



Pedro Manuel Duarte Ribeiro

Terapia Fotodinâmica: Conceitos Básicos e Aplicações

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Fernanda Maria Fernandes Roleira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Pedro Manuel Duarte Ribeiro

Terapia Fotodinâmica: Conceitos Básicos e Aplicações

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
Orientada pela Professora Doutora Fernanda Maria Fernandes Roleira e apresentada
à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagem de capa

Instituto Cosmopolitan [Acedido a 7 de junho de 2015]. Disponível na Internet em: <http://www.icosmopolitan.com.br/noticias/ver/17/terapia-fotodinamica-previne-e-trata-o-cancer-de-pele-sem-deixar-cicatrices>

Eu, Pedro Manuel Duarte Ribeiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010127678, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de setembro de 2015.

Pedro Manuel Duarte Ribeiro

A Tutora da Monografia

(Prof. Doutora Fernanda Maria Fernandes Roleira)

O Aluno

(Pedro Manuel Duarte Ribeiro)

Aos meus pais, avós, madrinha e tia pelo apoio incondicional.

*À Sandra Fonseca, pelo apoio, sincera amizade e boas memórias
criadas ao longo dos últimos anos.*

Aos meus amigos de longa data, Ricardo Barreto e Miguel Melita.

Aos meus amigos de faculdade, aqueles que nunca me desiludem.

À Professora Doutora Fernanda Roleira, pela orientação e apoio.

*Aos departamentos de Desenvolvimento do Negócio e
de Investigação, Desenvolvimento e Inovação da Bluepharma.*

A Coimbra, a cidade que me continuará a ver sorrir.

Índice	
Siglas e Acrónimos	2
Resumo	3
Abstract	3
Introdução	4
1. Radiação utilizada	5
1.1. <i>Interação da radiação com os tecidos e moléculas biológicas</i>	5
1.2. <i>Interação da radiação com o fotossensibilizante</i>	6
2. Reação Fotoquímica	8
2.1. <i>Reação fotoquímica do tipo I</i>	8
2.2. <i>Reação fotoquímica do tipo II</i>	9
3. Fotossensibilizantes	10
3.1. <i>Localização subcelular e fotorelocalização</i>	11
3.2. <i>Fotodegradação e fotomodificação</i>	11
3.3. <i>Propriedades do fotossensibilizante ideal</i>	11
3.4. <i>Fotossensibilizantes em comercialização</i>	13
3.4.1. <i>Porfímero sódico</i>	13
3.4.2. <i>Ácido 5-aminolevulínico</i>	14
3.4.3. <i>Temoporfina</i>	16
3.4.4. <i>Verteporfina</i>	17
4. Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica	17
4.1. <i>Na célula tumoral</i>	17
4.1.1. <i>Resposta necrótica</i>	18
4.1.2. <i>Resposta apoptótica</i>	18
4.2. <i>No sistema imunitário</i>	19
5. Sistemas de transporte	20
Conclusão	21
Bibliografia	22

Siglas e Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIM	Autorização de introdução no mercado
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
EMA	Agência Europeia do Medicamento, do inglês <i>European Medicines Agency</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fotossensibilizante
³FS*	Fotossensibilizante excitado no estado de tripleto (activado)
FS_{ext}	Fotossensibilizante no meio extracelular
FS_{int}	Fotossensibilizante no meio intracelular
Hb	Desoxi-hemoglobina
HbO₂	Oxi-hemoglobina
HpD	Derivados da hematoporfirina, do inglês <i>hematoporphyrin derivatives</i>
IV	Intravascular
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
m-THPC	<i>meta</i> -Tetra(hidroxifenil)clorina (temoporfina), do inglês <i>meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin</i>
PEG	Polietilenoglicol
PPIX	Protoporfirina IX
ROS	Espécies reativas de oxigénio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
TFD	Terapia Fotodinâmica

Resumo

A Terapia Fotodinâmica consiste num método de tratamento do cancro que recorre à administração de um agente fotossensibilizante, com especificidade para o tecido alvo, ao qual se segue a irradiação do local a tratar por luz de comprimento de onda adequado. A formação de espécies reativas de oxigénio nas células-alvo promove alterações bioquímicas que culminam na morte celular.

Na sequência desta monografia, pretende-se abordar os conceitos básicos da Terapia Fotodinâmica, focando os mecanismos de ação desta modalidade de tratamento, bem como as particularidades mais relevantes da radiação e fotossensibilizantes utilizados. Adicionalmente, será dado destaque a alguns fotossensibilizantes que se encontram atualmente em comercialização e suas características.

Abstract

Photodynamic Therapy is a novel method of treating cancer in which a target-specific photosensitizing agent is used, followed by irradiation of the treatment site with light of appropriate wavelength. Reactive oxygen species are formed in the target cells, causing biochemical changes and, ultimately, cellular death.

The basic concepts behind Photodynamic Therapy are described, emphasizing this technique's mechanism of action as well as the most important parameters related to the photosensitizer and radiation used. Furthermore, some photosensitizers currently being marketed and their characteristics will be showcased.

Introdução

A Terapia Fotodinâmica (TFD, do inglês *Photodynamic therapy, PDT*) é um método de tratamento principalmente orientado para o cancro. Permite uma abordagem centrada no tumor, tendo como foco os seus requisitos clínicos característicos. O protocolo clínico deste tipo de terapia consiste na administração por via sistémica de um fármaco fotoativo (dito fotossensibilizante, FS), que é incorporado e acumulado de uma forma seletiva nas células ou tecidos alvo, sendo estes posteriormente irradiados por um feixe de luz de comprimento de onda adequado à excitação do fármaco (habitualmente na região do visível) (Fig. 1) (1–3).

A TFD teve início com a observação da sensibilização de tecidos por um mecanismo fotoquímico, por Raab em 1900, tendo sido subsequentemente investigada por von Tappeiner *et al.* para o tratamento de tumores cutâneos, recorrendo à aplicação tópica de eosina e sob ação de luz solar. Nos anos 50, foi sintetizado por Lipson *et al.* um derivado da hematoportirina (Photofrin® I) que deu posteriormente origem a um derivado purificado (Photofrin® II), que constitui o FS mais usado até à data (4, 5). Estes compostos marcaram o início da busca por fotossensibilizantes com características mais atrativas em termos clínicos, dando origem a alguns que se encontram atualmente em utilização.

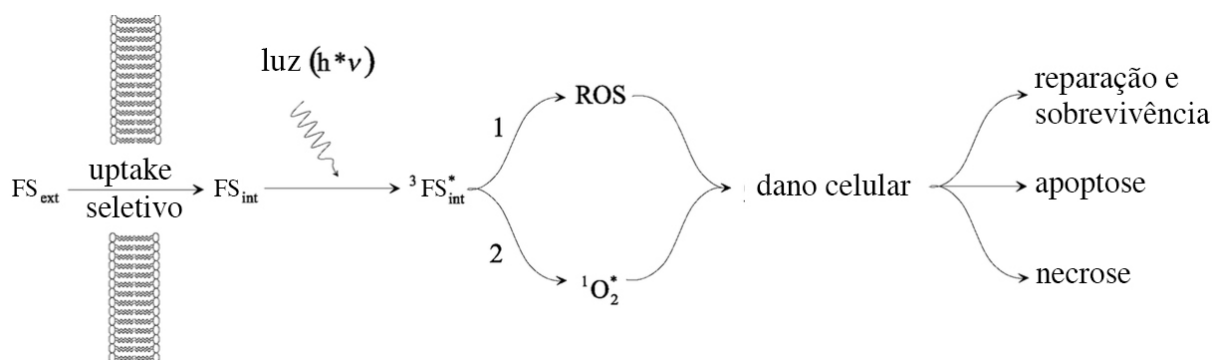


Fig. 1 Adaptado de Plaetzer *et al.*, 2003. Representação esquemática do princípio teórico subjacente à terapia fotodinâmica. FS_{ext} – fotossensibilizante no meio extracelular; FS_{int} – fotossensibilizante no citoplasma; 3FS* – fotossensibilizante excitado no estado de tripleto (activado).

