

B IOMATERIAIS APLICADOS AO
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS
TERAPÊUTICOS AVANÇADOS

B IOMATERIALES APLICADOS
AL DISEÑO DE SISTEMAS
TERAPÉUTICOS AVANZADOS

Hermínio C. de Sousa
Mara E. M. Braga
Alejandro Sosnik
(editores)

CAPÍTULO 16. TERAPIA FOTODINÂMICA PARA TRATAMENTO DO CANCRO

Luís B. Rocha^{1,2}, Luís G. Arnaut^{1,3}, Mariette M. Pereira^{1,3}, Luís Almeida¹, Sérgio Simões^{1,2}

¹*Luzitin, SA, S. Martinho do Bispo, 3045-016 Coimbra, Portugal.*

²*Bluepharma – Indústria Farmacêutica, SA, S. Martinho do Bispo, 3045-016 Coimbra, Portugal.*

³*Departamento de Química, Universidade de Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal.*

Resumo:

A Terapia Fotodinâmica (PDT) é um procedimento não invasivo, seguro e clinicamente aprovado que tem sido reconhecido como uma estratégia terapêutica anticancerígena promissora. O protocolo de PDT envolve a administração de um composto fotossensibilizador seguido da irradiação do tecido alvo com luz de comprimento de onda específico, que, na presença de oxigénio, dá origem a uma série de reacções fotoquímicas que levam a formação local de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Para além do efeito directo das ROS, responsáveis pela destruição selectiva das células e vasculatura tumoral, actualmente é unanimemente aceite que alguns protocolos de PDT podem também induzir uma resposta imunitária antitumoral específica e sistémica. A PDT pode ser muito eficaz no tratamento de tumores em fase precoce e também pode ser aplicada no tratamento paliativo de doentes com cancro avançado. Os efeitos secundários associados à PDT são reduzidos, sendo o mais comum a fotossensibilidade cutânea temporária. Não são conhecidos mecanismos intrínsecos ou adquiridos de resistência e o efeito cosmético após o tratamento de lesões cutâneas é muito bom. Nos últimos anos, tem

sido empreendido um enorme esforço no desenvolvimento de fotosensibilizadores mais eficazes, na produção de fontes de luz mais económicas e dispositivos versáteis para a sua aplicação precisa e principalmente na optimização de protocolos de PDT que, para além da eliminação do tumor primário, possam induzir o sistema imunitário do paciente a reconhecer e eliminar metástases distantes. Com estes progressos a PDT poderá aspirar a entrar para a primeira linha de terapias na luta contra o cancro.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; cancro; fotossensibilizadores; espécies reativas de oxigénio; imunidade antitumoral.

Abstract:

Photodynamic Therapy (PDT) is a non-invasive, safe and clinically-approved procedure that is increasingly been recognized as a promising anticancer therapeutic strategy. The PDT procedure involves the administration of a photosensitizing agent followed by irradiation of the target tissue with light of a specific wavelength, which, in the presence of oxygen, originates a series of photochemical events that lead to the local formation of reactive oxygen species (ROS). Besides the direct effect of ROS, responsible for the selective destruction of tumour cells and vasculature, it is now widely accepted that some PDT protocols can also induce a systemic and tumour-specific immune response. PDT can be very effective against early stage tumours and can also be used as a palliative treatment in advanced cancer patients. There are only minimal side-effects associated with PDT, the most common being temporary skin photosensitivity. No intrinsic or acquired resistance mechanisms are known and the cosmetic outcome after the treatment of skin lesions is very good. Over the last years, great efforts have been made on the development of more effective photosensitizers, on the design of economic and versatile light sources and light delivery devices, and especially on the optimization of PDT protocols that, besides the elimination of the primary tumour, will be able to induce the patient immune system to target and eliminate

distant metastasis. With this achievements PDT can move forward to the first line of therapies in the fight against cancer.

Keywords: Photodynamic therapy; cancer; photosensitizers; reactive oxygen species; antitumour immunity.

16.1. Introdução

Os constantes progressos científicos na área das ciências da vida têm permitido compreender, cada vez com maior detalhe, a complexidade associada à fisiologia do organismo humano e a muitas das suas patologias. O cancro é uma das principais causas de morte a nível global (8,2 milhões de mortes em 2012) [1] constituindo por isso um dos principais focos de atenção de muitos grupos de investigação.

As estratégias terapêuticas tradicionais – cirurgia, quimioterapia e radioterapia – atualmente permitem a obtenção de taxas de cura bastante elevadas em alguns tipos de cancro. No entanto, a sua baixa eficácia em alguns pacientes, conjuntamente com a elevada incidência de efeitos secundários graves, tem motivado a procura de novas terapias mais seguras e eficazes [2]. O crescente conhecimento sobre os mecanismos de génese, evolução e disseminação do cancro tem permitido a concepção e optimização de estratégias terapêuticas alternativas: direccionamento ativo de fármacos citostáticos, agentes anti-angiogénicos, terapia génica, imunoterapia, ou terapia fotodinâmica. As várias terapias alternativas aprovadas podem ser específicas para determinados tipos de cancro ou para populações restritas de doentes (e.g. que expressam fenótipos específicos), para os quais apresentam taxas de eficácia e segurança superiores às terapias tradicionais.

Este capítulo aborda uma das mais promissoras estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento do cancro, a Terapia Fotodinâmica (PDT). O conceito baseia-se na interacção dinâmica entre um composto fotosensibilizador (PS), luz de comprimento de onda específico e o oxigénio molecular, para promover a destruição selectiva do tecido alvo. A aplicação clínica da PDT tem demonstrado taxas de cura elevadas em alguns tipos de tumores em fase inicial de desenvolvimento, especialmente em dermatologia no tratamento de lesões pré-cancerígenas e cancerígenas não melanómicas [3]. Para além disso, a PDT demonstrou a capacidade em prolongar a sobrevivência e melhorar a qualidade de vida dos doentes em alguns casos de tumores da cabeça e pescoço em estado avançado, apresentando, nestes casos, uma relação custo-benefício mais favorável

relativamente à cirurgia [4]. Apesar do conceito da PDT ter surgido há mais de 100 anos, só em 1993 foi aprovado o primeiro medicamento para PDT do cancro, o porfímero sódico (Photofrin®). Atualmente, os constantes avanços que resultam em novos PS, mais seguros e eficazes, e em melhores fontes de luz, com menor custo e de fácil utilização, permitem que a PDT seja encarada na prática clínica como uma alternativa terapêutica com elevado potencial, com aplicação em áreas como a oncologia, dermatologia e oftalmologia.

16.2. O princípio da Terapia Fotodinâmica

A PDT tem como objectivo final a destruição seletiva de um tecido alvo. Para esse efeito é necessária a combinação simultânea nesse tecido de três componentes: o composto fotossensibilizador, luz visível com comprimento de onda apropriado e oxigénio molecular.

O efeito fotodinâmico inicia-se com a absorção de luz pelo PS, desencadeando uma série de reações fotoquímicas que conduzem à geração de espécies reativas de oxigénio (ROS¹) no local da irradiação. As ROS produzidas, tipicamente moléculas de oxigénio eletronicamente excitadas – oxigénio singuleto – causam danos oxidativos extensos em biomoléculas e estruturas celulares, conduzindo assim à morte celular do tecido alvo [5]. Outras ROS, como o ião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), ou o radical hidroxilo (OH^{\cdot}), também têm sido implicadas nos efeitos citotóxicos observados em PDT [6, 7].

A Figura 16.1 ilustra o princípio base da PDT: o PS no estado fundamental (singuleto) absorve luz passando para um estado energeticamente excitado (singuleto) com um tempo de vida muito curto (nanossegundos). Este, por sua vez, sofre conversão intersistemas originando um estado excitado (tripleto) com tempo de vida mais elevado (microssegundos), permitindo a sua interação com o oxigénio molecular presente nos tecidos.

¹ Do inglês *Reactive Oxygen Species*.

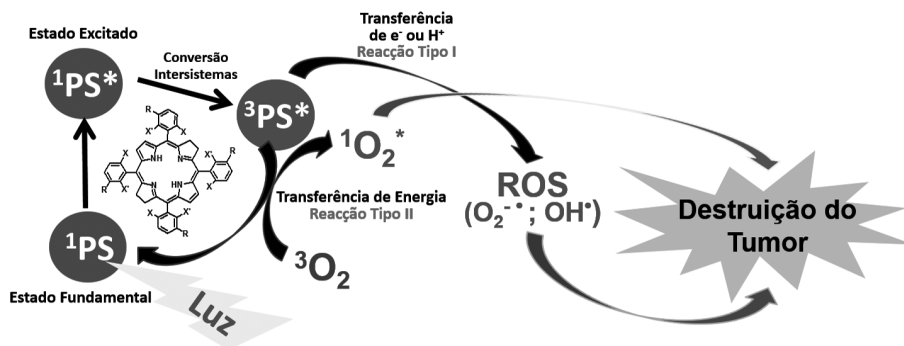


Figura 16.1. Representação esquemática das reações fotofísicas e fotoquímicas que estão na base do mecanismo da PDT que conduz à destruição do tecido tumoral por ação direta do oxigénio singuleto e outros radicais de oxigénio formados. PS - composto fotossensibilizador; ROS - espécies reativas de oxigénio.

Existem duas vias possíveis para a interação do estado excitado triplete do PS com o oxigénio molecular [8]: transferência direta de energia para o O_2 (triplete) originando oxigénio singuleto (1O_2) – mecanismo de tipo II; ou reação direta com o O_2 ou com uma molécula orgânica, com transferência de um electrão. No primeiro caso forma-se diretamente anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), enquanto no segundo se forma um radical anião. Este radical pode depois reagir com o oxigénio molecular e originar também $O_2^{\bullet-}$, ou receber um protão e originar outros radicais – mecanismo de tipo I. Por si só, o anião $O_2^{\bullet-}$ não causa grandes danos oxidativos nos tecidos mas, sofrendo uma reação de dismutação catalisada pela enzima dismutase do superóxido (SOD^2), dá origem a peróxido de hidrogénio (H_2O_2). O $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 , na presença do ião ferroso (Fe_2^+), originam a produção do radical hidroxilo (OH^{\bullet}) que, sendo um agente oxidante extremamente reativo, inicia uma série de reações oxidativas em cadeia, responsáveis por extenso dano oxidativo nos tecidos. Este mecanismo de formação do radical hidroxilo é conhecido por reação de Fenton (descrito em [9]).

