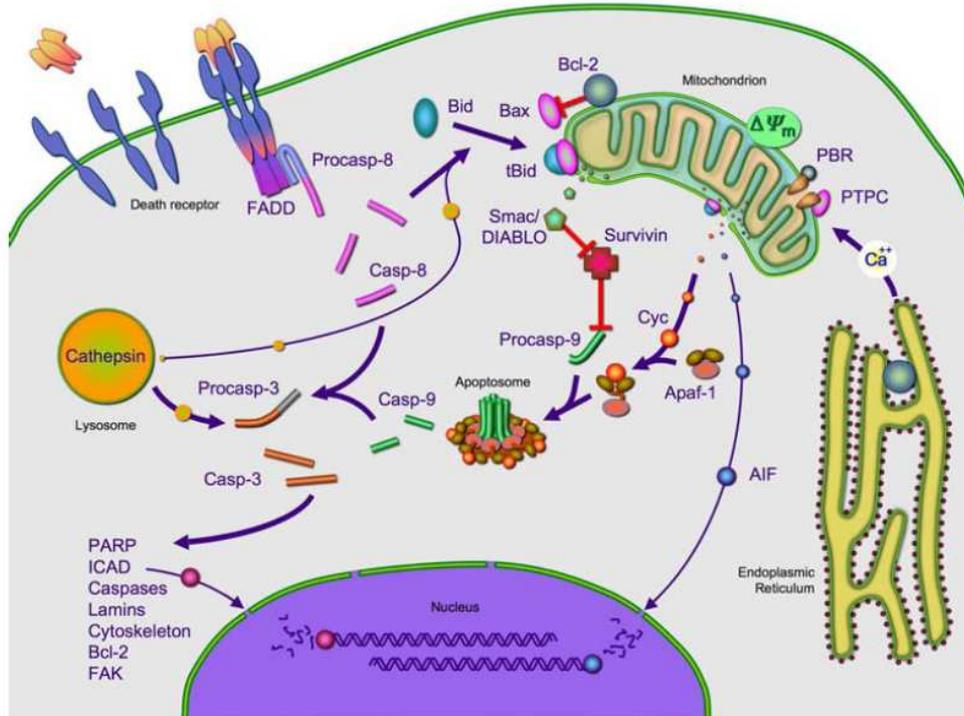


Figura 6: Passos e componentes da apoptose que foram associados à PDT. As moléculas análogas estão representadas por famílias típicas. Por exemplo, a família de proteínas Bcl-2 inclui um grande número de moléculas responsáveis por promover e inibir a apoptose a nível mitocondrial, no entanto, apenas a Bcl-2, a bax, e a bid estão representadas neste esquema. AIP: factor inibidor da apoptose, Bid e Bax: membros da família Bcl-2, Casp: caspase, FADD: proteína com domínio de morte associada a Fas, FAK: cinase de adesão focal 1, ICAD: inibidor da Dnase (*deoxyribonuclease*) activada pela caspase-3, PARP: polimerase poli-ADP ribose, Procasp: pró-caspase, PBR: receptor de benzodiazepina periférico, PTPC: complexo de poro de permeabilidade transicional. Retirado de Ortel *et al.*, 2009.

para integrar o apoptossoma. Em muitos cancros foi documentada sobre-expressão da survivina, constituindo um factor de prognóstico desfavorável (Ortel *et al.*, 2009).

A hierarquia de eventos moleculares é controversa e pode ser diferente dependendo da localização do fotossensibilizador e do protocolo de tratamento. A alteração do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) parece ser evento central e início do mecanismo. Esta etapa é sensível ao aumento de iões de cálcio no citoplasma que é uma consequência da fotossensibilização do retículo endoplasmático (ER). A maior parte dos

fotossensibilizadores não se localiza apenas num organelo celular, podendo associar-se a vários tipos de membranas. Neste caso, a fotossensibilização directa da mitocôndria pode ter um efeito sinérgico com os danos introduzidos pelo aumento de cálcio como consequência da fotossensibilização do ER (Buytaert *et al.*, 2007).

2.3.2. AUTOFAGIA

A autofagia é um processo rigidamente controlado em que componentes celulares (incluindo organelos inteiros) são captados para vesículas membranares que se fundem com lisossomas para degradação e reaproveitamento dos seus componentes. Este processo é fundamental nos processos de desenvolvimento, ocorrendo também em casos de doenças humanas, e como resposta celular à privação de nutrientes (Klionsky, 2005).

Recentemente demonstrou-se que a autofagia pode ocorrer em resposta à PDT podendo representar uma tentativa da célula remover organelos lesados pela geração de ROS. Provavelmente devido à elevada importância atribuída à apoptose e à celeridade do processo, a ocorrência da autofagia como resposta à reacção fotodinâmica só foi recentemente postulada (Ortel *et al.*, 2009). Nestes estudos recentes, concluiu-se que a morte celular autofágica se torna mais prevalente e detectável nos casos em que a maquinaria apoptótica está prejudicada ou em baixas doses de PDT (Kessel *et al.*, 2006). Ainda não foi determinado se a autofagia é uma ocorrência regular na PDT e quais os mecanismos de interacção com a apoptose. No entanto, o processo de autofagia tem potencialmente implicações para o desenvolvimento da imunidade tumoral após PDT pelo facto de a exposição de antígenos ser uma consequência natural do processamento lisossómico (Ortel *et al.*, 2009).

2.3.3. NECROSE

A necrose é uma forma violenta e rápida de degeneração que afecta populações generalizadas de células. Caracteriza-se pelo edema celular e destruição dos organelos, e pelo rompimento da membrana plasmática, levando à libertação do conteúdo intracelular e, conseqüentemente, inflamação (Robertson *et al.*, 2009)

Há uma distinção entre a necrose tissular e a necrose resultante de activação de vias moleculares. Na maioria das aplicações clínicas e experimentais *in vivo*, a disrupção vascular resulta em necrose tissular e domina a resposta clínica do tumor (McMahon *et al.*, 1994). Ao nível celular, a necrose caracteriza-se por um aumento de volume dos organelos e ruptura da membrana citoplasmática (Ortel *et al.*, 2009). Alguns investigadores defendem que existem caminhos moleculares distintos que resultam em necrose, e que têm como principais reguladores as proteínas relacionadas com a via do TNF (*tumor necrosis factor*), o RIP-1 (*receptor interacting protein*) e a ciclofilina D (Golstein e Kroemer, 2007). Na morte celular por necrose também intervêm proteínas como a PARP (*poly-ADP ribose polymerase*), calpaínas e catepsinas, no entanto não foi estabelecida nenhuma associação firme com a terapia fotodinâmica (Buytaert *et al.*, 2007). O efeito diferencial mais importante de necrose *versus* autofagia e apoptose é que a necrose provoca a inflamação do tecido (Castano *et al.*, 2006). Conceptualmente, a inflamação aguda é um processo favorável, uma vez que pode impulsionar a resposta imune anti-tumor (Korbelik, 2006).

Para além da morte das células tumorais pela acção directa da reacção fotodinâmica está também comprovado que a PDT pode ter ainda efeitos indirectos. A deterioração da vascularização do tumor e dos tecidos circundantes pode ser induzida, resultando em morte tumoral indirecta, como consequência da indução de hipoxia e privação de

nutrientes. Para além destas vias, a PDT pode ainda iniciar uma resposta imune do organismo contra o tumor. A contribuição de cada uma destas vias de indução de morte é de grande importância e depende de regime de tratamento administrado (Gollnick e Brackett, 2010).