I. Radiação utilizada

A radiação electromagnética na região visível do espectro (entre os 400 nm e 700 nm) é emitida e absorvida em quantidades discretas (fotões), que se comportam em simultâneo como uma onda e partícula. Uma onda de radiação electromagnética é caracterizada por uma frequência e amplitude, sendo estas inversamente proporcionais. A energia transportada por um fotão é tanto maior quanto maior for a frequência da radiação (6).

O doseamento da radiação a aplicar é difícil, visto que esta atravessa diferentes meios, com propriedades óticas distintas. Importa também considerar a sua absorção por parte de macromoléculas e a eficiência quântica da produção de oxigénio singuleto (uma espécie eletronicamente excitada da molécula de oxigénio molecular (O_2)) e/ou formação de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (1).

I.1. Interação da radiação com os tecidos e moléculas biológicas

Ao incidir nos tecidos, ocorre uma redução na energia da radiação electromagnética devido a fenómenos de reflexão e refração, absorção e dispersão.

Os fenómenos de reflexão e refração na interface de separação entre dois meios são descritos, respectivamente, pelas leis de Fresnel e Snell, e o seu impacto na perda de intensidade é determinado pelos valores relativos dos índices de refração dos meios. Esta perda pode ser minimizada através da aplicação perpendicular do feixe de radiação em relação à interface que separa os dois meios. A dispersão de luz nos tecidos provoca, tal como acontece com a refração, um alargamento do feixe de luz. Isto resulta numa perda da taxa de fluência (dada pela potência por unidade de área de luz em $[W.m^{-2}]$) e numa mudança na direcção do raio de luz.

Em relação à absorção nos tecidos, os espectros da desoxi-hemoglobina (Hb), oxihemoglobina (HbO_2), melanina e água são os mais relevantes e determinam a janela ótica para a TFD (Fig. 2) (1, 7). Os citocromos podem também influenciar a janela ótica, embora tenham menor importância. Podem existir diferenças significativas nas quantidades de Hb e HbO_2 entre os tecidos não-tumorais e tumorais, devido a uma menor oxigenação e pH inferior destes. Para que se consiga uma penetração profunda nos tecidos, FSs que absorvam comprimentos de onda superiores a 650 nm são ideais. No entanto, a energia mínima necessária para a produção de oxigénio singuleto, produzido por FSs no estado de tripleto, representa o limite superior de comprimento de onda para excitação do FS usado na TFD, sendo

a sua redução evitável através da escolha de um FS que absorva na região *far-red*, ou seja, entre 710 nm e 850 nm, do espectro eletromagnético (1).

Para a TFD em tumores sólidos, a profundidade de penetração efetiva é de grande relevância, sendo esta definida como a profundidade à qual a intensidade é reduzida para 37% da intensidade na interface entre os meios. No entanto, o uso de FSs com picos de absorção em comprimentos de onda superiores a 700 nm permite duplicar a profundidade de penetração da radiação permitindo, desta forma, o tratamento de tumores de maior espessura (1).

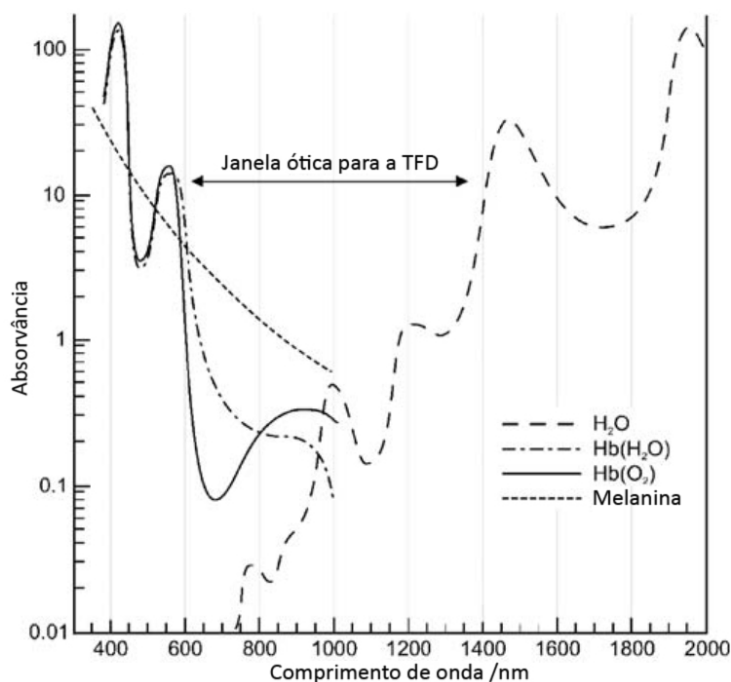


Fig. 2 Adaptado de Plaetzer *et al.*, 2009. Representação esquemática da janela ótica para a TFD. Idealmente, o comprimento de onda da radiação utilizado deverá situar-se entre 650 e 850 nm.

1.2. Interação da radiação com o fotossensibilizante

A interação da radiação com o FS pode afectar a eficácia da TFD, uma vez que tal pode resultar na degradação, modificação ou realocação do fármaco, como será discutido posteriormente.

Uma molécula de FS no seu estado fundamental de singuleto (S_0) é caracterizada por electrões emparelhados, todos no menor estado de energia possível. Após absorção de radiação com a energia apropriada, um destes electrões é transferido para uma orbital desimpedida de energia superior. Dependendo da quantidade de energia transferida, o FS pode sofrer uma transição para um estado singuleto excitado S_x (em que $x=1, 2, 3, \dots$, de acordo com o estado energético atingido), que se divide em vários níveis vibracionais de energias distintas. Uma vez que qualquer estado excitado é energeticamente menos favorável do que

o estado fundamental, a molécula regressa ao S_0 após um curto período de tempo, podendo esta transição ocorrer por vários mecanismos (Fig. 3). Um electrão num nível vibracional elevado de um estado excitado (por exemplo, S_1), pode rapidamente decair para o nível de menor energia desse estado e a energia é dissipada sob a forma de calor, sendo este processo denominado de relaxamento vibracional. Se um electrão transitar para um estado energético superior S_x , pode, após o relaxamento vibracional, regressar ao primeiro estado excitado S_1 . O relaxamento para S_0 irá ocorrer por emissão de um fóton secundário (isto é, emissão de fluorescência) ou por dissipação de calor. A emissão de fluorescência inicia-se sempre a partir do menor estado vibracional de S_1 . Para além disto, os fótons emitidos têm menor energia e comprimentos de onda do que os utilizados para a excitação da molécula.

A partir de S_1 , a molécula pode transitar para um nível isoenergético do estado tripleto, T_1 , sendo este processo não radiativo denominado de cruzamento intersistemas.

Após um rápido relaxamento vibracional no nível energético T_1 , ocorre um relaxamento vibracional para S_0 , denominado de fosforescência. Os estados de tripleto são geralmente caracterizados por um tempo de vida relativamente longo (que se pode prolongar até alguns segundos) (1, 8).