O mecanismo de tipo II, por ter um mecanismo mais simples e ser geralmente termodinamicamente favorecido, tende a ocorrer preferencialmente relativamente à reação de tipo I. Na prática a extensão de cada

² Do inglês *Superoxide Dismutase*.

uma das vias é determinada pelas características do PS, do protocolo de PDT aplicado e da concentração local de oxigénio [6, 10].

16.3. Percurso histórico da Terapia Fotodinâmica

Desde a antiguidade que a luz tem sido usada como agente terapêutico. Na Índia e na Grécia antiga já eram utilizadas diferentes formas de fototerapia, mas o conceito atual e a aplicação clínica da PDT foram descritos nos primeiros anos do século XX por Raab, von Tappeiner e Jesionek, que após uma década de trabalho utilizaram a aplicação tópica de eosina seguida de exposição à luz solar para tratar cancro de pele (descrito em [11, 12]). No entanto, os resultados obtidos não tiveram o alcance e o impacto desejados e a PDT ficou adormecida durante muitos anos. O interesse na PDT apenas ressurgiu a partir de 1960 com a descoberta do derivado de hematoporfirina (HPD) por Lipson e Baldes, que demonstrou alguma eficácia terapêutica após PDT num doente com cancro na bexiga [13]. Mas o potencial da PDT só se tornou aparente após o extenso trabalho de Dougherty e colaboradores que, entre 1975 e 1978, reportaram a cura completa de tumores malignos através da aplicação combinada de HPD e luz vermelha: inicialmente num modelo de cancro da mama em ratinho e mais tarde em doentes com tumores de pele, próstata, mama e cólon [14, 15]. Os resultados promissores foram sendo confirmados em ensaios clínicos com versões melhoradas de HPD em doentes com cancro da pele e da bexiga. Um marco histórico para a PDT foi alcançado no Canadá em 1993, com a aprovação regulamentar do porfímero sódico (Photofrin®), uma versão semi-purificada de HPD, para tratamento do cancro da bexiga [13].

Posteriormente, assistiu-se à aprovação do porfímero sódico noutros países, incluindo os EUA, encontrando-se actualmente aprovado no cancro esofágico, cancro brônquico e esófago de Barrett. No entanto, cedo se constatou a necessidade de encontrar novas moléculas mais eficazes e com menos efeitos adversos, ou seja, uma 2ª geração de PS para PDT. Com esse objectivo, a atenção focou-se na descoberta e desenvolvimento de novas moléculas, de que resultou a aprovação da temoporfina (Foscan®),

da família das clorinas, que está indicada no tratamento do cancro da cabeça e pescoço, e da verteporfina (Visudyne®) para o tratamento da degenerescência macular relacionada com a idade. Atualmente, encontram-se PS de 3ª geração, da família das bacterioclorinas, em fase avançada de desenvolvimento clínico (Figura 16.2).

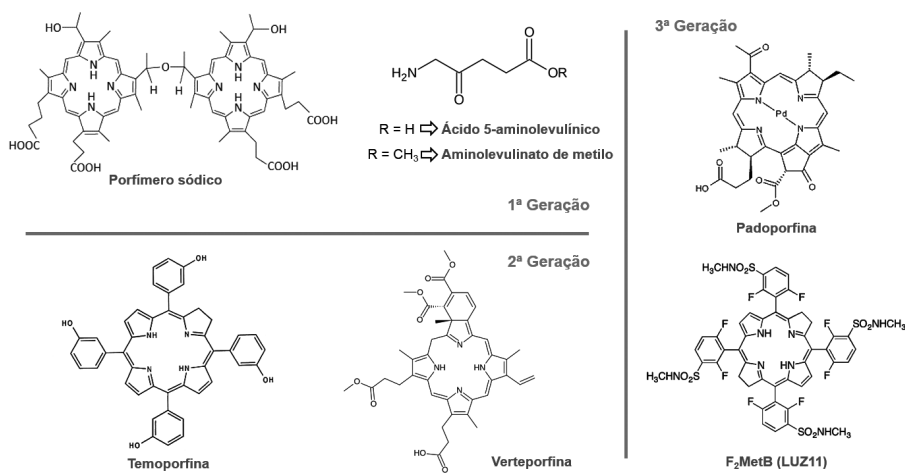


Figura 16.2. Estrutura química de alguns fotossensibilizadores usados ou em desenvolvimento para PDT. (F₂MetB - 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoiifenil)bacterioclorina [16]).

16.4. A Terapia Fotodinâmica como alternativa terapêutica no tratamento do cancro

16.4.1. Áreas de aplicação

O mecanismo da PDT tem como objectivo final a destruição seletiva de um tecido alvo. Este conceito foi aplicado em diferentes áreas terapêuticas, nomeadamente a oncologia.

Os alvos terapêuticos incluem tumores sólidos, não metastizados e que possam ser acedidos por uma fonte de luz. Uma das mais bem-sucedidas aplicações da PDT tem sido no tratamento de tumores não melanómicos da

pele, como o carcinoma basocelular (BCC) ou o carcinoma espinocelular, e lesões pré-cancerosas, como a queratose actínica [3]. Tem também sido usada, em regime “off-label”, no tratamento da acne [17]. Este sucesso é explicado quer pela facilidade de aplicação tópica do fármaco e da luz necessária ao tratamento, quer pelas vantagens cosméticas comparativamente a outras estratégias terapêuticas, como a cirurgia ou a crioterapia. Para além disso, nas aplicações cutâneas a PDT tem a vantagem de permitir tratar várias lesões em simultâneo [18]. Outros alvos terapêuticos tumorais para os quais existem PS em desenvolvimento são os tumores da bexiga, fígado, ductos biliares, pâncreas, colo uterino e cérebro [19].

16.4.2. Protocolo terapêutico

O protocolo da PDT é composto por dois passos sequenciais: primeiro, é necessário fazer chegar o PS ao local que se pretende tratar e depois procede-se à irradiação do tecido alvo com luz de um comprimento de onda adequado. A conjugação do PS e da luz inicia a reação fotoquímica, que dá origem à produção de ROS, responsáveis pelas respostas biológicas que levam à destruição do tecido alvo.

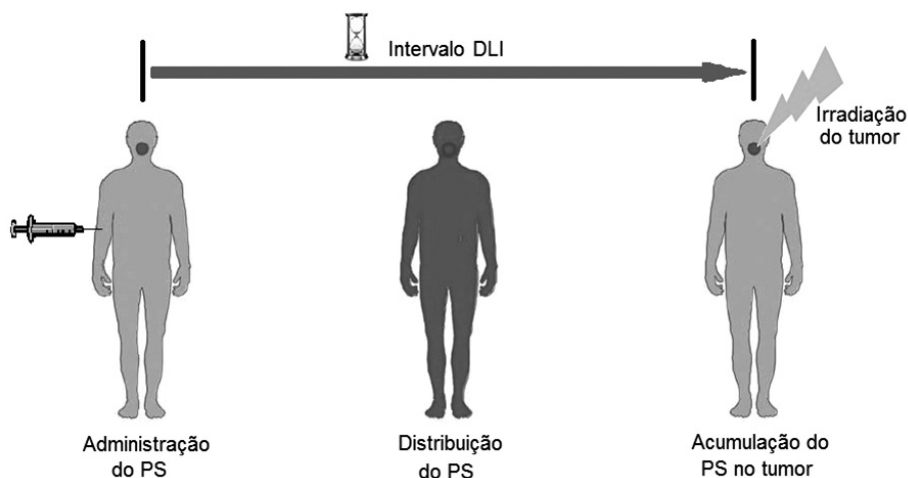


Figura 16.3. Esquema ilustrativo da aplicação clínica de um protocolo de PDT em oncologia.

Após a administração do PS é necessário aguardar um determinado período de tempo, para que este chegue e, de preferência, se acumule no tecido alvo. Este período tem a designação de “intervalo fármaco-luz” (DLI³) e depende da via de administração do PS, do tipo de PS e da sua farmacocinética e biodistribuição. No momento em que a quantidade de PS no tecido alvo atinge o seu valor óptimo (que maximiza o efeito foto-dinâmico), o local a tratar é irradiado com luz de comprimento de onda específico (normalmente corresponde à banda de absorção mais intensa do PS), durante o tempo necessário à obtenção da dose de luz predefinida. Durante a irradiação são produzidas as ROS que promovem a destruição do tumor, maioritariamente oxigénio singuleto (via reação tipo II), mas também os radicais superóxido e hidroxilo (via reação tipo I), tal como descrito anteriormente (Figura 16.3) [10].

O mecanismo da PDT depende da conjugação precisa de muitas variáveis, o que representa um enorme desafio na prática clínica, tornando bastante difícil a optimização dos protocolos. A obtenção do resultado terapêutico pretendido está dependente do tipo de PS, da dose administrada, da sua localização aquando da irradiação, da dose total de luz aplicada, da sua taxa de fluência, do comprimento de onda, do DLI, do tipo de tumor, e da concentração de oxigénio no seu interior [20].

A complexidade inerente à conjugação dos vários componentes do mecanismo da PDT e da multiplicidade de factores que afecta cada um deles, permite compreender a dimensão do desafio que constitui a optimização de todo o processo, para que se possa chegar a um tratamento oncológico seguro e altamente eficaz [21].

16.4.3. Vantagens e limitações

A elevada capacidade de destruição do tecido tumoral, preservando o tecido saudável circundante, é uma das características principais da PDT, sendo reconhecida como uma das suas maiores vantagens relativamente

³ Do inglês *Drug-Light Interval*.

a outras opções terapêuticas. Para este elevado nível de seletividade contribuem dois factores críticos: (1) a capacidade intrínseca de muitos PS se acumularem preferencialmente no tecido tumoral, e (2) a aplicação da luz exclusivamente na área a tratar [22]. A acumulação seletiva do PS no tumor é mais facilitada se a aplicação for tópica, uma vez que o PS é aplicado localmente apenas sobre a lesão a tratar. Nos casos em que a administração é intravenosa (IV), é necessário que o PS se mantenha em circulação durante o tempo suficiente para chegar e se poder acumular no tumor, tirando partido do micro-ambiente específico da maioria dos tumores sólidos. Estes apresentam capilares sanguíneos fenestrados, drenagem linfática reduzida e pH baixo, originando o chamado efeito de EPR⁴ que favorece a passagem e acumulação de PS no local (descrito em [23]).