2.4. VASCULARIZAÇÃO

O crescimento tumoral depende do funcionamento da vasculatura que fornece oxigénio e nutrientes. Danos selectivos na microvasculatura existente podem prevenir a formação de novos vasos sanguíneos e aumentar a eficácia do tratamento. Sabe-se que a PDT pode causar o colapso da microcirculação causando severa hipóxia tissular (Bhuvanewari *et al.*, 2009).

Cada vez mais a investigação de substâncias fotossensíveis tem como objectivo seleccionar moléculas com elevada selectividade para as células tumorais. No entanto, tem aumentado o interesse para outra modalidade, a PDT direccionada para a vascularização sanguínea. Se inicialmente se pensou que o momento ideal para a iluminação seria quando a concentração do fármaco é elevada no tumor em relação aos tecidos normais, verificou-se que em alguns casos a concentração da molécula fotossensibilizadora no sangue poderá ser um melhor indicador. Isto mostra que as células tumorais poderão nem sempre ser os alvos directos da PDT, ou seja, a morte tumoral poderá resultar de danos noutros tipos de células como as células endoteliais próximas (Triesscheijn *et al.*, 2006). Na PDT anti-neovascularização, pretende-se que o fotossensibilizador tenha selectividade mínima para o tumor e rápida depuração. A irradiação ocorre enquanto o fármaco ainda circula nos compartimentos vasculares e

pretende-se provocar a trombose e oclusão de microvasos, de forma a induzir a ablação tumoral pela supressão do aporte de nutrientes e oxigénio. Nesta modalidade da PDT têm sido usados derivados da PDbacterioclorofila, nomeadamente o WST09 ou *Tookad* e o WST11 (Brandis *et al.*, 2005).

2.5. RESPOSTA IMUNE

Apesar de a PDT ser inicialmente considerada uma terapêutica local, vários estudos indicam que pode resultar em neutrofilia sistémica, indução de proteínas da fase aguda, aumento dos níveis de complemento e libertação sistémica de citocinas pró-inflamatórias. Estudos recentes em murganhos mostraram que a PDT pode induzir resposta inflamatória anti-tumor (Gollnick e Brackett, 2010). O colapso dos tumores tratados com a PDT em que é induzida necrose tissular ocorre no prazo de 24 horas. No entanto, a clampagem total de tumores subcutâneos imediatamente após o tratamento impede a ablação dessas lesões. Isto demonstra que a interacção do hospedeiro é essencial na ablação tumoral mediada pela PDT (Korbelik, 2006).

A resposta imune à PDT está agora bem documentada e mostra melhorar a eficácia da PDT *in vivo* (O'Connor *et al.* 2009). Têm sido encontradas células do sistema imune no estroma tumoral, separadas das células tumorais por membranas basais e componentes da matriz extra-celular. Estas e outras evidências mostram que a PDT parece destruir a estrutura do tumor por activação da interacção directa entre células imunitárias e células tumorais. A PDT tem sido apontada com uma forma de vacinação *in situ* capaz de induzir uma reacção sistémica anti-tumor (van Duijnhoven *et al.*, 2003).

Uma maior compreensão da resposta do hospedeiro prevê o desenvolvimento de mecanismos úteis para melhorar a eficácia do tratamento clínico com PDT.

A resposta imunitária induzida pela PDT está representada na figura 7. Durante e após o tratamento fotodinâmico, ocorrem danos pró-inflamatórios ao nível das membranas celulares e vasos sanguíneos da área tratada o que parece recrutar células dendríticas, neutrófilos, mastócitos, monócitos e macrófagos. Estas células também libertam mediadores inflamatórios que aumentam o recrutamento massivo de células imunitárias ao local de tratamento (Qiang *et al.*, 2007). A PDT pode activar a expressão e produção de várias citocinas pro-inflamatórias como interleucinas (IL) e TNF- α , moléculas de adesão como E-selectina e ICAM-1 (*inter-cellular adhesion molecule 1*) (Bhuvanewari *et al.*, 2009; Qiang *et al.*, 2007). Um estudo recente mostrou que doentes submetidos a PDT adjuvante apresentam um aumento de IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 (Qiang *et al.*, 2007).

A exposição à PDT resulta na activação prolongada dos genes c-fos e c-jun que formam heterodímeros que regulam a expressão da proteína activadora AP1. A activação de AP1 é crítica para a proliferação, diferenciação e inflamação. Como resposta à activação de AP1 são produzidos mediadores da inflamação como por exemplo a IL-6 (Ortel *et al.*, 2009).

O envolvimento das citocinas na resposta imune induzida pela PDT mostra que a modulação desta terapêutica para a activação de mediadores inflamatórios e imunitários pode resultar não só na destruição do tecido tumoral, mas também contribuir para a eliminação de células tumorais no organismo e activar o sistema imunitário do hospedeiro contra o cancro prevenindo possíveis recorrências ou metástases

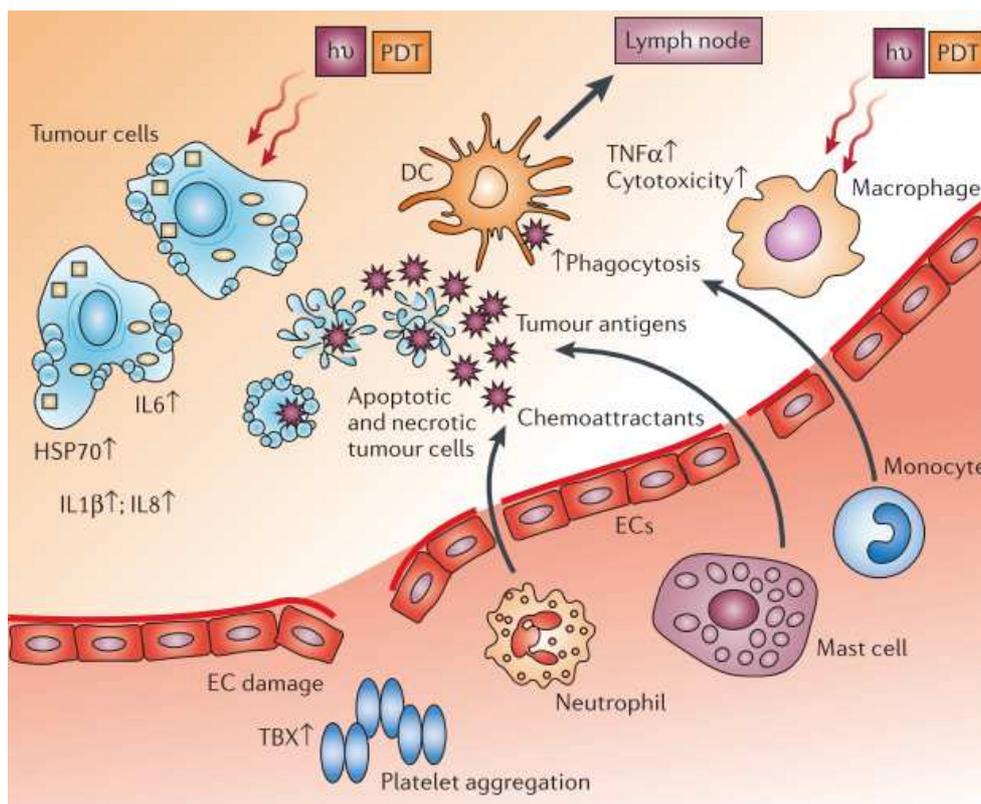


Figura 7: Inflamação induzida pela PDT. A ocorrência de danos nas células endoteliais (EC's) activa uma cascata de eventos que leva a inflamação local, dilatação dos vasos e agregação de plaquetas. Esta cascata causada principalmente pela libertação de tromboxanos (TBX), citocinas como a interleucina 1 β (IL1 β), IL6, IL8, produção de TNF- α , e infiltração da área tumoral tratada por células do sistema imune. As células tumorais que iniciam vias de necrose e apoptose expressam proteínas *Heat-Shock* (HSPs) e fornecem antígenos às células dendríticas (DCs) que migram para nódulos linfáticos. *hv*: luz. Retirado de Castano *et al.*, 2006.