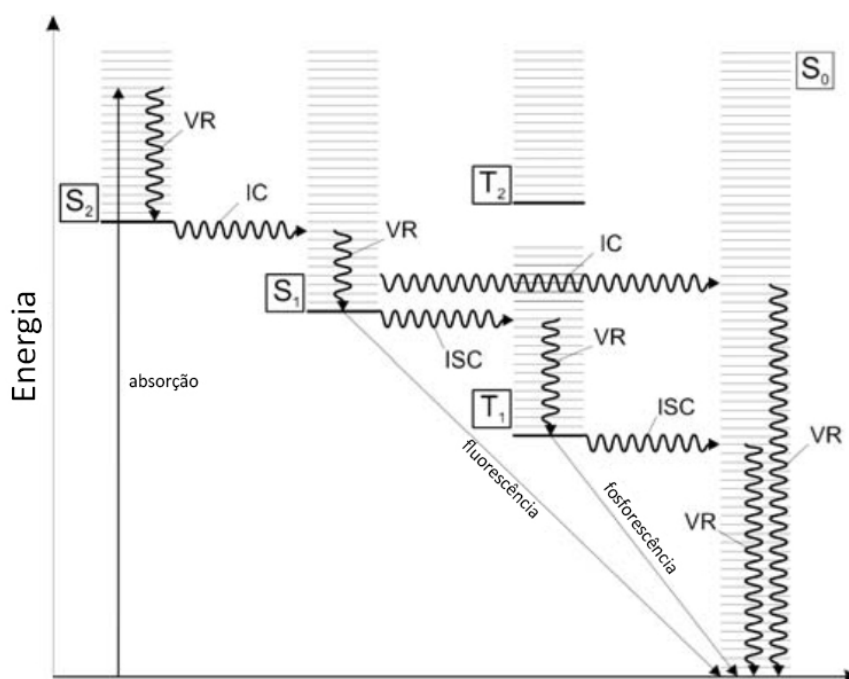


Fig. 3 Adaptado de Plaetzer *et. al.*, 2009. Diagrama de Jablonski dos principais processos foto-físicos. IC – conversão interna; ISC – cruzamento intersistemas, do inglês *intersystems crossing*; S_x – estado de singuleto; T_x – estado de tripleto; VR – relaxamento vibracional.

Deste modo, o FS é excitado através da absorção de um fóton até um estado de singuleto, que pode perder energia via cruzamento intersistemas ou transitar para um estado de tripleto de maior tempo de semi-vida. O FS no estado de tripleto pode promover a transferência de um electrão ou de um átomo de hidrogénio para moléculas adjacentes (reação fotoquímica do tipo I) ou transferir energia para o oxigénio molecular no estado fundamental (reação fotoquímica do tipo II) (1, 2).

2. Reação Fotoquímica

A TFD recorre a reações químicas nas quais um FS foto-ativado (no estado de tripleto) provoca a formação de várias ROS, entre elas o oxigénio no estado de singuleto (produto fotoquímico principal), que leva à oxidação de moléculas intracelulares e ao desenvolvimento de uma resposta celular.

Os FSs no estado de tripleto podem induzir alterações químicas numa molécula vizinha através de duas vias competitivas entre si, denominadas de reações fotoquímicas do tipo I e do tipo II (1).

2.1. Reação fotoquímica do tipo I

As reações fotoquímicas do tipo I envolvem a transferência de electrões ou prótons para uma molécula de oxigénio ou outras moléculas adjacentes, levando à formação de radicais aniónicos ou catiónicos, respetivamente (Fig. 4). Estes radicais podem reagir com o oxigénio molecular para produzir ROS (1).

As reações fotoquímicas do tipo I resultam frequentemente na formação de aniões superóxido ($O_2^{\cdot-}$), através da transferência de um electrão do FS para o oxigénio molecular, que é posteriormente convertido a peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Este é de grande relevância na produção do dano celular, visto que facilmente atravessa membranas biológicas, não se restringindo a um único compartimento celular. Em concentrações mais elevadas, o H_2O_2 pode reagir com $O_2^{\cdot-}$ para formar radicais hidroxilo (HO^{\cdot}) de grande reatividade, via reacção de Haber Weiss (Fig.4), que facilmente se difundem através das membranas, tal como o H_2O_2 . Com um potencial de redução-oxidação (E_0) de +1.35 V (o mais elevado das ROS), o HO^{\cdot} pode oxidar qualquer molécula de origem biológica, sendo as energias de ativação para estas reações muito baixas. Na presença de iões metálicos, tais como cobre ou ferro, os radicais hidroxilo também podem ser produzidos através da reacção de Fenton (Fig. 4) (1, 2).

2.2. Reação fotoquímica do tipo II

A transferência de energia para o oxigénio molecular denomina-se de reação fotoquímica do tipo II (Fig. 4).

O oxigénio molecular tem um atributo especial, uma vez que a configuração de triplete ($^3\text{O}_2$) representa o estado fundamental da molécula. Durante o processo de transferência de energia numa reação fotoquímica do tipo II, forma-se oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$), um intermediário com a capacidade de reagir com diversas biomoléculas (2).

Tanto as reações fotoquímicas do tipo I como as do tipo II acontecem em paralelo, dependendo da razão em que ocorrem vários parâmetros, sendo o FS usado e a concentração de oxigénio os mais importantes. Para as porfirinas e seus derivados, FSs comumente usados em TFD, a reação fotoquímica do tipo II representa o processo dominante (1, 2).

Como se pode ver através das fórmulas da Fig. 4, o rendimento do oxigénio singuleto está dependente da velocidade da reação química do FS no estado de triplete, e é reduzida por processos tais como fosforescência, conversão intersistemas do estado de triplete a singuleto, ou reações químicas do FS no estado de singuleto-excitado.

O oxigénio no estado de singuleto pode, sendo uma molécula sem carga, difundir-se através do citoplasma e membranas biológicas. No citoplasma, o seu tempo de vida (τ) é de 1×10^{-7} s (0.1 μs), com um raio máximo de ação de 30 nm. Como consequência, a localização intracelular do FS determina o dano celular decorrente da TFD (1).

