

PANSA, MARIA FLORENC

Efectos de la terapi



73939

2015

73939

TESIS DOCTORAL

Efectos de la terapia fotodinámica sobre la interacción
tumor-macrófago-endotelio en el microambiente tumoral
en un modelo de cáncer de colon.

Mic. María Florencia Pansa

Directora

DRA. VIVIANA A. RIVAROLA

Co-Director

DR. CÉSAR BARBERO

Junio 2015

Río IV - Cba - Arg



Universidad Nacional De Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Biología Molecular

73839

MFN:

Clasif:

-1,206

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto bajo la dirección de la Dra. Viviana A. Rivarola y la co-dirección del Dr. César Barbero, para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas.

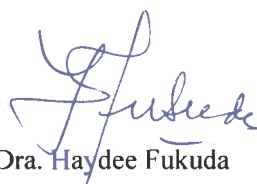
Dra. Viviana A. Rivarola
Director

Dr. César Barbero
Co-Director

Aprobado por el Tribunal de Tesis:



Dra. Mariana Salatino



Dra. Haydee Fukuda



Dra. Cecilia I. Álvarez Igarzabal

Río Cuarto, 12 de Junio de 2015



A mi familia

AGRADECIMIENTOS

“Hay momentos en la vida que son especiales por si solos. COMPARTIRLOS con las personas que quieres es lo que los hace INOLVIDABLES”

Agradezco **a la vida** por haber puesto en mi camino a tanta gente maravillosa...

A mis viejos, esas dos personas que me apoyan de forma incondicional, que siempre están ahí, para compartir lo bueno y hacer más liviano lo que no es tan bueno...gracias por compartir mi vida pero permitirme vivirla con libertad...gracias por disfrutar y celebrar cada paso que doy...todo se los debo a ustedes...gracias por esta familia que formaron, de la que siento tanto orgullo, gracias por enseñarnos tanto y por aprender con nosotros...

A mis hermanos, Seba, Juan, Rodri y Matu a los que elegiría mil veces si pudiera...los guardianes de mi felicidad...tan diferentes, y tan uno. “Influyen” en mi vida de una forma tremendamente positiva...disfruto de aprender juntos, de ser juntos, de estar juntos...cerca o lejos...me hacen sentir fuerte...

A mi abuela, por disfrutar de cada visita y perseguirme con su “avisame cuando quieras y yo te cebo mates”, por el inocente “que te vaya bien en el colegio” y el “ojala vengas de vuelta pronto”...

A Vivi, por haberme abierto las puertas del Laboratorio y de su casa...gracias por enseñarme con tanto cariño, por valorar y respetar el trabajo en equipo, gracias por dejarme ser parte de un equipo... (y que equipo!!)...gracias por las charlas, gracias por las risas, gracias por el empuje, gracias por la confianza, gracias por el “si podes” gracias, gracias...

A los chicos del Lab, July, Belu, Mati/Exe, Renzo, Lauri, Sol, Luisito, equipazo!!! Si que los voy a extrañar!!...Gracias por las charlas, los debates, las estadísticas alarmantes de Renzo, las “confesiones” de Lauri, los comentarios picantes de Matías...gracias por la compañía chicos!!. Gracias a **Juli y Belu** especialmente, por haberme aguantado desde el arranque, por las horas de campana y discusión de resultados...si hoy estoy escribiendo esto es gracias a su apoyo y ayuda de siempre...las tías orgullosas de mis queridos esferoides... las que estuvieron conmigo desde que comenzó la difícil pero increíble tarea de incorporar el cultivo tridimensional!

A Mari, amiga...hermana de la vida. Gracias por tanto! Esta etapa de mi vida no hubiera sido la misma sin vos...horas y horas felizmente compartidas. Gracias por hacerme sentir siempre que tu casa era mi casa...por estar siempre tan presente en cada momento...ahora solo nos queda expandir el territorio...porque esta amistad trasciende las distancias...

A Sole, gracias por todo! Gracias por cada momento compartido, por permitirme disfrutar de esa hermosa familia que formaste, por dejarme ser la “Tía” de esas dos princesitas hermosas que me llenan de alegría...”Córdoba siempre estará cerca”...

A mis amigas, las “Microbiólogas”, Tami, Vale, Ina, Day, Mili, Buchi...gracias por esa amistad que trasciende el paso del tiempo y la distancia...mis Locas por Petri 2.0!! Gracias por estar y compartir cada momento...

A mis amigas de la vida, por aguantarme las ausencias, por enseñarme que los verdaderos lazos de amistad no necesitan el verse todos los días...años de amistad bien compartida...

A todos los chicos de Biología Molecular, gracias por cada momento compartido, porque estamos todos recorriendo el mismo camino, porque compartimos lo lindo y lo no tanto de esta profesión que elegimos...gracias por la buena onda de todos los días...y que no se corten los festejos de fin de año!! La unión hace la fuerza....

A los miembros del Tribunal de Tesis, Dra. Mariana Salatino, Dra. Cecilia Alvarez Igarzabal y a la Dra. Haydee Fukuda, gracias por la predisposición, los valiosos aportes y sugerencias ofrecidas.

A Mariela y Miguel, porque sin ellos el trabajo en el laboratorio no sería posible...gracias por la buena onda y el compromiso para con todos nosotros...

Gracias a todos aquellos que de una u otra forma estuvieron presentes en esta etapa de mi vida en la que disfrute, aprendí, y que tanta felicidad me dio...

Gracias a mí querida **Universidad Nacional de Río Cuarto** por permitirme “CREER... CREAR...Y CRECER...”

RESUMEN

El estudio de las interacciones celulares en el microambiente tumoral (MAT) se ha convertido en una de las principales áreas de investigación en la lucha contra el cáncer. En este trabajo de Tesis caracterizamos el rol fundamental que desempeñan las principales células inflamatorias infiltrantes y residentes de tumores y sus mediadores moleculares como constituyentes claves del MAT. En este sentido, la población de macrófagos es el componente mayoritario no maligno en tumores sólidos. Debido a su plasticidad funcional, los macrófagos son capaces de adquirir fenotipos bien diferenciados los cuales pueden combatir (tipo M1) o promover (tipo M2) el crecimiento neoplásico. Por ello, centramos nuestra atención en el controvertido papel funcional de los macrófagos asociados a tumores (TAMs, del inglés "*tumor associated macrophages*") y su implicancia en el resultado final del tratamiento de tumores colorrectales.

La terapia fotodinámica (TFD) es un procedimiento mínimamente invasivo y clínicamente aprobado que involucra la administración de un fotosensibilizador (FS), compuesto no tóxico que es retenido selectivamente en el tejido neoplásico. La irradiación de la zona afectada lleva a la activación del FS con la consecuente fotogeneración de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés "*reactive oxygen species*") altamente citotóxicas que destruyen las células que incorporaron el FS.

En el presente trabajo, investigamos la implicancia de los macrófagos residentes y no residentes en el contexto de un tumor colorrectal tratado con TFD mediante el desarrollo de una plataforma experimental combinada de cultivos 2D y 3D, recreando interacciones tumor-estroma *in vitro*. Demostramos que la citotoxicidad de la TFD se incrementó en presencia de macrófagos no residentes, los cuales presentaron un fuerte fenotipo anti-tumoral (M1) mediado por la producción de óxido nítrico, IL-6 y TNF- α . Por el contrario, los macrófagos residentes del tumor adoptaron un fenotipo pro-tumoral (M2), mediante la promoción de la migración de células tumorales y la estimulación endotelial.

Sobre la base de estos resultados, resultaría alentador el desarrollo de una estrategia terapéutica que amplifique la actividad de los macrófagos, eliminando de forma selectiva TAMs residentes (perfil M2) y favoreciendo el reemplazo de esta población por macrófagos M1.

ABSTRACT

Studies of cellular interactions in the tumor microenvironment (TME) have become one of the main areas of oncologist research. In this thesis, we characterized the fundamental role played by the main tumor infiltrating and resident inflammatory cells and their molecular mediators as key constituents of the tumor microenvironment. Macrophages are a major component in solid tumors. Because of their functional plasticity, they are able to acquire distinct phenotypes which can fight (M1 type) or promote (type M2) neoplastic growth. In particular, we focus on the controversial functional role of tumor-associated macrophages (TAMs) and its implications in the outcome of colorectal cancer treatment.

Photodynamic therapy (PDT) is a minimally invasive and clinically approved method involving administration of a photosensitizer (PS), a non-toxic compound that is selectively retained by neoplastic tissue. Irradiation of the affected area leads to activation of PS with consequent photogeneration of reactive oxygen species (ROS) that destroy highly cytotoxic cells that incorporated the PS.

It was investigated the role of residents and non-residents macrophages in the context of colorectal tumors treated with PDT by developing a combined experimental 2D and 3D platform cultures, recreating tumor-stromal interactions *in vitro*. In our study, we showed that cytotoxicity of PDT was enhanced in the presence of non-resident macrophages, which showed a strong anti-tumor phenotype (M1) mediated by nitric oxide, IL-6 and TNF- α generation. On the opposite, resident macrophages of tumor adopted a pro-tumor phenotype (M2), by promoting tumor cell migration and endothelial stimulation.

Based on these results, it would be encouraging the development of a therapeutic strategy to amplify the activity of macrophages, selectively removing residents TAMs (M2 profile) and promoting replacement of this macrophage population M1.



Capítulo	Pag.
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer	1
1.2. Epidemiología del cáncer	1
1.3. Cáncer colorrectal	2
1.3.1. Etiología y factores de riesgo.....	2
1.3.2. Histotipos.....	3
1.3.3. Clasificación.....	3
1.3.4. Biología del cáncer colorrectal.....	5
1.4. Microambiente tumoral	7
1.4.1. Angiogénesis.....	9
1.4.2. Respuesta inflamatoria tumoral e inmunosupresión.....	11
1.4.2.1. Actividad antitumoral de macrófagos con perfil M1.....	13
1.4.2.2. Inmunosupresión: actividad pro-tumoral de macrófagos tipo M2.....	15
1.5. Prognosis y tratamiento del cáncer colorrectal	15
1.6. Terapia fotodinámica	16
1.7. Mecanismos de acción de la Terapia fotodinámica	18
1.8. Fotosensibilizadores	20
1.8.1. Ácido delta 5-aminolevulínico.....	22
1.8.2. Metil-ácido delta 5-aminolevulínico.....	24
1.9. TFD y microambiente tumoral	25
1.10. Desarrollo de modelos de estudio que permiten recrear el microambiente tumoral	26
1.10.1. Modelo de cultivo en esferoides.....	27
 REFERENCIAS	 30



Capítulo

2	<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i>	37
	2.1. Hipótesis	37
	2.2. Objetivo general	37
	2.3. Objetivos específicos	37

Capítulo

3	<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	38
	3.1. MATERIALES	38
	3.1.1. Medios de cultivo.....	38
	3.1.2. Tripsina- EDTA.....	38
	3.1.3. Solución balanceada de fosfatos.....	38
	3.1.4. Compuesto fotosensibilizador.....	39
	3.1.5. Aparato de irradiación.....	39
	3.1.6. Microscopio de fluorescencia.....	39
	3.2. MÉTODOS	40
	3.2.1. Cultivos celulares.....	40
	3.2.2. Generación de línea celular estable SW480-G.....	40
	3.2.3. Generación de cultivos tumorales tridimensionales (esferoides).....	40
	3.2.4. Caracterización de la morfología esférica.....	41
	3.2.5. Protocolo de fotosensibilización (TFD).....	41
	3.2.6. Análisis de la viabilidad celular por MTT.....	41
	3.2.7. Cinética de formación de PpIX en esferoides tumorales.....	42
	3.2.8. Ensayo de co-cultivos con macrófagos tumorales.....	42
	3.2.9. Generación de medios condicionados.....	42
	3.2.10. Ensayo de migración de macrófagos.....	43
	3.2.11. Determinación de tipo de muerte celular.....	43
	3.2.12. Crecimiento y migración de esferoides tumorales.....	43
	3.2.13. Determinación del efecto biológico sobre células HMEC.....	44
	3.2.13.1. Capacidad de migración celular.....	44
	3.2.13.2. Ensayo de proliferación celular.....	44
	3.2.13.3. Ensayo de formación de tubo.....	44



3.2.14. Cuantificación de VEGF.....	44
3.2.15. Determinación de óxido nítrico en medios condicionados.....	45
3.2.16. Determinación de actividad arginasa.....	45
3.2.17. Cuantificación de citoquinas.....	45
3.2.18. Análisis estadístico.....	46

REFERENCIAS.....	47
-------------------------	-----------

Capítulo

4	RESULTADOS.....	48
	4.1. Implicancia del grado de diferenciación celular en la efectividad del tratamiento fotodinámico con ALA-Met sobre células de cáncer de colon humano.....	48
	4.1.1. Línea CACO-2 (estadio tumoral I o B de Dukes, más diferenciado): Modelo de cultivo 2D.....	48
	4.1.2. Línea SW480 (estadio tumoral I o B de Dukes, menos diferenciado): modelo de cultivo 2D.....	50
	4.2. Estandarización de modelos de cultivo tridimensional de células tumorales.....	52
	4.2.1. Esferoides de células de carcinoma colorrectal Caco-2 y SW480.....	53
	4.2.2. Caracterización de la cinética de crecimiento de los cultivos tridimensionales de la línea SW480.....	55
	4.3. Implicancia de la arquitectura tumoral en la efectividad del tratamiento fotodinámico con ALA-Met sobre células de cáncer de colon humano SW480.....	59
	4.4. Efecto de esferoides de células tumorales sensibilizados sobre eventos del proceso angiogénico.....	64
	4.5. Implicancia del microambiente tumoral en el tratamiento fotodinámico.....	69
	4.5.1. Generación de plataformas combinadas de cultivo <i>in vitro</i> 2D y 3D de células tumorales y estromales para recrear interacciones presentes en un tumor <i>in vivo</i>	69



4.6. Impacto de los macrófagos residentes y no residentes en la eficacia terapéutica de la TFD en un microambiente de cáncer colorrectal.....	73
4.6.1. Incidencia en la viabilidad de la célula tumoral a corto plazo.....	73
4.6.2. Tipo de muerte celular desencadenado por el tratamiento fotodinámico.....	78
4.6.3. Supervivencia celular al tratamiento fotodinámico.....	80
4.7. Reclutamiento de células endoteliales por la presencia de macrófagos residentes y no residentes en el microambiente tumoral intervenido por TFD.....	84
4.8. Capacidad quimiotáctica de macrófagos en un microambiente celular tratado con TFD.....	86
4.9. Polarización de macrófagos residentes y no residentes frente al tratamiento fotodinámico.....	89
4.10. Determinación de la producción de las citoquinas IL-6 y TNF-α en el en las diferentes plataformas de cultivo tratadas con TFD.....	92
REFERENCIAS.....	96
Capítulo	
5	
<i>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</i>	99
5.1. Discusión.....	99
5.2. Conclusiones.....	107
REFERENCIAS.....	109

ABREVIATURAS

ALA: ácido 5-aminolevulínico
ALA-Met: derivado metilado del ácido 5-aminolevulínico
Ang: angiopoyetinas
ATCC: American Type Culture Collection
CCR: Cáncer colorrectal
CE: célula endotelial
CT: célula tumoral
DL50: dosis letal 50
DMEM: Medio de Eagle modificado de Dulbecco
DMSO: dimetilsulfóxido
EDTA: Ácido etilén-diamino-tetracético
EGF: factor de crecimiento epidérmico
FC: ferroquelatasa
GFP: proteína fluorescente verde
FGF α/β : factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico
FS: fotosensibilizador
HÖ: Hoescht
hetMAT/Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes
hetMAT/NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes
HIF 1 y 2: factor de transcripción inducido por hipoxia 1 y 2
HMEC: células microendoteliales humanas
homMAT: microambiente tumoral homotípico
IFN- γ : interferón gamma
IL-10: interleucina 10
IL-12: interleucina 12
IL-6: interleucina 6
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
LPS: lipopolisacárido
M Φ : macrófago
M1: macrófago con fenotipo 1
M2: macrófago con fenotipo 2
MAT: microambiente tumoral
MC: medios condicionados
MCP-1 o CCL2: proteína quimiotáctica de monocitos-1
MEC: matriz extracelular
MMPs: metaloproteasas de la matriz extracelular
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5 difenilbromuro de tetrazolio
NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NOS: óxido nítrico sintasa
NK: natural killer

ON: óxido nítrico
PBS: Solución Balanceada de Fosfatos
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
PpIX: protoporfirina IX
qPCR: PCR real time
ROS: especies reactivas del oxígeno
TAMs: macrófagos asociados a tumor
TFD: Terapia fotodinámica
TFD-La: terapia fotodinámica con dosis de luz alta
TFD-Lb: terapia fotodinámica con dosis de luz baja
TGF- β : Factor de crecimiento transformante β
TNF- α : factor de necrosis tumoral α
TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral
TNM: tumor, nódulos, metástasis.
VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR-1,2 y3: receptores para VEGF



Introducción

Introducción

1.1 Cáncer

Lo que en términos generales llamamos cáncer es en realidad un amplio espectro de enfermedades provocadas por causas físicas, químicas o biológicas, no todas bien conocidas, que tienen como expresión común un crecimiento incontrolado de células. Esto conduce a la formación de una masa celular, denominada tumor, que se extiende y propaga por el organismo.