(Gollnick e Brackett, 2010; Qiang *et al.*, 2007). Kabingu *et al.* (2007) demonstraram que o controlo do crescimento de tumores fora da área de tratamento é dependente da existência de um sistema imunitário intacto e é mediada por células CD8+.

A activação do complemento parece ter também um papel importante na resposta à PDT, pois em modelos animais em que o complemento foi bloqueado observou-se uma menor taxa de cura após o tratamento utilizando vários fotossensibilizadores (Korbelik, 2006). O aumento da actividade anti-tumor foi associada com a infiltração de linfócitos

CD8+, neutrófilos, e aumento de mediadores inflamatórios, nomeadamente: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, tromboxanos, prostaglandinas, leucotrienos e histamina (Ortel *et al.*, 2009).

2.6. ANGIOGÉNESE

A reacção fotodinâmica incompleta pode ter como consequência a angiogénese tumoral. O stresse oxidativo induzido pelo tratamento pode causar condições de hipóxia, que provocam, como resposta adaptativa, a expressão de factores angiogénicos e citocinas (Bhuvanewari *et al.*, 2009). Apesar dos danos ao nível da vascularização contribuírem grandemente para a resposta à terapia, a redução de oxigénio pode limitar o tratamento pela indução da produção de factores anti-angiogénicos como o VEGF (*vascular endothelial growth factor*), a ciclooxigenase-2 (COX-2), as metaloproteinases (MMP) e outras citocinas que podem contribuir para a recorrência (Bhuvanewari *et al.*, 2009).

O VEGF é um dos mais importantes reguladores da angiogénese, actuando como um gatilho que pode iniciar a recorrência ao promover a proliferação (Bhuvanewari *et al.*, 2009). Vários trabalhos reportaram a sobre-regulação do VEGF após o PDT. Em alguns deles, foi reportado o aumento da expressão de VEGF após o tratamento fotodinâmico com base em vários sensibilizadores: HpD, Photofrin® e hipericina. A hipóxia e o stresse oxidativo mediados pelo tratamento podem estar envolvidos na expressão de HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor 1 alpha*) e no aumento dos níveis de HIF-1, alvo do gene do VEGF (Bhuvanewari *et al.*, 2009).

As ciclooxigenases (COX) estão envolvidas na síntese de prostaglandinas e a isoforma indutível, COX-2, está relacionada com a carcinogénese e a progressão tumoral em múltiplos órgãos (Bhuvanewari *et al.* 2009; Ortel *et al.* 2009). A COX-2 induz a angiogénese, principalmente, através da produção de VEGF e da promoção do crescimento e da migração de vasos sanguíneos. A expressão prolongada de COX-2 foi detectada após o tratamento fotodinâmico em vários estudos, em PDT baseado em porfirinas, clorinas ou hipericina. A relevância funcional destas enzimas foi estabelecida utilizando inibidores selectivos, que não provocam o aumento da fotossensibilidade, mas que resultam numa melhor resposta do tumor (Ferrario *et al.*, 2002).

As metaloproteinases de matriz (MMP) são um grupo de endopeptidases zinco-dependentes que degradam componentes da matriz extracelular. Cada vez mais evidências indicam que as MMP são importantes no desenvolvimento do tumor, na invasão, na metastização e estão envolvidas na sobrevivência da célula cancerosa e progressão tumoral. A PDT usando Photofrin® e hipericina mostrou manter a expressão de MMP sobre-regulada (Bhuvanewari *et al.* 2009; Ortel *et al.* 2009). Inibidores das MMP têm demonstrado prolongar a sobrevivência em modelos animais e em associação com a PDT observou-se melhor resposta e aumento da sobrevida a longo prazo em ratos portadores de tumor. Curiosamente, a fotossensibilidade cutânea não foi afectada (Ortel *et al.* 2009).

Neste contexto, estudos *in vivo* recentes provaram que o efeito da PDT pode ser melhorado em combinação com agentes anti-angiogénicos no regime de tratamento (Bhuvanewari *et al.*, 2009). Vários princípios anti-angiogénicos foram testados, nomeadamente o bloqueio do VEGF circulante (por exemplo, com Bevacizumab), a inibição de sinalização dependente de VEGF (por exemplo, ZD647) e a inibição da migração e proliferação de células endoteliais (TNP-470) (Ferrario *et al.*, 2000).

Quando o tratamento anti-angiogénico foi aplicado de modo a reduzir os níveis de VEGF em tumores verificaram-se melhores taxas de remissão (Ortel *et al.* 2009).

2.7. STRESSE OXIDATIVO

O stresse oxidativo e as ROS produzidas pela PDT podem activar o NF-K β (*nuclear factor kappa beta*), factor nuclear capaz de interagir com genes pró-inflamatórios, relacionados com as vias da apoptose e também capaz de modular a expressão de genes envolvidos na sobrevivência tumoral como a COX-2 e MMP-9 (Ortel *et al.*, 2009).

Outro factor de transcrição que é activado pela PDT é o HIF-1 α , como consequência da hipoxia produzida por esta terapêutica. O HIF-1 α é importante na regulação do VEGF, podendo ter como consequência o crescimento tumoral, a invasão e a metastização (Ferrario *et al.*, 2000)

O stresse oxidativo consequente da PDT mostrou induzir a expressão de proteínas de stresse quer ao nível de mRNA quer ao nível proteico, nomeadamente HSP-70 ou Heme Oxigenase 1 (HO-1) que pode conferir alguma resistência à fotossensibilização e inibir vias de apoptose (Curry e Levy, 1993; Gomer *et al.*, 1996; Ortel *et al.*, 2009).

2.8. LUZ, OXIGÉNIO E FOTOSSENSIBILIZADOR

O tratamento fotodinâmico tem três requisitos fundamentais: luz, oxigénio e a substância fotossensibilizadora. A substância fotossensibilizadora é escolhida dependendo do tipo de tumor a ser tratado e é administrada ao doente que passado

algum tempo, o suficiente para assegurar que a concentração máxima está no interior das células tumorais (excepto quando se pretende que a PDT actue ao nível da vascularização do tumor), é irradiado na zona a tratar com luz de comprimento de onda apropriado. A luz deve penetrar até ao local onde se encontra o tumor, ou não terá os efeitos desejados. Para além disso, quanto mais elevada for a concentração de oxigénio no tumor melhores serão os resultados. No entanto, o sucesso da terapêutica está essencialmente na dependência da substância fotossensível.