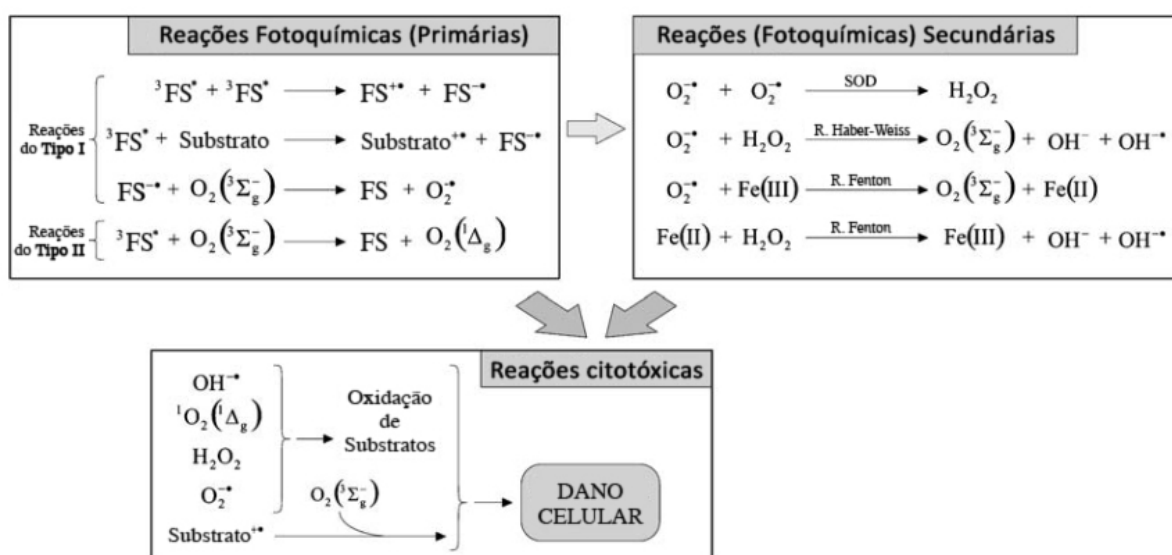


Fig. 4 Adaptado de Plaetzer *et al.*, 2009. Reações fotoquímicas que ocorrem na TFD. H_2O_2 – peróxido de hidrogénio; $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ – oxigénio no estado de singuleto; $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ – oxigénio no estado de triplete (estado fundamental); O_2^- – anião superóxido; HO^* – radical hidroxilo; SOD – superóxido dismutase; $\text{X}^{-/+}$ – espécie aniônica/catiônica; X^* – espécie radicalar.

3. Fotossensibilizantes

Tal como outros fármacos, os FSs podem ser classificados em gerações de acordo com o momento da sua síntese. Os FSs de primeira geração são baseados na estrutura das porfirinas e incluem compostos como a hematoporfirina (que endogenamente resulta da hidrólise ácida da hemoglobina) e os seus derivados (HpD, do inglês *hematoporphyrin derivatives*) (9). São misturas complexas com uma fraca seletividade para o tecido tumoral, necessitando da administração de quantidades relativamente elevadas para obtenção de uma resposta fototerapêutica satisfatória, com a consequência de ocorrer uma fotossensibilidade cutânea marcada. Para além disto, apresentam um máximo de absorção relativamente curto (630 nm), no qual a penetração de radiação nos tecidos é reduzida. Estes fatores conduziram ao desenvolvimento dos FSs de segunda geração que são puros e bem caracterizados, apresentam períodos de fotossensibilidade mais curtos, comprimentos de onda de ativação entre os 650 nm e os 800 nm, que permitem uma maior profundidade de penetração nos tecidos, rendimentos de oxigénio no estado de singuleto superiores e uma maior seletividade para os tecidos tumorais. O tipo de compostos que têm sido mais investigados são as clorinas, texapirinas, purpurinas e ftalocianinas (10), sendo que estudos *in vivo* indicam um aumento de atividade segundo a sequência porfirinas, clorinas, bacterioclorinas (8). No entanto, a sua elevada lipofilia conduziu ao desenvolvimento de FSs de terceira geração, que incluem FS de primeira e segunda geração incorporados em sistemas de transporte ou complexados com outras estruturas como anticorpos monoclonais e lipoproteínas séricas (4, 5, 11, 12).

Os FSs podem ser também agrupados por famílias, como ilustrado no quadro I.

Porfirinas	Clorofilas
<ul style="list-style-type: none"> • Derivados da hematoporfirina (HpD); • Derivados da benzoporfirina baseados nos HpD; • Ácido 5-aminolevulínico (ALA); • Texapirinas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Clorinas; • Purpurinas; • Bacterioclorinas.
	Corantes
	<ul style="list-style-type: none"> • Ftalocianinas; • Naftalocianinas.

Quadro I. Adaptado de Allison et. al., 2004. Famílias de fotossensibilizantes.

3.1. Localização subcelular e fotorelocalização

Os FSs com características hidrofílicas localizam-se preferencialmente nos lisossomas e citoplasma, enquanto que os que apresentam características lipofílicas tendencialmente localizam-se nas membranas celulares. Devido à curta distância de difusão (até 30 nm) e ao curto tempo de semi-vida das ROS formadas, a localização preferencial do agente FS determina o seu alvo celular primário, tendo um forte impacto no modo de morte celular (2, 7).

A fotorelocalização consiste na alteração da localização intracelular do FS mediante a exposição à luz. Este fenómeno tem relevância após exposições reduzidas ou múltiplas, nas quais as primeiras iluminações podem contribuir para uma mudança na mobilidade do FS no interior da célula. Para alguns FSs com características hidrofílicas (que se localizam inicialmente nos lisossomas), ocorre a sua realocação dos lisossomas para o núcleo, aumentando o seu rendimento quântico (ϕ , que representa o número de moléculas que reagem por cada fóton absorvido (6), ou seja, a transferência de energia proveniente da radiação para os produtos citotóxicos (10)), devido aos danos provocados no ADN (1, 9, 14).

3.2. Fotodegradação e fotomodificação

Após iluminação, todos os FSs são modificados quimicamente (fotomodificação) ou degradados (fotodegradação). Estes fenómenos apresentam uma elevada probabilidade de ocorrência dada a proximidade do FS às espécies reativas, no ambiente biológico, resultando de um ataque direto de ROS ou de oxigénio no estado singuleto às moléculas de FS.

A fotodegradação consiste na destruição química de uma molécula de FS, originando vários fragmentos de menores dimensões que não absorvem radiação na região do visível. Como consequência, as moléculas de FS fotodegradadas perdem a sua função no contexto da TFD. Em contraste, a fotomodificação (ou formação de fotoprodutos) é provocada pelo ataque de radicais que conduzem à modificação de grupos químicos e/ou do esqueleto químico do FS, ocorrendo a alteração química em menor grau (1, 9).

3.3. Propriedades do fotossensibilizante ideal

Entre as propriedades fotofísicas, o comprimento de onda de ativação e uma eficiência de transição elevada do FS para o estado de tripleto são as mais importantes. O comprimento de onda de absorção máximo do FS deve corresponder à janela ótica (entre 650 nm e 850 nm) na qual, tanto a penetração de radiação nos tecidos, como a energia do estado de tripleto, são suficientemente elevadas para a produção de oxigénio no estado de singuleto.

Os FSs devem ainda exibir um determinado grau de fluorescência, para finalidades de fotodiagnóstico ou de ajuste da área de irradiação (1, 5).

Os FSs fotoestáveis, isto é, FS que tenham uma fotodegradação reduzida são os mais indicados para períodos de irradiação prolongados. No entanto, dependendo da *clearance* biológica do FS das células e tecidos, um baixo fotobranqueamento (do inglês *photobleaching*, ou seja, destruição fotoquímica do fluoróforo) pode provocar fotossensibilidade no doente por um período de tempo prolongado (1).

No que diz respeito à administração de FSs, a solubilidade do mesmo é de grande importância. A anfifilicidade garante um transporte por via sanguínea sem ocorrência de precipitação ou formação de agregados (que reduzem o rendimento quântico (9)) e uma penetração eficaz através da bicamada fosfolipídica da membrana celular (1, 5, 11).

A característica mais importante de um FS neste contexto é a sua seletividade, que restringe o dano foto-induzido nos tecidos circundantes. Este fenómeno tem sido descrito como sendo causado por fenómenos como elevada permeabilidade vascular tumoral ao FS; baixo pH no compartimento extracelular tumoral; elevada afinidade do FS para células endoteliais ou cancerígenas em proliferação (com elevada expressão de receptores com afinidade para compostos lipofílicos, como o receptor das LDL (1, 5)); reduzida drenagem linfática nos tumores; existência de um elevado número de macrófagos associados a tumores que fagocitam agregados de FS e os convertem nos respetivos monómeros.

