

ESTROMA TUMORAL E TERAPIA FOTODINÂMICA

Natália Mazini Ribeiro^{1,2,3}, Erika Fonseca Ferrari⁴, Maria Angélica Gargione Cardoso², Milton Beltrame Júnior¹, Cristina Pacheco Soares³

¹Laboratório de Síntese Orgânica, ²Laboratório de Imunologia, ³Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares, ⁴Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica, – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos/SP, natmazini@gmail.com, cpsoares@univap.br

Resumo – A Terapia Fotodinâmica (PDT) envolve a administração de um fármaco fotossensibilizador seguida de ativação por luz em comprimento de onda específico. O que resulta numa seqüência de processos fotoquímicos e fotobiológicos que causam dano irreversível ao tecido tumoral. Foi demonstrado em estudos nas últimas décadas que células do estroma tumoral, como os Macrófagos Associados ao Tumor (TAMs) acumulam maior quantidade de fármaco fotossensibilizador que as células tumorais. Por essa razão, muitos pesquisadores passaram a estudar os efeitos da PDT em TAMs. A PDT tendo TAMs como alvo, pode ser eficiente não só devido a afinidade que estes têm pelo fármaco fotossensibilizador, mas também porque a eliminação dos TAMs afeta rapidamente importantes funções metabólicas do tumor que são influenciadas por eles como a angiogênese e a metástase.

Palavras-chave: Macrófagos Associados ao Tumor, Terapia Fotodinâmica, Fotossensibilizadores
Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

A Terapia Fotodinâmica (PDT - *Photodynamic Therapy*) envolve a administração de um fármaco fotossensibilizador seguida de ativação por luz em comprimento de onda específico. O que resulta numa seqüência de processos fotoquímicos e fotobiológicos que causam dano irreversível ao tecido tumoral (DOUGHERTY *et al.*, 1998).

Durante a progressão neoplásica, macrófagos assim como outros leucócitos são recrutados para o interior da massa tumoral e iniciam a resposta imunológica. No entanto, as células cancerígenas são capazes de escapar do sistema imune que não é capaz de destruí-las completamente. Dessa forma, os macrófagos podem tanto ajudar a impedir o estabelecimento e a disseminação de células tumorais como apoiar seu crescimento (DIRKX *et al.*, 2006).

Foi demonstrado em estudos nas últimas décadas que células do estroma tumoral, como os Macrófagos Associados ao Tumor (TAMs - *Tumor-associated macrophages*) acumulam maior quantidade de fármaco fotossensibilizador que as células tumorais (KORBELIK *et al.*, 1991). Por essa razão, muitos pesquisadores passaram a estudar os efeitos da PDT em TAMs (BRASSEUR *et al.*, 1999; HAMBLIN; MILLER; ORTEL, 2000; CHOI *et al.*, 2004; LIU; HAMBLIN, 2005).

Macrófagos Associados ao Tumor (TAMs)

Os tumores sólidos são formados por células malignas e estroma, que apesar de interdependentes, influenciam-se mutuamente. O

estroma tumoral é formado por vasos sanguíneos, matriz extracelular e leucócitos inflamatórios, entre eles os TAMs (LEWIS *et al.*, 1995). Macrófagos infiltrados chegam a representar metade da massa do tumor (SICA; SACCANI; MANTOVANI, 2002).

Com base no seu estado de ativação, macrófagos podem ser referidos como Tipo I (ou M1 ou via clássica) ou Tipo II (ou M2 ou via alternativa). A ativação de macrófagos M1 ocorre em resposta a produtos microbianos ou interferon gama (IFN- γ) e é caracterizada pela alta produção de interleucinas-12 (IL-12) e IL-23 (LAMAGNA; AURRAND-LIONS; IMHO, 2006).

Uma vez polarizado como M1, o macrófago é caracterizado pela alta capacidade de apresentar antígenos e de produzir fatores que promovem a proliferação e atividade de células T. Esta ativação também resulta em alta produção de substâncias tóxicas, tais como intermediários de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (EROs). Assim, os macrófagos M1 podem servir como potentes células efetoras que matam microorganismos e células tumorais, apresentam antígenos e produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias. TAMs localizados no microambiente do tumor exibem polarização M2. A exposição a glicocorticóides, IL-4, IL-10 e IL-13 induz TAMs a desenvolverem-se para o Tipo II. Estas células apresentam pouca capacidade de apresentar antígenos, produzem fatores que suprimem a proliferação celular e a atividade de células T e geralmente são mais bem adaptadas a eliminação de restos celulares, promoção da angiogênese, e reparação e remodelação de tecidos danificados. Macrófagos M1 expressam receptores

opsonizadores (como Fc γ RII [CD16]) quando expostos à sinais clássicos de ativação como IFN- γ e LPS. Em contraste, macrófagos M2 expressam preferencialmente receptores não opsonizadores como receptor manose (MR) e receptor scavenger. (MANTOVANI *et al.*, 2002; SICA *et al.*, 2006).