O carácter local da PDT, que se pode considerar simultaneamente uma vantagem e uma limitação, como se explicará mais à frente, é reforçado pelo facto da produção das ROS no tecido alvo ocorrer apenas durante o tempo e no local onde se verificar interação da luz com o PS. Para além disso, tanto o oxigénio singuleto como o radical hidroxilo têm tempos de vida de alguns nanosegundos, o que limita o seu raio de ação destrutiva ao local onde são produzidos, evitando a propagação dos fenómenos oxidativos aos tecidos saudáveis circundantes [10].

Os reduzidos efeitos secundários, que advêm da elevada seletividade, e a inexistência de mecanismos específicos de resistência à PDT, permitem que o tratamento possa ser repetido em caso de necessidade, como em situações de recorrência ou de existência de múltiplas lesões. A PDT pode ser também utilizada em conjugação com cirurgia, quimioterapia ou radioterapia, uma vez que não interfere com estas modalidades de tratamento nem apresenta os efeitos secundários que as caracterizam. Muitas combinações de PDT com fármacos convencionais estão também a ser estudadas com o objectivo de encontrar efeitos de sinergismo [24].

A ausência de sequelas significativas depois de tratamentos de PDT constitui também uma enorme vantagem. Durante o tratamento não se verifica o aumento da temperatura do tecido, ainda que em tratamentos

⁴ Do inglês *Enhanced Permeability and Retention*.

dermatológicos com frequência os pacientes reportem a sensação de queimadura, e também não há destruição do tecido conjuntivo, o que permite manter a integridade dos tecidos em termos anatómicos e funcionais. Exemplo disso é o excelente efeito cosmético que normalmente se obtém depois do tratamento de lesões na pele, em oposição às cicatrizes que frequentemente subsistem após uma cirurgia [22].

Na área da oncologia, em tumores sólidos localizados e em fase inicial de desenvolvimento, a PDT pode ser uma alternativa terapêutica extremamente eficaz com apenas um tratamento. No entanto, em casos de cancro avançado onde os tumores são normalmente de maiores dimensões, a PDT tem sido aplicada apenas como tratamento paliativo, devido a capacidade limitada de penetração da luz nos tecidos. Nestes casos, permite atrasar a progressão da doença e aumentar a qualidade de vida dos doentes. O carácter localizado da PDT também tem sido visto como uma das suas principais limitações, uma vez que até agora não permitia o tratamento de tumores metastizados [13, 22]. Com o intuito de ultrapassar esta limitação, muitos grupos de investigação estão empenhados em compreender e modular a resposta do sistema imunitário após o tratamento de PDT. O objectivo é favorecer a geração de uma resposta imunitária anti-tumoral específica com capacidade para eliminar células tumorais espalhadas pelo organismo (*e.g.* metástases) [25, 26].

As reações de fotossensibilidade cutânea têm sido apontadas até agora como o efeito adverso mais significativo da PDT. Este é um problema que ocorre devido à acumulação de PS na pele dos doentes. As moléculas de PS acumuladas na pele podem iniciar a reação fotodinâmica, por ação da luz solar ou iluminação artificial forte, originando lesões cutâneas de fotossensibilidade. O mesmo fenómeno pode ocorrer a nível ocular. Para evitar este problema, os pacientes devem permanecer em casa algumas semanas após o tratamento, até que os níveis de PS na pele diminuam para valores seguros. Ainda que à primeira vista esta limitação possa ser considerada um preço baixo a pagar pelo doente, tendo em conta os benefícios obtidos, o risco de fotossensibilidade sempre foi mal aceite quer por doentes quer por médicos, tendo contribuído para a lenta penetração da PDT na prática clínica. No tratamento com

porfímero sódico (Photofrin[®]) o período de fotossensibilidade pode durar entre 4 e 12 semanas, enquanto com a temoporfina (Foscan[®]) é de 2 a 4 semanas [12, 13]. Alguns PS de 3^a geração atualmente em desenvolvimento já apresentam perfis farmacocinéticos que se caracterizam por uma rápida eliminação do composto do organismo, minimizando a sua acumulação na pele, o que se traduz numa redução significativa do risco de ocorrência de reacções de fotossensibilidade [27, 28]

16.4.4. Fontes de luz, fotossensibilizadores e oxigénio

16.4.4.1. Fontes de luz

Acompanhando os progressos que se têm verificado ao nível do desenvolvimento de novas moléculas para PDT, o conhecimento da interação da luz com tecidos biológicos e o desenvolvimento tecnológico de fontes de luz também conheceram grandes avanços. Atualmente é possível fazer chegar luz em doses adequadas e de forma precisa à maioria dos locais no organismo. Os sistemas de irradiação utilizados em PDT variam consoante o tipo de tumor a irradiar e a sua localização. Para tratamentos na pele, lâmpadas adequadas, associadas a sistemas de filtros ópticos, ou sistemas de LED⁵ são boas alternativas devido ao baixo custo e ao fácil acesso à zona a tratar. Para tratamento de tumores internos e/ou de maiores dimensões recorre-se frequentemente a um laser cuja luz é direcionada para o tecido alvo por intermédio de fibra óptica, através de endoscopia. Atualmente os lasers de díodo são muito usados em PDT devido à sua fiabilidade e simplicidade de utilização. Cada laser emite num determinado comprimento de onda que é fixo, o que obriga a existência de dispositivos de irradiação específicos para cada PS com bandas de absorção distintas [13, 22].

A luz é um componente-chave da PDT, como tal é necessário fazê-la chegar de forma precisa e em quantidade adequada ao tecido alvo para

⁵ Do inglês *Light-Emitting Diode*.

que o tratamento produza o efeito desejado. A propagação da luz nos tecidos é influenciada principalmente por fenômenos de dispersão e absorção, que dependem da composição do tecido e do comprimento de onda da luz. A estrutura dos tecidos não é homogênea devido à presença de macromoléculas, organitos celulares e outras estruturas, o que contribui para uma grande dispersão de luz, especialmente para comprimentos de onda mais baixos. A influência da absorção é bastante menor mas ainda assim, moléculas como a hemoglobina ou a melanina possuem cromóforos responsáveis pela absorção de luz abaixo dos 600 nm, enquanto acima dos 1300 nm a absorção de luz pela água nos tecidos aumenta substancialmente. Para além disso, a luz de comprimento de onda superior a 800 nm não possui energia suficiente para iniciar a reação fotodinâmica. Devido a estes constrangimentos a gama útil de comprimentos de onda da luz para PDT, designada por janela terapêutica, situa-se entre os 600 e os 800 nm [10, 25].

A profundidade de penetração efetiva média da luz varia de forma significativa dentro desta gama de comprimentos de onda. Por exemplo, um PS que seja excitado com luz de 630 nm permite uma profundidade efetiva de tratamento de 3-5 mm, enquanto outro PS com absorção a 750 nm permite aumentar profundidade efetiva para cerca de 10 mm. Este facto explica o grande esforço que se tem verificado no desenvolvimento de novas moléculas para PDT com elevada absorção a comprimentos de onda mais elevados, que visam garantir maior eficácia em zonas mais profundas ou em tumores de maior dimensão [6].

Sendo um dos componentes essenciais da PDT, a luz a utilizar deve ser controlada de forma rigorosa em termos de precisão da aplicação, área de aplicação, intensidade e dose total. Para cada protocolo de irradiação estão definidos rigorosamente os parâmetros chave a respeitar e que consistem normalmente em:

Energia em Joule (J);

Potência em Watt (W)⁶;

⁶ 1 W = 1 J/segundo.

Fluência – energia por unidade de área (J/cm_2);

Taxa de fluência – velocidade de aplicação da luz por unidade de área (W/cm_2);

Tempo de irradiação.

16.4.4.2. Fotossensibilizadores

A maioria das moléculas usadas como PS em PDT é baseada na estrutura do anel tetrapirrólico da porfirina, semelhante ao encontrado no grupo heme da hemoglobina, ou nas clorofilas, que são conhecidas pela sua grande capacidade de absorção de luz.

Como referido anteriormente (Secção 16.3), os primeiros compostos a demonstrar potencial terapêutico em PDT foram derivados da hematoporfirina (HPD), cuja versão purificada e aprovada comercialmente, o porfímero sódico (Photofrin[®]), representa a 1^a geração de fármacos para PDT. O porfímero sódico caracteriza-se por ser uma mistura de moléculas foto-ativas e apresenta um espectro com várias bandas de absorção, que diminuem de intensidade quanto maior for o comprimento de onda, até aos 630 nm. Uma vez que a capacidade de penetração da luz nos tecidos aumenta com o comprimento de onda, a excitação do porfímero sódico é efectuada com luz de 630 nm, o que obrigada à aplicação de doses de luz elevadas ($100 - 200 J/cm_2$) para compensar a sua reduzida absorção de luz nessa região do espectro. Apesar de atualmente continuar a ser utilizado na clínica, cedo se percebeu que o porfímero sódico apresentava alguns pontos fracos: (1) baixa eficácia, devido à reduzida capacidade de absorver luz e à limitada capacidade da luz de 630 nm em penetrar nos tecidos, e (2) longo período de fotossensibilidade cutânea como principal efeito secundário [13].

A aprovação do ácido 5-aminolevulínico (Levulan[®]), seguida pela do seu éster mais apolar aminolevulinato de metilo (Metvix[®]), constituiu outro importante marco na história da PDT. Ambas as moléculas são pró-fármacos, uma vez que são metabolizadas no interior das células para formar o verdadeiro PS, a protoporfirina IX (um PS de

1ª geração). As suas principais indicações são o tratamento de lesões pré-cancerígenas da pele, como a queratose actínica, ou cancerígenas não melanómicas, como o BCC [12].