A eliminação por fotodegradação, metabolização ou excreção do FS deve ser tão rápida quanto possível, sem formar produtos de degradação tóxicos, de modo a que o período de fotossensibilidade seja minimizado. No entanto, para algumas indicações (por exemplo, tratamentos múltiplos recorrendo à TFD), a retenção das moléculas de FS no tecido alvo pode ser necessária de modo a evitar repetidas administrações do fármaco. O FS não deve ter efeito mutagénico, independentemente de ser sujeito à radiação ou não, o que depende também da sua falta de tendência para se (re)localizar no núcleo da célula.

A administração do fármaco não deve causar qualquer efeito tóxico, incluindo toxicidade no escuro (*dark toxicity*), reação alérgica ou outros efeitos secundários (15). Dor durante a irradiação, tal como ocorre na síntese de protoporfirina IX (PPIX) induzida pela administração de ácido 5-aminolevulínico (ALA) para fins de TFD, deve ser evitada ou contrariada se possível (1, 11).

O protocolo da TFD deve ainda ser reproduzível e seguro e o FS utilizado não deve limitar o uso de outras formas complementares de tratamento (ex: cirurgia, radioterapia ou quimioterapia) (1).

Um FS que obedeça a todas estas condições não existe. Deste modo, o clínico deve avaliar as propriedades dos agentes FSs existentes e selecionar aquele com as características clínicas mais vantajosas para a indicação específica em causa. A aceitação e disseminação da TFD requer, em última análise, um doseamento adequado do agente FS, do fluxo luminoso e do fornecimento de oxigénio ao tumor (sem o qual a ocorrência de uma reação fotoquímica do tipo II não é possível), devendo a abordagem ser focada no FS e não no tipo de tumor. Deve também ser dada importância ao desenvolvimento e promoção de modalidades de tratamento que consistam num fármaco, uma fonte de luz e um protocolo específico adequado a uma aplicação particular (1, 15, 16).

3.4. Fotossensibilizantes em comercialização

3.4.1. Porfímero sódico

O porfímero sódico consiste numa mistura de oligómeros formados principalmente por ligações éter de até oito unidades de derivados da hematoporfirina (Fig. 5) (17, 18), sendo um FS de primeira geração dos mais usados em terapêutica. Apresenta um comprimento de onda de excitação de 630 nm, sendo a profundidade de penetração da radiação de aproximadamente 3 a 5 mm, dependendo do tecido (1, 15, 18, 19). O seu alvo principal é a vasculatura tumoral, ocorrendo uma oclusão vascular progressiva com o decorrer do tratamento, também mediada pela libertação de tromboxano A₂ pelas plaquetas ativadas (18). Deste modo, sugeriu-se que a morte das células tumorais ocorra através de um fenómeno de necrose isquémica com consequente inflamação dos tecidos circundantes (17).

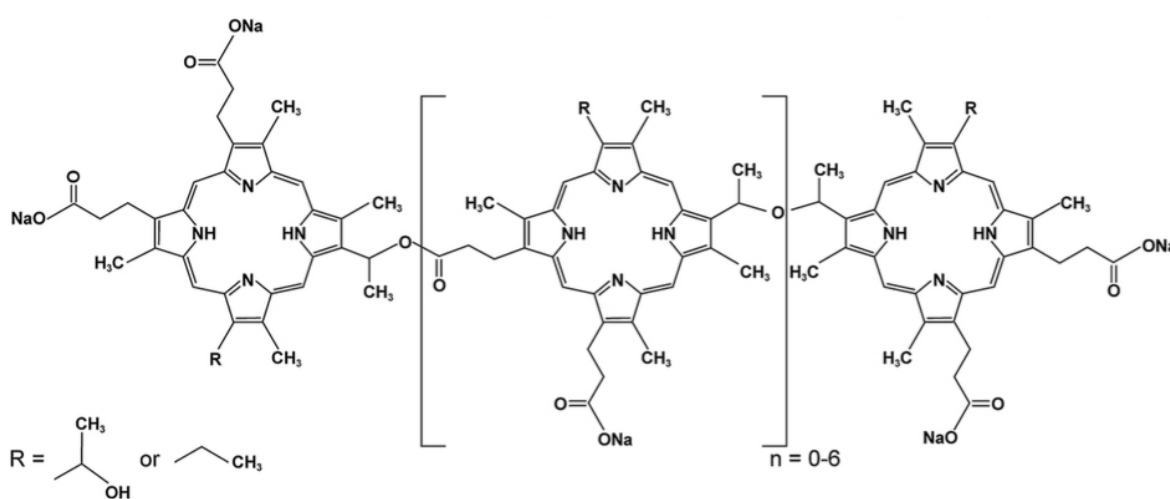


Fig. 5 Adaptado de Weijer et. al., 2015. Fórmula estrutural representativa do porfímero sódico.

Apresenta limitações como a sua complexidade, fraca absorção de radiação e tendência a ficar retido na pele, provocando uma fotossensibilidade cutânea prolongada (2 a 3

meses) (15, 17). Para além disto, possui um rendimento quântico moderado (de 0,5) e uma profundidade de efeito limitada a 0,5 cm (10).

Com o nome comercial de Photofrin® (liofilizado para administração por via IV), foi inicialmente aprovado em 1995, nos Estados Unidos da América (EUA), tendo desde então obtido o estatuto de medicamento órfão (usado para doenças que afetem menos de 200 mil pessoas ou 1 em cada 1500 pessoas (20)) para a ablação de displasia de elevado grau do esófago de Barrett, em doentes não elegíveis para esofagectomia; colangiocarcinoma e como adjuvante à cirurgia em casos de mesotelioma pleural maligno. Encontra-se também aprovado para o tratamento de cancro pulmonar, esofágico, gástrico, cervical e da bexiga.

Em Portugal, foi comercializado com o nome comercial de PhotoBarr® entre março de 2002 e setembro de 2012, altura em que a AIM foi revogada. Deste modo, atualmente, não se encontra comercializada nenhuma forma de porfímero sódico em Portugal (21).

3.4.2. Ácido 5-aminolevulínico

O ácido 5-aminolevulínico (ALA) (Fig. 6) é um aminoácido sintetizado endogenamente a partir de glicina e succinil co-enzima A pela ALA-sintetase, sendo um precursor metabólico na via biossintética do heme, que constitui o grupo prostético da hemoglobina, mioglobina, outras hemoproteínas, e de outras moléculas de estrutura tetrapirrólica (2, 7, 15, 17, 22). No citoplasma, a polimerização de oito moléculas de ALA conduz à formação de protoporfirina IX (PPIX) (Fig. 6), com propriedades fotossensibilizantes. O último passo na via biossintética do heme ocorre na mitocôndria e consiste na incorporação de Fe^{2+} na molécula de PPIX pela ferroquelatase, sendo este o passo limitante da via biossintética (3, 7, 22, 23).