1.2 Epidemiología del cáncer

A nivel mundial el cáncer ocupa la segunda causa de muerte luego de las enfermedades cardiovasculares.

La Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta de acuerdo a las estimaciones realizadas por la IARC para el año 2012, con una estimación de 217 casos nuevos por año cada 100.000 habitantes (Figura 1).

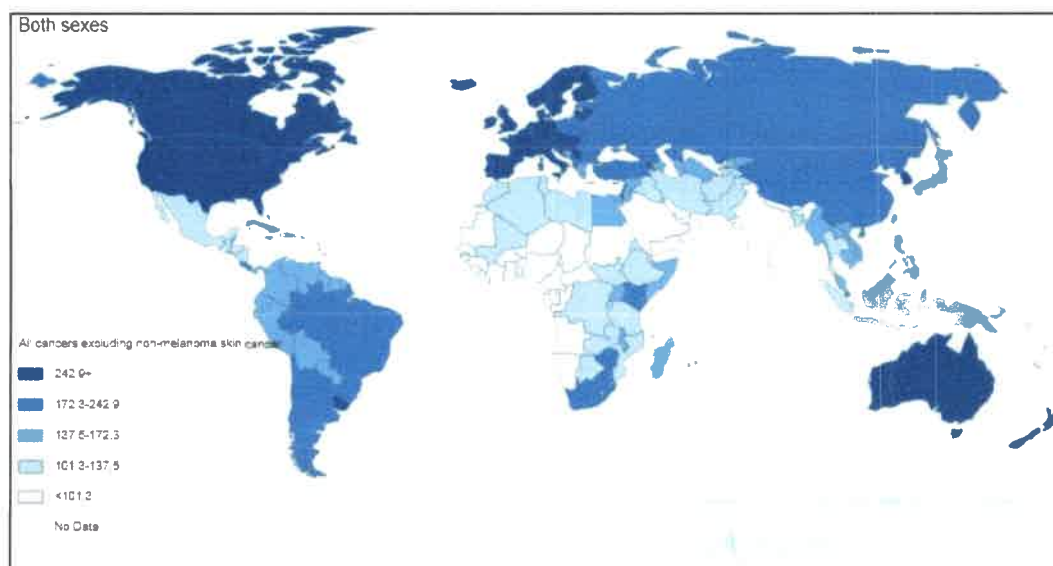


Figura 1: Incidencia de cáncer en el mundo 2012. Tasas estandarizadas por 100.000 habitantes. Fuente: Globocan(IARC).

Según indican los últimos datos oficiales, los tumores malignos en la Argentina constituyen la principal causa de muerte entre los 40 y los 64 años, y la segunda en los grupos de 5 a 39 años y en individuos mayores de 64. En 2012 en Argentina fallecieron 61.866 personas por cáncer. Sin discriminar por sexos, el más frecuente fue el de pulmón (14.9%), seguido por los de colon y recto (11.2%) y mama (9%). (Fuente: SIVER/INC–Ministerio de Salud de la Nación, en base a registros de mortalidad de la DEIS. Argentina, 2014).

1.3 Cáncer colorrectal

El cáncer de células epiteliales de colon y recto se conoce como cáncer colorrectal (CCR). Es una de las neoplasias más comunes que afecta a los individuos de países occidentales y es la tercera causa de muerte por cáncer luego del cáncer de pulmón¹.

El cáncer colorrectal ocupa el segundo tipo de cáncer más común en hombres y mujeres (informado por el Ministerio de Salud de la Nación²). Si bien a nivel nacional no existen datos fehacientes, se constató que, tanto en Estado Unidos como en los países europeos, este cáncer ocupa, también, el segundo lugar para ambos sexos y se atribuyen a esta enfermedad más de 400 mil muertes en todo el mundo³.

El cáncer de colon es más frecuente que el cáncer de recto, principalmente en países industrializados en donde la incidencia de casos es dos veces mayor y se incrementa aún más en la población femenina⁴.

1.3.1 Etiología y factores de riesgo

El cáncer colorrectal se hereda en sólo el 5% de los casos, siendo más frecuente la aparición de forma esporádica⁵.

Los factores de riesgo más importantes son:

- **Genéticos**: asociado a frecuencia de poliposis o síndromes no polipósicos.
- **No genéticos**
-Dietarios: factor exógeno más importante identificado hasta ahora en la etiología del cáncer colorrectal.

-No dietarios: tales como el tabaco y el consumo de antiinflamatorios no esteroideos.

1.3.2. Histotipos

El principal tipo histológico de cáncer de intestino grueso es el adenocarcinoma, que representa el 90-95% de todos los tumores del intestino grueso, mientras que los adenocarcinomas mucosos o coloides representan aproximadamente el 17% de los casos. Estos adenocarcinomas son definidos por la gran cantidad de mucina extracelular retenida dentro del tumor. Otras variantes raras de tumores epiteliales son los carcinomas de células escamosas y el carcinoma adenoescamoso. Dentro de los menos frecuentes, se encuentran los carcinomas indiferenciados, que no contienen estructuras glandulares o se caracterizan por la falta de secreción de mucus. En este grupo se encuentran los carcinomas simples, carcinoma medular y el carcinoma trabecular, entre otros.

1.3.3. Clasificación

La estadificación patológica del cáncer de colon está basada hace años en la clasificación de Dukes⁶, en la cual se evalúa la penetración transmural del tumor en la pared del colon. Teniendo en cuenta la última modificación realizada por *Astler and Coller*, se definen los siguientes estadios: A, B, C1, C2 y D⁷.

Una clasificación más avanzada, precisa y descriptiva que la clasificación de Dukes, es la que utiliza un sistema dual denominado TNM⁸ que incluye una clasificación clínica (cTNM) y otra patológica (pTNM) que sirven para diferentes propósitos. En general, el cTNM es la base para la elección del tratamiento y la pTNM es la base para la evaluación del pronóstico. TNM significa tumor, nódulos y metástasis. En la Tabla 1 se describen los diferentes parámetros utilizados en el sistema TNM, en el cual se identifican la profundidad de la invasión, el estado de los ganglios linfáticos y la presencia de metástasis a distancia.

Tabla 1: Descripción del sistema TNM para la estadificación de cáncer colorrectal.

Tumor primario (T)

TX: El tumor primario no puede ser evaluado

T0: No hay evidencia de tumor

Tis: Carcinoma *in situ*. Intraepitelial o invasión de la lámina propia

T1: El tumor invade la submucosa

T2: El tumor invade la *muscularis propria*

T3: El tumor invade la subserosa o adyacentes sin otros órganos involucrados

T4: El tumor invade otros órganos o estructuras y/o perfora el peritoneo

Nódulos linfáticos regionales (N)

NX: Nódulos regionales no pueden ser evaluados

N0: No hay metástasis en nódulos regionales

N1: Metástasis en 1 a 3 nódulos

N2: Metástasis en 4 o más nódulos linfáticos

Metástasis distante (M)

MX: No puede evaluarse la presencia de metástasis

M0: No hay evidencia de metástasis

M1: Metástasis distante

Teniendo en cuenta esta clasificación se pueden distinguir cinco estadios de cáncer colorrectal, que se corresponden con los estadios definidos por la clasificación de Dukes (Figura 2).

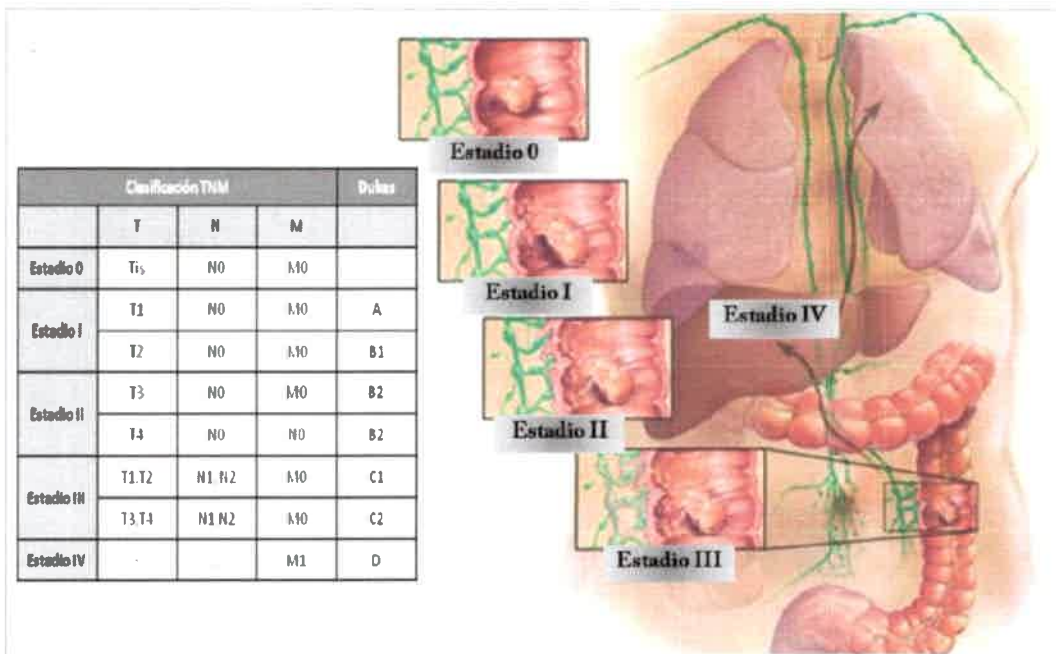


Figura 2. Correlación entre el sistema de clasificación TNM y la clasificación de Dukes

Los estadios del CCR van desde el estadio 0, conocido también como carcinoma *in situ*, hasta el estadio IV en donde el tumor adquirió la capacidad de diseminarse a través de la sangre y los ganglios linfáticos a otras partes del cuerpo, como el pulmón, el hígado, la pared del abdomen o el ovario. Su clasificación está basada en el grado de compromiso en orden ascendente de las diferentes capas de tejido del tubo digestivo, desde mucosa, submucosa, músculo, serosa hasta llegar a la capa más luminal en donde se encuentran los vasos sanguíneos y linfáticos.

1.3.4. Biología del cáncer colorrectal

El CCR es el resultado de una acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas de genes que regulan el crecimiento celular y la diferenciación, desencadenando el crecimiento incontrolado de colonocitos, las células que recubren el colon y el recto⁹. Los cambios genéticos señalados como responsables del desarrollo de esta enfermedad han sido bien caracterizados, gracias al avance en las técnicas de biología

molecular^{10,11}. Estas alteraciones en general son resultado de mutaciones en genes involucrados en la regulación del crecimiento celular, tales como los genes supresores de tumores (*APC*, *Smad4* y *p53*) y oncogenes (*k-Ras*, *c-myc*, *c-neu*, *c-src*)¹².

El desarrollo del CCR va desde hiperplasias benignas a estados de crecimiento altamente invasivos. Comienza en el revestimiento interno del colon y / o recto como un crecimiento de tejido lento o hiperplasia a través de algunas o todas sus capas. La transformación maligna se da como resultado de mutaciones o por pérdida de los principales genes reguladores, provocando el pasaje de hiperplasia hacia adenoma, carcinoma y finalmente, se desencadena la metástasis hacia otros órganos (Figura 3)¹³.

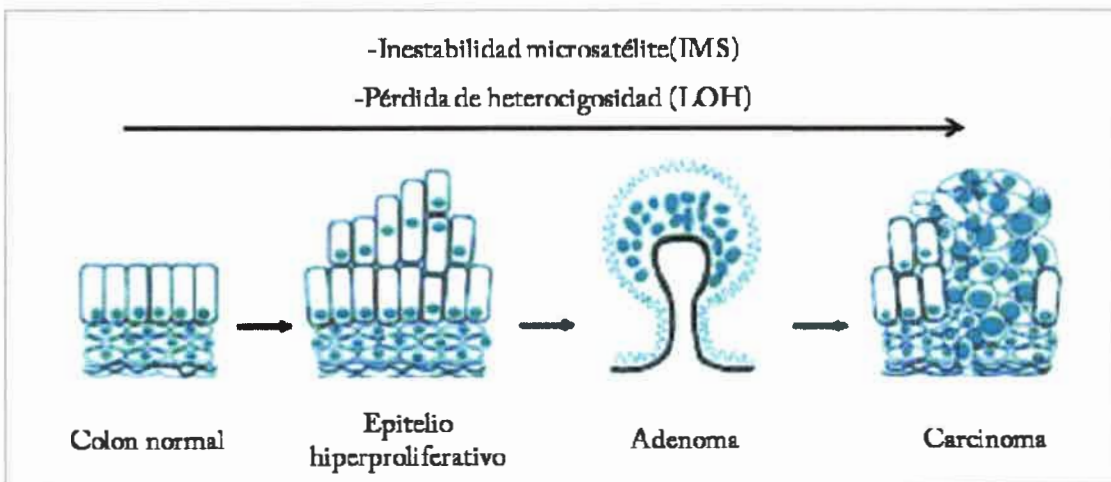


Figura 3. Etapas del desarrollo de cáncer colorrectal. El avance hacia estados más agresivos está fuertemente asociado a la pérdida de heterocigosidad e inestabilidad de microsatélites.

Las dos vías más importantes asociadas a la tumorigenicidad del CCR son la inestabilidad cromosómica, con la consecuente pérdida de heterocigosidad, y la inestabilidad de microsatélites. La pérdida de heterocigosidad en el desarrollo tumoral se da principalmente en los genes supresores de tumores. Por otro lado, la inestabilidad microsatélite se caracteriza porque el número de repeticiones de los microsatélites (secuencias cortas y repetidas de ADN) resulta diferente de la célula normal. La causa posiblemente sea consecuencia directa de la pérdida de capacidad de reparar errores durante la replicación^{9,13}.

1.4. Microambiente tumoral

Como ya hemos mencionado, las mutaciones en las células cancerígenas son el motor del desarrollo y progresión tumoral. Sin embargo, estas células transformadas no pueden hacerlo solas. Para ello son reclutados un amplio y variado conjunto de células que derivan de tejidos normales o médula ósea constituyendo lo que se conoce como microambiente tumoral (MAT)¹⁴. Estos contactos no sólo conectan las células en forma mecánica sino que también juegan un importante rol en el metabolismo y la señalización.

El proceso de carcinogénesis en el CCR, a partir del cual el epitelio del colon normal se transforma progresivamente en un pólipo adenomatoso y en última instancia en un carcinoma de colon invasivo, está asociado y depende fuertemente del microambiente tumoral. Éste podría ser considerado como un tipo particular de ecosistema, en donde diferentes poblaciones celulares interactúan unas con otras cumpliendo un rol funcional definido, con el objetivo final de facilitar su propio crecimiento, la supervivencia, la invasión y la metástasis tumoral¹⁵ (Figura 4).

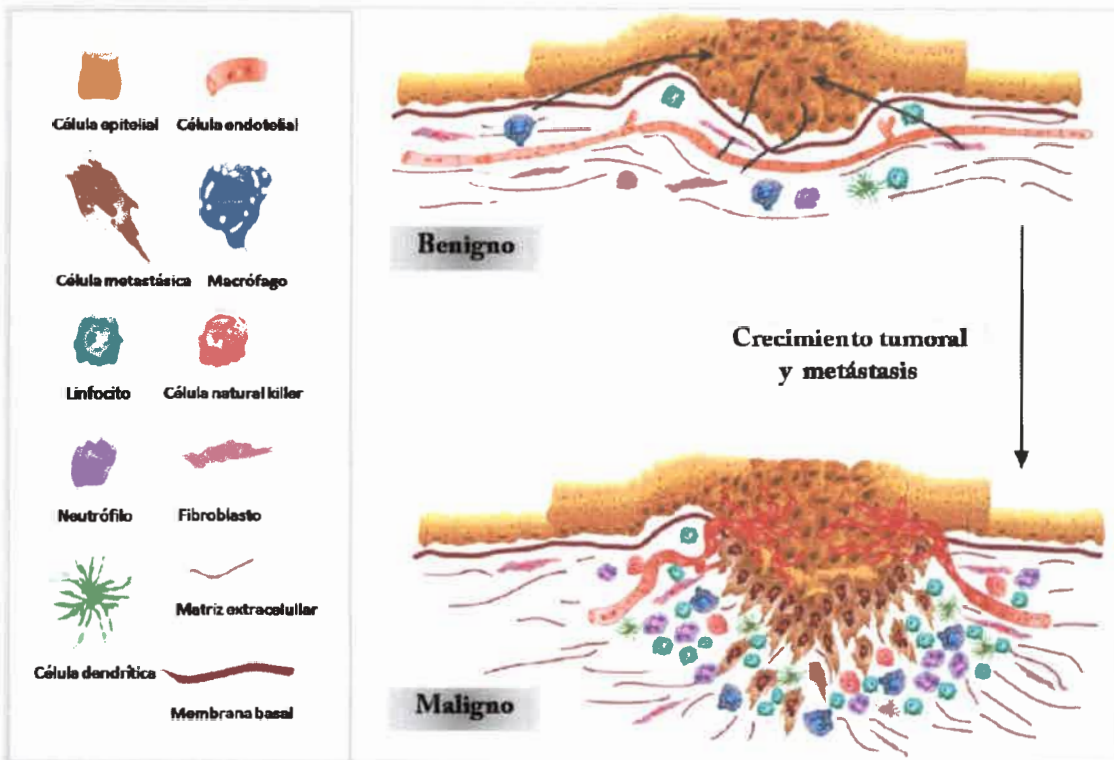


Figura 4. Modelo esquemático que representa el cambio sufrido por el microambiente de un tejido normal durante la transformación maligna. Tras el inicio de los tumores epiteliales, las interacciones recíprocas entre células epiteliales transformadas y estromales desempeñan un papel clave en la conmutación de un microambiente normal a uno que apoya el crecimiento tumoral y la diseminación.