Como resultado da procura de melhores PS, em 2001 foi aprovado na Europa um novo fármaco para PDT, a temoporfina (Foscan®), um PS de 2ª geração. A temoporfina é um composto puro, com maior absorção de luz num comprimento de onda mais longo (652 nm) relativamente às porfirinas, necessitando de doses de luz cerca de dez vezes inferiores e permitindo uma profundidade efetiva de tratamento ligeiramente superior à do porfímero sódico. De realçar também que o período de fotossensibilidade cutânea da temoporfina é significativamente menor (2 a 4 semanas contra 4 a 12 semanas para o porfímero sódico) [13]. Contudo, a aprovação da temoporfina para PDT deixou ainda uma grande margem de progressão para o desenvolvimento de novos PS, com propriedade farmacocinéticas mais favoráveis e com maiores índices fototerapêuticos. Neste contexto, entende-se o índice fototerapêutico como a razão entre toxicidade do PS na ausência de luz e a sua fototoxicidade, ou seja, um índice que traduz a vantagem de um PS que é bem tolerado pelo organismo mas que se torna localmente muito citotóxico quando é iluminado por luz de comprimento de onda adequado.

As características de um fotossensibilizador ideal para aplicação em PDT no tratamento do cancro encontram-se descritas e discutidas em vários artigos de revisão [10, 12, 22], revelando a existência de um elevado consenso. Assim, um PS ideal deve ser um composto puro, com boa estabilidade em armazenamento e com baixo custo de produção. Deve apresentar uma forte absorção de luz em comprimentos de onda elevados, dentro da janela terapêutica (600 – 800 nm) e elevada capacidade para geração de ROS, para maximizar a sua eficácia e a profundidade efetiva de tratamento. Deve ter características físico-químicas que facilitem a sua administração em formulações biocompatíveis e que favoreçam a sua acumulação preferencial no tecido alvo. Não deve ser tóxico na ausência de luz e deve ser rapidamente eliminado dos tecidos saudáveis de forma a minimizar a ocorrência de efeitos secundários.

Na última década tem-se assistido à procura de uma 3ª geração de PS para PDT que deverá apresentar moléculas ativadas por luz de comprimentos de onda mais longos, que minimizem ou eliminem a ocorrência de reações de fotossensibilidade cutânea e que tenham uma maior capacidade de acumulação seletiva no tumor [13]. Inserindo-se nesta nova geração de PS, recentemente foi desenvolvida a síntese de uma família de macrociclos tetrapirrólicos da família das bacterioclorinas [29, 30], que se têm evidenciado por apresentar características fotofísicas e

Tabela 16.1. Medicamentos para PDT aprovados para tratamento de tumores ou lesões pré-cancerígenas na Europa e nos EUA [31, 32].

Molécula	Excitação λ (nm)	Nome Comercial	Indicação Aprovada
Porfímero sódico	630	Photofrin (EUA)	<ul style="list-style-type: none"> • Displasia grave do esófago (esófago de Barret) • Cancro do esófago • Cancro do pulmão
		Levulan (EUA)	<ul style="list-style-type: none"> • Queratose actínica
Ácido 5-aminolevulínico (5-ALA)	635	Ameluz (Europa)	<ul style="list-style-type: none"> • Queratose actínica
		Gliolan (Europa)	<ul style="list-style-type: none"> • Glioma (em combinação com cirurgia)
Aminolevulinato de metilo (MAL)	635	Metvixia (EUA)	<ul style="list-style-type: none"> • Queratose actínica
		Metvix (Europa)	<ul style="list-style-type: none"> • Queratose actínica • Carcinoma basocelular • Carcinoma espinocelular <i>in situ</i>
Temoporfina	652	Foscan (Europa)	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro da cabeça e pescoço

fotoquímicas muito próximas do PS ideal [16, 33], tendo revelado resultados muito promissores na fase de desenvolvimento não-clínico [34-36]. Um outro exemplo, é a padoporfina, um derivado de bacterioclorofila que se encontra em desenvolvimento clínico para o cancro da próstata [37]. Na Tabela 16.1 encontram-se listados os PS aprovados para PDT do cancro na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA). A Tabela 16.2 apresenta os PS em fase de desenvolvimento clínico para indicações oncológicas.

16.4.4.3. Oxigénio

Apesar do oxigénio molecular ser um dos três componentes chave do mecanismo da PDT, a sua importância para a eficácia do tratamento pode ser facilmente negligenciada ao assumir-se como certa a sua presença em quantidade suficiente no tecido alvo. Na realidade a concentração de O_2 pode variar de forma significativa entre diferentes tumores e mesmo entre diferentes regiões do mesmo tumor, dependendo principalmente da densidade da vasculatura que o irriga. Especialmente em tumores sólidos mais profundos, frequentemente caracterizados pelo seu micro-ambiente anóxico, a falta de oxigénio pode ser um factor muito limitante. Num tratamento de PDT, a irradiação do tumor com luz de potência elevada pode facilmente levar a que a velocidade a que o O_2 é consumido pela reação fotodinâmica supere a taxa de difusão do O_2 no tecido. Esta situação pode originar o esgotamento local temporário do O_2 , levando à interrupção da produção de ROS e à consequente redução da eficácia do tratamento. De facto, num ambiente anóxico, um PS com estado tripleto mais longo tem mais probabilidade de interagir com uma molécula de oxigénio antes de retornar ao seu estado electrónico fundamental. Consequentemente, nestas condições, poderá ser mais eficaz do que um PS com estado tripleto mais curto. Existem estratégias que devem ser consideradas durante a fase de optimização do protocolo de PDT para controlar os níveis de O_2 no tumor. Através de técnicas de monitorização da quantidade de O_2 nos tecidos [39] é possível ajustar a potência da luz (compensada com o aumento do tempo de irradiação para manter a dose total de luz) até que a taxa de consumo de O_2 se equipare à taxa de difusão. Este equilíbrio também pode ser conseguido recorrendo ao fraccionamento da dose de luz, isto é, aplicação intermitente da dose de luz (descrito em [40, 41]).

Tabela 16.2. Moléculas em fase desenvolvimento clínico para PDT do cancro [38].

Molécula	Excitação λ (nm)	Indicação em Estudo	Fase Clínica
5-ALA	635	• Cancro da cabeça e pescoço	I
		• Neurofibroma dérmico benigno	I
		• Carcinoma basocelular	II
		• Cancro do cólon	II
Hexaminolevulinato	635	• Cérvix uterino	II
HPPH	665	• Cancro da cabeça e pescoço	II
		• Mesotelioma	I
		• Cancro do pulmão	II
Padioporfina	753	• Cancro do rim	II
		• Cancro da próstata	III
Porfímero sódico	630	• Tumores do SNC	I
		• Metástases de carcinoma da mama na pele	I
		• Hepatocarcinoma	I
		• Cancro da bexiga	II
		• Cancro da cabeça e pescoço	II
		• Mesotelioma	II
• Colangiocarcinoma	III		
Ftalocianina de silício 4	675	• Tumores cutâneos (não-melanoma)	I
Temoporfina	652	• Cancro do pulmão	I
LUZ11	749	• Cancro da cabeça e pescoço	I/II

HPPH – 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide- α ; SNC – Sistema nervoso central; LUZ11 - 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoilfenil) bacterioclorina.

16.5. Efeitos da Terapia Fotodinâmica no organismo

16.5.1. Biodistribuição e acumulação intracelular do PS

16.5.1.1. Aplicação tópica

A identificação visual e o fácil acesso às lesões localizadas na pele conduziram à seleção da via de administração tópica como via pre-

ferencial para aplicação cutânea de PDT. No entanto, o elevado peso molecular dos PS que têm como estrutura base a molécula de porfirina, que dificulta a permeação cutânea, levou ao desenvolvimento de novos PS com menor peso molecular. O ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e o metilaminolevulinato (MAL) são moléculas bastante mais pequenas e, por isso, em formulações adequadas para aplicação tópica, apresentam uma capacidade muito maior para atravessar a barreira física da pele, especialmente o MAL por ser mais hidrofóbico. Ambos são precursores metabólicos da protoporfirina IX (PP IX), uma molécula fotossensibilizadora produzida pela via biossintética do grupo heme em todos os tipos de células nucleadas do organismo (Figura 16.4) [12].

O protocolo de tratamento inicia-se com a aplicação de uma formulação tópica da molécula precursora diretamente sobre as lesões a tratar. Após a aplicação são necessárias algumas horas de espera antes da irradiação, para que o composto penetre nas células alvo e seja convertido em protoporfirina IX (PP IX), que é sintetizada na mitocôndria e depois acumula-se noutros sistemas membranares intracelulares [22]. Esta acumulação ocorre devido à saturação da enzima ferroquelatase, que converte a PP IX no grupo heme e que em alguns tipos de tumor também apresenta menor atividade do que nos tecidos normais, contribuindo de forma significativa para a seletividade do tratamento [42].

16.5.1.2. Administração sistémica

Quando a lesão a tratar se encontra em locais mais internos do organismo é necessário que o PS, formulado num veículo adequado às suas características físico-químicas, seja injetado na corrente sanguínea, para que se distribua pelo organismo e preferencialmente se acumule nas células alvo. Os perfis de farmacocinética e de biodistribuição, que dependem muito do tipo de PS, permitem a determinação dos parâmetros do protocolo de PDT, especialmente o momento em que é realizada a irradiação [43]. A polaridade da molécula é um dos principais factores que determinam o modo como a molécula se distribui pelo organismo quando entra no

sistema vascular, quanto tempo permanece em circulação, como interage com os componentes sanguíneos e qual a sua capacidade para se acumular no tecido tumoral. Estes factores também estão muito dependentes da composição da formulação selecionada para administrar o PS [23].

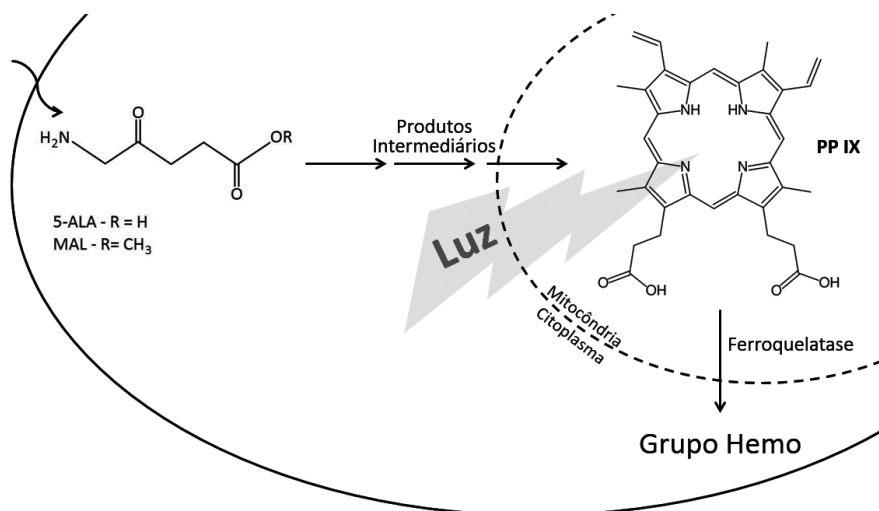


Figura 16.4. Esquema resumido da via biossintética do grupo heme. A entrada de 5-ALA ou MAL exógeno nas células favorece a síntese e acumulação de PP IX. Após a aplicação da formulação tópica o intervalo de tempo DLI tem uma duração de 3 a 6h, após o qual o tecido alvo é irradiado com luz de 635 nm.