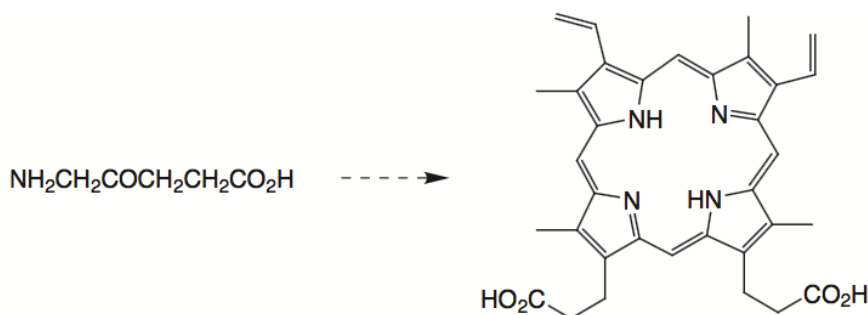


Fig. 6 Adaptado de Sharman *et. al.*, 1999. Fórmula estrutural da protoporfirina IX (à direita) e do seu precursor, o ácido 5-aminolevulínico (à esquerda).

Em circunstâncias normais, a formação de ALA é regulada através de um mecanismo de *feedback* negativo pelo heme, pelo que não ocorre acumulação de PPIX no interior da célula. Deste modo, a administração de ALA por via IV, oral ou tópica, permite que ocorra

acumulação de PPIX nas células devido à capacidade limitada da ferroquelatase, permitindo o seu aproveitamento no contexto da TFD (2, 7). A PPIX localiza-se principalmente nas mitocôndrias, podendo também difundir-se para os lisossomas e membrana plasmática (2, 5, 7), podendo ser ativada por radiação vermelha (635 nm), verde (510 nm) ou azul (410 nm) (5, 10).

O racional biológico para a utilização de ALA em TFD baseia-se numa maior expressão de determinadas enzimas da via biossintética do heme (porfobilinogénio desaminase, coproporfirinogénio oxidase), numa reduzida expressão de ferroquelatase nas células cancerígenas (7, 22, 23).

A utilização de ALA no contexto da TFD encontra-se limitada pela sua reduzida profundidade de ação (1 mm), pelo que atualmente a sua utilidade clínica foca-se nos carcinomas das células basais. Outras patologias como a doença de Paget, carcinomas das células escamosas, linfomas das células T e lesões cutâneas pré-cancerosas (queratoses e doença de Bowen) e cancro do pulmão, bexiga, cavidade oral, esófago, endométrio e cérebro foram já tratadas com resultados significativos (3, 5, 10).

Uma vez que o ALA não desencadeia uma reação fotoquímica *per se*, uma das suas vantagens na utilização em TFD é o seu baixo risco de indução de fototoxicidade, permitindo a sua administração por via oral (22).

De modo a aumentar a eficácia da TFD mediada por ALA têm sido exploradas várias alternativas, tais como a administração de quelantes de ferro (de modo a reduzir a quantidade de ferro livre necessário à conversão de PPIX a heme); a síntese de ésteres alquílicos do ALA (metílico, pentílico, hexílico ou benzílico) que são hidrolisados por esterases intracelulares, melhorando a sua permeabilidade membranar; a utilização de estruturas macromoleculares de veiculação, tais como lipossomas e dendrímeros (3, 5, 7, 24). É importante referir que a fotomodificação de PPIX e de outras porfirinas conduz à formação de clorinas, que possuem propriedades fotossensibilizantes mais eficazes do que as suas moléculas precursoras (1).

O ALA foi inicialmente aprovado sob o nome comercial de Levulan[®] (solução a 20%) em dezembro de 1999, nos EUA, para o tratamento de queratose actínica (manchas dermatológicas pré-cancerosas) (22). Em setembro de 2000 foi também aprovado um iluminador de luz azul com comprimento de onda de 410 nm (5, 25), destinado a ser usado exclusivamente com o Levulan[®], com o nome comercial de BLU-U[®]. Em maio de 2007 foi concedida a designação de medicamento órfão ao Levulan[®] para o tratamento de displasia esofágica.

Em Portugal, encontram-se atualmente aprovadas formas farmacêuticas tópicas de ALA (Ameluz[®], gel; Alacare[®], emplastro medicamentoso) e aminolevulinato de metilo (Metvix[®], creme); de ALA para administração por via oral (Gliolan[®], pó para solução oral); de aminolevulinato de hexilo para uso intravesical (Hexvix[®], pó e solvente) (21).

3.4.3. Temoporfina

A temoporfina (*m*-tetra(hidroxifenil)clorina ou *m*-THPC) (Fig. 7) é um FS sintético de segunda geração da família das clorinas. Possui um curto tempo de semi-vida plasmático e acumula-se preferencialmente nas células tumorais, sendo ativado com radiação de comprimento de onda de 652 nm. Para além de um efeito direto nas células tumorais, também provoca danos vasculares possivelmente devido à sua capacidade de ligação a proteínas plasmáticas ainda não identificadas. Mediante administração por via IV, verifica-se de imediato a ocorrência de um pico plasmático, que se repete após algumas horas, podendo este comportamento farmacocinético ser explicativo da sua fototoxicidade (8, 10, 15, 26).

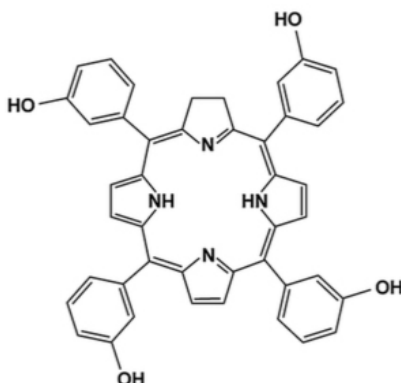


Fig. 7 Adaptado de Weijer et. al., 2015. Fórmula estrutural da temoporfina.

Apesar de ser um fotossensibilizante 100 vezes mais potente que o porfímero sódico, com um rendimento quântico de 0.87, comparativamente, provoca menos fotossensibilidade, que apenas tem a duração de cerca de 2 semanas (8, 10). A sua potência implica que seja necessária uma dosimetria precisa, de modo a minimizar a ocorrência de lesões secundárias como consequência de uma iluminação excessiva (5, 13, 26).

A sua utilização em situações de cancro da cabeça e do pescoço tem oferecido taxas de resposta excelentes, sendo utilizado principalmente nestas indicações. No entanto, pode também ser usado em situações de lesão cutânea, cancro pulmonar e cancro esofágico (13, 26).

Apesar de ter recebido o estatuto de medicamento órfão pela FDA, em novembro de 1999, para o tratamento de carcinomas das células escamosas da cabeça ou do pescoço, em doentes que não foram curados com sucesso por cirurgia ou radioterapia, a temoporfina recebeu um parecer negativo em 2000, não tendo sido aprovada nos EUA. No entanto, foi aprovada pela EMA em julho de 2001, tendo sido introduzida no mercado com o nome comercial de Foscan®.

Em Portugal, o Foscan® na forma de solução injectável encontra-se aprovado desde outubro de 2001, apesar de não se encontrar comercializado (21).

3.4.4. Verteporfina

A verteporfina (Fig. 8) é uma clorina que absorve radiação a comprimentos de onda superiores (a 690 nm) quando comparada com o porfímero sódico, o que lhe confere uma penetração nos tecidos superiores. É também rapidamente absorvida pelo tecido tumoral com uma boa seletividade, provocando fotossensibilidade apenas por alguns dias (8, 15).

A verteporfina foi aprovada em 2000 nos EUA e na União Europeia (incluindo em Portugal) sob o nome comercial Visudyne® para utilização no tratamento da degeneração macular (17, 27).