El componente biótico central de este ecosistema son las células tumorales, que conforman el parénquima, y son quienes dirigen el crecimiento de células no tumorales nativas o no nativas, que constituyen lo que se conoce como estroma tumoral: células endoteliales (CE), fibroblastos, células del sistema inmune tales como macrófagos, linfocitos, células natural killer, entre otras¹⁶. Todas estas poblaciones celulares se mantienen juntas en un hábitat rico en matriz extracelular (MEC), que apoya la arquitectura y la integridad del tejido, así como también regula varias características bioquímicas¹⁵.

Estas células son capaces de mantener procesos fisiológicos claves como la angiogénesis, la inflamación asociada a tumores y la supresión de la respuesta inmune antitumoral, promoviendo el crecimiento tumoral y la metástasis¹⁷⁻¹⁹.

1.4.1. Angiogénesis

El aumento descontrolado en el crecimiento de las células tumorales y su entorno en última instancia requiere de la vasculatura. Una vez que la lesión tumoral excede de 100 μm de diámetro, la limitación de oxígeno (hipoxia)²⁰ y la privación de nutrientes desencadena un "switch angiogénico" para permitir que el tumor siga progresando (Figura 5)²¹.

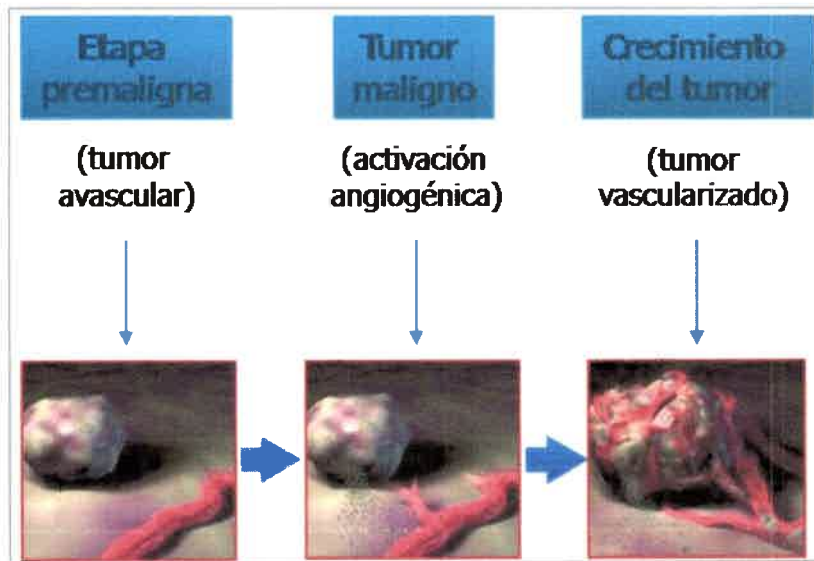


Figura 5: Switch angiogénico. Cuando los tumores desarrollan un tamaño crítico donde la difusión de O_2 no alcanza a todas las células, deben generar sus propios vasos sanguíneos, proceso conocido como "switch angiogénico".

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos a partir de capilares preexistentes y tiene gran importancia en procesos fisiológicos y patológicos del organismo²². En general, en el adulto la vasculatura está quiescente y la angiogénesis sólo ocurre en tejidos estimulados²³.

El "switch angiogénico" depende fuertemente del balance de señales pro y anti-angiogénicas presentes en su microambiente. El crecimiento de vasos sanguíneos en relación al crecimiento tumoral, es un proceso complejo, muy regulado y que consta de varias etapas:

- 1) activación de la CE y separación de ésta de los pericitos y de la membrana basal,
- 2) degradación de MEC,

3) movilización y migración de las CE en respuesta a factores pro-angiogénicos,
4) reorganización en estructuras tubulares (nuevos vasos sanguíneos) dentro de la masa tumoral (Figura 6)²⁴.

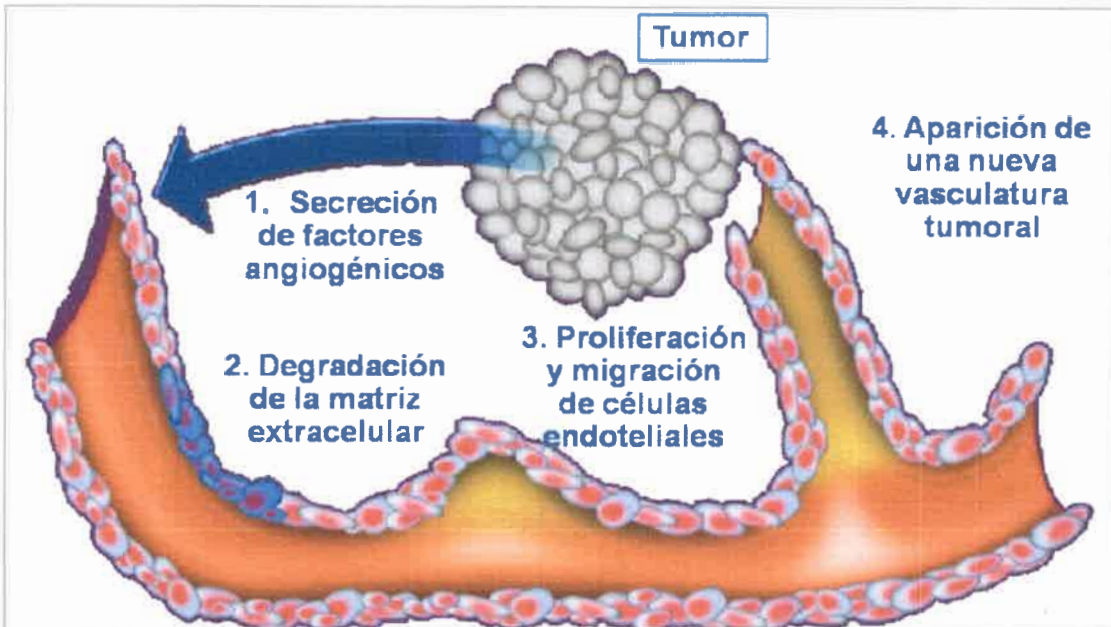


Figura 6: Etapas principales del desarrollo de la nueva vasculatura.

Entre los factores específicos que promueven la angiogénesis se destacan el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)²⁵ y las angiopoyetinas (Ang)²⁶. Los factores proangiogénicos inespecíficos son numerosos y afectan al crecimiento de la CE y de muchas otras, y son: el factor de crecimiento de fibroblastos (ácido y básico) (FGF α/β)²⁷, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β)²⁸, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)²⁹, y la angiogenina³⁰, entre otros³¹.

Los VEGFs (VEGFa, VEGFb, VEGFc, VEGFd), son las citoquinas proangiogénicas más importantes y median sus funciones a través de su unión a los tres receptores tirosina quinasa expresados en la membrana de las CE: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR), y VEGFR-3 (Flt-4)²².

Por otra parte, las integrinas son una gran familia de receptores de la superficie celular expresados por las CE activadas desempeñando un papel crítico en la regulación de

la proliferación, migración y supervivencia celular. De forma específica, se ha demostrado que la alteración de la unión entre las integrinas y la MEC inhibe la angiogénesis³². Al igual que las integrinas, la VE-caderina es otra proteína de superficie de la CE que se asocia a la MEC e induce permeabilidad de los vasos facilitando la migración de las CE.

Aunque en la angiogénesis están implicadas diversas proteasas, las que parecen tener un papel más importante son las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs). Pertenecen a una familia de metalo-endopeptidasas de al menos 26 enzimas que se dividen en matrilisinas, estromalisinas y gelatinasas y son secretadas tanto por la célula tumoral como por la CE. Su acción degradadora está implicada en al menos tres pasos del proceso: degradación de la membrana basal, migración y formación del lumen vascular³³.

Sin embargo, es importante destacar que la vasculatura asociada a los tumores está expuesta al conjunto de estímulos reinantes en el microambiente tumoral, regido por vías de señalización un tanto anormales y exacerbadas. Por esta razón hay diferencias en su estructura y función si se las compara a los vasos sanguíneos normales, siendo muchos más permeables y hemorrágicos con estructura más irregular y caótica^{23,34}.

El crecimiento, la dispersión de las células tumorales y el pronóstico desfavorable del cáncer colorrectal está correlacionado con el incremento en la densidad de los vasos sanguíneos¹⁰. Los tumores que presentan alta densidad de vasos sanguíneos son los más probables a metastatizar, y por lo tanto, tienen peor pronóstico. La angiogénesis está asociada con la progresión y metástasis de dicho cáncer^{35,36}, afectando la supervivencia del paciente, y ocasionando la mayoría de las muertes³⁷⁻⁴⁰.

1.4.2. Respuesta inflamatoria tumoral e inmunosupresión.

El concepto de que la inflamación crónica promueve el desarrollo tumoral ha sido ampliamente corroborado^{19,41}. Se sabe que las respuestas humorales persistentes exacerbaban en el microambiente tumoral el reclutamiento y activación de células del sistema inmune. Éstas contribuyen a la remodelación tisular, a la angiogénesis, y dan señales capaces de activar la supervivencia de la célula tumoral y de promover su desarrollo^{19,42}. Los adenomas benignos presentan infiltrado de leucocitos que se incrementa marcadamente en los tejidos de un CCR. Las células inmunes se localizan tanto en la periferia como en el interior del tumor, formando parte de su estroma⁴³. Las poblaciones más abundantes son los

macrófagos, sin embargo pueden encontrarse también linfocitos T eosinófilos, mastocitos, células NK y células dendríticas¹⁹.

Los macrófagos son células del sistema inmune con actividad pleiotrópica y amplia diversidad funcional, siendo ésta la característica clave de dicha población celular. Los macrófagos asociados a tumor (TAMs, del inglés “*tumor associated macrophages*”) son un componente altamente relevante del microambiente tumoral. Pueden tener efectos duales sobre la tumorigenicidad, ya que tienen capacidad de promover⁴⁴ o contrarrestar el crecimiento tumoral, dependiendo del contexto reinante⁴⁵.

La elevada plasticidad funcional de estas células está gobernada por la abundancia de receptores de superficie que interactúan con una amplia gama de factores de crecimiento, citoquinas, quimoquinas y otras moléculas presentes en el microambiente. Esta interacción es la que permite definir el fenotipo específico reflejado en su perfil de expresión y consecuentemente su papel funcional^{46,47}. Recientemente se ha demostrado que el contacto célula-célula es otro factor adicional que condiciona el comportamiento de los macrófagos en cuanto a sus propiedades pro-o anti-tumorales⁴³ (Figura 7).

El metabolismo diferencial de la L-arginina proporciona un medio para distinguir los dos estados de activación de esta población celular. Los macrófagos M1, o “clásicamente activados”, aumentan la expresión de iNOS para metabolizar L-arginina a citrulina y óxido nítrico (ON), uno de los principales mecanismos citotóxicos de estas células⁴⁸. Por otro lado, los macrófagos M2, o “alternativamente activados”, inducen la expresión de arginasa 1, que metaboliza arginina a ornitina y urea, siendo el primero el precursor necesario para la síntesis de poliaminas, que son esenciales para síntesis de colágeno y proliferación celular⁴⁹ (Figura 7).

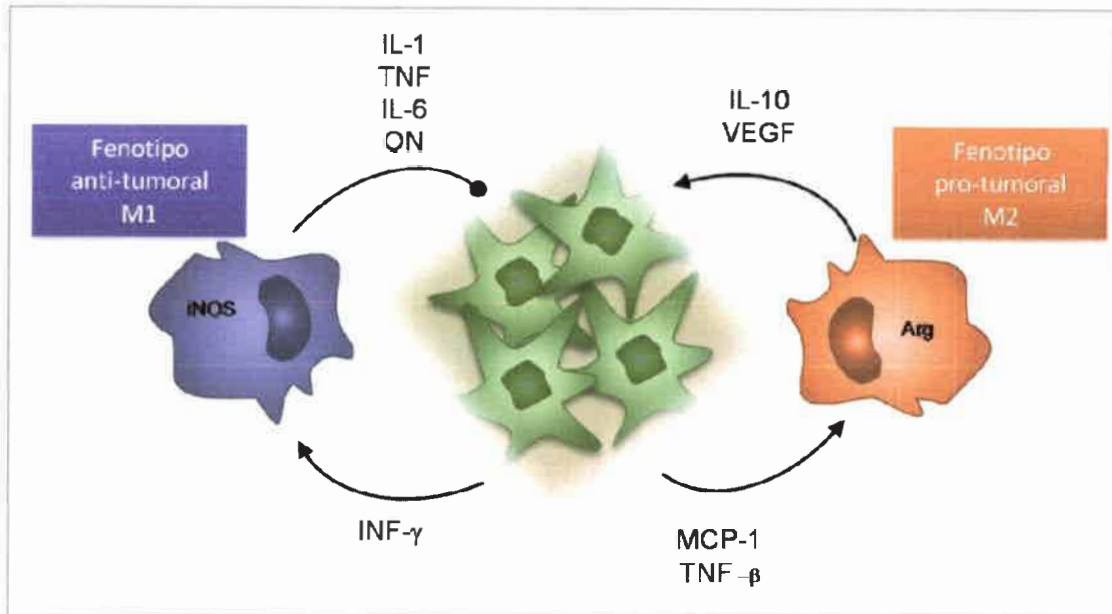


Figura 7: Características del perfil de macrófago M1 y M2 en cuanto a los factores liberados por el tumor que estimulan su polarización y las moléculas que produce.

1.4.2.1. Actividad antitumoral de macrófagos con perfil M1.

Durante la primera etapa del crecimiento neoplásico, las células inmunes son atraídas hacia el sitio del tumor e inician la respuesta inmune contra las células tumorales. Éstas son eliminadas por los macrófagos a través del proceso de fagocitosis y luego presentadas a otras células efectoras inmunes, tales como los linfocitos *natural killer* (NK) y linfocitos T. Los macrófagos que ejercen esta función se los conoce como “clásicamente activados” y presentan un perfil fenotípico del tipo M1 (Figura 7). Reportes realizados sobre biopsias de pacientes con CRC indicaron que una densa infiltración de macrófagos en el margen del tumor influye de forma positiva en el pronóstico de este tipo de cáncer⁵⁰.

Los macrófagos M1 son una sub-población activada a través de ligandos de receptores tipo Toll (*Toll-like receptor*), tales como los lipopolisacáridos (LPS). Su perfil de expresión característico incluye una amplia variedad de citoquinas pro-inflamatorias y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Muestran un fenotipo fagocítico en respuesta a interferón gamma (IFN- γ) y juega un papel importante en las funciones anti-tumorales y pro-inflamatorias, mediante la producción de IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , del inglés “*tumor necrosis-factor α* ”) y ON.

El ON es una molécula gaseosa multifuncional y un radical libre altamente reactivo⁵¹. Es sintetizado a partir de la L-arginina, NADPH y oxígeno por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Como molécula señal, el ON regula varios procesos fisiológicos y fisiopatológicos, tales como angiogénesis, y en concentraciones relativamente elevadas pueden tener funciones citotóxicas. Paradójicamente, varios estudios han revelado que el ON puede tanto promover como inhibir la progresión del tumor y la metástasis. Estos efectos dependen de la actividad y localización de las isoformas de NOS, la concentración y la duración de la exposición a ON, y la sensibilidad celular. De las tres isoformas conocidas de NOS, dos están constitutivamente expresadas, mientras que la isoforma inducible (iNOS) puede ser expresada en respuesta a agentes pro-inflamatorios⁵² y ha sido utilizada ampliamente como marcador del perfil de macrófagos M1, perfil fenotípico antitumoral. El cáncer colorrectal es uno de los tipos de tumores que se caracterizan por una expresión incrementada de iNOS^{53,54}, y está fuertemente asociada a la presencia de macrófagos.