Compostos com características hidrofílicas, por serem mais solúveis em meio aquoso, são mais simples de formular e administrar sem causar precipitação e, quando em circulação, ligam-se preferencialmente à albumina. No entanto, a sua elevada polaridade dificulta a sua passagem através da membrana celular (com características apolares), o que resulta em baixos níveis de acumulação nas células tumorais. Por outro lado, moléculas com características hidrofóbicas têm solubilidade muito reduzida em meio aquoso pelo que a sua administração IV não é tão simples.

Este tipo de PS requer formulações mais complexas como micelas, lipossomas, nanopartículas poliméricas ou conjugação com polímeros hidrofílicos. Para além deste tipo de formulações para entrega passiva, têm sido desenvolvidas outras que permitem aumentar a seletividade do PS através de direcionamento ativo para o tecido tumoral, fazendo a sua

conjugação com lipoproteínas de baixa densidade (LDL), anticorpos monoclonais específicos ou outras moléculas com elevada afinidade para os tumores alvo. A formulação ideal deve ser biodegradável, não-imunogénica e permitir a acumulação do PS no tecido alvo em quantidade terapêutica, minimizando ou eliminando a sua interação com os tecidos saudáveis. Deve proporcionar também a entrega do PS na sua forma monomérica e sem alteração da sua atividade terapêutica [44].

Muitos dos PS com características hidrofóbicas após entrarem na circulação têm tendência para se ligarem ao núcleo lipídico de lipoproteínas, principalmente as LDL, tirando partido da sobre-expressão de receptores para as LDL em muitas células tumorais para aí conseguirem uma acumulação mais seletiva. Este aumento da expressão dos receptores de LDL permite às células neoplásicas captar o colesterol extra de que necessitam para a biossíntese de membranas celulares que necessitam para o seu rápido desenvolvimento [23].

16.5.1.3. Localização intracelular do PS

Como referido na Secção 16.4.3, um dos factores que contribui para a seletividade da PDT é o tempo de vida muito curto das ROS formadas no local da irradiação, o que limita o seu raio de ação destrutiva a apenas alguns nanómetros. Este facto obriga a que, nos protocolos de PDT que visam tirar partido duma acumulação preferencial do PS nas células tumorais, o PS tenha capacidade de chegar e interagir com as células do tecido alvo. Esta interação compreende a sua entrada na célula e a sua localização intracelular, e depende sobretudo da carga iónica, polaridade e grau de assimetria da molécula de PS. Compostos com características hidrofóbicas e com até 2 cargas negativas podem entrar nas células atravessando a membrana celular por difusão e posteriormente localizar-se no ambiente apolar de estruturas membranares intracelulares, como o retículo endoplasmático ou a aparelho de Golgi. Os PS deste tipo tendem a ser captados em maior quantidade, mesmo quando a sua concentração no meio extracelular é baixa. Já as moléculas com características hidrofílicas

e com mais de 2 cargas negativas são demasiado polares para atravessar a membrana celular por difusão e, por isso, são captadas pelas células por endocitose, podendo depois localizar-se nos lisossomas formados nesta via de internalização [6, 43].

Outra das possibilidades de localização intracelular para um PS é a mitocôndria. Compostos hidrofóbicos e com cargas positivas tendem a localizar-se na mitocôndria atraídos pelo seu potencial de membrana e ambiente apolar. A mitocôndria é considerada um alvo intracelular muito importante em PDT, isto porque a sua destruição pela reação fotodinâmica está associada ao desencadear do mecanismo de morte celular programada por apoptose [6].

Os PS não têm tendência para se localizarem no núcleo das células e, por isso, as ROS geradas pela aplicação da PDT não têm efeito direto sobre o seu ADN, o que reduz bastante o risco da ocorrência de efeitos mutagénicos, frequentemente associados aos tratamentos de quimioterapia ou radioterapia [20, 45].

O estudo da localização intracelular dos PS utilizados em PDT é considerado de grande importância, uma vez que permite relacionar os locais de acumulação dos compostos no interior das células com o efeito fotodinâmico obtido e assim suportar a escolha do PS mais adequado para a aplicação pretendida. Estes estudos são normalmente realizados recorrendo à microscopia confocal de fluorescência onde se identifica, por co-localização, a fluorescência das moléculas de PS com a fluorescência de sondas marcadoras que se localizam de forma específica nos diversos organitos celulares.

16.5.2. Modos de ação da PDT

Em oncologia, o resultado esperado de um tratamento de PDT é a eliminação definitiva do tumor tratado e para este resultado contribuem 3 efeitos distintos, mas que parecem estar interligados [23]. Na Figura 16.5 encontram-se representados os efeitos associados ao mecanismo da PDT.

16.5.2.1. Efeito direto sobre as células tumorais

A ação direta da PDT sobre as células tumorais constitui o efeito mais estudado e procurado quando se aplica esta estratégia terapêutica no cancro. Os três mecanismos principais de morte celular – necrose, apoptose e autofagia – podem ser ativados como resposta à cascata oxidativa iniciada pelas ROS formadas na reação fotodinâmica. O dano oxidativo destrói de forma irreversível biomoléculas e estruturas celulares chave conduzindo à morte celular. O mecanismo de morte celular está diretamente relacionado com os organitos celulares onde as moléculas de PS se localizavam no momento da irradiação, uma vez que serão esses que sofrerão os danos mais severos [20, 23]. O efeito citotóxico direto sobre as células tumorais é favorecido por protocolos com intervalo DLI suficientemente elevado (*e.g.* >24 horas) que permitam a entrada e acumulação preferencial do PS nas células tumorais, relativamente aos tecidos saudáveis circundantes e ao compartimento vascular, contribuindo para um tratamento de PDT bastante seletivo.

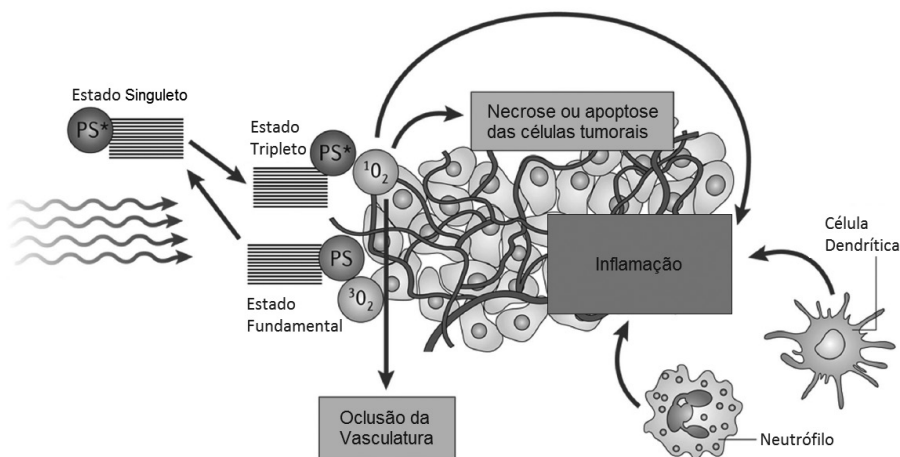


Figura 16.5. Representação esquemática dos modos de ação da PDT no tratamento do cancro (adaptado com permissão de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer [25], © 2006).

16.5.2.2. Efeito vascular

Para além dos danos oxidativos causados diretamente nas células tumorais pela PDT, frequentemente a aplicação da PDT também leva à destruição da microvasculatura tumoral, originando a morte do tecido tumoral devido à interrupção do fornecimento de oxigénio e nutrientes [46]. Vários estudos demonstraram que este efeito tem um papel muito importante para a eficácia da PDT a longo prazo (descrito em [10]), sendo por isso uma estratégia muito explorada atualmente. Em termos práticos, opta-se por um protocolo de PDT com administração IV e com um intervalo DLI muito curto (e.g. <30 minutos), para que a irradiação do tumor seja realizada quando a maior parte do PS ainda se encontra no compartimento vascular [28]. Desta forma sacrifica-se o ganho de seletividade obtido com uma possível acumulação seletiva do composto no tumor (que requer um intervalo DLI maior) para obter um ganho de eficácia por via da destruição da vasculatura tumoral. Neste tipo de protocolo a seletividade continua a ser assegurada pela forma precisa de aplicação de luz sobre o tumor, evitando o mais possível a irradiação de tecido saudável circundante [47].

Os efeitos da PDT na microvasculatura tumoral estarão relacionados sobretudo com danos sobre o endotélio. Dependendo do PS utilizado, estes efeitos podem estar relacionados com alteração dos níveis de óxido nítrico, ativação plaquetar e libertação de tromboxanos, que originam vasoconstrição, adesão de leucócitos, agregação plaquetar e formação de trombos [23].

16.5.2.3. Efeito sobre o sistema imunitário

As terapias oncológicas tradicionais apresentam frequentemente efeitos secundários indesejáveis. Entre outros efeitos adversos, as doses terapêuticas utilizadas em quimioterapia ou radioterapia causam normalmente imunossupressão, devido à sua toxicidade sobre a medula óssea (responsável pela produção das células que compõem o sistema imunitário) [25].