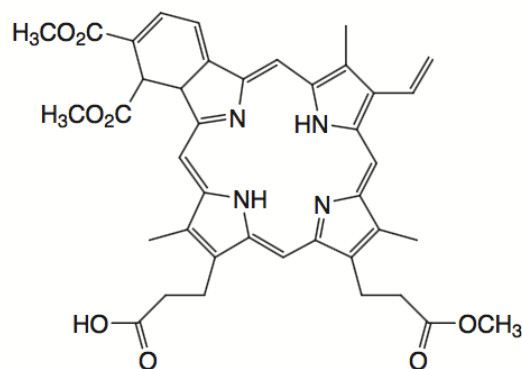


Fig. 8 Adaptado de Sharman et. al., 1999. Fórmula estrutural da verteporfina.

4. Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica

4.1. Na célula tumoral

De um modo geral, os tipos de resposta celular são dose-dependente, em que, de acordo com o grau de dano celular, a célula pode transitar para um estado de sobrevivência e reparação, apoptose ou necrose (1, 2, 28). É, no entanto, improvável que exista apenas um mecanismo de resposta celular à TFD, dependendo esta de parâmetros externos, tais como as variáveis inerentes ao tratamento mais relevantes (dose de FS administrado, concentração

na célula, localização subcelular e dose de radiação aplicada) e de parâmetros internos que influenciam a sensibilidade das células ao tratamento fotodinâmico (tipo celular, características metabólicas e genéticas e fase do ciclo celular em que se encontram) (1, 2, 17). Deste modo, os parâmetros externos da TFD devem ser definidos de modo a que a resposta celular seja de apoptose. Assim, é possível evitar o processo inflamatório desencadeado pela libertação de material intracelular no processo necrótico, bem como a ocorrência de dano a células vizinhas (1, 2). É, também, importante considerar que, nos tumores sólidos, se verifica um gradiente de radiação do exterior para o interior do tumor, que provoca uma menor activação do FS no interior deste. Assim, diferentes áreas de um mesmo tumor podem apresentar respostas celulares ou eficácia de citotoxicidade distintas, podendo existir uma combinação de respostas apoptótica e necrótica num mesmo tumor (2).

Recentemente, descobriu-se que as células sujeitas à TFD morriam em aglomerados e não individualmente. Deste modo, a morte celular ocorre de modo propagado ao longo do tecido, sendo este efeito mais pronunciado se ocorrer através da via necrótica. Adicionalmente, verificou-se que este efeito ocorre em maior grau em células normais, em comparação com células tumorais, estando ainda o seu mecanismo molecular por esclarecer (17).

4.1.1. Resposta necrótica

A necrose constitui um processo de morte celular passiva, caracterizada pela perda da integridade membranar e homeostase iónica e metabólica da célula.

Os FSs de natureza lipofílica e aniónica desencadeiam este tipo de resposta celular, uma vez que têm tendência a acumular-se nas membranas celulares e promoverem a peroxidação de colesterol membranar e outros fosfolípidos. Deste modo, promovem alterações na permeabilidade membranar, perda de fluidez e inativação de enzimas e recetores associados às membranas, interferindo também com enzimas mitocondriais, comprometendo a homeostase metabólica da célula (2).

4.1.2. Resposta apoptótica

A apoptose constitui um processo de morte celular activa, controlado por fatores internos e externos à célula, que culmina com uma sequência característica de alterações morfológicas e bioquímicas, não provocando inflamação (17).

Pensa-se que se trata de um modo de eliminação de células que produzam ROS de forma excessiva. Existem várias teorias explicativas do processo, mas crê-se que o aumento da concentração intracelular de cálcio seja um indutor da apoptose, através da promoção da

libertação de citocromo c da mitocôndria. De igual modo, a indução de dano nos lisossomas por FS hidrofílicos pode promover a ativação de caspases, responsáveis pelo desencadear da resposta apoptótica. Um outro mecanismo que se pensa conduzir à apoptose é a destruição fotoquímica de proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2, por oxigênio no estado de singuleto, desencadeada por FS que se localizem na mitocôndria (2, 17). Por outro lado, a estimulação da expressão e secreção de fator de necrose tumoral (TNF) conduz à ativação de NF- κ B, um fator de transcrição responsável pela promoção da expressão de genes que codificam várias proteínas envolvidas em processos pró-inflamatórios e de imunoregulação. Existe também evidência que a TFD interfere com a via das MAP cinases p38, responsáveis pela resposta celular a estímulos de *stress*, induzindo apoptose (17).

Deste modo, os FSs que se localizem nas mitocôndrias são mais eficazes no desenvolvimento de uma resposta apoptótica em comparação com FSs que se localizem em outros compartimentos celulares distintos, uma vez que é neste organelo que se desenvolvem respostas a situações de *stress* celular (2, 17). Os FSs lipofílicos catiónicos localizam-se preferencialmente na membrana mitocondrial interna. No entanto, certos FSs de natureza aniônica (porfímero sódico) ou neutra (ftalocianina de sílica, Pc4) podem também localizar-se na mitocôndria através da ligação aos seus constituintes (17).

Em contraste com o desenvolvimento de necrose, é necessária uma menor dose de FS ou radiação para induzir apoptose, sendo esta considerada um processo inicial que se verifica nas primeiras horas após a TFD, precedendo a necrose e a regressão do tumor (17).

Tendo em conta que a TFD conduz a um processo apoptótico, que aparenta evitar mecanismos que tornem as células resistentes à apoptose, pode constituir uma alternativa eficaz para o tratamento de tumores que se mostrem resistentes aos métodos convencionais de tratamento de quimioterapia e radioterapia (2, 17). Neste âmbito, pensa-se que a TFD possa conduzir a uma eliminação eficaz de células tumorais com níveis elevados de Bcl-2, que constitui um mecanismo de resistência da célula às terapias convencionais, apesar deste não se encontrar ainda totalmente esclarecido (17).

4.2. No sistema imunitário

O modo de morte celular tem um grande impacto na resposta imune pós-tratamento. Devido à resposta inflamatória decorrente da TFD, na necrose ocorre principalmente o recrutamento de macrófagos, enquanto que na apoptose verifica-se o recrutamento e activação de linfócitos T citotóxicos CD8⁺, que auxiliam na completa erradicação

do tecido tumoral. No entanto, os mecanismos imunológicos desencadeados pela TFD ainda não são totalmente compreendidos (2).

5. Sistemas de transporte

Na perspectiva de melhorar as dificuldades de administração intravenosa inerentes à elevada lipofilia dos FSs já existentes, surgiram os FSs de terceira geração, que aproveitam algumas características intrínsecas às células tumorais, como antígenos de superfície específicos e presença de recetores das LDL. Entre os sistemas de transporte desenvolvidos destacam-se as nanopartículas, que apresentam várias características atraentes que permitem melhorar a eficácia da TFD, como uma elevada área de superfície que pode ser modificada por grupos funcionais que confirmam propriedades bioquímicas e de vectorização adicionais; possibilidade de libertação controlada do fármaco; acumulação preferencial no tumor devido à maior permeabilidade vascular local e maior efeito de retenção (como consequência da ausência de uma drenagem linfática local funcional (4, 29). Estas podem desempenhar um papel ativo na TFD ou apenas ter a função de transporte e proteção dos FSs.

Tendo um papel ativo na TFD, podem servir como catalisadores para a produção de radicais livres, moduladores de ROS ou fontes de radiação com a finalidade de ativarem os FSs. Entre estas destacam-se os fulerenos (C_{60}), que se podem comportar como fotossensibilizantes *per se* e os nanotubos de carbono, que podem atuar como agentes de extinção de fluorescência, podendo modular a formação de oxigénio no estado de singuleto.