Como ya mencionamos, durante el desarrollo neoplásico, los macrófagos que infiltran el tumor son capaces de producir gran variedad de citoquinas. Se ha reportado que citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α , contribuyen en la progresión del cáncer colorrectal. Un estudio reciente indica que la producción aumentada de IL-6 y TNF- α por TAMs co-cultivados con células de cáncer colorrectal induce un fenotipo metastásico⁵⁵.

El TNF- α es un miembro de la superfamilia de citoquinas TNF y es una molécula clave que regula la inflamación y la defensa del huésped. La activación de los receptores de TNF (TNFR) puede desencadenar la activación de vías de supervivencia asociadas a NF- κ B o bien señales apoptóticas asociadas a la activación de caspasa 8. Se ha demostrado que esta citoquina puede regular mecanismos de acción opuestos en cuanto al desarrollo tumoral, ya que puede actuar como un factor de promoción tumoral o bien favorecer su destrucción⁵⁶.

Otra citoquina de importancia biológica en la inflamación asociada al cáncer es la IL-6. Esta citoquina tiene una fuerte participación en la transición entre inflamación aguda y crónica, así como también en la inmunidad innata y adquirida⁵⁷. Ha sido reportado que la expresión de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 por parte de macrófagos, activa la respuesta de linfocitos T asociada con respuesta inmunes antitumorales⁵⁰.

1.4.2.2. Inmunosupresión: actividad pro-tumoral de macrófagos tipo M2

Se ha demostrado que ciertos tumores pueden prevenir la acción del sistema inmune mediante la secreción de factores inmunosupresores, tales como factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , del inglés “*transforming growth factor β* ”), siendo la evasión inmune una de las nuevas características emergentes de las células cancerosas⁵⁸.

Si el tumor logra evadir la maquinaria inmunológica, los macrófagos dentro del microambiente tumoral adquieren un fenotipo específico “alternativamente activado”, denominado de tipo M2 (Figura 7). La sub-población M2 es estimulada por interleuquina-4 o 13 (IL-4 o IL-13) y expresan particularmente arginasa 1, receptor de manosa CD206 y receptor de IL-4 de cadena α . Esta polarización alternativa está asociada a un fenotipo pro-tumoral por producción de citoquinas como IL-10 y factores angiogénicos como VEGF, TGF- β y FGF entre otros^{59,60}. Este perfil fenotípico orquesta diversos eventos que favorecen el desarrollo tumoral, tales como la angiogénesis, la proliferación de células tumorales, metástasis, inmunosupresión, deposición de matriz extracelular, y la remodelación del tejido.

1.5. Prognosis y tratamiento del cáncer colorrectal.

Los avances en el conocimiento de la biología del cáncer colorrectal y las nuevas opciones terapéuticas disponibles han aumentado la calidad de vida los pacientes. Dependiendo del estadio tumoral y progresión de la enfermedad, los regímenes de tratamiento para CCRs incluyen: colectomía, quimioterapia adyuvante post-operatoria y quimioterapia, anticuerpos monoclonales y radioterapia. Desafortunadamente, estos tratamientos están asociados a múltiples efectos adversos y no han demostrado eficacia significativa en la mayoría de los casos.

Uno de los campos prometedores en el tratamiento de CCR es el desarrollo de terapias inmunomoduladores. Se está investigando sobre la base de una amplia variedad de estrategias, muchas de las cuales se encuentran en etapas de ensayos clínicos, que involucran péptidos, vacunas de células enteras, terapias basadas en células dendríticas, inhibición de inmunomodulación, inmunoestimulación no específica y terapia basada en células efectoras⁶¹.

En este sentido, el tratamiento antitumoral ideal debería unificar la acción citotóxica directa sobre la célula tumoral con un potente efecto inmunoestimulante de células efectoras inmunes que reconozcan determinantes moleculares inmunogénicos en las células que mueren. La Terapia fotodinámica (TFD) es una novedosa modalidad de tratamiento que sin duda se asocia a la inducción de muerte celular inmunogénica en células cancerígenas⁶².

1.6. Terapia fotodinámica.

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento prometedor para tumores superficiales o de fácil acceso por vía endoscópica, que involucra la destrucción de células inducida por la luz, las cuales han sido previamente sensibilizadas por la administración de un agente fotosensibilizador (FS)⁶³. La irradiación de la zona afectada lleva a la fotogeneración de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés “reactive oxygen species”) altamente citotóxicas que destruyen las células que incorporaron el FS. Por lo tanto, para que el tratamiento sea efectivo deben estar presentes tres componentes: FS, luz y oxígeno (Figura 8).

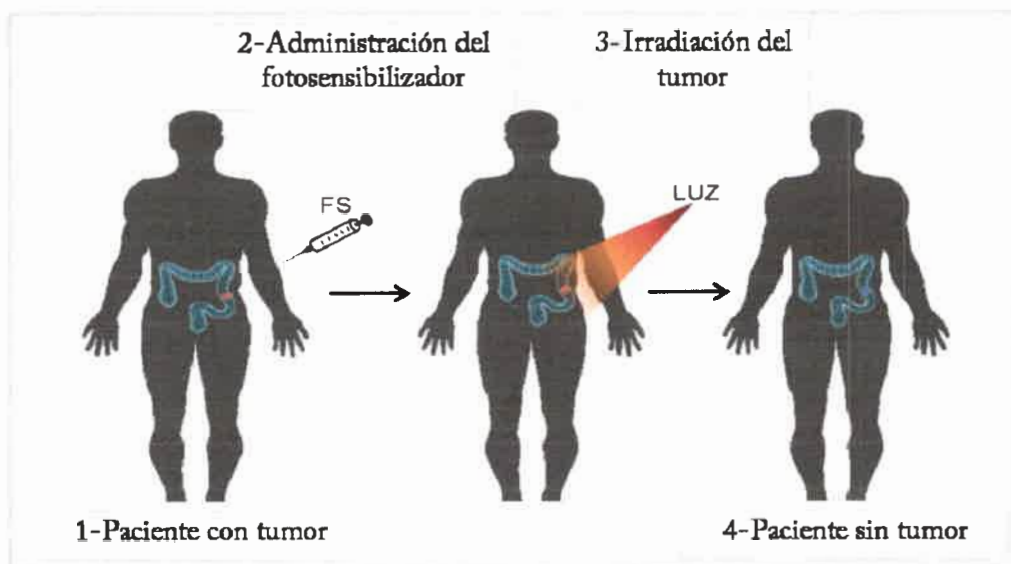


Figura 8. Esquema de la aplicación del tratamiento fotodinámico. FS: Fotosensibilizador.

Una amplia variedad de lesiones tumorales y pre-tumorales han sido tratadas con éxito con TFD⁶⁴. Este tipo de terapia actúa mediante 3 mecanismos principales: 1) muerte directa de la célula tumoral; 2) daño de la vasculatura tumoral; y 3) respuesta inmunológica post-tratamiento (Figura 9)⁶⁵.

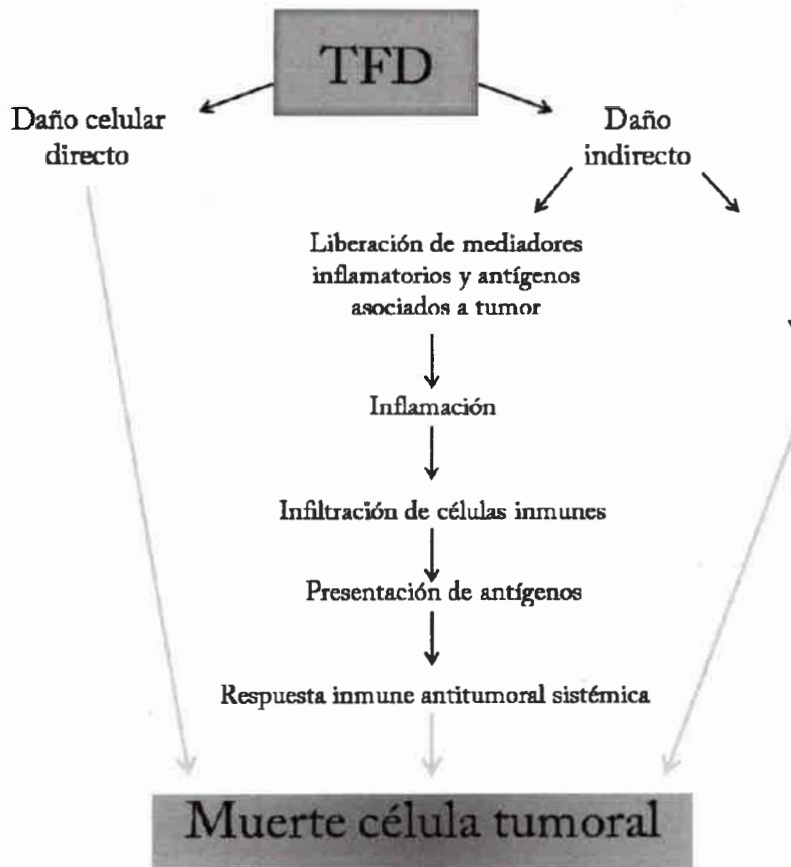


Figura 9. Mecanismos antitumorales provocados por TFD. En el primer caso, la TFD induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden matar directamente las células tumorales por apoptosis y / o necrosis. Por otra parte, las células tumorales muertas asociado a la liberación de citoquinas y antígenos asociados a tumores inducen una respuesta inflamatoria no específica seguida de una inmunidad adaptativa de desarrollo lento. Por último, la TFD induce la destrucción de la vasculatura asociada a tumores, lo que puede conducir a la muerte del tumor a través de la falta de oxígeno y nutrientes.

La mayoría de las terapéuticas utilizadas en la terapia del cáncer convencional no presentan actividad citotóxica preferencial hacia células tumorales. Muchas de estas terapias, tienen efectos secundarios dañinos sobre células normales, y además, en numerosos casos, las células tumorales desarrollan procesos de resistencia que disminuyen e incluso anulan la efectividad de estos tratamientos.

La TFD es una modalidad terapéutica en la que no ocurren la mayor parte de los efectos adversos de los compuestos usados en terapias anti-tumorales, debido a que el FS ocasiona citotoxicidad sólo después de la exposición a luz de una longitud de onda específica y sólo en las células tumorales (sitio de irradiación). Además, la TFD es económica, rápida, simple, ambulatoria y no tóxica, y tiene baja morbilidad⁶³.

En la Tabla 2 se enumeran algunas de las ventajas que tiene el tratamiento fotodinámico para tumores malignos.

Tabla 2: *Ventajas de tratamiento fotodinámico.*

Ventajas de la TFD
<i>Es un tratamiento fácil de aplicar y no resulta agresivo para el paciente.</i>
<i>Provoca destrucción selectiva del tumor.</i>
<i>Se puede aplicar a pacientes no aptos para cirugía.</i>
<i>El paciente puede ser ambulatorio.</i>
<i>Puede combinarse con otras terapias.</i>
<i>El tratamiento puede ser reiterado.</i>
<i>Si no hay acumulación cutánea del fotosensibilizador, no es necesario evitar la exposición solar.</i>
<i>Las aplicaciones repetidas no producen toxicidad acumulativa.</i>

1.7. Mecanismos de acción de la Terapia fotodinámica.

Durante la iluminación, el FS es excitado desde su estado elemental (S^0) al primer estado excitado singlete (S^1). Este puede decaer al estado basal emitiendo fluorescencia o se transforma al estado triplete (S^3) por conversión de spin electrónico (ISC, del inglés “intersystem crossing”). El FS en estado triplete puede inducir cambios químicos en una molécula vecina a través de dos mecanismos que compiten entre sí, denominados reacciones de Tipo I y Tipo II. Ambas reacciones fotoquímicas se producen en paralelo, y que predomine una sobre otra depende de varios parámetros, siendo los más importantes la concentración de oxígeno presente y el tipo de FS utilizado⁶⁴.

En el mecanismo de Tipo I, el FS excitado en estado triplete, bajo condiciones anóxicas reacciona directamente con sustratos orgánicos (A) por intercambio electrónico, produciendo un estado oxidado (A^+) y un FS reducido (S^-). En condiciones hipóxicas, el FS

reducido puede reaccionar con oxígeno para producir aniones superóxidos (O_2^-), los cuales luego pueden formar la especie altamente reactiva del radical hidroxilo (OH^\cdot). El FS excitado S^3 puede también reaccionar con radicales superóxidos, los que luego pueden dar lugar a la formación del radical hidroxilo⁶⁴. (Figura 10)

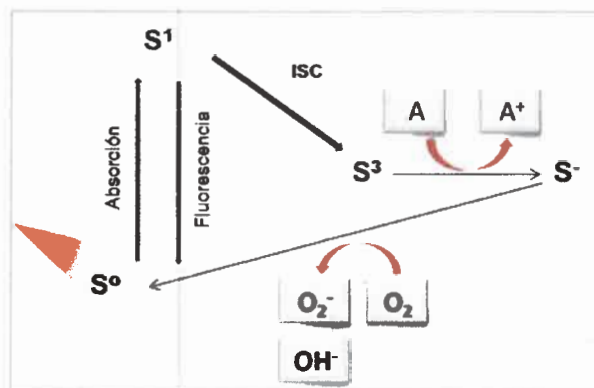


Figura 10. Mecanismo de acción de los fotosensibilizadores de Tipo I. Sustratos orgánicos (A) son oxidados por el fotosensibilizador en estado excitado triplete (S^3) con producción de radicales libres. A : sustratos orgánicos; A^+ : sustratos orgánicos en estado oxidado; S^0 : fotosensibilizador en su estado elemental; S^1 : fotosensibilizador en estado excitado singlete; S^3 : fotosensibilizador en estado excitado triplete; S^- : fotosensibilizador en estado reducido; O_2^- : aniones superóxidos; OH^\cdot : radical hidroxilo.

El mecanismo de Tipo II consiste en la transferencia de energía desde el estado S^3 al oxígeno molecular en estado elemental, generando oxígeno singlete (1O_2) extremadamente reactivo que puede interactuar con un gran número de sustratos biológicos, induciendo daño oxidativo y por último muerte celular (Figura 11).

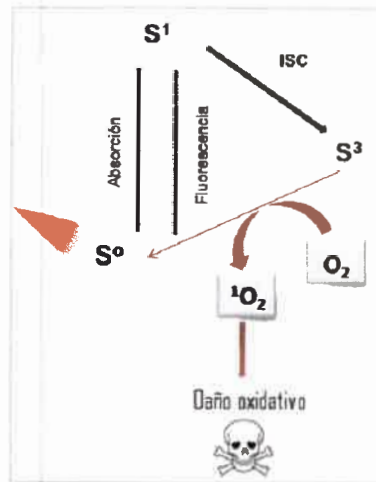


Figura 11. Mecanismo de acción de los fotosensibilizadores de Tipo II. El fotosensibilizador en estado excitado triplete (S^3) reacciona con el O_2 generando especies altamente reactivas del O_2 . S^0 : fotosensibilizador en su estado elemental; S^1 : fotosensibilizador en estado excitado singlete; S^3 : fotosensibilizador en estado excitado triplete; S : fotosensibilizador en estado reducido; 1O_2 : oxígeno singlete.

En síntesis, el mecanismo de Tipo I involucra la generación de radicales libres, mientras que el Tipo II lleva a la producción de oxígeno singlete⁶⁴. El mecanismo Tipo II es el más frecuente entre los fotosensibilizadores estudiados y por lo tanto el oxígeno singlete es el principal responsable de la destrucción tumoral⁶⁶.

1.8. Fotosensibilizadores

Los fotosensibilizadores son compuestos capaces de absorber luz a una longitud de onda específica y transformarla en energía útil. En el caso de la TFD, esta energía involucra la producción de agentes citotóxicos^{66,67}.

Las características ideales con las que debe contar un fotosensibilizador que resulte eficiente para ser aplicado en TFD son las siguientes:

- Ser un compuesto químicamente puro, cuyo proceso de síntesis pueda reproducirse.
- Ser retenido preferentemente en el tumor.
- Ser rápidamente excretado del cuerpo e inducir baja toxicidad sistémica.

- Poseer una toxicidad mínima en oscuridad y sólo ser citotóxico en presencia de luz.
- Tener alta reactividad fotoquímica, con gran producción de estados tripletes de largo tiempo de vida para producir efectivamente oxígeno singlete y otras especies reactivas del oxígeno.
- Tener fuerte absorbancia a longitudes de onda alta (mayores de 600 nm), donde la penetración de la luz en el tejido es máxima, mientras continúa siendo energéticamente capaz de producir oxígeno singlete.
- Carecer de potencial mutagénico.