RECRUTAMENTO

Com o crescimento do tumor sólido, a difusão do oxigênio e nutrientes aos tecidos torna-se insuficiente e há aparecimento de múltiplas áreas de hipóxia. Isso ocorre geralmente quando o tumor atinge 2 mm de diâmetro. Alguns fatores produzidos nestas áreas são potentes na atração de monócitos que são continuamente recrutados em tumores, diferenciados em TAMs, e em seguida acumulam-se nos domínios hipóxicos onde produzem os fatores de transcrição HIF-1 e HIF-2 (fator induzível por hipóxia). Esses por sua vez ativam um vasto conjunto de genes de promoção de células tumorais, invasão e angiogênese (LEE; LIU; HUANG, 2006).

A quimiocina CCL2, também chamada de proteína-1 quimiotática de monócito (MCP-1) é provavelmente a citocina da família CC (cisteína-cisteína) mais freqüente em tumores desde sua descrição como fator quimiotático. Níveis baixos de secreção de CCL2, com acúmulo fisiológico de TAMs, promovem a formação do tumor, enquanto a alta secreção de CCL2 resulta em massiva infiltração de macrófagos na massa do tumoral e na sua destruição (MANTOVANI; ALLAVENA; SICA, 2004).

Outras quimiocinas envolvidas no recrutamento de monócitos estão CSF-1 (ou M-CSF, fator estimulador de colônias de macrófagos), CCL3, MIP-1 α (proteína inflamatória de macrófagos 1 – alfa), CCL4, CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), VEGF, e MIF (fator inibitório de macrófago) (SHIH *et al.*, 2006; SICA *et al.*, 2006). O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) também funciona como um fator quimiotático de monócitos para áreas de hipóxia do tumor (GURUVAYOORAPPAN, 2008).

ANGIOGÊNESE, INVASÃO E METÁSTASE

A angiogênese é necessária para o crescimento tumoral, progressão e metástase. A angiogênese envolve a degradação da membrana basal e a invasão do estroma por células endoteliais que proliferam, migram e se tornam organizadas numa estrutura capilar (CHEN *et al.*, 2003).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas extracelulares proteolíticas capazes de digerir vários componentes estruturais da matriz extracelular (PAZOS, NADER, 2007). Macrófagos

são capazes de produzir MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12 (MANTOVANI; ALLAVENA; SICA, 2004; LEE; LIU; HUANG, 2006).

Os macrófagos podem produzir tanto moléculas pró-angiogênicas quanto anti-angiogênicas (BINGLE *et al.*, 2002). Em cobaias CSF-induzidas, a metaloelastase (MMP-12) produzida por TAMs gera angiostatina (DONG *et al.*, 1998). Angiostatina é uma molécula anti-angiogênica resultante da clivagem proteolítica do plasminogênio por proteases, que são principalmente produzidas por TAMs (DONG, *et al.*, 1997).

Em geral, para a interação com células neoplásicas, as funções pró-angiogênicas dos TAMs prevalecem. Em vários estudos em tumores humanos, a acumulação de TAMs tem sido associada a angiogênese (SICA *et al.*, 2006).

Vários de fatores de crescimento como VEGF, fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de transformação do crescimento β (TGF β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) são conhecidos por serem produzidos por TAMs (MANTOVANI; ALLAVENA; SICA, 2004).

Eles não são apenas fatores de crescimento de células tumorais, como também são potentes agentes mitogênicos para promover a proliferação de células endoteliais (LEE; LIU; HUANG, 2006).

Citocinas também estão envolvidas no processo de angiogênese. As citocinas IL-8 (também chamanda de CXCL-8), IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são produzidas por TAMs. IL-8 e TNF- α estimulam a angiogênese, já IL-6 promove a ativação de MMPs (LEE; LIU; HUANG, 2006; GURUVAYOORAPPAN, 2008).

Macrófagos hipóxicos são suscetíveis de promover o comportamento invasor e/ou metastático das células tumorais através da liberação de fatores pró-invasivos tais como MIF e fator de tecido (TF). MIF modula as atividades de uma série de tipos de células de tumores, incluindo a estimulação da motilidade das células tumorais. O MIF causa liberação de MMP- 9, que por sua vez, degrada componentes da matriz extracelular, aumentando assim a motilidade das células do tumor. TF é uma proteína transmembranar primariamente envolvida na cascata de coagulação que também desempenha um importante papel na metástase de tumores sólidos. Dentro dos tumores o TF é expresso pelas células tumorais, células endoteliais, fibroblastos e macrófagos e promove a geração de trombina em tumores. A trombina promove a atividade metastática das células tumorais (LEWIS, MURDOCH, 2005).