2.8.1. LUZ

Qualquer fonte de luz pode ser utilizada como aplicador de irradiação em PDT. As primeiras fontes de luz utilizadas eram lâmpadas convencionais que não produziam luz homogénea e cujo *output* era definido através de filtros (Mitton e Ackroyd, 2008; Triesscheijn *et al.*, 2006). As lâmpadas foram usadas principalmente para lesões superficiais (Huang *et al.*, 2008), no entanto, o cálculo da potência e energia total obtidas é impreciso. Para além disso, é necessário usar filtros para eliminar a radiação UV e é preciso ter em atenção ao aquecimento que pode ser produzido (Triesscheijn *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de lasers foi um importante marco na PDT. Hoje são as fontes de luz mais usadas. Os lasers produzem luz homogénea de comprimento de onda único que permite calcular facilmente a potencia e a energia total. Os lasers de díodo têm numerosas vantagens: são relativamente baratos, pequenos e móveis, não necessitam de sistemas de refrigeração externos e são muito fiáveis. Estes sistemas estão licenciados na Europa (Juzeniene *et al.*, 2004; Mitton e Ackroyd, 2008) . A luz produzida pode

facilmente ser levada através de uma fibra óptica até localizações mais inacessíveis (Mitton e Ackroyd, 2008).

A tecnologia de fibras ópticas adaptou-se às necessidades da PDT. A PDT requer sistemas de entrega de luz direccionados e que garantam uma distribuição homogénea. As fibras ópticas actuais permitem virtualmente a entrega de luz, de comprimento de onda, potência e energia total adequados a tumores localizados em praticamente qualquer parte do corpo (Triesscheijn *et al.*, 2006). A ponta das fibras ópticas pode ser adaptada às características da lesão. Uma fibra óptica com uma microlente na ponta pode distribuir a luz uniformemente sobre uma superfície lisa. Um difusor esférico isotrópico pode ser localizado no centro de uma cavidade e levar a luz a toda a sua superfície. Um difusor cilíndrico, em que existem vários comprimentos disponíveis, pode ser usado para irradiar superficialmente um lúmen cilíndrico ou intersticialmente um órgão alvo (Huang *et al.*, 2008).

A escolha da fonte de luz depende da natureza e da localização da lesão. O comprimento de onda tem que coincidir com o espectro de absorção do fármaco escolhido. O comprimento de onda óptimo deverá ser calculado através da capacidade de produzir a máxima concentração de oxigénio singlete (Mitton e Ackroyd, 2008). A dose óptima pode ser obtida ajustando a potência e a energia total emitida pela luz. Ao considerar a entrega de luz é preciso ter em atenção que a sua propagação nos tecidos é influenciada por processos de refacção, reflexão, absorção e dispersão. Para além de conhecer as propriedades dos fotossensibilizadores utilizados é importante ter em conta a dosimetria da luz e a alteração das suas propriedades ao atravessar meios (vidro, ar, água, tecidos) com diferentes propriedades ópticas. (Plaetzer *et al.*, 2009).

Para além da aplicação de luz monocromática, a excitação dos fotossensibilizadores com dois fotões, ou seja, a absorção de fotões de dois comprimentos de onda diferentes,

também tem sido testada e mostrou-se como uma alternativa para melhorar a reacção fotodinâmica em especial para tratar pequenas lesões profundas (Huang *et al.*, 2008).

2.8.2. OXIGÉNIO

O oxigénio desempenha uma função fundamental no processo da PDT e a sua disponibilidade no tecido tem um profundo efeito no resultado do tratamento.

O oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$) formado como resultado da reacção fotodinâmica é, na maior parte dos casos, a ROS mais importante deste processo (Jiménez-Banzo *et al.*, 2008). Existe muita controvérsia em relação ao tempo de meia-vida e, conseqüentemente, à distância de difusão das espécies de oxigénio transitórias. No entanto, estudos recentes demonstraram que a vida intracelular do oxigénio singlete dura cerca de $3\mu\text{s}$ em células viáveis, metabolicamente activas contendo água (O'Connor *et al.*, 2009). Este tempo é consideravelmente maior que o reportado em estudos anteriores (Jiménez-Banzo *et al.*, 2008). O coeficiente de difusão intracelular resultante foi estimado em 2 a $4 \times 10^{-6}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$, o que significa que o volume de actividade do oxigénio singlete provavelmente será uma esfera de cerca de 100nm (Hatz *et al.*, 2008). Por um lado esta vida curta do oxigénio singlete e a curta distância de difusão tornam a PDT uma terapêutica altamente selectiva devido aos efeitos locais que produz (Robertson *et al.* 2009). Por outro lado, a molécula fotossensibilizadora deve estar localizada próximo do seu alvo no momento de irradiação (Hopper, 2000; Robertson *et al.* 2009; Triesscheijn *et al.* 2006). A localização subcelular dos fotossensibilizadores é crítica na mediação da resposta citotóxica à PDT e é determinada pelas propriedades químicas da molécula, formulação, concentração, microambiente da

lesão e também pelo fenótipo das células afectadas. A membrana plasmática, membranas intracelulares e organelos como o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, lisossomas, mitocôndria e núcleo foram identificados com alvos subcelulares de muitas substâncias fotossensibilizadoras. Alguns fármacos distribuem-se largamente nas membranas destes organelos, outros especificamente em lisossomas e mitocôndrias, outros ainda redistribuem-se durante o período de irradiação (Huang *et al.*, 2008).

Foi demonstrado que concentrações decrescentes de oxigénio estão correlacionadas com reacções fotodinâmicas menos eficazes (Mitton e Ackroyd, 2008) e que tumores em condição de hipóxia são resistentes à PDT. Existem dois tipos de hipóxia: células hipóxicas pré-existentes, que são um resultado do desenvolvimento fisiológico do tumor e que existem em muitos tumores sólidos; e a hipóxia que a PDT por si própria pode induzir devido à rápida depleção local.

A formação de ROS e a eficácia da PDT podem ser afectadas pela tensão de O₂ intra-tumoral, pela saturação de O₂ da hemoglobina e pelo microambiente dos tumores sólidos. Assim, a monitorização da oxigenação dos tecidos tumorais durante a reacção fotodinâmica é importante para compreender os mecanismos fisiológicos básicos e a dosimetria da PDT. Foram propostas várias metodologias para lidar com a hipóxia causada pela reacção fotodinâmica, por exemplo, a redução da potência ou a irradiação fraccionada através de intervalos controlados de luz e escuro (Huang *et al.*, 2008). Estas técnicas servem para promover a oxigenação tissular e a reperfusão tumoral compensando a depleção de oxigénio causada pela reacção fotoquímica. Apesar de ter sido reportada alguma melhoria da resposta tumoral também foram observados algumas limitações destas técnicas. A redução da potência e energia total e o fraccionamento da dose de luz influencia apenas a depleção de O₂, e não as células hipóxicas pré-existentes e para além disso, obriga ao aumento do tempo de tratamento (Huang *et al.*, 2008).

Ensaio clínicos em que a PDT foi aplicada em câmaras com O₂ hiperbárico demonstraram melhorias significativas da resposta ao tratamento. A hiper-oxigenação mostrou aumentar o período de sobrevivência em pacientes com carcinoma do esófago. Outros estudos pré-clínicos mostraram que a hiper-oxigenação normobárica é tão eficaz, senão mais, do que a oxigenação hiperbárica (Huang *et al.*, 2003). Esta hiperoxigenação pode oxigenar células hipóxicas pré-existentes e torná-las mais susceptíveis à PDT e, simultaneamente, compensar a depleção de oxigénio resultante da reacção fotodinâmica (Huang *et al.* 2008; Mitton e Ackroyd, 2008).