Si nos remitimos a la historia de los FS empleados en terapia fotodinámica⁶⁸, los primeros que fueron desarrollados entre los años 1970 y 1980 son los que se conocen como FS de “primera generación” y en general son compuestos porfirínicos. La administración sistémica de éstos FS, produce una fotosensibilización cutánea durante varias semanas, lo que constituye uno de los principales inconvenientes del tratamiento. Otro de los problemas resulta de la débil absorción relativa a 630 nm (longitud de onda empleada en el tratamiento). Por esto, se ha iniciado la búsqueda de nuevos y mejores FS para ser empleados en los ensayos clínicos. Los llamados de “segunda generación” son aquellos derivados de porfirinas o de origen sintético y fueron desarrollados a partir de 1980 en adelante. Los nuevos FS de segunda generación incluyen derivados de porfirinas, clorinas, ftalocianinas y naftalocianinas. Éstos se han estudiado con profundidad y se están aplicando actualmente en ensayos clínicos.

La tabla 3 lista los FS que se emplean actualmente en clínica y su empresa fabricante.

Tabla 3: Fotosensibilizadores disponibles en la actualidad y tipos de tumores para los que están aprobados.

Compuesto	Droga	Sustancia	Empresa	Tipo de tumores
Porfirina	Photofrin®	HpD	Axcan Pharma, Inc.	Pulmón, esófago, ducto biliar, vejiga, cerebro, ovario
Porfirina	Levulan®	ALA	DUSA Pharmaceuticals, Inc.	Piel, vejiga, cerebro, esófago
Porfirina	Metvix®	Me-ALA	Photocure ASA	Piel, vejiga
Porfirina	Visudyne®	Vertiporfin	Novartis Pharmaceuticals	Oftalmológicos, páncreas, piel
Texafrina	Antrin®	Lutexafrina	Pharmacylics	Mama
Clorina	Foscan®	Temoporfirina	Biolitec Pharma Ltd.	Cabeza y cuello, pulmón, cerebro, piel, ducto biliar
Clorina	LS11	Talaporfina	Light Science	Hígado, colon y cerebro
Clorina	Photochlor	HPPH	RPCI	Nasofaríngeo, linfomas de células T
Colorante	Photosens®	Ftalocianina	General Physics Institute	-

Dentro de estas nuevas drogas de aplicación en TFD se encuentra el ácido 5-aminolevulínico (ALA) y sus derivados (ésteres hidrocarbonados), entre los que se encuentra el derivado metilado (ALA-Met). Los nuevos compuestos derivados del ALA permiten una mayor optimización de la TFD.

1.8.1. Ácido delta 5-aminolevulínico

El ácido aminolevulínico (ALA) es un precursor del potente fotosensibilizador endógeno protoporfirina IX (PpIX) (Figura 12)⁶⁹. Su actividad fotodinámica se logra mediante la irradiación con luz roja de una longitud de onda de 635nm en presencia de oxígeno, lo cual genera la producción de las especies reactivas con un fuerte efecto citotóxico.



Figura 12. Estructura molecular del ácido delta 5-aminolevulínico y la protoporfirina IX (PpIX).

Las mitocondrias son las organelas clave en el metabolismo de PpIX. El 5-ALA se forma a partir de la glicina y el succinil coenzima A en el interior de la mitocondria. La formación del 5-ALA es el primer paso de la vía biosintética del grupo hemo. Al final de dicha vía se encuentra la protoporfirina IX (PpIX), a la cual se le incorpora el hierro gracias a la acción de la enzima ferroquelatasa⁶. Luego de la administración exógena de ALA o sus derivados metilados, las células tumorales acumulan PpIX a través de esta ruta biosintética (Figura 13).

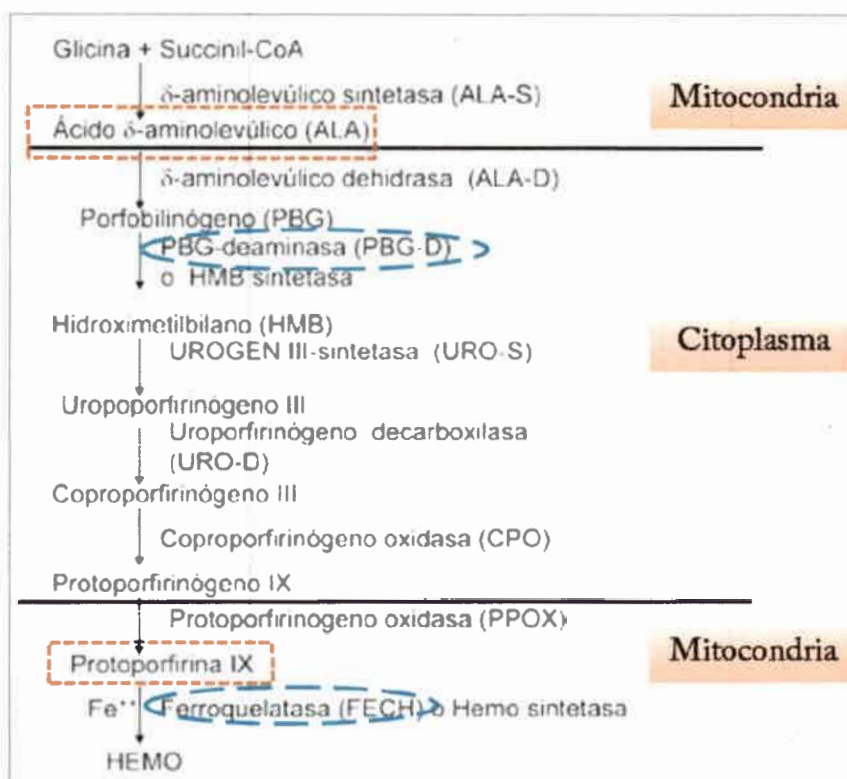


Figura 13. Biosíntesis celular del grupo hemo

La acumulación preferencial en células tumorales de PpIX está asociada a la actividad de enzimas claves en la regulación de la vía. Los tumores se caracterizan en tener una baja actividad de ferroquelatasa, enzima removedora de PpIX, debido a que cataliza la adición de hierro para convertirla en hemo; y un aumento de la actividad de la enzima porfobilinógeno deaminasa (PBGD), ubicada más río arriba de la vía generadora de PpIX⁷⁰.

1.8.2. Metil-ácido delta 5-aminolevulínico

A causa de su baja lipofilicidad, el ALA difunde lentamente a través de las membranas celulares. Con el objetivo de aumentar su tasa de difusión, se han desarrollado derivados del ALA que poseen mayor lipofilicidad, como por ejemplo el derivado metilado de ALA (Me-ALA) (Figura 14)⁷¹.

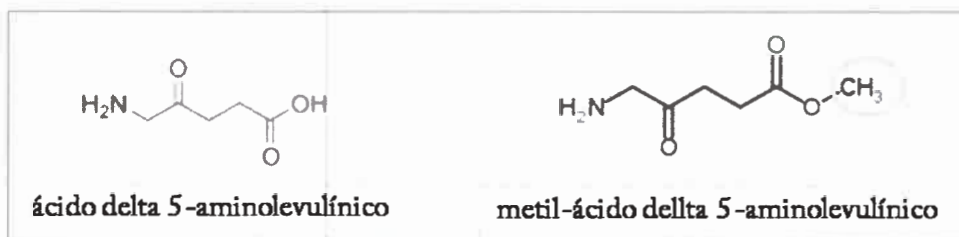


Figura 14. Estructura molecular del ácido delta 5-aminolevulínico y su derivado metilado Me-ALA.

La prodroga derivada del ALA entra más rápidamente a las células y es hidrolizada enzimáticamente a ALA, conduciendo a la formación de PpIX^{71,72}.

El derivado metilado del ALA formulado en crema, Metvix®, tiene como principio activo al metiléster del ácido aminolevulínico y ha sido registrado en más de 30 países para el tratamiento fotodinámico de afecciones dermatológicas, mostrando más selectividad y efectividad fotosensibilizante que ALA⁷³.

1.9. TFD y microambiente tumoral

El estudio de las interacciones celulares en el MAT se ha convertido en una de las principales líneas de investigación en la lucha contra el cáncer. El objetivo final en este campo es identificar nuevos tratamientos que puedan contrarrestar las vías de escape de las células tumorales.

Esta dependencia o "adicción" de las células cancerosas a los componentes del estroma abre nuevas vías para el desarrollo de agentes terapéuticos potenciales. Se ha visto que en algunas situaciones de aplicación de TFD, a través de la inducción de hipoxia relativa, se promueve el fenómeno de angiogénesis. En el año 2000, Ferrario y col⁷⁴ demostraron por primera vez la relación entre pro-angiogénesis y TFD, promoviendo un sinergismo terapéutico al combinar esta terapia con inhibidores angiogénicos. Desde entonces, se ha reportado un aumento en la expresión de factores pro-angiogénicos como VEGF, VEGF-R, MMPs, citoquinas, entre otros, en respuesta al estímulo fotodinámico⁷⁵. En este contexto ha sido reportado que la respuesta a la TFD sobre macrófagos asociados a

tumor puede ocasionar tanto la completa regresión del tumor⁷⁶ o su recurrencia post-TFD por estimulación del proceso angiogénico⁷⁷. Por otro lado, la fuerte inducción de TNF- α e IL-6 por el tratamiento fotodinámico ha sido asociada a la respuesta inmunológica antitumoral⁷⁸.

Por otro lado, el rol fundamental de los TAMs en asegurar la eliminación eficaz de células tumorales muertas se convierte en un aspecto de importancia crítica en tumores que han sido tratados por terapias tales como la TFD. Inmediatamente después del tratamiento la aparición de un gran número de células cancerosas muertas facilita el procesamiento y presentación de antígenos por parte de macrófagos a los linfocitos T desencadenando una respuesta inmune adaptativo antitumoral.

Todo esto hace suponer que el microambiente tumoral no sólo afecta las características fisiológicas del tumor, tal como patrones de crecimiento, función vascular, angiogénesis, metástasis^{58,79}, sino también puede afectar de forma trascendental la respuesta a las terapias antitumorales.

1.10. Desarrollo de modelos de estudio que permiten recrear el microambiente tumoral.

Al igual que la distribución de luz y la dosis de FS, la dinámica del “microambiente-tumor” es un factor limitante de la eficacia de la TFD⁷⁵. Hay que tener presente que la evaluación de las terapias contra el cáncer en modelos tumorales no fisiológicos pueden obstaculizar la traslación de resultados experimentales a aplicaciones clínicas debido a que el crecimiento de tumores en disímiles ambientes muestran reacciones diferentes frente al mismo tratamiento⁸⁰.

Ha sido ampliamente descrito el poder predictivo de los modelos de cultivos que imitan las características del microambiente a estudiar⁸¹.

En condiciones *in vivo*, los tejidos crecen rodeados por matrices tridimensionales (3D). Sin embargo, los estudios en cultivos celulares se realizan a menudo en condiciones en que las células son crecidas en forma bidimensional adheridas a sustratos sintéticos tal como plástico o vidrio que las fuerzan a adaptarse a superficies planas y rígidas. Es evidente que estos sistemas de cultivos proporcionan un medio conveniente y rápido de análisis bioquímico, pero ellos carecen de las propiedades de microambiente encontradas en

el tejido de un organismo, limitando el uso de estos estudios para señales estructurales y funcionales específicas de un tejido o proceso en particular. Se ha demostrado, que la simulación de las condiciones 3D asegura la reproducción de interacciones célula-célula y célula-matriz existentes en los tejidos reales⁸². Los modelos de cultivos en esferoides permiten el estudio de procesos biológicos en un ambiente que simula un ambiente *in vivo* proveyendo además un contexto fisiológico.

Actualmente estos modelos de trabajo están siendo utilizados para el estudio de las señales que regulan los procesos normales y en estados de enfermedad como el cáncer. La relevancia en el diseño del sistema, es la de generar la matriz extracelular y el ambiente cuando se pretende estudiar el comportamiento celular *in vitro*.

En la Tabla 4 se mencionan algunas de las características más distintivas de ambos tipos de cultivo, destacando sus principales ventajas y desventajas.

Tabla 4: Comparación entre cultivos en monocapa versus cultivo en esferoides⁸³.

	Ventajas	Desventajas
Monocapa	<ul style="list-style-type: none"> -Simple de realizar -Óptimo crecimiento y re-oxigenación. -Fácil análisis: MTT, ensayo clonogénico 	<ul style="list-style-type: none"> -Ausencia de gradientes de O₂, pH y nutrientes. -Ausencia de interacciones célula-célula/célula-matriz.
Esferoides	<ul style="list-style-type: none"> -Gradiente de O₂, pH y nutrientes -Influencia de interacciones célula-célula/célula-matriz -Heterogeneidad celular (zonas definidas) -Simulación microtumor avascular 	<ul style="list-style-type: none"> -Menos fácil de manipular -No todas las líneas celulares generan esferoides -Dificultades para el análisis

1.10.1. Modelo de cultivo en esferoides

La formación de esferoides se basa en un único principio, que es permitir la agregación de células evitando al mismo tiempo su adhesividad al soporte de cultivo.

Al igual que durante el desarrollo embrionario y la morfogénesis de tejidos, los complejos procesos de adhesión y diferenciación celular contribuyen fuertemente al establecimiento de estas estructuras celulares tridimensionales. En este sentido, el proceso

de formación de esferoides puede definirse en tres etapas, caracterizadas por el cambio en el perfil de expresión de moléculas de adhesión⁸⁴ (Figura 15).

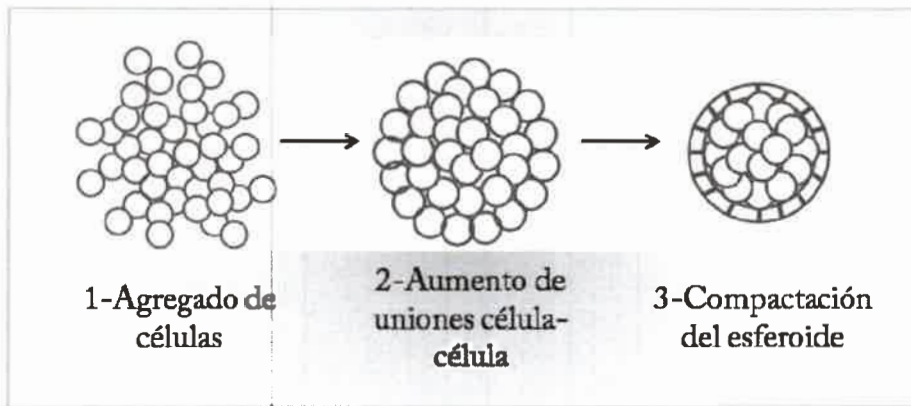


Figura 15. Representación esquemática del proceso de formación de esferoides. (1) Agregados de células sueltas a través; (2) un periodo de retardo para aumentar la expresión de moléculas de adhesión célula-célula; (3) formación de esferoides compactos.

Las técnicas utilizadas se basan en las observaciones de Holtfreter quien, en 1944, estudió la morfología celular de los embriones de anfibios con agregados de células que crecen sobre una capa de agar⁸⁵.

Existen varias técnicas para desarrollar este tipo de cultivo tridimensional. La formación de agregados tridimensionales se puede conseguir tanto mecánicamente, por el movimiento continuo de las células (cultivo spinner), desafiando la gravedad (técnica de la gota colgante, HD, del inglés “hanging drop”), o químicamente, mediante el uso de sustratos no adhesivos para las células en cultivo (técnica de líquido sobrelapante, LO, del inglés “liquid overalay”)⁸⁶ (Figura 16).

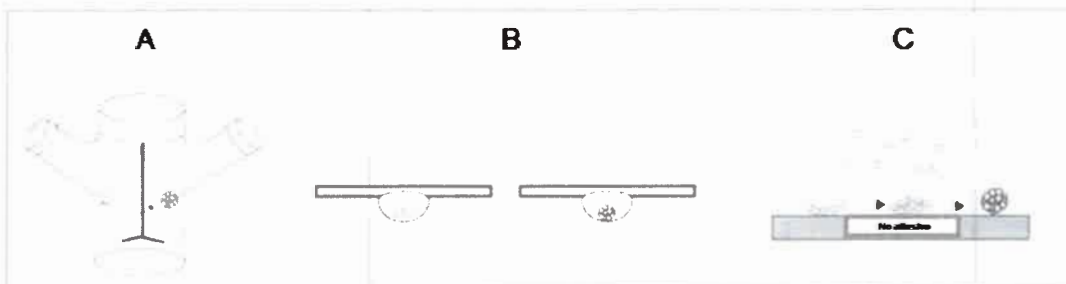


Figura 16. Métodos utilizados para la generación de esferoides tumorales. (A) cultivo spinner; (B) Hanging drop y (C) liquid overlay⁸⁷.