TAMs e PDT

Liu e Hamblin (2005) observaram que a afinidade dos macrófagos com o fármaco fotossensibilizador ocorre devido à expressão de receptores do tipo *scavenger*, característicos desse tipo celular.

Os receptores *scavenger* são estruturalmente receptores multi-ligantes independentes que são definidos por sua capacidade de endocitar ligantes polianiônicos (STUART, EZEKOWITZ, 2008).

Macrófagos de retículo-sarcoma da linhagem celular murina J774 têm sido usados como modelo para o estudo da PDT, em especial na PDT tendo o receptor *scavenger* como alvo. Por exemplo, sabe-se que o receptor *scavenger* classe-A é expresso em células J774, mas não em células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano. O que permite analisar o papel do receptor *scavenger* na PDT através de estudo comparado entre as linhagens (CHOI *et al.*, 1994).

Brasseur e colaboradores (1999) descreveram a preparação e fototoxicidade de uma série de fármacos fotossensibilizadores conjugados entre BSA e alumínio ftalocianina tetrasulfonada (AlPcS₄). Foram utilizadas as linhagens J774 e EMT-6 (células de carcinoma mamário murino) que não expressam receptor *scavenger*. A absorção do fármaco fotossensibilizador não foi medida diretamente, mas foi encontrado alto grau de fototoxicidade nas células J774.

Do mesmo modo, Hamblin, Miller e Ortel (2000), conjugaram covalentemente o fotossensibilizador clorina e6 e a proteína BSA. Tal como no estudo anterior, os conjugados exibiram maior internalização e atividade fotodinâmica em células J774 em comparação com a linhagem não-fagocítica OVCAR-5 de células de carcinoma de ovário humano. A captação e fototoxicidade em células J774 foram fortemente diminuídas após incubação a 4°C, indicando rota de entrada endocítica.

Huang e colaboradores (2003) sintetizaram uma ftalocianina catiônica que foi posteriormente conjugada a BSA. Fotossensibilizadores catiônicos têm afinidade com a mitocôndria, aumentando assim a sua capacidade de promover apoptose. Para os testes *in vitro* foram utilizadas as linhagens J774 e células HepG2. Nas células HepG2 a fototoxicidade do conjugado foi significativamente maior do que a da ftalocianina não conjugada, onde 80% das células sobreviveram quando submetidas a PDT com a ftalocianina não conjugada enquanto menos de 30% das células sobreviveram a PDT com o conjugado. Os resultados da fototoxicidade do conjugado foram ainda melhores com a linhagem J774, cuja viabilidade celular caiu de 74% (para a ftalocianina não conjugada) para 2% (para o conjugado). Os autores não citam o receptor

scavenger, mas atribuem esse resultado a afinidade que os macrófagos tem por BSA.

Choi e colaboradores (2004) descreveram a preparação e fototoxicidade de uma zinco hexadeca-carboxi ftalocianina e uma hexadeca-carboxi ftalocianina livre. Foram utilizadas as linhagens J774 e células HepG2 e a viabilidade celular foi determinada por ensaios colorimétricos de MTT (3-(4,5-dimetiazol-2-il-2,5-brometo de difeniltetrazólio). Na ausência de luz, os fotossensibilizadores não apresentaram citotoxicidade. Após irradiação, a HepG2 mostrou-se resistente ao efeito fototóxico das duas ftalocianinas enquanto J774 mostrou-se muito sensível. Os resultados indicam que o receptor *scavenger* está envolvido no processo fototóxico dos fotossensibilizadores em células J774. Para demonstrar isso foi realizado um ensaio competitivo na presença de ácido poliinosínico, um ligante para o receptor *scavenger* de classe A (SRA). O ácido poliinosínico inibiu a citotoxicidade da zinco ftalocianina de maneira dose dependente.

A fim de definir melhor a utilidade da metodologia, estabelecida em estudo anterior (HAMBLIN; MILLER; ORTEL, 2000), Liu e Hamblin (2005) analisaram a ativação de macrófagos e a expressão do SRA em duas outras linhagens celulares de macrófagos tumorais murinos (RAW264.7 e P388D1) e na linhagem EMT-6 como controle negativo para SRA submetidas a PDT. Já que macrófagos tendem a estar em estado ativado diante de doenças, Liu e Hamblin (2005) pesquisaram sobre a eficácia da PDT tendo o SRA como alvo para matar macrófagos ativados. Foram avaliados a SRA-dependência e os efeitos da ativação via clássica (com IFN- γ e/ou LPS) sobre a captação do conjugado e conseqüente fototoxicidade do conjugado. As células foram pré-induzidas com IFN- γ e/ou LPS seguido do conjugado. Foram medidas a expressão de SRA, a liberação de TNF- α , a internalização celular do conjugado e a eficiência da PDT. Foi verificado que ambas as linhagens de macrófagos captaram especificamente o conjugado de forma SRA-dependente. O aumento na captação nas células tratadas com IFN- γ não conduziu a um aumento da eficiência da PDT, enquanto a estimulação com LPS ou IFN- γ + LPS resultou em uma significativa proteção contra PDT, apesar de um aumento significativo na captação do conjugado. Estes dados podem ter implicações no conhecimento da forma como a manipulação do estado de ativação do macrófago irá influenciar o efeito da PDT.