A PDT foi durante muitos anos considerada como um tratamento local que exercia o seu efeito unicamente através da ação tóxica das ROS diretamente sobre as células e a microvasculatura tumoral. Recentemente, provou-se que a ação da PDT provoca frequentemente uma resposta inflamatória aguda localizada, o que leva à ativação do sistema imunitário do paciente. A resposta imunitária gerada também contribui de forma significativa para a eficácia da terapia, conseguindo mesmo atuar em tumores estabelecidos em locais afastados do local de irradiação (descrito em [48, 49]). Estas importantes descobertas foram realizadas sobretudo em modelos animais, mas existem relatos de tratamentos clínicos de PDT que confirmam a existência de uma resposta anti-tumoral sistêmica induzida pela PDT [50, 51]. A resposta imunitária induzida pela PDT será abordada em maior profundidade na Secção 16.5.4.

16.5.3. Mecanismos de morte celular em PDT

Os estudos até agora realizados demonstram que não existe um mecanismo único responsável pela morte celular provocada pela PDT. Na Secção 16.5.2.1 foi referido que os três principais mecanismos de morte celular (apoptose, necrose ou autofagia) poderão estar envolvidos. O contributo de cada um deles para o efeito final da PDT depende do tipo de tumor, das características do PS e dos múltiplos factores que definem o protocolo de tratamento. Os resultados conhecidos sugerem que em protocolos de PDT mais agressivos (elevada dose de PS, elevada dose de luz, ou ambas e tempos DLI curtos) tendem a provocar extensa morte celular por necrose, ao contrário de protocolos menos intensos, que parecem favorecer a morte celular por apoptose [52].

16.5.3.1. Autofagia

A autofagia é um mecanismo celular catabólico que permite às células eucarióticas reciclar os seus componentes. Numa situação normal este

mecanismo permite às células a digestão de proteínas e organitos danificados ou agentes patogénicos, mas em situações de emergência pode permitir a redistribuição de nutrientes para processos essenciais à sua sobrevivência. No entanto, em situações mais extremas também pode levar à morte celular, devido a excessiva digestão de componentes essenciais [20, 52].

A autofagia também pode apresentar esta dicotomia funcional como resposta à PDT. Em determinadas condições pode permitir às células recuperar dos danos infligidos pela PDT e noutras pode favorecer a morte das células atingidas pelo tratamento. Os dados disponíveis parecem indicar que nos protocolos de PDT em que a apoptose é a principal via de morte celular, a autofagia funciona como um mecanismo de reparação celular, protegendo as células afectadas pela destruição oxidativa e contrariando o efeito do tratamento. Noutras situações, quando o mecanismo de apoptose nas células afectadas pela PDT se encontra danificado, ocorre um aumento brutal da atividade autofágica que promove a morte celular, favorecendo a destruição do tumor. No entanto, o mecanismo responsável pela alternância entre o efeito protetor e o efeito destruidor da via autofágica ainda é pouco conhecido [10, 53].

16.5.3.2. Apoptose

A apoptose é descrita como um mecanismo de morte celular programada que se encontra geneticamente codificado e dependente de energia (sob a forma de ATP). Em termos morfológicos, caracteriza-se pela condensação da cromatina, clivagem do ADN cromossómico, contração celular, enrugamento da membrana com formação dos corpos apoptóticos, e exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana celular [52, 53]. O processo de apoptose leva à secreção de moléculas sinalizadoras para o meio extracelular que atraem células fagocíticas responsáveis pela eliminação dos corpos apoptóticos resultantes, evitando o processo inflamatório e a consequente ativação do sistema imunitário [45].

O facto de protocolos de PDT menos agressivos favorecerem a morte celular por apoptose pode ser explicado pela necessidade de que toda

a complexa maquinaria celular necessária se encontre funcional, o que poderá não acontecer após protocolos de PDT mais agressivos [52].

16.5.3.3. Necrose

A necrose é um mecanismo de morte celular descrito como uma forma de degeneração rápida e marcada de populações celulares relativamente grandes, e que se caracteriza pela expansão do citoplasma, destruição de organitos e desintegração da membrana celular, provocando a libertação do conteúdo do citoplasma para o meio extracelular e consequente reação inflamatória. Este mecanismo é favorecido por protocolos de PDT mais agressivos, com doses elevadas de PS, de luz, ou de ambos, e também por PS que tendem a acumular na membrana celular [52].

Devido à capacidade de originar uma extensa resposta inflamatória aguda local, que pode levar à ativação do sistema imunitário, o mecanismo de morte celular por necrose poderá ser o mais relevante para protocolos de PDT com eficácia sistêmica e de longo prazo.

As vias de morte celular ativadas pela PDT dependem das estruturas celulares diretamente atingidas pelo dano oxidativo e a extensão dos danos determinará a resposta celular. Possivelmente, o mecanismo de autofagia será ativado como forma de defesa pelas células afetadas pela PDT, para tentar conter e eliminar proteínas e estruturas danificadas. A partir de um determinado limiar de destruição, quando a reparação celular deixa de ser possível, ocorrerá a ativação da via apoptótica. Nos casos em que o protocolo de PDT é extremamente agressivo, destruindo a maquinaria celular responsável pelos mecanismos de autofagia e apoptose e levando à perda de integridade celular, a necrose será a única via de morte celular possível [52]. Note-se, porém, que no tratamento de um tumor sólido a distribuição da luz no tecido tumoral não será homogênea devido à forte atenuação da luz pelos tecidos. Assim, a região mais superficial do tumor estará sujeita a uma dose de luz mais elevada do que uma região mais profunda, o que poderá significar que os mecanismos de morte celular a ocorrer sejam diferente nas várias regiões do tecido tumoral.

Assim, uma melhor compreensão da relação entre os mecanismos de autofagia, apoptose e necrose ao nível intracelular, juntamente com um maior conhecimento do seu impacto no desenvolvimento da resposta imunitária, são requisitos essenciais para melhorar as estratégias terapêuticas em PDT.

16.5.4. Resposta imunitária induzida pela PDT

Em oncologia, para além da destruição definitiva do tumor principal, a terapia ideal deve ser capaz também de ativar o sistema imunitário para o reconhecimento e destruição das células tumorais no local, ou em metástases noutras locais do organismo. A PDT tem sido descrita como sendo capaz de provocar alterações significativas no sistema imunitário. Estas alterações podem traduzir-se em efeitos de ativação ou de supressão da resposta imunitária. Os efeitos imunossupressores apenas têm sido associados a uma reação local a tratamentos de lesões na pele com áreas de irradiação elevadas [25, 54].

O dano oxidativo infligido sobre as células que fazem parte do estroma tumoral (células tumorais, células endoteliais, macrófagos, etc.) pela PDT leva à sua morte por necrose ou apoptose. Por oposição à apoptose, onde o conteúdo do citoplasma das células permanece isolado em vesículas membranares, a necrose caracteriza-se pela desintegração da membrana plasmática e libertação do conteúdo do citoplasma para o meio extracelular, originando a exposição de antigénios tumorais que normalmente se encontram confinados ao meio intracelular. Esta alteração súbita da integridade e da homeostasia do tecido desencadeia uma resposta inflamatória aguda iniciada pela secreção de mediadores pro-inflamatórios como o factor de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) ou interleucina-6 (IL-6), que atraem elementos responsáveis pela resposta imunitária não específica que se infiltram no tecido danificado: neutrófilos, mastócitos, macrófagos e células dendríticas [52].

Esta mobilização das células da componente inata do sistema imunitário tem como função repor a homeostasia na região afectada, através da

destruição das células danificadas e remoção dos detritos resultantes da morte das células do tecido tumoral, e é fundamental para a subsequente ativação da componente adaptativa.

As células dendríticas desempenham um papel de relevo na ponte entre os dois braços do sistema imunitário, o inato e o adaptativo. Ao infiltrarem-se na região afectada pela PDT, as células dendríticas são ativadas pelos mediadores de inflamação presentes, captando antígenos tumorais presentes no meio extracelular e dirigindo-se depois para os nódulos linfáticos mais próximos. Aí chegadas as células dendríticas expõem os antígenos tumorais, tornando-os acessíveis ao contacto com linfócitos T CD4⁺ que ficam ativados. Estes por sua vez estimulam linfócitos T citotóxicos CD8⁺, que assim adquirem a capacidade de reconhecer e destruir de forma específica as células tumorais, podendo circular por todo o organismo durante longos períodos de tempo, assegurando uma resposta imunitária anti-tumoral sistémica (descrito em [10, 23, 25]). A Figura 16.6 mostra de forma esquemática o mecanismo de ativação do sistema imunitário como resposta ao tratamento de PDTO. O equilíbrio entre a ocorrência de apoptose ou necrose depende das características do PS e dos factores que definem o protocolo de PDT e tem influência direta na extensão da resposta imunitária induzida pela PDT [53]. No entanto, não é consensual qual das vias é mais eficaz na ativação do sistema imunitário. A hipótese com maior número de apoiantes defende que os protocolos de PDT anti-tumoral que favorecem a morte celular por necrose são muito mais efetivos na estimulação da resposta imunitária. Esta hipótese baseia-se no facto de, ao contrário da morte celular por apoptose, a morte celular por necrose causar uma forte resposta inflamatória local que é necessária para a ativação do sistema imunitário a nível sistémico [10, 25].

O estudo aprofundado dos mecanismos envolvidos na resposta imunitária induzida pela PDT tem concentrado uma enorme atenção de muitos grupos de investigação. Existem muitos relatos de estudos em modelos animais, sobretudo em roedores que, para além de ajudarem a compreender o fenómeno, também têm abordado várias estratégias de combinação da PDT com agentes adjuvantes, com o objectivo de potenciar a resposta do sistema imunitário para aumentar a eficácia da PDT [55-58].

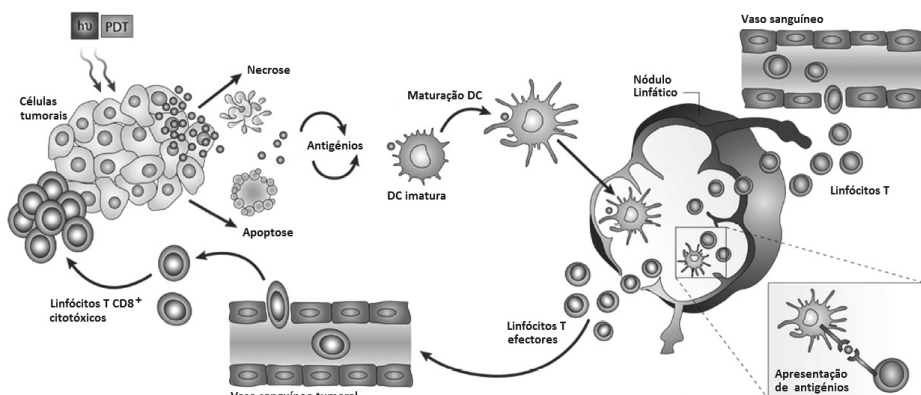


Figura 16.6. Representação esquemática do processo de ativação do sistema imunitário pela PDT. DC – células dendrítica (adaptado com permissão de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer [25], © 2006).