Los cultivos spinner, ampliamente utilizados, consisten en mantener un movimiento permanente de células evitando que se adhieran a la superficie de cultivo. En consecuencia, éstas se adhieren unas a otras formando esferoides. Si bien este método tiene la ventaja de que los esferoides pueden ser producidos a gran escala, las fuerzas mecánicas ejercidas sobre las células pueden causar daños. Por otro lado, este tipo de técnica requiere de un equipo especializado y los esferoides generados tienden a ser de diferente tamaño y forma, por lo que la estandarización resulta problemática⁸⁶.

La técnica de la gota colgante fue desarrollada inicialmente para el cultivo de cuerpos embrioides de células madre. En este tipo de técnica, gotas de la suspensión celular se depositan en la parte inferior de la tapa de una placa de cultivo de tejidos. Cada gota es de un volumen de 15-30 μL conteniendo un rango aproximado de 300-3000 células. Cuando se invierte la tapa, las gotas se mantienen en su lugar gracias a la tensión superficial. La micro-gravedad en el medioambiente de cada gota concentra las células, que entonces forman esferoides individuales en la interfaz líquido-aire libre⁸⁸. Esta técnica es especialmente útil para generar esferoides de tamaños definidos que puedan ser empleados en el estudio de eventos celulares o moleculares durante la invasión tumoral⁸⁹ y la interacción de dos tipos diferentes de células^{90,91}.

La técnica de líquido sobrelapante (LO), consiste en generar artificialmente una superficie no adherente para las células. En general se utilizan placas de 96 pocillos, los cuales son recubiertos previamente con una película delgada de algún compuesto no adherente para las células, como la agarosa⁹², o polímeros hidrofóbicos como el poli(hidroxi-etil-metacrilato)(poli-HEMA)⁹³.

Los parámetros que determinan la eficiencia de formación de esferoides y la uniformidad de tamaño y forma incluyen el tipo celular, la densidad de siembra, composición del medio de cultivo, y si necesitan agitación o crecimiento estático⁹⁴.

Debido a que incluso células del mismo origen de tejido pueden formar esferoides mediante técnicas diferentes, debe ser probado empíricamente el método más efectivo para cada línea celular.

Referencias

1. Chang GJ, Hu C-Y, Eng C, Skibber JM, Rodriguez-Bigas M a. Practical application of a calculator for conditional survival in colon cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):5938–5943.
2. Ministerio de Salud de la Nación. Boletín epidemiológico periódico N°40. 2008:ISSN 1851–295X.ISSN. 1851–4014.
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013;63(1):11–30.
4. Parkin D, Whelan S, Ferlay J, Teppo L, Thomas D. Cancer incidence in five continents. *IARC Sci Publ*. 2002;8(155):515–704.
5. Kwak E, Chung D. Hereditary colorectal cancer syndromes: an overview. *Clin Color. Cancer*. 2007;6(5):340–344.
6. Dukes C. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol*. 1932;35:323–332.
7. Fisher E, Sass R, Palekar A, Fisher B, Wolmark N. Dukes' classification revisited. Findings from the national surgical adjuvant breast and bowel projects (Protocol R-01). *Cancer*. 1989;64(11):2354–2360.
8. UICC. *TNM classification of malignant tumours*. 6th ed. (Sobin L, Wittekind C, eds.). New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-Liss; 2002.
9. Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*. 2014;1(6):400–406.
10. Abajo A, Bitarte N, Zarate R, et al. Identification of colorectal cancer metastasis markers by an angiogenesis-related cytokine-antibody array. *World J. Gastroenterol*. 2012;18(7):637–45.
11. Peddareddigari VG, Wang D, Dubois RN. The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer*. 2010;3:149–166.
12. Calvert P, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2002;137:603–612.
13. Chung TP, Fleshman JW. The Genetics of Sporadic Colon Cancer. *Semin. Colon Rectal Surg*. 2004;15:128–135.
14. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309–322.
15. Rumie Vittar NB, Lamberti MJ, Pansa MF, et al. Ecological photodynamic therapy: new trend to disrupt the intricate networks within tumor ecosystem. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013;1835(1):86–99.



16. Peddareddigari VG, Wang D, Dubois RN. The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer Microenviron.* 2010;3(1):149–66.
17. Allen M, Jones JL. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol.* 2011;223(2):162–176.
18. Wang D, Dubois RN, Richmond A. The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(6):688–696.
19. Erreni M, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) and inflammation in colorectal cancer. *Cancer Microenviron.* 2011;4:141–154.
20. Liao D, Johnson R. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26:281–290.
21. Weis S, Cheresh D. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med.* 2011;17(11):1359–1370.
22. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005;438:932–936.
23. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):401–410.
24. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86(3):353–364.
25. Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* 2006;12(17):5018–5022.
26. Ahmad S, Liu W, Jung Y, et al. The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cell.* 2001;61(4):1255–1259.
27. Cross M, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(4):201–207.
28. Pepper M. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8(1):21–24.
29. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1283–1316.
30. Badet J. Angiogenin, a potent mediator of angiogenesis. Biological, biochemical and structural properties. *Pathol Biol (Paris).* 1999;47(4):345–351.
31. Liekens S, Clercq E De, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 2001;61(3):253–270.

32. Kerr J, Slee A, Mousa S. The alpha v integrin antagonists as novel anticancer agents: an update. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002;11(12):1765–1774.
33. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52–67.
34. Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:83–90.
35. Ferrara N, Kerbel R. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005;438:967–974.
36. Belur LR, Podetz-Pedersen KM, Sorenson BS, et al. Inhibition of angiogenesis and suppression of colorectal cancer metastatic to the liver using the Sleeping Beauty Transposon System. *Mol. Cancer*. 2011;10(1):14.
37. Sporn M. The war on cancer. *Lancet*. 1996;347:1377–1381.
38. Chambers A, Groom A, MacDonald I. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(8):563–572.
39. Gupta G, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 2006;127(4):679–695.
40. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–674.
41. Gabrilovich D, Nagaraj S. Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):162–174.
42. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539–45.
43. Forssell J, Öberg Å, Henriksson ML, et al. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin. Cancer Res*. 2007;13(24):1472–1479.
44. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):71–8.
45. Lamagna C, Aurrand-Lions M, Imhof B a. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol*. 2006;80(4):705–13.
46. Mills CD, Ley K. M1 and M2 Macrophages: The Chicken and the Egg of Immunity. *J. Innate Immun*, 2014:716–726.
47. Murray P, Wynn T. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):723–737.
48. Amber I, Hibbs JJ, Parker C, et al, Activated macrophage conditioned medium: identification of the soluble factors inducing cytotoxicity and the L-arginine dependent effector mechanism. *J Leukoc Biol*. 1991;49(6):610–620.

49. Morris SJ. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:87–105.
50. Ong S-M, Tan Y-C, Beretta O, et al. Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. *Eur. J. Immunol.* 2012;42(1):89–100.
51. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2006;6(7):521–34.
52. Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* 1994;78(6):915–8.
53. Cianchi F, Cortesini C, Fantappiè O, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 2003;162(3):793–801.
54. Cianchi F, Cuzzocrea S, Vinci MC, et al. Heterogeneous expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase within colorectal tumors: correlation with tumor angiogenesis. *Dig. Liver Dis.* 2010;42(1):20–7.
55. Xu H, Lai W, Zhang Y, et al. Tumor-associated macrophage-derived IL-6 and IL-8 enhance invasive activity of LoVo cells induced by PRL-3 in a KCNN4 channel-dependent manner. *BMC Cancer.* 2014;14(1):330.
56. Waters J, Pober J, Bradley J. Tumour necrosis factor and cancer. *J Pathol.* 2013;230(3):241–248.
57. Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 2004;5(10):971–974.
58. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–674.
59. Galli SJ, Borregaard N, Wynn T a. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* 2011;12(11):1035–44.
60. Barbera-Guillem E, Nyhus JK, Wolford CC, Friece CR, Sampsel JW. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res.* 2002;62:7042–7049.
61. Mundade R, Imperiale T, Prabhu L, Loehrer P, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience.* 2014;1(6):400–406.
62. Panzarini E, Inguscio V, Dini L. Immunogenic Cell Death: Can It Be Exploited in PhotoDynamic Therapy for Cancer? *Biomed Res. Int.* 2013;2013:1–18.



63. Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33(8):869–880.
64. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci.* 2009;24(2):259–268.
65. Abels C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(8):765–771.
66. Castano A, Demidova T, Hamblin M. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004;1:279–293.
67. Berlanda J, Kiesslich T, Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Comparative *in vitro* study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2010;100(3):173–80.
68. Allison R. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004;1(1):27–42.
69. Kennedy J, Pottier R. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 1992;14(4):275–292.
70. Krieg RC, Messmann H, Rauch J, Seeger S, Knuechel R. Metabolic characterization of tumor cell-specific protoporphyrin IX accumulation after exposure to 5-aminolevulinic acid in human colonic cells. *Photochem. Photobiol.* 2002;76(5):518–25.
71. Donnelly R, McCarron P, Woolfson A. Derivatives of 5-aminolevulinic Acid for photodynamic therapy. *Perspect Med. Chem.* 2008;1:49–63.
72. Brunner H, Hausmann F, Krieg RC, et al. The effects of 5-aminolevulinic acid esters on protoporphyrin IX production in human adenocarcinoma cell lines. *Photochem. Photobiol.* 2001;74(5):721–725.
73. Krammer B, Verwanger T. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid or its methyl ester: Which one is superior? *Med. Laser Appl.* 2009;24(4):221–226.
74. Ferrar'io A, Tiehl KF Von, Rucker N, et al. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res.* 2000;60(15):4066 – 4069.
75. Bhuvaneswari R, Gan YY, Soo KC, Olivo M. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(14):2275–2283.
76. Nowis D, Stoklosa T, Legat M, et al. The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2(4):283–298.

77. Deininger M, Weinschenk T, Morgalla M, Meyermann R, Schluesener H. Release of regulators of angiogenesis following Hypocrellin-A and -B photodynamic therapy of human brain tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298(4):520–530.
78. Kick G, Messer G, Plewig G, Kind P, Goetz AE. Strong and prolonged induction of c-jun and c-fos proto-oncogenes by photodynamic therapy. 1996:30–36.
79. Witz IP. The tumor microenvironment: the making of a paradigm. *Cancer Microenviron.* 2009;2(1):9–17.
80. Bates RC, Edwards NS, Yates JD. Spheroids and cell survival. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2000;36:61–74.
81. Mazzoleni G, Lorenzo D Di, Steimberg N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmacotoxicology and food research? *Genes Nutr.* 2009;4(1):13–22.
82. Kosharsky B, Solban N, Chang SK, et al. A mechanism-based combination therapy reduces local tumor growth and metastasis in an orthotopic model of prostate cancer. *Cancer Res.* 2006;66(22):10953–10958.
83. Dubessy C, Merlin J, Marchal C, Poincare H, Vautrin CA. Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2000;36:179–192.
84. Lin RZ, Chou LF, Chien CCM, Chang HY. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and β 1-integrin. *Cell Tissue Res.* 2006;324:411–422.
85. Holtfreter J. A study on the mechanics of gastrulation. *J Exp Zool.* 1994;95:171–212.
86. Nagelkerke A, Bussink J, Sweep FCGJ, Span PN. Generation of multicellular tumor spheroids of breast cancer cells: How to go three-dimensional. *Anal. Biochem.* 2013;437(1):17–19.
87. Achilli T, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multicellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(10):1347–1360.
88. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol. J.* 2008;3:1172–1184.
89. Ridder L De, Cornelissen M, Ridder D De. Autologous spheroid culture: A screening tool for human brain tumour invasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2000;36:107–122.
90. Kelm J, Ehler E, Nielsen L, et al. Design of artificial myocardial microtissues. *Tissue Eng.* 2004;10(1-2):201–214.
91. Timmins N, Dietmair S, Nielsen L. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis.* 2004;7(2):97–103.



92. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. A Simplified Method for Production and Growth of Multicellular Tumor Spheroids. *Cancer Res.* 1977;37:3639–3643.
93. Landry J, Bernier D, Ouellet C, Goyette R, Marceau N. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: Histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J. Cell Biol.* 1985;101:914–923.
94. Hamilton G, Westmorel C, George A. Effects of medium composition on the morphology and function of rat hepatocytes cultured as spheroids and monolayers. *Vitr. Cell Dev Biol Anim.* 2001;37(10):656–667.



Hipótesis y Objetivos

2.1. HIPOTESIS: *La respuesta al tratamiento fotodinámico con ALA-Met en modelos de cáncer de colon, difiere en forma sustancial dependiendo de la heterogeneidad de la población de macrófagos presentes.*

2.2. OBJETIVO GENERAL: *Estudiar el efecto de la Terapia Fotodinámica sobre los factores moleculares que media la relación tumor-macrófago-endotelio, en modelos de cultivo 3D que representen lo acontecido en un contexto in vivo.*

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. *Desarrollar modelos de cultivo tridimensional apropiados para el estudio del tratamiento fotodinámico de células de cáncer de colon.*
2. *Evaluar el efecto de la terapia fotodinámica con ALA-Met (ALA-Met-TFD) sobre la viabilidad celular en líneas de cáncer de colon con diferente grado de malignidad en modelos 2D- 3D.*
3. *Examinar la respuesta de las células endoteliales al estímulo tumoral parácrino proveniente de células tratadas con ALA-Met-TFD en modelos 2D y 3D, mediante el estudio de parámetros relevantes en el proceso de angiogénesis tumoral.*
4. *Estudiar el efecto de ALA-Met-TFD sobre modelos 3D constituidos por células tumorales y macrófagos, en relación a viabilidad de la célula tumoral.*
5. *Caracterizar el perfil fenotípico de los macrófagos presentes en el microambiente de cáncer de colon en respuesta al tratamiento con ALA-Met-TFD y su implicancia en el proceso angiogénico y respuesta inflamatoria como eventos determinantes de la eficacia de la terapia.*

Materiales y Métodos

3.1. MATERIALES

3.1.1. Medios de cultivo

- **Medio de crecimiento**

Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con glucosa 1 X (Gibco), suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (Gibco), 1 % v/v de glutamina (GlutaMAX™ 100X – Gibco), 1 % v/v de antibiótico-antimicótico (PenicilinaG 10 µg/mL - esteptomicina 25 µg/mL - anfotericina B. Gibco) y 1 % v/v de piruvato de sodio (Hyclone®).

- **Medio de crecimiento no proliferativo**

Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con glucosa 1 X (Gibco), suplementado con 5 % v/v de suero fetal bovino (Gibco), 1 % v/v de glutamina (GlutaMAX™ 100X – Gibco), 1 % v/v de antibiótico-antimicótico (PenicilinaG 10 µg/mL - esteptomicina 25 µg/ml - anfotericina B. Gibco) y 1 % v/v de piruvato de sodio (Hyclone®).

- **Medio de congelamiento**

Suero fetal bovino (Gibco) y 10 % v/v de dimetilsulfóxido (DMSO).

3.1.2. Tripsina- EDTA 0,25%. Gibco.

3.1.3. Solución balanceada de fosfatos

NaCl -----	8,00 g
KCl-----	0,20 g
NaPO ₄ H 2H ₂ O-----	1,44 g
Agua Bidestilada c.s.p.-----	1000 mL

Se envasó la solución fraccionada en frascos de 200 mL aproximadamente, se esterilizó a $\frac{3}{4}$ atmósfera durante 30 min y se conservó a 4 °C hasta su uso.

3.1.4. Compuesto fotosensibilizador

El compuesto utilizado en este estudio fue el derivado metilado del ácido 5-aminolevulínico: ALA-Met (δ -aminoleavulinic acid methyl ester hydrochloride. SIGMA). Este se empleó como un precursor del fotosensibilizador PpIX.

3.1.5. Aparato de irradiación

Para realizar los experimentos de TFD, las células fueron irradiadas con un aparato dotado de un sistema de iluminación de multiLEDs (luz coherente), con una longitud de onda de 635 nm. La intensidad de irradiación de la lámpara fue de $0,89 \text{ mW/cm}^2$.



Figura 1. Equipo de irradiación. Sistema de iluminación de multiLEDs (luz coherente), con una longitud de onda de 636 nm e intensidad de irradiación de $0,89 \text{ mW/cm}^2$.

3.1.6. Microscopio de fluorescencia

Microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse Ti, acompañado con cámara digital Nikon DS-Qi1Mc. Software de análisis de imagen NIS Elements.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Cultivos celulares

Se utilizaron líneas celulares establecidas derivadas de adenocarcinoma colorrectal humano con diferente grado de diferenciación celular. En concreto se emplearon la línea CaCo-2 (adenocarcinoma colorrectal estadio temprano, bien diferenciadas, menos tumorigénicas e invasivas, ATCC: HTB-37) y la línea celular SW480 (estadio tumoral I o estadio B de Dukes, altamente tumorigénicas e invasivas). Además se utilizaron la línea celular SW480-G, transfectada de forma estable con GFP, la línea de macrófagos murinos RAW 264.7 y la línea celular microendotelial humana (HMEC), donada por la Dra A. Juarranz (España).