2.8.3. FOTOSSENSIBILIZADORES

Desde 1970, quando Dougherty usou o HpD como fármaco para este tipo de tratamento, que vários grupos se têm dedicado a encontrar substâncias fotossensibilizadoras com as características ideais. Pretende-se produzir fármacos que absorvam luz de comprimentos de onda mais longos (de 600 a 800nm), com depurações mais curtas (de forma a induzir menores períodos de fotossensibilidade temporária da pele), com maior especificidade tumoral, eficazes na transferência de energia para o oxigénio e que não apresentem toxicidade no escuro. Assim, continua a ser importante o desenvolvimento de novas moléculas (Ackroyd *et al.*, 2001; Mitton e Ackroyd, 2008; Plaetzer *et al.*, 2009).

A maioria das substâncias fotossensibilizadoras inclui na sua estrutura um anel tetrapirrólico (porfirinas e clorinas) ou estão estruturalmente relacionados com ele (ftalocianinas, etc). Este macrociclo, principal componente da hemoglobina e mioglobina, é essencial para a actividade biológica de todos os organismos vivos. Para

além do macrociclo heterocíclico, estas moléculas podem conter um átomo central metálico como o ferro ou o magnésio. A presença de um sistema de electrões 2π garante-lhes o elevado poder de absorção, o que as torna atractivas para aplicação em medicina. Na natureza existem várias porfirinas responsáveis por controlar processos de oxidação-redução (O'Connor *et al.*, 2009). Para além das características físicas e fotoquímicas favoráveis deste macrociclo é também favorável a sua capacidade intrínseca de se acumular selectivamente nos tumores. Os fotossensibilizadores, particularmente os do tipo porfirínico, têm tendência a acumular preferencialmente em células tumorais, o que foi demonstrado em vários estudos (Woodburn *et al.*, 1998; Boyle e Dolphin, 1996; Hamblin e Newman, 1994; Jori, 1989; Jori e Reddi, 1993; Larroque *et al.*, 1996). Os mecanismos responsáveis por este facto estão pouco esclarecidos, no entanto, vários autores desenvolveram estudos que apontam algumas hipóteses (Brown *et al.*, 2004). Uma propriedade dos compostos tetrapirrólicos é a sua tendência para se ligarem fortemente às proteínas séricas LDL (Jori e Reddi, 1993; Kessel *et al.*, 1991; Maziere *et al.*, 1990). Muitos tipos de células tumorais sobre-expressam o receptor de LDL apoB/E, o que deverá constituir uma resposta à biossíntese de lípidos necessária ao ritmo acelerado de extensão das membranas celulares de que depende o crescimento tumoral rápido (Allison *et al.*, 1994; Korbelik, 1992; Yuan *et al.*, 1993). Há ainda autores que defendem que os sensibilizadores são mantidos juntamente com outras macromoléculas no espaço extracelular devido à baixa drenagem linfática dos tumores (Roberts e Hasan, 1992) ou que o pH baixo frequentemente encontrado no citoplasma tumoral é responsável pela ionização de fotossensibilizadores aniónicos que, conseqüentemente, com carga neutra tornam-se mais lipofílicos (Pottier e Kennedy, 1990).

Os fotossensibilizadores são frequentemente classificados como porfirinas e não porfirinas. As porfirinas são bons fotossensibilizadores na medida em que, devido às características químicas da molécula, têm elevado potencial fototóxico e absorção na região do vermelho visível permitindo a sua actuação em camadas profundas dos tecidos (O'Connor *et al.*, 2009).

A maior parte dos sensibilizadores em ensaios pré-clínicos são derivados das porfirinas. Por sua vez, os fotossensibilizadores derivados das porfirinas são classificados como de primeira, segunda e terceira geração. Os da primeira geração incluem o HpD e o Photofrin®. Os fotossensibilizadores de segunda geração, como o Foscan® e Verteporfin®, foram desenvolvidos de forma a eliminar alguns problemas das moléculas da primeira geração como a fotossensibilidade prolongada da pele e a baixa penetração nos tecidos. Estes fotossensibilizadores são quimicamente puros, absorvem luz em comprimento de onda mais longo e causam consideravelmente menos fotossensibilidade da pele após o tratamento. Os sensibilizadores de segunda geração têm de ser pelo menos tão eficientes como o Photofrin®, o actual *goldstandard* da PDT. A terceira geração de substâncias fotossensíveis geralmente refere-se a modificações, como conjugados biológicos (fotossensibilizadores conjugados com lipossomas ou anticorpos) que melhoram a acumulação selectiva do fotossensibilizador no tecido tumoral e actualmente representam uma área de investigação activa (O'Connor *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2008).

A lipofilicidade dos fotossensibilizadores é determinante à captação celular e à localização intracelular dos compostos. A estrutura primária, cadeias laterais substituintes, complexação com iões metálicos e carga decidem propriedades moleculares tais como polaridade, solubilidade, farmacocinética e distribuição subcelular. Também determinam a absorção, o estado tripleto e a capacidade de formar

oxigénio singleto após irradiação (Greer, 2006). A solubilidade também é uma característica de grande importância. A anfifilicidade assegura não só o transporte na corrente sanguínea sem formação de precipitados ou agregados como, similarmemente, a penetração eficaz na camada lipídica da membrana celular. Para além disto os fotossensibilizadores não devem ter tendência a formar agregados pois isso reduziria a sua capacidade de absorver luz e passar ao estado tripleto. Em relação à farmacocinética, a selectividade, que corresponde à capacidade de o fotossensibilizador ser captado mais pelo tumor que pelos tecidos normais, diminuindo os danos nos tecidos circundantes, pode ser aumentada através da utilização de novas estratégias como o uso de transportadores ou a ligação a anticorpos. Após a reacção fotodinâmica o ideal é que a eliminação do fotossensibilizador seja a mais rápida possível de modo a minimizar o período de fotossensibilidade generalizada. O fotossensibilizador ideal não deve ser tóxico por si na concentração a utilizar no tratamento. A fotodegradação e o metabolismo celular também não podem formar produtos de degradação tóxicos. O mais importante é que os fotossensibilizadores não sejam mutagénicos quer não irradiados, quer irradiados; o que depende essencialmente da tendência para não acumular no núcleo e, na maior parte dos casos, esta tendência não se verifica. A PDT não costuma causar danos no DNA (*Deoxyribonucleic acid*), mutações ou carcinogénese. Os fotossensibilizadores que se localizam na mitocôndria tendem a provocar a morte celular por apoptose enquanto aqueles que se localizam na membrana plasmática matam mais por necrose (O'Connor *et al.*, 2009; Leist e Nicotera, 1997; Yang *et al.*, 1993).

No que se refere a características clínicas o fotossensibilizador não deve causar efeitos tóxicos, reacções alérgicas ou outros efeitos secundários, ou dor durante a

irradiação como acontece com o ácido 5-aminolevulínico (ALA) (Krammer e Plaetzer, 2008).

2.8.3.1. FOTOSSENSIBILIZADORES UTILIZADOS NA PRÁTICA CLÍNICA

Actualmente existem seis moléculas aprovadas para esta terapêutica, são elas: misturas poliméricas de éteres e ésteres da hematoporfirinas (HpD; Photofrin®, Photogem®, Photosan®, Hematoporphyrin Injection®), meta-Tetrahidroxilfenilclorina (Foscan®), ácido 5-aminolevulinico e éster metílico do ácido 5-aminolevulinico (Levulan®, Metvix®), mono-L-aspartil-clorina e6 (Npe6; Laserphyrin Talaporfin Sodium®), derivado mono-ácido da benzoporfirina (Verteporfin® ou Visudyne®) e ftalocianina de alumínio tetra-sulfonada (Photosense®).