Um destes estudos, realizado por P. Mroz e colaboradores [51], demonstrou num modelo de ratinho BALB/c com tumor do cólon CT26 subcutâneo que a aplicação de um protocolo de PDT de ação vascular resultou numa elevada taxa de cura a longo prazo. Esta elevada eficácia deveu-se à ativação do sistema imunitário, confirmada pela análise de marcadores moleculares específicos. Foi também demonstrado que a resposta imunitária foi sistêmica e suficientemente forte, para permitir a cura de um tumor estabelecido fora do campo de irradiação, e prolongada, permitindo a animais previamente curados com PDT rejeitarem uma segunda inoculação das mesmas células tumorais três meses após o tratamento. A necessidade de um sistema imunitário adaptativo funcional foi confirmada quando, nas mesmas condições, o protocolo foi utilizado para tratar o mesmo tumor em animais imunodeprimidos. Neste caso não se verificou qualquer cura definitiva do tumor primário e não houve nenhuma influência no crescimento de um segundo tumor localizado fora do campo de irradiação [51].

Este efeito de imunidade anti-tumoral sistêmica induzida pela PDT é atualmente descrito como fundamental para o aumento da eficácia da PDT a longo prazo, complementando o efeito das ROS na destruição das células tumorais no local tratado. Numa situação ideal, o tratamento

com PDT poderá funcionar como uma vacina anti-tumoral com alcance sistémico e duradouro capaz de eliminar possíveis metástases existentes noutros locais do organismo [59].

16.6. A PDT na prática clínica

Apesar do conceito da PDT aplicado ao tratamento do cancro já ter surgido há mais de um século, a penetração da PDT na prática clínica em oncologia tem sido bastante lenta. A falta de PS com as características adequadas e a complexidade inerente à definição das condições de tratamento e aos recursos tecnológicos envolvidos poderá desencorajar a sua aplicação clínica, acabando em muitos casos por ser apenas utilizada como tratamento paliativo quando já não existem alternativas. Adicionalmente, os períodos relativamente longos de fotossensibilidade cutânea, associados aos fotossensibilizadores comercializados, causam desconforto para o doente ao obrigá-lo a permanecer em ambientes com luz restringida [10].

Correntemente, a PDT por administração tópica de PS está aprovada para o tratamento de lesões dermatológicas (queratose actínica, carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular *in situ*) e, por via sistémica, está aprovada para o tratamento do esófago de Barret, cancro do esófago, carcinoma endobrônquico e cancro da cabeça e pescoço.

Até há algum tempo as principais limitações da PDT eram a localização do tumor em zonas dificilmente acessíveis pela luz e tumores com dimensões superiores à capacidade de penetração da luz nos tecidos. Contudo, têm sido desenvolvidos esforços com o objectivo de contornar estas dificuldades, nomeadamente através da utilização de fontes de luz acopladas a fibras ópticas, que recorrendo a endoscopia ou cateterismo, poderão conseguir fazer chegar luz a, virtualmente, todos os locais do organismo [10]. Por outro lado, para irradiar de forma eficaz tumores de maiores dimensões, tem-se recorrido a técnicas de monitorização da dose de luz mais elaboradas em combinação com PDT intersticial (iPDT), que consiste na introdução de fibras ópticas no interior do tumor,

guiada por técnicas de imagiologia, para que a luz possa chegar em quantidade suficiente a todas as células alvo [60].

Apesar das dificuldades referidas, a PDT apresenta-se como uma estratégia terapêutica com enorme potencial. Esta convicção é suportada pela contínua aposta no aprofundar do conhecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos, no desenvolvimento de novos e melhores PS e na evolução tecnológica ao nível das fontes de luz. Os resultados estão a revelar progressos importantes, no sentido de maximizar as vantagens e eliminar ou reduzir as limitações (abordadas na Secção 16.4.3), traduzindo-se num número considerável de moléculas em desenvolvimento para PDT do cancro e de outras doenças.

16.7. Perspectivas futuras

No futuro próximo a PDT para tratamento do cancro deverá continuar o trabalho desenvolvido até aqui, procurando novas indicações terapêuticas e melhorando os protocolos de tratamento existentes. Os avanços tecnológicos conduzirão ao melhoramento das técnicas de dosimetria, das fontes de luz e da capacidade de a fazer chegar ao tumor, o que irá permitir tirar melhor partido dos PS já existentes, bem como de novos PS com características mais próximas do ideal [12].

A longo prazo, a PDT em oncologia poderá ser revolucionada com a introdução de estratégias inovadoras, algumas das quais já em desenvolvimento. Uma das abordagens tem-se focado no aumento da especificidade do PS para o tecido alvo através da manipulação das suas propriedades farmacocinéticas e de biodistribuição, nomeadamente recorrendo à encapsulação das moléculas de PS em nanopartículas, como lipossomas, com ou sem direcionamento ativo, ou ao seu acoplamento com ligandos para receptores específicos do tecido alvo [61, 62]. No entanto, esta abordagem é algo controversa, uma vez que os protocolos de PDT que têm demonstrado maior eficácia são aqueles que visam a destruição do sistema vascular tumoral, não sendo necessário neste caso a acumulação do PS nas células tumorais (descrito em [10, 12]).

Uma estratégia para aumentar a profundidade efetiva de tratamento em PDT está a ser estudada há já algum tempo e tem a designação de *two-photon* PDT. Esta técnica utiliza pulsos de laser (aproximadamente 100×10^{-15} segundos) de elevada potência de pico, o que permite que cada molécula de PS absorva simultaneamente dois fotões de luz. Uma vez que a energia dos dois fotões absorvidos se soma, é possível utilizar luz com comprimento de onda superior a 800 nm e, ainda assim, ter energia suficiente para desencadear a reação fotodinâmica, contrariamente ao que ocorre com a PDT tradicional. Ao utilizar luz de maior comprimento de onda consegue-se aumentar de forma significativa a capacidade de penetração da luz nos tecidos, o que torna possível o tratamento de tumores de maiores dimensões ou localizados em maior profundidade. Com a utilização do laser pulsado é também possível aumentar de forma substancial a seletividade na aplicação da luz, através da focagem do feixe apenas num determinado ponto em profundidade, permitindo o tratamento de áreas muito pequenas e reduzindo os danos nos tecidos adjacentes. Os desafios técnicos a ultrapassar ainda são significativo e estão relacionados principalmente com a necessidade de desenvolvimento de novos PS que absorvam luz a comprimentos de onda mais longos (entre 800 e 950 nm) e que simultaneamente apresentem propriedade farmacológicas adequadas [63]. Para além disso, o elevado custo e complexidade dos sistemas de laser pulsado, ou a dificuldade de acoplamento em fibra óptica, podem desencorajar a aplicação desta estratégia na clínica [64].

A aplicação de PDT em doses baixas de PS e de luz tem sido usada para favorecer a ocorrência de apoptose, minimizando a ocorrência de necrose. Esta abordagem está a ser explorada, numa estratégia conhecida como *metronomic* PDT, para aplicação da PDT em situações em que a resposta inflamatória originada pelo mecanismo de necrose celular é desaconselhada. Esta técnica tem sido aplicada no tratamento de glioma, para eliminação das células tumorais nas margens deixadas após a cirurgia, minimizando a destruição de tecido adjacente saudável e evitando a ocorrência de resposta inflamatória aguda, que neste caso é prejudicial [65].

O tema das vacinas anti-tumorais aborda sem dúvida um dos tópicos mais apetecíveis da medicina moderna. A possibilidade de reduzir subs-

tancialmente a mortalidade e a morbidade em doenças com elevada taxa incidência, constitui uma enorme motivação para a comunidade científica. A estratégia de uma vacina convencional baseia-se na introdução no organismo do agente infeccioso inativado, o que leva à produção de anticorpos específicos que, num futuro contacto com o mesmo agente, darão início à resposta imunitária para o eliminar [49, 66]. A capacidade da PDT induzir uma resposta imunitária contra o tumor tratado poderá servir de base a uma vacina anti-tumoral criada com PDT. De forma resumida, células tumorais seriam removidas do doente através de biopsia ou cirurgia e cultivadas. A essas células seria aplicado um protocolo de PDT *ex vivo* para as destruir, criando um lisado tumoral com elevado potencial imunogénico que depois seria reintroduzido no organismo. Em termos clínicos, esta abordagem teria a capacidade de impedir o desenvolvimento de metástases to tumor. O desenvolvimento desta estratégia ainda se encontra numa fase inicial, mas espera-se que os resultados possam confirmar as suas potencialidades [67].

16.8. Conclusão

A PDT é considerada uma estratégia terapêutica anti-tumoral muito promissora. No entanto, as suas potencialidades ainda não foram totalmente desenvolvidas, sendo esperado que a sua gama de aplicações seja largamente ampliada num futuro próximo.

A PDT apresenta vantagens relativamente às terapias oncológicas tradicionais – cirurgia, quimioterapia e radioterapia – sendo valorizada principalmente pelo bom perfil de tolerabilidade, ausência de mecanismos específicos de resistência e possibilidade de repetição de tratamentos.

Uma característica ainda pouco explorada da PDT começa a revelar-se como um dos seus mais importantes factores de diferenciação relativamente a outras estratégias anti-tumorais: a capacidade para mobilizar o sistema imunitário para o desenvolvimento de uma resposta imunitária anti-tumoral específica e sistémica capaz de destruir metástases e de assegurar uma maior eficácia do tratamento a longo prazo.