3.2.2. Generación de línea celular estable SW480-G

El ADN del plásmido pZsGreen1-N1 (Clontech) fue transfectado en células SW480 usando el reactivo de transfección Fugene® HD (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células SW480 que expresaron GFP junto con el gen de resistencia a neomicina fueron seleccionadas en medio de crecimiento suplementado con 2 mg/ml de geneticina activa (G418) (Life Technologies). Se generó una línea celular clonal estable a partir del aislamiento de colonias individuales después de 2-3 semanas de crecimiento bajo selección utilizando el método del anillo de clonación. La expresión de GFP se evaluó bajo microscopio de fluorescencia¹.

3.2.3. Generación de cultivos tumorales tridimensionales (esferoides)

Para la generación de esferoides se utilizaron 2 métodos: “gota colgante” (HD, del inglés “*hanging drop*”)² y “líquido sobrelapante” (LO, del inglés “*liquid overlay*”)³. Para la técnica HD, se utilizaron como soporte placas de Petri de 100 mm de diámetro. Las células fueron resuspendidas en medio de crecimiento no proliferativo según la concentración deseada y sembradas en forma de gotas de 30 μ L en la tapa de la placa. La base de la placa se llenó con 20 mL de PBS para evitar la evaporación de líquido de las gotas. Para la técnica LO, se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo redondo cubiertos con una fina capa de agarosa al 1% (UltraClean® Agarose). Las células se sembraron en cada pocillo en

100 μ L de medio de crecimiento no proliferativo según la concentración deseada. En ambos casos, los cultivos se incubaron en estufa a 37°C, 5% CO₂ durante diferentes días para permitir la formación de los esferoides. Los cultivos fueron examinados bajo microscopio invertido (LO) y microscopio directo (HD) y se tomaron fotografías, las cuales fueron analizadas con el programa ImageJ 1.42q. (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), para determinar el diámetro de los esferoides.

3.2.4. Caracterización de la morfología esferoidal

La morfología de los esferoides se evaluó por microscopía de fluorescencia utilizando el microscopio *Nikon Eclipse Tiand* con un objetivo de 5x. Para la tinción nuclear (azul), los esferoides se incubaron con colorante Hoechst (2 μ g/mL, Sigma) en medio de crecimiento durante 30 min a temperatura ambiente. Las células tumorales SW480-G expresan constitutivamente GFP. Las fotografías fueron tomadas utilizando el *Software Nis Element (Nikon)*. El tamaño de los esferoides se analizó utilizando las herramientas de análisis de calibración del software ImageJ1.42q. (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

3.2.5. Protocolo de fotosensibilización (TFD).

Las células fueron incubadas con ALA-Met en medio de crecimiento sin suero fetal bovino (SFB) a 37°C. Posteriormente, los cultivos fueron expuestos a diferentes dosis de irradiación (0,89 mW/cm², λ =636 nm) a temperatura ambiente y finalizado el tratamiento el medio fue remplazado por medio fresco⁴. Las células tratadas fueron incubadas en estufa gaseada por el lapso de tiempo definido para cada ensayo. Para el tratamiento de esferoides tumorales se utilizaron 10 esferoides de 20000 células por cada condición de tratamiento en placas 35mm.

3.2.6. Análisis de la viabilidad celular por MTT

La viabilidad celular de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos fotodinámicos con ALA-Met se realizó empleando el método colorimétrico de reducción del MTT (Bromuro de 3-4,5-dimetiltiazol-2-ilo-2,5-difeniltetrazol)⁵.

Cultivo en monocapa: Una vez finalizado el tratamiento fotodinámico fue reemplazado el medio de cultivo por medio completo. Transcurridas 24 horas, las células fueron incubados con MTT (0,5 mg/mL MTT) por 3 horas y los cristales de formazán fueron disueltos en DMSO.

Cultivo en esferoides: Una vez finalizado el tratamiento fotodinámico fue reemplazado el medio de cultivo por dilución con medio completo (para evitar la manipulación de los esferoides). A las 24 h fueron incubados durante 4 h con MTT (0,5 mg/mL MTT) y finalizado este tiempo fueron centrifugados 5 min a 10000 rpm y resuspendidos en 1 mL de DMSO. Las medidas de absorbancia fueron tomadas a una longitud de onda de 540 nm utilizando lector de placas de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan FC).

3.2.7. Cinética de formación de PpIX en esferoides tumorales

Esferoides de SW480 de 20000 células fueron incubados con ALA-Met durante 4, 12 y 24 h. Posteriormente fueron fijados con paraformaldehído 3%, durante toda la noche a 37°C y teñidos con Hoescht (Stock: 1 mg/mL en agua destilada, concentración final: 0,01 mg/mL). La incorporación de PpIX se evaluó mediante microscopia confocal (λ exc: 514 nm; λ em: 585 nm).

3.2.8. Ensayo de co-cultivos con macrófagos tumorales

Para el ensayo de co-cultivo se generaron esferoides de 20000 células SW480-G mediante la técnica LO. Los mismos fueron incubados con monocapas de macrófagos, manteniendo una relación de 75% de células SW480 y un 25% de macrófagos⁶ y sometidos o no a tratamiento fotodinámico. Una vez tratados, fue reemplazado el medio conteniendo la droga por medio de crecimiento completo y se incubaron a 37°C durante 24 h y 10 días. Se tomaron imágenes de fluorescencia y el diámetro del esferoide fue cuantificado utilizando el software ImageJ.

3.2.9. Generación de medios condicionados

Esferoides, tratados o sin tratar, fueron lavados tres veces con PBS para eliminar toda traza de suero. Se incubaron durante 24h con medio de cultivo libre de suero fetal

bovino sin rojo fenol según la relación 6×10^5 cell/mL MC. Los MC obtenidos fueron cosechados y clarificados por centrifugación durante 10 min a 1000 rpm, se almacenaron posteriormente en freezer a -80°C hasta el momento de su uso⁷.

3.2.10. Ensayo de migración de macrófagos

La migración de macrófagos en respuesta al estímulo tumoral de co-cultivos tratados con TFD fue analizado mediante el uso de cámaras *Transwell*.

3.2.11. Determinación de tipo de muerte celular

El porcentaje de células apoptóticas fue evaluado 24 h después del tratamiento fotodinámico por citometría de flujo utilizando el kit anexina-V-FITC (BD, Pharmingen). Los esferoides fueron disgregados por digestión con tripsina, y lavados con PBS. Se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 min para bajar el sedimento. Posteriormente las células disgregadas fueron incubadas con $5 \mu\text{g/mL}$ anexina V, $5 \mu\text{g/mL}$ de yoduro de propidio (PI) (PI, del inglés "*propidium iodide*") en buffer de unión (provisto por el kit) durante 15 minutos en oscuridad y en hielo. La fluorescencia se midió usando un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences). Las células en apoptosis temprana son Anexina V-positivas y PI-negativas (Anexina V-FITC+/PI-), mientras que en apoptosis tardía (en etapa terminal) son Anexina V/PI-doble positivas (Anexina V-FITC+/PI+). Las células necróticas son Anexina V-negativas y PI-positivas (Anexina V-FITC-/PI+)⁸. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo 10.0.7 (Treestar Inc, Ashland, Estados Unidos).

3.2.12. Crecimiento y migración de esferoides tumorales

Para evaluar el crecimiento y la migración tumoral de esferoides de células SW480-G co-cultivadas con macrófagos, se tomaron imágenes de fluorescencia a las 24 h y a los 10 días después de aplicar la TFD. Fue cuantificado el diámetro de áreas GFP + y la superficie cubierta por células GFP + que migran usando el software ImageJ⁹. Con la finalidad de calcular el crecimiento del tumor, el diámetro de cada esferoide a las 24 h post-tratamiento fue restado al diámetro medido 10 días post-tratamiento. La migración del tumor se calculó como el área de la migración de las células de los esferoides 10 días post-TFD¹⁰.

3.2.13. Determinación del efecto biológico sobre células HMEC

3.2.13.1. Capacidad de migración celular

Con el objetivo de estudiar el efecto sobre la capacidad de migración de las células HMEC en respuesta al estímulo tumoral proveniente de células tratadas con TFD se realizó el ensayo de migración celular a partir de esferoides de células HMEC. Para realizar este ensayo se generaron esferoides de 20.000 células HMEC utilizando el método de generación LO. Se colocaron 10 esferoides en placas 35mm y una vez adheridos a la superficie el medio fue reemplazado por medios condicionados obtenidos a partir de esferoides de células tumorales sometidos o no a tratamiento fotodinámico. Se tomaron fotografías a las 24 h de comenzado el ensayo. La cantidad de células migrantes fue cuantificada mediante el software ImageJ.

3.2.13.2. Ensayo de proliferación celular

Se sembraron 100 μ L por pocillo de células HMEC en placas de 96 pocillos a una concentración de 5×10^3 células/mL. Una vez adheridas se les agregó medio condicionado y se las incubó durante 24 h en estufa gaseada. Como controles se utilizó medio de cultivo sin suero fetal bovino (SFB). Una vez finalizado el tiempo de incubación se realizó un ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.6. para cultivos en monocapa.

3.2.13.3. Ensayo de formación de tubo

En placas de 96 pocillos cubiertas con 50 μ L de Matrigel® (matriz extracelular comercial), se sembraron células HMEC a una concentración de $2,5 \times 10^5$ células/mL. Una vez adheridas se les agregaron los medios condicionados provenientes de las células tumorales. Fueron incubadas durante 16 h y fotografiadas con cámara digital Nikon CoolPix 8400 acoplada al microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS100.

3.2.14. Cuantificación de VEGF

El ARN total fue extraído con Trizol, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies). Para la retrotranscripción se utilizó la enzima M-MLV (Invitrogen), partiendo de 1 μ g de RNA, según protocolo del fabricante. Las expresiones

génicas fueron determinadas mediante qPCR con el termociclador Light Cycler (Roche Diagnostics, Meylan, France) usando SYBR Premix Ex Taq (TakaraBio). Los niveles relativos de ARNm se calcularon utilizando el gen de referencia para la subunidad 18S ribosomal y según la siguiente fórmula: $2^{-\Delta\Delta CT} = [(CT \text{ gen en la muestra} - CT \text{ 18S en la muestra}) - (CT \text{ gen en el control} - CT \text{ } \beta\text{-18S en el control})]^{-1}$. Los primers utilizados fueron los siguientes: Para VEGFa (humano): Forward: 5' GGCGAGGCAGCTTGAGTTAA 3'; Reverse: 5' CACCGCCTCGGCTTGTC 3'. Para 18S (humano): Forward: 5' aac ccgttgaacccattcgt gat 3'; Reverse: 5' agt caagttcgaccgttctt cag3'.

3.2.15. Determinación de óxido nítrico en medios condicionados

Los niveles de óxido nítrico en los medios condicionados fue determinado mediante la reacción de Griess¹². A 50uL de medio condicionado se les adicionaron 100 uL de reactivo de Griess (sulfamida 1,5 g% en HCl 1N y naftilamida 5,5 mM) y la absorbancia fue leída a 540nm utilizando lector de placas de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan FC).

3.2.16. Determinación de actividad arginasa

Lisados celulares se mezclaron con 10 mM MnCl₂, y la enzima se activó por calentamiento durante 10 minutos a 56 °C. La hidrólisis de L-arginina se llevó a cabo mediante la incubación de 25 μL del lisado activado con 25 μL de L-arginina 0.5 M, pH 9,7, a 37°C durante 60 min. La reacción se detuvo mediante el agregado de 400 μL de una solución a partir de H₂SO₄ (96%) / H₃PO₄ (85%) / H₂O (1/3/7, v/v/v). La concentración de urea se midió a 540 nm utilizando lector de placas ELISA (Thermo Scientific, Multiskan FC) después de la adición de 40 μL de α-isonitrosopropiofenona (disuelto en etanol al 100%), seguido por calentamiento a 95°C durante 30 min¹³. La actividad de arginasa fue expresada como nmoles de urea metabolizada por mg de proteína por minuto. Las proteínas fueron cuantificadas utilizando *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*.

3.2.17. Cuantificación de citoquinas

La cantidad de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF-α fueron cuantificadas mediante ELISA utilizando *Mouse IL-6 ELISA Kit* y *Mouse TNF- α ELISA Kit* (BD).

3.2.18. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el software GraphPad Prism 5. Se consideraron significativos los valores de p igual o menor a 0.05.

Las diferencias entre grupos fueron evaluados mediante un análisis de 2 vías de la varianza con pruebas post-test de Bonferroni utilizando el software Infostat. Todos los resultados se expresaron como error estándar de medición media + y $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Referencia de figuras: $P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$.

Referencias

1. Mathupala S, Sloan A. An agarose-based cloning-ring anchoring method for isolation of viable cell clones. *Biotechniques*. 2009;46(4):305–307.
2. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol. Bioeng.* 2003;83(2):173–80.
3. Metzger W, Sossong D, Bächle A, et al. The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytotherapy*. 2011;13(8):1000–1012.
4. Lamberti MJ, Pansa MF, Vera RE, Vittar NBR, Rivarola VA. Photodynamic therapy potentiates the paracrine endothelial stimulation by colorectal cancer. *Laser Phys.* 2014;24:115602.
5. Merlin J, Azzi S, Lignon D, et al. MTT assays allow quick and reliable measurement of the response of human tumour cells to photodynamic therapy. *Eur J Cancer*. 1992;28A:1452–1458.
6. Cammarota R, Bertolini V, Pennesi G, et al. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *J. Transl. Med.* 2010;8(1):112.
7. Valcárcel M, Arteta B, Jaureguibeitia A, et al. Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis. *J Transl Med.* 2008;6:57.
8. Aubry JP, Blaecke A, Lecoanet-Henchoz S, et al. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry*. 1999;37:197–204.
9. Tonn JC, Kerkau S, Hanke A, et al. Effect of synthetic matrix-metalloproteinase inhibitors on invasive capacity and proliferation of human malignant gliomas in vitro. *Int. J. Cancer*. 1999;80:764–772.
10. Ezhilarasan R, Mohanam I, Govindarajan K, Mohanam S. Glioma cells suppress hypoxia-induced endothelial cell apoptosis and promote the angiogenic process. *Int J Oncol.* 2007;30(3):701–707.
11. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
12. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of Nitrate , Nitrite , and [15N] Nitrate in Biological Fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131–8.
13. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: A micromethod. *J. Immunol. Methods.* 1994;174(94):231–235.

Resultados

Resultados

Durante la última década, varios investigadores han reportado los efectos de ALA-TFD en diversas células tumorales, incluidas células de cáncer colorrectal (CCR) ¹, pero resultan insuficientes los ensayos realizados utilizando ALA-Met como fotosensibilizador.

Sobre la base de estos antecedentes y considerando la relevancia del modelo de estudio, los primeros objetivos de este trabajo de Tesis se centraron en la evaluación del efecto citotóxico de la TFD con ALA-Met sobre células de CCR en cultivos en monocapa y esferoides de modo comparativo y su implicancia en el proceso angiogénico (Figura 1).

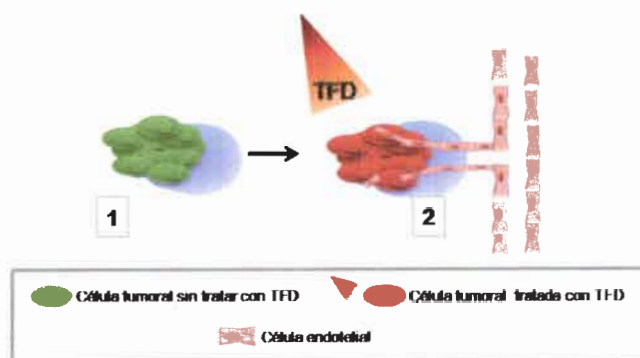


Figura 1: Esquema representativo de los objetivos 1 y 2 desarrollados en este trabajo de Tesis. 1: desarrollo de un modelo 3D para la evaluación del efecto de la TFD (comparado a los cultivos en monocapa). 2-Evaluación del efecto de la TFD sobre el proceso angiogénico. TFD: terapia fotodinámica.

4.1. Implicancia del grado de diferenciación celular en la efectividad del tratamiento fotodinámico con ALA-Met sobre células de cáncer de colon humano

4.1.1. Línea CACO-2 (estadio tumoral I o B de Dukes, más diferenciado): Modelo de cultivo 2D.

Teniendo en cuenta que la especificidad de la TFD está en parte determinada por la acción combinada de tres componentes (FS, luz y O₂), el daño causado en forma individual por alguno de ellos desestima su posible aplicación, ya que dichos componentes por sí solos deben ser inocuos.

Cuando células Caco-2 crecidas como monocapa fueron tratadas con concentraciones superiores a 1mM de ALA-Met se evidenció citotoxicidad en ausencia de luz del compuesto *per se*, (ver Figura 2, dosis de luz: 0 J/cm²). Por otro lado, no se observó disminución de la viabilidad celular cuando los cultivos fueron irradiados con diferentes dosis de luz (ver Figura 2, ALA-Met 0 mM y rango de luz 0,1-0,5 J/cm²).