Considerações Finais

A PDT tendo TAMs como alvo, pode ser eficiente não só pela grande capacidade que os TAMs têm de reter o fármaco fotossensibilizador (KORBELIK *et al.*, 1991) mas também porque sua

eliminação afeta rapidamente importantes funções metabólicas do tumor como a angiogênese e a metástase (CHOI *et al.*, 2004).

Referências

- BINGLE, L., BROWN, N.J., LEWIS, C.E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **J. Pathol.**, v. 196, n. 3, p. 254-65, 2002.
- BRASSEUR, N. *et al.* Receptor-Mediated Targeting of Phthalocyanines to Macrophages Via Covalent Coupling to Native or Maleylated Bovine Serum Albumin. **Photochem. Photobiol.**, v. 69, n. 3, p. 345-52, 1999.
- CHEN, J.J.W. *et al.* Up-Regulation of Tumor Interleukin-8 Expression by Infiltrating Macrophages: Its Correlation with Tumor Angiogenesis and Patient Survival in Non-Small Cell Lung Cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, n. 2, p. 729-37, 2003.
- CHOI, C.F. *et al.* Synthesis and *in vitro* photodynamic activity of new hexadeca-carboxy phthalocyanines. **Chem. Comm. (Camb)**, v. 7, n. 19, p. 2236-7, 2004.
- DIRKX, A.E. *et al.* Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, n. 6, p. 1183-96, 2006.
- DOUGHERTY, T.J. *et al.* Photodynamic Therapy. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.90, n.12, p. 889-905, 1998.
- GURUVAYOORAPPAN, C. Tumor Versus Tumor-Associated Macrophages: How Hot is the Link? **Integr. Cancer Ther.**, v. 7, n. 2, p. 90-5, 2008.
- HAMBLIN, M.R.; MILLER J.L.; ORTEL, B. Scavenger-Receptor Targeted Photodynamic Therapy. **Photochem. Photobiol.**, v. 72, n. 4, p. 533-40, 2000.
- HUANG, J.D. *et al.* Photodynamic activities of a dicationic silicon(IV) phthalocyanine and its bovine serum albumin conjugates. **Tetrahedron Lett.**, v. 44, n. 43, p. 8029-32, 2003.
- KORBELIK, M. *et al.* Distribution of Photofrin between tumour cells and tumour associated macrophages. **Br. J. Cancer**, v. 64, n. 3, p. 508-12, 1991.
- LAMAGNA, C.; AURRAND-LIONS, M.; IMHOF, B.A. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, n. 4, p. 705-713, 2006.
- LEE, C.C.; LIU, K.J.; HUANG T.S. Tumor-associated macrophage: Its role in tumor angiogenesis. **J. Cancer Mol.**, v. 2, n. 4, p. 135-40, 2006.
- LEWIS, C.; MURDOCH, C. Macrophage Responses to Hypoxia: Implications for Tumor Progression and Anti-Cancer Therapies. **Am. J. Pathol.**, v. 167, n. 3, p. 627-35, 2005.
- LEWIS, C.E. *et al.* Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v. 57, n. 5, p. 747-51, 1995.
- LIU, Q.; HAMBLIN, M.R. Macrophage-targeted photodynamic therapy: scavenger receptor expression and activation state. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, v. 18, n. 3, p. 391-402, 2005.
- MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. **Eur. J. Cancer**, v. 40, n. 11, p. 1660-7, 2004.
- MANTOVANI, A. *et al.* Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol.**, v. 23, n. 11, p. 549-55, 2002.
- PAZOS, M.C.; NADER, H.B. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, n. 8, p. 1025-35, 2007.
- SHIH, J.Y. *et al.* Tumor-associated macrophage: Its role in cancer invasion and metastasis. **J. Cancer Mol.**, v. 2, n. 3, p. 101-6, 2006.
- SICA, A. *et al.* Tumor-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. **Eur. J. Cancer**, v. 42, n. 6, p.717-27, 2006.
- SICA, A.; SACCANI, A.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, n. 8, p. 1045-54, 2002.
- STUART, L.M., EZEKOWITZ, R.A. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, n. 2, p. 131-41, 2008.