Existem mais algumas moléculas em ensaios clínicos e a estrutura química de muitas delas baseia-se na estrutura química de porfirinas e de clorinas.

Derivados da Hematoporfirina

A primeira geração de substâncias fotossensibilizadoras são as hematoporfirinas, os seus derivados e formas purificadas. O HpD é uma mistura de vários monómeros, dímeros e oligómeros da hematoporfirina. Esta mistura mostrou localizar-se preferencialmente em tumores e ter acção anticancerígena quando combinada com luz vermelha (Triesscheijn *et al.*, 2006).

Em 1993, o Photofrin®, foi o primeiro fármaco aprovado para PDT anti-tumoral, no Canadá e posteriormente nos EUA e na Europa. É ainda hoje o fármaco mais

largamente usado. Mais tarde surgiram outros fármacos constituídos por derivados purificados do HpD e que apresentam melhor efeito em alguns tipos de tumores malignos, nomeadamente o Photogem®, o Photosan®, e a Hematoporphyrin Injection®.

O Photofrin® por ser uma mistura de vários derivados da HpD apresenta vários picos de absorção, sendo o de 630nm o mais fraco. No entanto, por ser o comprimento de onda mais longo, capaz de penetrar mais profundamente nos tecidos, este sensibilizador é activado por luz deste comprimento de onda (630nm). Devido ao baixo coeficiente de absorção que se obtém são necessárias energias totais de irradiação de 100 a 200J/cm². As doses terapêuticas do HpD muitas vezes resultam em fotossensibilidade da pele durante quatro a doze semanas (Triesscheijn *et al.*, 2006).

O HpD tem várias características positivas: destrói as células tumorais eficazmente, não é tóxico na ausência de luz e pode ser preparado facilmente em solução aquosa para administração intravenosa. No entanto, o HpD tem também uma série de limitações, nomeadamente a indução de fotossensibilidade temporária da pele e por vezes, baixa selectividade inicial para os tecidos tumorais. O HpD tem uma boa capacidade de acumulação nos tecidos tumorais, mas apenas passadas 48 a 72 horas depois de o fármaco ser administrado. Durante este período de tempo o doente tem de permanecer em ambiente controlado, especialmente quanto à exposição à luz o que representa um aumento significativo nos custos do tratamento (Triesscheijn *et al.*, 2006).

O Photofrin® está aprovado em vários países para o tratamento de cancro esofágico obstrutivo, cancro esofágico em estadios iniciais e esófago de *Barrett* (Qiang *et al.*, 2006). O cancro do esófago continua a ser de tratamento complicado e os doentes têm taxa de sobrevivência muito baixa, estando a doença associada a elevada morbidade e

mortalidade. Hur *et al.* mostraram que a qualidade e a esperança de vida é maior em doentes tratados com PDT do que submetidos a esofagectomia (Wolfsen, 2002).

São poucos os estudos publicados referentes à utilização da PDT no tratamento de cancro do estômago e cólon (Qiang *et al.*, 2006; Wolfsen, 2002; Spinelli *et al.*, 2006). Naturalmente, sendo a cirurgia o tratamento de primeira linha, as indicações para estes tipos de cancro limitam-se a doentes que não podem ser operados. No entanto, foram reportados alguns casos de sucesso (Nakamura *et al.*, 2003).

Vários ensaios clínicos têm confirmado a elegibilidade da PDT em casos de colangiocarcinoma (Mitton e Ackroyd, 2008; Ortner, 2001; Wiedmann e Caca, 2004), carcinoma da bexiga (Manyak e Ogan, 2003; Mitton e Ackroyd, 2008), cancro do pulmão de não pequenas células e, para tratamento paliativo de cancros obstrutivos da árvore traqueobrônquica (Chen *et al.*, 2006; Moghissi *et al.*, 2000; Usuda *et al.*, 2006).

Devido aos avanços na tecnologia dos aplicadores de luz já é possível realizar PDT ao nível intersticial para tratamento de órgãos parenquimatosos como o pâncreas ou o fígado. Nos casos de cancro do pâncreas, a PDT diminuiu o crescimento celular e produziu alguma necrose local que cicatrizou facilmente, tendo o tratamento prolongado a sobrevivência dos doentes (Fan e Andren-Sandberg, 2007; Qiang *et al.*, 2006; Verrico *et al.*, 2001).

Temoporfin

Com o objectivo de ultrapassar as limitações do HpD, surge nos anos 90 a segunda geração de fármacos fotodinâmicos anti-cancro. O objectivo foi produzir substâncias quimicamente puras com melhores características químicas, nomeadamente, aumentar

os comprimentos de onda de absorção e incorporar grupos químicos que aumentassem a hidrossolubilidade e a absorção.

A meta-tetrahidroxifenilclorina (mTHPC), também designada por temoporfin, é um fotossensibilizador sintético, muito mais potente que o HpD ou que a Protoporfirina IX. Requer irradiação com energias totais de apenas 10-20J/cm². A fotossensibilidade da pele é reduzida para apenas alguns dias e o seu pico de absorção é muito favorável: 652nm, o que aumenta o poder de penetração da luz nos tecidos.

O Foscan® foi licenciado na União Europeia em 2001 como tratamento paliativo ou local para doentes com cancro da cabeça e do pescoço avançados, que não responderam a terapêuticas prévias e que não eram adequados a quimioterapia ou radioterapia (Qiang *et al.*, 2006). Estão a decorrer vários estudos e ensaios clínicos no sentido de testar a aplicação da PDT baseada em Foscan® para doentes com cancros da cabeça e pescoço (Copper *et al.*, 2003; Hopper *et al.*, 2004; Lou *et al.*, 2003; Manyak e Ogan, 2003).

Ácido 5-aminolevulínico

Ainda dentro da segunda geração de fármacos fotossensibilizadores anti-cancro e apenas por uma questão temporal, começou a utilizar-se o ácido 5-aminolevulínico (ALA) como fármaco para PDT anti-cancro.

O uso do ácido 5-aminolevulínico (ALA) é uma abordagem completamente diferente. Em vez de uma molécula fotossensibilizadora é administrado um pro-fármaco. O ALA por si só não produz efeito fotodinâmico, mas é um precursor do heme e inicia uma via que resulta na produção de protoporfirina IX (PpIX), cuja acumulação em células tumorais resulta em sensibilidade tumoral.

A PpIX tem actividade fotodinâmica dependente da ferroquelatase, enzima que muitas vezes está diminuída em células tumorais (Triesscheijn *et al.*, 2006). O espectro de absorção da PpIX é muito semelhante ao do HpD e sendo também normalmente activada por luz de 630nm. A ALA-PDT tem uma depuração mais rápida, limitando o período de fotossensibilidade a um ou dois dias. O ALA é comercializado sob o nome de Levulan® para o tratamento da queratose actínica, uma lesão pré-cancerosa da pele. A aplicação tópica deste pro-fármaco actua contra algumas patologias dermatológicas e é eficiente em basaliomas superficiais e linfomas cutâneos das células-T (Krammer e Plaetzer, 2008).