16.9. Referências

- [1] J. Ferlay, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. GLOBOCAN 2012 v1.0 2013 [cited 2014 12-05-2014]; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
- [2] B.J. Coventry, M.L. Ashdown, *Cancer Manag. Res.* 2012, 4, 137-149.
- [3] S.H. Ibbotson, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2010, 7(1), 16-23.
- [4] C. Hopper, C. Niziol, M. Sidhu, *Oral Oncol.* 2004, 40(4), 372-382.
- [5] Z. Huang, H. Xu, A.D. Meyers, A.I. Musani, L. Wang, R. Tagg, A.B. Barqawi, Y.K. Chen, *Technol. Cancer Res. Treat.* 2008, 7(4), 309-320.
- [6] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2004, 1(4), 279-293.
- [7] E.F. Silva, C. Serpa, J.M. Dabrowski, C.J. Monteiro, S.J. Formosinho, G. Stochel, K. Urbanska, S. Simoes, M.M. Pereira, L.G. Arnaut, *Chemistry* 2010, 16(30), 9273-9286.
- [8] C.S. Foote, *Photochem. Photobiol.* 1991, 54(5), 659.
- [9] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, and T. Kiesslich, *Lasers Med. Sci.* 2009, 24(2), 259-268.
- [10] P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S.M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab, *CA Cancer J. Clin.* 2011, 61(4), 250-281.
- [11] M.D. Daniell, J.S. Hill, *Aust. N. Z. J. Surg.* 1991, 61(5), 340-348.
- [12] R.R. Allison, C.H. Sibata, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2010, 7(2), 61-75.
- [13] M. Triesscheijn, P. Baas, J.H.M. Schellens, F.A. Stewart, *The Oncologist* 2006, 11(9), 1034-1044.
- [14] T.J. Dougherty, G.B. Grindey, R. Fiel, K.R. Weishaupt, D.G. Boyle, *J. Natl. Cancer Inst.* 1975, 55(1), 115-121.
- [15] T.J. Dougherty, J.E. Kaufman, A. Goldfarb, K.R. Weishaupt, D. Boyle, A. Mittleman, *Cancer Res.* 1978, 38(8), 2628-1635.
- [16] M.M. Pereira, C.J.P. Monteiro, A.V.C. Simões, S.M.A. Pinto, A.R. Abreu, G.F.F. Sá, E.F.F. Silva, L.B. Rocha, J.M. Dąbrowski, S.J. Formosinho, S. Simões, L.G. Arnaut, *Tetrahedron* 2010, 66(49), 9545-9551.
- [17] F.H. Sakamoto, J.D. Lopes, R.R. Anderson, *J. Am. Acad. Dermatol.* 2010, 63(2), 183-193.
- [18] T.J. Dougherty, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 2002, 20(1), 3-7.
- [19] T.C. Zhu, J.C. Finlay, *Med. Phys.* 2008, 35(7), 3127-3136.
- [20] E. Buytaert, M. Dewaele, P. Agostinis, *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1776(1), 86-107.
- [21] L.G. Arnaut, in *Advances in Inorganic Chemistry*, Volume 63, E. Rudi van and S. Grażyna, Editors. 2011, Academic Press. p. 187-233.
- [22] S.B. Brown, E.A. Brown, I. Walker, *Lancet Oncol.* 2004, 5(8), 497-508.
- [23] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2005, 2(2), 91-106.
- [24] I. Postiglione, A. Chiaviello, G. Palumbo, *Cancers* 2011, 3(2), 2597-2629.
- [25] A.P. Castano, P. Mroz, M.R. Hamblin, *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6(7), 535-545.
- [26] T.G. St Denis, K. Aziz, A.A. Waheed, Y.-Y. Huang, S.K. Sharma, P. Mroz, M.R. Hamblin, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, 10(5), 792-801.

- [27] R.A. Weersink, J. Forbes, S. Bisland, J. Trachtenberg, M. Elhilali, P.H. Brún, B.C. Wilson, *Photochem, Photobiol.* 2005, 81(1), 106-113.
- [28] O. Mazor, A. Brandis, V. Plaks, E. Neumark, V. Rosenbach-Belkin, Y. Salomon, A. Scherz, *Photochem. Photobiol.* 2005, 81(2), 342-351.
- [29] C.J. Monteiro, J. Pina, M.M. Pereira, L.G. Arnaut, *Photochem Photobiol Sci*, 2012, 11(7), 1233-8.
- [30] M.M. Pereira, A.R. Abreu, N.P.F. Goncalves, M.J.F. Calvete, A.V.C. Simoes, C.J.P. Monteiro, L.G. Arnaut, M.E. Eusebio, J. Canotilho, *Green Chem.* 2012, 14(6), 1666-1672.
- [31] Approved Drug Products. Food and Drug Administration (FDA) - Center for Drug Evaluation and Research [cited 2013 10-01-2013]; Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>.
- [32] Human Medicines. European Medicines Agency (EMA) [cited 2013 10-01-2013]; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
- [33] J.M. Dabrowski, L.G. Arnaut, M.M. Pereira, C.J. Monteiro, K. Urbanska, S. Simoes, G. Stochel, *Chem. Med. Chem.* 2010, 5(10), 1770-1780.
- [34] M.M. Pereira, C.J.P. Monteiro, A.V.C. Simões, S.M.A. Pinto, L.G. Arnaut, G.F.F. Sá, E.F.F. Silva, L.B. Rocha, S. Simões, S.J. Formosinho, J. Porphyr. Phthalocyan. 2009, 13(04n05), 567-73.
- [35] J.M. Dabrowski, L.G. Arnaut, M.M. Pereira, K. Urbanska, S. Simoes, G. Stochel, L. Cortes, *Free Radic. Biol. Med.* 2012, 52(7), 1188-1200.
- [36] J.M. Dabrowski, L.G. Arnaut, M.M. Pereira, K. Urbanska, G. Stochel, *Med. Chem. Comm.* 2012, 3(4), 502-505.
- [37] J. Trachtenberg, R.A. Weersink, S.R. Davidson, M.A. Haider, A. Bogaards, M.R. Gertner, A. Evans, A. Scherz, J. Savard, J.L. Chin, B.C. Wilson, M. Elhilali, *BJU Int.* 2008, 102(5), 556-562.
- [38] ClinicalTrials.gov. U.S. National Institutes of Health [cited 2014 15-05-2014]; Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/home>.
- [39] J.H. Woodhams, A.J. MacRobert, S.G. Bown, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2007, 6(12), 1246-1256.
- [40] S. Anand, B.J. Ortel, S.P. Pereira, T. Hasan, E.V. Maytin, *Cancer Lett.* 2012, 326(1), 8-16.
- [41] B.W. Henderson, T.M. Busch, J.W. Snyder, *Lasers Surg. Med.* 2006, 38(5), 489-493.
- [42] Z. Ji, G. Yang, V. Vasovic, B. Cunderlikova, Z. Suo, J.M. Nesland, Q. Peng, J. Photochem. Photobiol. B 2006, 84(3), 213-220.
- [43] C.A. Robertson, D.H. Evans, H. Abrahamse, *J Photochem Photobiol B*, 2009, 96(1), 1-8.
- [44] Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allemann, J. Photochem. Photobiol. B 2002, 66(2), 89-106.
- [45] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2005, 2(1), 1-23.
- [46] C. Abels, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004, 3(8), 765-771.
- [47] B. Chen, B.W. Pogue, P.J. Hoopes, T. Hasan, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2006, 16(4), 279-305.
- [48] E. Kabingu, L. Vaughan, B. Owczarczak, K.D. Ramsey, S.O. Gollnick, *Br. J. Cancer* 2007, 96(12), 1839-1848.
- [49] S.O. Gollnick, C.M. Brackett, *Immunol. Res.* 2010, 46(1-3), 216-226.
- [50] P.S. Thong, K.W. Ong, N.S. Goh, K.W. Kho, V. Manivasager, R. Bhuvanewari, M. Olivo, K.C. Soo, *Lancet Oncol.* 2007, 8(10), 950-952.

- [51] P. Mroz, A. Szokalska, M.X. Wu, M.R. Hamblin, *PLoS one*, 2010, 5(12), e15194-e15205.
- [52] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G.B. Kharkwal, M.R. Hamblin, *Cancers* 2011, 3(2), 2516-2539.
- [53] A.D. Garg, D. Nowis, J. Golab, P. Agostinis, *Apoptosis* 2010, 15(9), 1050-1071.
- [54] P. Mroz, M.R. Hamblin, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2011, 10(5), 751-758.
- [55] H. Saji, W. Song, K. Furumoto, H. Kato, E.G. Engleman, *Clin. Cancer Res.* 2006, 12(8), 2568-2574.
- [56] A.P. Castano, P. Mroz, M.X. Wu, M.R. Hamblin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105(14), 5495-5500.
- [57] Y.G. Qiang, C.M. Yow, Z. Huang, *Med. Res. Rev.* 2008, 28(4), 632-644.
- [58] M. Kwitniewski, A. Juzeniene, R. Glosnicka, J. Moan, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008, 7(9), 1011-1017.
- [59] P. Mroz, A.P. Castano, M.R. Hamblin, in *Biophotonics and Immune Responses IV*, W.R. Chen, Editor 2009, SPIE: San Jose, CA, USA. p. 717803-03.
- [60] S.A. de Visscher, P.U. Dijkstra, I.B. Tan, J.L. Roodenburg, M.J. Witjes, *Oral Oncol.* 2013, 49(3), 192-210.
- [61] A.S.L. Derycke P.A.M. de Witte, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004, 56(1), 17-30.
- [62] M.J. Bovis, J.H. Woodhams, M. Loizidou, D. Scheglmann, S.G. Bown, A.J. MacRobert, *J. Control. Release* 2012, 157(2), 196-205.
- [63] J.R. Starkey, A.K. Rebane, M.A. Drobizhev, F. Meng, A. Gong, A. Elliott, K. McInnerney, C.W. Spangler, *Clin. Cancer Res.* 2008, 14(20), 6564-6573.
- [64] B.C. Wilson, M.S. Patterson, *Phys. Med. Biol.* 2008, 53(9), R61-109.
- [65] M.S. Mathews, E. Angell-Petersen, R. Sanchez, C.-H. Sun, V. Vo, H. Hirschberg, S.J. Madsen, *Lasers Surg. Med.*, 2009, 41(8), 578-584.
- [66] P. Mroz, J.T. Hashmi, Y.-Y. Huang, N. Lang, M.R. Hamblin, *Expert Rev. Clin. Immun.* 2011, 7(1), 75-91.
- [67] M. Korbelik, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2011, 10(5), 664-669.