No que diz respeito às nanopartículas com a função exclusiva de transporte e vectorização tumoral, encontram-se em desenvolvimento nanopartículas de polímeros biodegradáveis (lipossomas, dendrímeros e ciclodextrinas) e não-biodegradáveis (poliacrilamida, nanopartículas de sílica e nanopartículas metálicas). Ambas podem ser vectorizadas para o tecido tumoral de interesse, melhorando a seletividade, através da acoplação a anticorpos monoclonais ou ligandos característicos do tumor (tais como vitaminas e fatores de crescimento) e modificadas de modo a possibilitar uma libertação controlada do FS em resposta a determinados estímulos como alterações de pH, temperatura e radiação, o que permitirá evitar ou reduzir a ocorrência de fototoxicidade (29, 30).

Conclusão

Desde os seus primórdios que a terapia fotodinâmica aparenta ser um método de tratamento com resultados promissores, apesar de se basear num conceito simples que permite de forma eficaz e específica a destruição de neoplasias malignas ou benignas, não afetando em simultâneo os tecidos saudáveis. No entanto, é ainda necessário desenvolver métodos que permitam dosear o fotossensibilizante para o doente e o tipo de tumor em causa, coordenando em simultâneo a sua administração com o momento certo de incidência de radiação, visto que o doseamento da radiação, a sua profundidade de penetração e a iluminação da área a tratar de forma homogénea ainda não são ideais, face às necessidades de tratamento atuais. Neste sentido, a comercialização conjunta de um fotossensibilizante, iluminador e protocolo de tratamento, à semelhança do que foi feito com o Levulan® e o BLU-U® poderá constituir a norma num futuro próximo. Adicionalmente, um melhor doseamento da radiação poderá permitir a obtenção de melhores resultados com os fotossensibilizantes já disponíveis. Possivelmente, a melhor alternativa será a junção do fotossensibilizante com uma fonte de luz numa única partícula, evitando assim os fenómenos de interação da radiação com os tecidos, bem como a possibilidade de se poderem atingir maiores profundidades de eficácia terapêutica.

Em última análise, apesar de já ter eficácia comprovada, a terapia fotodinâmica ainda se encontra no início do seu desenvolvimento, sendo ainda necessário o desenvolvimento de fotossensibilizantes, transportadores, iluminadores e protocolos clínicos que melhor permitam o seu aproveitamento a nível clínico.

Bibliografia

- (1) PLAETZER K., KRAMMER B., BERLANDA J., BERR F., KIESSLICH T. - Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers Med. Sci.*, (2009) 259–268.
- (2) PLAETZER K., KIESSLICH T., VERWANGER T., KRAMMER B. - The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. *Med. Laser Appl.*, (2003) 7–19.
- (3) FUKUDA H., CASAS A., BATLLE A. - Aminolevulinic acid: From its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, (2005) 272–276.
- (4) KONAN YN., GURNY R., ALLÉMANN E. - State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, (2002) 89–106.
- (5) ALLISON RR., SIBATA CH. - Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2 (2010) 61–75.
- (6) ATKINS P., PAULA J DE. - *Physical Chemistry for the Life Sciences*. 2.^a ed. Oxford University Press, 2011. ISBN 978-0-19-956428-6
- (7) CASTANO AP., DEMIDOVA TN., HAMBLIN MR. - Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2004 (2004) 279–293.
- (8) DEROSA MC., CRUTCHLEY RJ. - Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.*, (2002) 351–371.
- (9) JUZENIENE A., MOAN J. - The history of PDT in Norway. Part one: Identification of basic mechanisms of general PDT. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, (2007) 3–11.
- (10) HOPPER C. - Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol.*, (2000) 212–219.
- (11) WEIJER R., BROEKGAARDEN M., KOS M., VUGHT R VAN., RAUWS E A. J., BREUKINK E., GULIK TM VA., STORM G., HEGER M. - Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, (2015) 103–131.
- (12) CHATTERJEE DK., FONG LS., ZHANG Y. - Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 15 (2008) 1627–1637.
- (13) ALLISON RR., DOWNIE GH., CUENCA R., HU XH., CHILDS CJH., SIBATA CH. - Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, (2004) 27–42.

- (14) BERG K., MOAN J. - Photochemotherapy of Cancer: Experimental Research (Yearly Review). *Photochem. Photobiol.*, 6 (1992) 931–948.
- (15) SHARMAN W., ALLEN C., VAN LIER JE. - Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov. Today*, 11 (1999) 507–517.
- (16) PLAETZER K., BERNEBURG M., KIESSLICH T., MAISCH T. - New Applications of Photodynamic Therapy in Biomedicine and Biotechnology. *Biomed Res. Int.*, (2013).
- (17) OLEINICK NL., MORRIS RL., BELICHENKO I. - The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.*, (2002) 1–21.
- (18) AXCAN SCANDIPHARM INC. - Photofrin® (Resumo das Características do Medicamento). [Em linha] Birmingham: Food and Drug Administration, 2003. [acedido a 20 de julho de 2015] Disponível na Internet em: <http://www.fda.gov/>
- (19) SCHUITMAKER JJ., BAAS P., VAN LEENGOED HL., VAN DER MEULEN FW., STAR WM., VAN ZANDWIJK N. - Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. *J. Photochem. Photobiol. B.*, (1996) 3–12.
- (20) Orphan Drugs (21:1:D:316). *Electron. Code Fed. Regul.*, [Em linha] Washington D.C.: U.S. Government Publishing Office [acedido a 20 de julho de 2015] Disponível na Internet em: http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr&SID=51cf70689d51f0ea4147c0a8ac649321&rqn=div5&view=text&node=21:5.0.1.1.6&idno=21#se21.5.316_121
- (21) INFARMED I.P. - Infomed - Base de dados de medicamentos de uso humano. [Em linha] [acedido a 15 de agosto de 2015] Disponível na Internet em: <https://www.infarmed.pt/infomed/inicio.php>
- (22) ISHIZUKA M., ABE F., SANO Y., TAKAHASHI K., INOUE K., NAKAJIMA M., KOHDA T., KOMATSU N., OGURA SI., TANAKA T. - Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *Int. Immunopharmacol.*, 3 (2011) 358–365.
- (23) DEL C. BATLLE AM. - Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy — a model for carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 1 (1993) 5–22.
- (24) CASAS A., BATLLE A. - Rational design of 5-aminolevulinic acid derivatives aimed at improving photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents*, 4 (2002) 465–475.
- (25) DUSA PHARMACEUTICALS INC. - Levulan® (Resumo das Características do Medicamento). [Em linha] Birmingham: Food and Drug Administration, 1999. [acedido a 20 de julho de 2015] Disponível na Internet em: <http://www.fda.gov/>
- (26) CHIAVIELLO A., POSTIGLIONE I., PALUMBO G. - Targets and mechanisms of photodynamic therapy in lung cancer cells: A brief overview. *Cancers (Basel)*, 1 (2011) 1014–1041.

- (27) CERMAN E., ÇEKIÇ O. - Clinical Use of Photodynamic Therapy in Ocular Tumors. *Surv. Ophthalmol.*, (2015).
- (28) WYLD L., REED MW., BROWN NJ. - Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *Br. J. Cancer*, 10 (2001) 1384–1386.
- (29) ANDREWS DL., SCHOLES GD., WIEDERRECHT GP., CHENG Y., BURDA C. - Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Compr. Nanosci. Technol.*, (2011) 1–28.
- (30) DERYCKE ASL., DE WITTE P A M. - Liposomes for photodynamic therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, (2004) 17–30.