Por se tratar de uma molécula altamente hidrofóbica, tem dificuldade de entrar nas células, tendo sido desenvolvidos alquil-ésteres do ALA para contornar esse problema. O Metvix® é um metil-éster do ácido 5-aminolevulínico (metil-ALA) que foi aprovado em 2001 para uso tópico contra melanoma não melanocítico, basaliomas e queratose actínica. Hexvix® e Benzvix® são estéres metil e benzil do ALA. O Hexvix® está aprovado nos EUA para o diagnóstico dos tumores da bexiga e seu tratamento, e o Benzvix® encontra-se em estudos clínicos para cancro gastro-intestinal.

O ALA é o pro-fármaco fotodinâmico mais usado no cancro da pele. Devido às suas características estruturais, particularmente o seu pequeno tamanho, pode ser administrado topicamente evitando assim a consequente fotossensibilidade geral da administração sistémica (Morton *et al.*, 2002). O licenciamento do ALA nos EUA foi baseado em testes clínicos que envolveram 484 doentes cujos resultados confirmaram que o fármaco é seguro e eficiente. A aprovação internacional para o tratamento de queratose actínica foi obtida na sequência de vários ensaios clínicos nos quais os doentes demonstraram taxas de resposta completas de 70 a 89%, comparáveis às do 5-fluoracilo (Allison *et al.*, 2006; Marmur *et al.*, 2004).

Os ensaios clínicos com o metil-ALA em basaliomas nodulares e superficiais foram realizados em vários países e incluíram mais de 2500 doentes, demonstrando a eficácia e a segurança deste fármaco, levando ao desenvolvimento e aprovação do produto para uso tópico (Soler *et al.*, 2001).

Vários ensaios clínicos têm comprovado o sucesso do tratamento tópico de ALA e seus derivados em vários tipos de lesão superficial não nodular, nomeadamente, doença de Bowens, carcinoma escamoso superficial da pele ou, basaliomas, os quais apresentam elevadas taxas de resposta completa (Allison *et al.*, 2006; MacCormack, 2008; Morton *et al.*, 2002; Szeimies *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008).

Decorrem também ensaios clínicos com PDT baseado em ALA sistémico, nomeadamente para o tratamento da doença de *Barrett* (Dougherty *et al.*, 1998) e também para tratamento do cancro da bexiga sendo aplicado intravesicalmente, tendo-se registado boas taxas de remissão e ausência de efeitos secundários substanciais (Berger, 2003; Skyrme *et al.*, 2005; Szygula *et al.*, 2004). A PDT baseada em ALA foi utilizada como terapia neoadjuvante para tratar glioblastomas após remoção cirúrgica tendo-se observado melhoramentos na qualidade de vida e sobrevivência dos doentes (Stummer *et al.*, 2008; Stylli e Kaye, 2006).

Laserphyrin Talaporfin Sodium®

A Mono-L-aspartil-clorina e6 (Npe6), de nome comercial Laserphyrin Talaporfin Sodium®, foi aprovada para o uso no diagnóstico e tratamento de estágios iniciais de cancro do pulmão no Japão, onde a PDT é recomendada como opção de tratamento. Devido à sua selectividade, esta molécula pode ser usada não só para PDT mas também para diagnóstico fotodinâmico baseado na fluorescência. Vários ensaios clínicos em

doentes com cancro do pulmão em estadios iniciais confirmaram os excelentes efeitos anti-tumorais da PDT baseada em Npe6, tendo sido obtidas respostas completas em mais de 85% dos casos. Para além disso confirmou-se a baixa fotossensibilidade da pele induzida por esta terapêutica em relação ao Photofrin® (Usuda *et al.*, 2006).

Verteporfin®, Visudyne®

O derivado mono-ácido da benzoporfirina foi desenvolvido para o tratamento da degenerescência macular relacionada com a idade. Embora não tenha sido desenvolvido para o tratamento oncológico tem a vantagem de ser eliminado rapidamente e não provoca fotossensibilidade da pele por mais de 24 horas. É comercializado sob os nomes Verteporfin® ou Visudyne® (Brown *et al.*, 2004).

Depois de ensaios clínicos com esta porfirina sintética, concluiu-se que a rápida eliminação e síntese complicada constituem limitações deste composto. Foi aprovado para o tratamento de basaliomas. Continua a ser testado em ensaios clínicos para outros tipos de cancro e para a psoríase (Waterfield *et al.*, 2008).

Fotosense®

A Ftalocianina sulfonada de alumínio, comercialmente Photosense®, é outro composto sintético. É um derivado da porfirina com absorção a comprimentos de onda mais longos. A inserção do alumínio aumenta a eficácia da formação de ROS e os grupos sulfonados diminuem o carácter hidrofóbico intrínseco do macrociclo. Foi aprovado para o tratamento de diferentes tipos de cancro, nomeadamente, pulmão, pescoço, cabeça ou mama. Várias ftalocianinas estão em ensaios clínicos para o

tratamento de lesões da pele originadas por diferentes tipos de cancro (Serra *et al.*, 2008).

3. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS FOTOSSENSIBILIZADORES DO TIPO PORFIRÍNICO

As porfirinas constituem o grupo químico de base da maior parte dos fotossensibilizadores, o que se deve às suas características fotofísicas e fotoquímicas adequadas associadas a alguma afinidade para as células tumorais (Serra *et al.*, 2008; Triesscheijn *et al.*, 2006).

A facilidade de preparação de 5,10,15,20-tetrafenilporfirinas (TPP) faz com que estas sejam estruturas atraentes para serem estudadas em PDT (figura 8). A escolha dos substituintes com polaridade e comprimento diferente para a substituição nas posições livres 5, 10, 15, 20 dos derivados tetrapirrol pode introduzir várias modificações estruturais, incluindo bromação, nitração, ou formilação, tornando estes compostos apropriados para diversas aplicações (Banfi *et al.*, 2006).

O Foscan® (mTHPC), actualmente em uso clínico, é o fotossensibilizador de segunda geração mais bem sucedido (Banfi *et al.* 2004; Chen *et al.* 2006) e apresenta um substituinte hidroxilo na posição meta de todos os quatro grupos fenil (Calvert e Frutch, 2002; Watson, 2006). Actualmente, a mTHPC é aplicada para a cabeça e pescoço (Agostinis *et al.*, 2004) e tem sido estudada para o carcinoma basocelular ou

basalioma (Yslas *et al.* 2007) e para as recidivas localizadas do cancro da mama (Banfi *et al.*, 2006; Marchal *et al.*, 2004) .

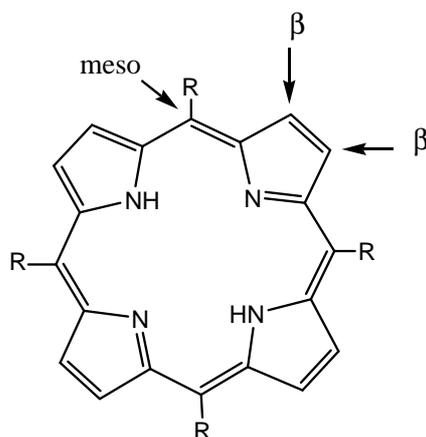


Figura 8: Estrutura química das 5,10,15,20-tetrafenilporfirinas. Para além deste tipo de substituintes as 8 restantes posições pirrólicas podem sofrer várias modificações estruturais, incluindo bromação, nitração, ou formilação, tornando estes compostos apropriados para diversas aplicações. Adaptado de Banfi *et al.*, 2006.

No entanto, as estruturas de compostos deste tipo (substituídas na posição *meso*) são muito diferentes das porfirinas naturais que não são substituídas nas posições β . Esta característica estrutural pode ser um obstáculo para a necessária eliminação do sensibilizador pelo organismo. Um compromisso entre actividade fotodinâmica, a simplicidade dos métodos de síntese e uma estrutura mais próxima das estruturas de ocorrência natural, pode ser conseguido pela preparação de 5,15-diarilporfirinas, onde apenas dois grupos nas posições *meso* são usados para conferir hidrofiliabilidade à estrutura. Outra vantagem dessas porfirinas são as suas estruturas menos volumosas e menor peso molecular que aumentam a possibilidade de ter melhores captações celulares.

Alguns estudos constituem exemplos da utilização destes tipos de porfirinas na PDT (Banfi *et al.*, 2006; Bourre *et al.*, 2002; Wiehe *et al.*, 2005).

Banfi *et al.* (2006) estudaram uma série de derivados tetrapirrólicos com potencial de uso em medicina. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os compostos substituídos por apenas dois grupos arilo são mais eficazes do que os correspondentes derivados tetraarílicos no tratamento fotodinâmico em células humanas de adenocarcinoma de cólon e que compostos hidroxissubstituídos são mais activos do que os derivados metoxissubstituídos. Para além disto, algumas monoarilporfirinas são fotossensibilizadores particularmente promissores, com valores IC50 comparáveis, ou ainda melhores do que as diarilporfirinas mais activas.

Recentement Banfi *et al.* (2006) sintetizaram uma serie de derivados 5,15-diariltetrapirrol, que na sua maioria mostram grande fototoxicidade em comparação quer com o Photofrin® quer com o mTHPC numa linha celular humana de adenocarcinoma do cólon (Gariboldi *et al.*, 2009).

A presença de átomos de halogéneos nestas estruturas pode ser um factor importante para aumentar a actividade fotodinâmica desejada (Serra *et al.*, 2008) devido ao efeito do átomo pesado (Azenha, 2002), como demonstrado por Gorman *et al.*, 2004.

Como referido anteriormente, o oxigénio singlete é o agente fundamental do processo terapêutico da PDT. O rendimento quântico de oxigénio singlete de um fotossensibilizador é regulado pela eficiência da transição do fotossensibilizador de um estado singlete para um estado tripleto que pode ser maximizada pela presença dos halogéneos. A possibilidade de incluir um átomo pesado no fotossensibilizador pode constituir um mecanismo para controlar os níveis de oxigénio singlete (Gorman *et al.*, 2004).

Gorman *et al.* (2004) demonstraram o efeito do átomo pesado *in vitro*, modulando a produção de oxigénio singleto em fotossensibilizadores pela exploração deste efeito. Uma matriz de fotossensibilizadores com ou sem átomos de bromo substituintes deu origem a uma série de compostos com diferentes perfis de geração de oxigénio singleto. A comparação directa da eficácia de fotossensibilizadores que só diferem na estrutura molecular pela presença de dois átomos de bromo, mostrou um aumento na eficácia de mais de mil vezes em ambas as linhas celulares utilizadas.

Além do efeito sobre as propriedades fotofísicas e fotoquímicas da porfirina, é possível que as estruturas halogenadas interferiram na actividade da glicoproteína-P (PGP). A PGP é um transportador membranar responsável pela multi-resistência a fármacos (MDR) em vários tipos de cancro, sendo capaz de extrusar os fármacos anti-cancro a partir do meio intracelular (Leslie *et al.* 2005). Moléculas halogenadas (Chauffert *et al.*, 1986; DeGregorio *et al.*, 1989) têm a capacidade de interferir, bloqueando a PGP, inibindo a sua acção e revertendo a MDR. Elevada actividade anti-cancro devido à presença dos átomos de halogéneo, foi demonstrada no caso do cloro e do bromo (Das *et al.*, 2008; DeGregorio *et al.*, 1989; Um *et al.*, 2008)

O mecanismo exacto da captação de sensibilizador pelas células do tumor é ainda pouco conhecido. Existem evidências de que as porfirinas são transportadas no plasma por lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e interiorizadas nas células através da interacção das LDL com os seus receptores nas membranas celulares. A ligação às LDL provavelmente está relacionada com as características anfífilas da molécula. A presença de um ou mais grupos hidroxilo aumenta o grau de hidrofiliabilidade das porfirinas, e a este respeito, a metoxifenil porfirina é considerada a precursora do macrociclo tetrapirrol contendo hidroxifenil, de que o mTHCP é o exemplo mais valioso (Banfi *et al.*, 2004).

4. PERSPECTIVA CLÍNICA

Mais de 25 anos de intensos estudos e ensaios clínicos decorreram, e milhares de doentes foram tratados desde que a PDT foi reconhecida como terapêutica em oncologia.

Desde o licenciamento do Photofrin®, o primeiro fármaco aprovado para PDT, a investigação nesta área científica dinâmica tem evoluído no sentido de consolidar e garantir um uso desta terapêutica contra o cancro. Se por um lado a investigação intensa evoluiu no sentido de melhorar as propriedades químicas dos fotossensibilizadores, a tecnologia dos sistemas de aplicação de luz também não tem sido esquecida. No desenvolvimento dos fármacos o objectivo tem sido o melhoramento de propriedades ópticas, físicas e químicas, nomeadamente, aumento do comprimento de onda de absorção, da solubilidade e da eficiência de produção de espécies reactivas de oxigénio.

A maioria dos compostos em estudo, e que constituem potenciais novos fármacos, baseia-se na estrutura de ocorrência natural, a porfirina, quer por ser a estrutura dos compostos já aprovados para tratamento, quer pelas suas propriedades químicas e selectividade tumoral.

A PDT já provou ter numerosas vantagens em relação às terapêuticas convencionais, pois, é menos invasiva, é selectiva e tem poucos efeitos secundários. No entanto, apesar de ser uma terapia reconhecida em numerosos países, e de existirem vários fármacos aprovados e com indicações para diversos tipos de cancro, a PDT continua a estar pouco disseminada na prática clínica. Algumas das razões para este facto poderão ser a falta de ensaios clínicos de grandes dimensões; a resistência dos clínicos em utilizar um novo tratamento, já que as terapêuticas convencionais têm boa

taxa de resposta; ou as dificuldades em estabelecer protocolos de rotina numa terapêutica que depende de várias variáveis (fármaco, luz, características da neoplasia).

O desenvolvimento de novos fotossensibilizadores, estudos da biologia e mecanismos da PDT ou casos clínicos estão a ser publicados regularmente. Pretende-se que a molécula fotossensibilizadora tenha excelentes propriedades fotodinâmicas, seja selectiva e possua boas propriedades farmacocinéticas. Com o surgimento de uma terceira geração de fotossensibilizadores emergem novos sistemas de distribuição selectiva dos fármacos, como conjugação com anticorpos ou componentes celulares e lipossomas. É importante explorar estas possibilidades, assim como a possibilidade de combinar a PDT com outras terapias.

Para tumores localizados é ainda importante investigar métodos de entrega dos fármacos localmente, de forma a melhorar a eficácia do tratamento, diminuir o tempo de tratamento e eliminar totalmente a reacção de fotossensibilidade da pele. São de prever progressos em técnicas de injeção intratumoral, particularmente com agulhas endoscópicas, que combinem a irradiação localizada com a injeção localizada do fármaco.