Sin embargo, la combinación de ALA-Met con distintas dosis de luz (rango 0,1-0,5 J/cm²) afectó la viabilidad celular en forma proporcional al incremento de dosis de irradiación empleadas evidenciando la existencia de actividad fotodinámica (Figura 2).

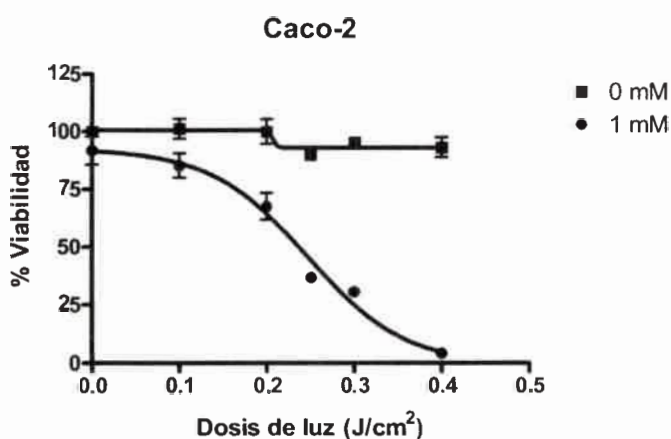


Figura 2. Viabilidad celular post-TFD de células CaCo-2 a las 24h. Las células crecidas en monocapa fueron incubadas durante 4h en presencia de ALA-Met a una concentración de 1mM e irradiadas con diferentes dosis de luz. A las 24 se realizó un ensayo de MTT. La supervivencia celular se expresó como porcentaje con respecto al control sin tratar. Los valores representan la media ± SD (n=3). SD: desviación estándar.

En la Figura 3 se muestran fotografías representativas en campo claro en donde se evidencia el daño a nivel celular ocasionado por el tratamiento fotodinámico.

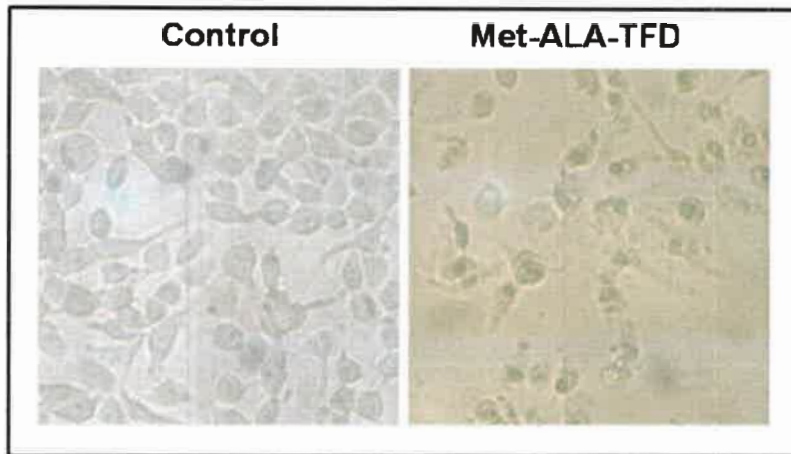


Figura 3. Imágenes en campo claro de la morfología de células CaCo-2 a las 24 h de ser sometidas o no a tratamiento fotodinámico. Met-ALA-TFD: corresponde a células que recibieron tratamiento con Met-ALA y luego fueron irradiadas (aumento 10x).

Puede observarse la morfología epitelial característica de las células Caco-2 en la imagen correspondiente a las células control, mientras que el tratamiento fotodinámico ocasiona pérdida de la integridad de membrana, y un aumento notable en la presencia de gránulos en el interior del citoplasma.

4.1.2. Línea SW480 (estadio tumoral I o B de Dukes, menos diferenciado): modelo de cultivo 2D.

Cuando se evaluó la respuesta de la línea celular SW480 ante la TFD, la mortalidad celular obtenida fue debida sólo al efecto de la combinación de fotosensibilización e irradiación, debido a que la prodroga o la luz, en forma individual, no mediaron efectos sobre la viabilidad celular. Como puede observarse en la figura 4, el tratamiento con ALA-Met a una concentración 1mM genera una notable citotoxicidad a la mínima dosis de luz utilizada ($0,1\text{Jcm}^2$). Empleando concentraciones menores de FS (0,3mM) se evidencia una paulatina reducción de la viabilidad celular directamente proporcional al aumento de la dosis de luz empleada (Figura 4).

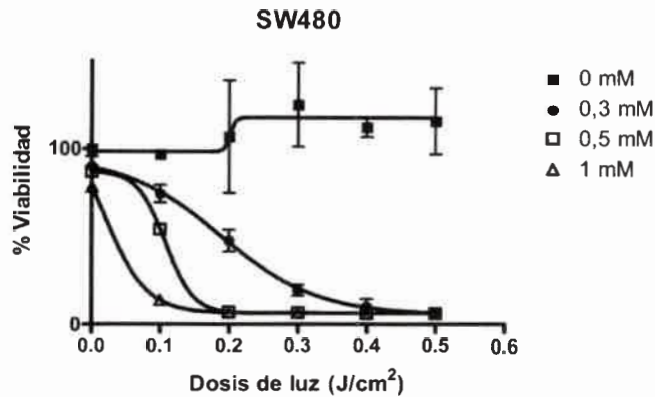


Figura 4. Viabilidad celular de células SW480. Las células crecidas en monocapa fueron incubadas durante 4h en presencia de ALA-Met a concentraciones de 0,3; 0,5 y 1mM e irradiadas con diferentes dosis de luz. A las 24 h se realizó un ensayo de MTT. La supervivencia celular se expresó como porcentaje con respecto al control. Los valores representan la media \pm SD (n=3). SD: desviación estándar.

Al igual que para las células Caco-2, se tomaron fotografías en campo claro de las monocapas celulares sometidas o no a TFD a las 24 h post-tratamiento y las imágenes representativas se muestran en la Figura 5.

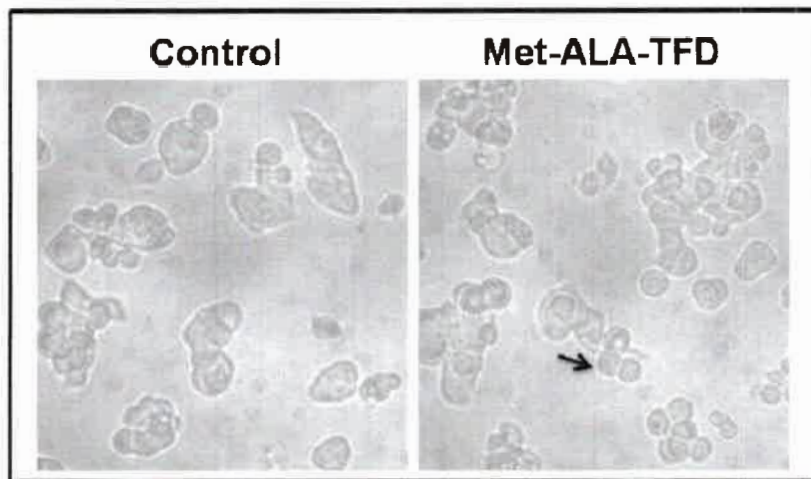


Figura 5. Imágenes en campo claro de la morfología de células SW480 a las 24 h de ser sometidas o no a tratamiento fotodinámico. Met-ALA-TFD: corresponde a células que recibieron tratamiento con Met-ALA y luego fueron irradiadas (aumento 10x).

Puede observarse en la imagen correspondiente al control que las células SW480 son más pleomórficas que las células Caco-2, posiblemente debido a su pérdida en el grado de diferenciación celular. Por otro lado, el daño ocasionado por la TFD se caracteriza por la presencia de células más redondeadas, característico de la muerte celular por apoptosis.

En base a los resultados obtenidos fue posible definir las dosis que producen la muerte del 50% (DL50) para estas líneas celulares empleando el software *Graphpad Prism* (regresión no lineal).

En la Tabla 1 se detallan las condiciones definidas para cada línea celular.

Tabla 1: Condiciones de TFD para la línea celular Caco-2 y SW480 en modelos de cultivo 2D a su DL50 y sus correspondientes tratamientos a dosis altas y bajas de luz. La concentración de ALA-Met se expresa en mM y la dosis de luz en J/cm².

Línea	DL50
Caco-2 (2D)-1mM	0,237±0,002 J/cm ²
SW480 (2D)-0,3mM	0,189±0,002 J/cm ²

DL50: dosis letal 50

Tal como se desprenden de los datos obtenidos, la línea celular menos indiferenciada Caco-2, resultó ser más resistente al tratamiento fotodinámico, ya que si bien las dosis de luz son similares, se requiere casi tres veces más de ALA-Met para lograr el mismo porcentaje de muerte celular.

4.2. Estandarización de modelos de cultivo tridimensional de células tumorales

El proceso de validación pre-clínica de los tratamientos contra el cáncer comprende, como primera medida, ensayos bioquímicos basados en cultivos celulares seguidos de una evaluación en modelos animales. Los cultivos bidimensionales estándares, si bien resultan simples y convenientes, no reproducen la complejidad y fisiopatología presente en el tejido tumoral²⁻⁴. Con la finalidad de generar un modelo de estudio de mayor complejidad para el estudio del tratamiento fotodinámico, se desarrolló el cultivo de las células tumorales como

esferoides. Este tipo de cultivo representa con mayor fidelidad las interacciones célula-célula y células-matriz que están presentes en el tejido tumoral, así como los gradientes de pH, oxígeno y demás nutrientes⁵.

4.2.1. Esferoides de células de carcinoma colorrectal Caco-2 y SW480.

Como ya fue mencionado, se han desarrollado diferentes métodos para generar esferoides a partir de células tumorales. Sin embargo, uno de los parámetros claves que determina la eficiencia y la uniformidad en la obtención de estas estructuras 3D es también el tipo celular empleado⁶. Por lo tanto, y debido a que incluso células del mismo origen de tejido pueden formar o no esferoides mediante técnicas diferentes, decidimos identificar el método ideal para obtener los agregados celulares de nuestras líneas celulares mediante el desarrollo de dos metodologías diferentes, gota colgante (hanging drop, HD) y líquido sobrelapante (liquid overlay, LO). Se comparó la forma y el tamaño de los esferoides obtenidos con las células Caco-2 y SW480 mediante cada una de las técnicas utilizando diferentes números de células iniciales. Se observó que el tamaño de los esferoides generados luego de 3 días de incubación fue proporcional a la cantidad de células iniciales (Figura 6).

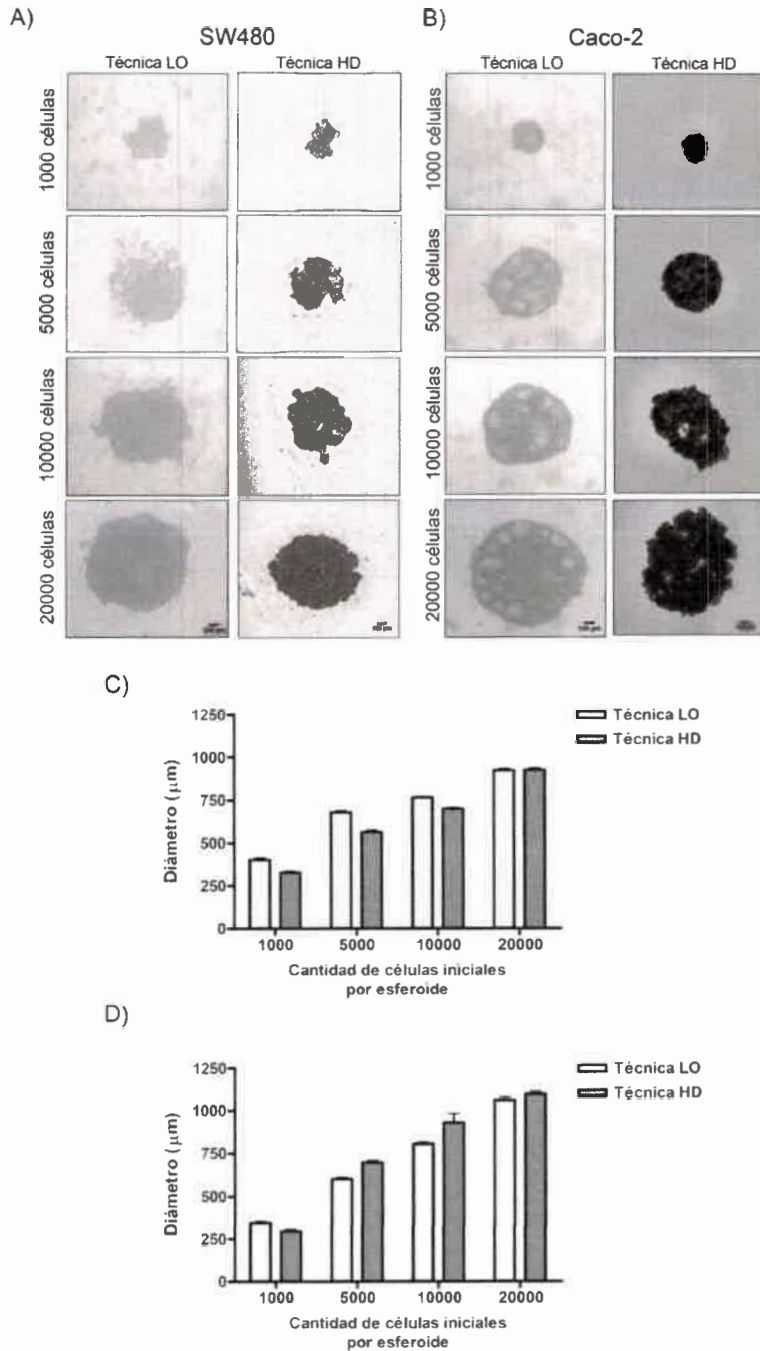


Figura 6. Crecimiento tridimensional de las células de cáncer colorrectal. Las células SW480 (A y C) y Caco-2 (B y D) (1000, 5000, 10000 y 20000 células) fueron sembradas en placas de 96 pocillos con fondo redondo previamente recubiertas de agarosa 1% (técnica LO) o en gotas de 30 µl en la tapa de placas de Petri (técnica HD) en medio de crecimiento no proliferativo. Luego de 3 días de incubación, se tomaron las fotos con el aumento 4X del objetivo. El diámetro de los esferoides generados se midió utilizando el software ImageJ.

En cuanto a los esferoides de la línea celular SW480 puede observarse que presentan una morfología característica con uniones más laxas entre las células con bordes marcadamente irregulares y poco homogéneos a menor número de células iniciales. Sin embargo, los esferoides formados a partir de 20000 células presentan una mayor homogeneidad de la estructura tridimensional (Figura 6-A). Luego de un exhaustivo análisis, se seleccionó a la técnica LO sobre HD por ser más reproducible, rápida y por generar esferoides más homogéneos.

Por otro lado, los cultivos 3D generados a partir de la línea Caco-2, más diferenciada, mostró la presencia de cistos en la periferia. Una de las características de la línea celular derivada de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 es que no son células completamente indiferenciadas. Por ello, es posible que en ciertas condiciones de cultivo sufran procesos de diferenciación espontánea, lo que desencadena la expresión de características morfológicas y funcionales de los enterocitos maduros. La formación de quistes se considera un paso crucial en la morfogénesis epitelial *in vitro*⁷. Estas estructuras son las que luego se transforman en túbulos que se alargan y ramifican lo que conduce finalmente al desarrollo de los órganos lumbinales en el cuerpo. En este sentido se ha observado que en muchos tipos de cáncer este proceso presenta anomalías que se asocian con la promoción neoplásica⁸. Teniendo en cuenta que tanto en este estudio como en otros ya reportados^{9,10} la línea celular Caco-2, más resistente al tratamiento fotodinámico, presenta semejanzas con los enterocitos no malignos, en el presente proyecto no consideramos pertinente continuar con el estudio en este modelo debido a que no cuenta con características propias del microambiente tumoral.

4.2.2. Caracterización de la cinética de crecimiento de los cultivos tridimensionales de la línea SW480

Una vez definida la técnica que resultó más eficiente para la generación de esferoides de la línea celular SW480, se decidió evaluar otro de los parámetros que debe ser contemplado durante la estandarización del cultivo tridimensional. El estado fisiológico de los esferoides depende claramente del tamaño, el comportamiento específico del tipo de célula tumoral, la densidad celular dentro del esferoide y también directa o indirectamente del tiempo de cultivo¹¹. Debido a la importancia de conocer la dinámica de formación de

esferoides, se comparó la forma, el tamaño y el número de células viables de los esferoides obtenidos mediante la técnica LO utilizando diferentes números de células iniciales y diferentes tiempos de incubación. En la Figura 7 se muestran imágenes representativas de los esferoides obtenidos.

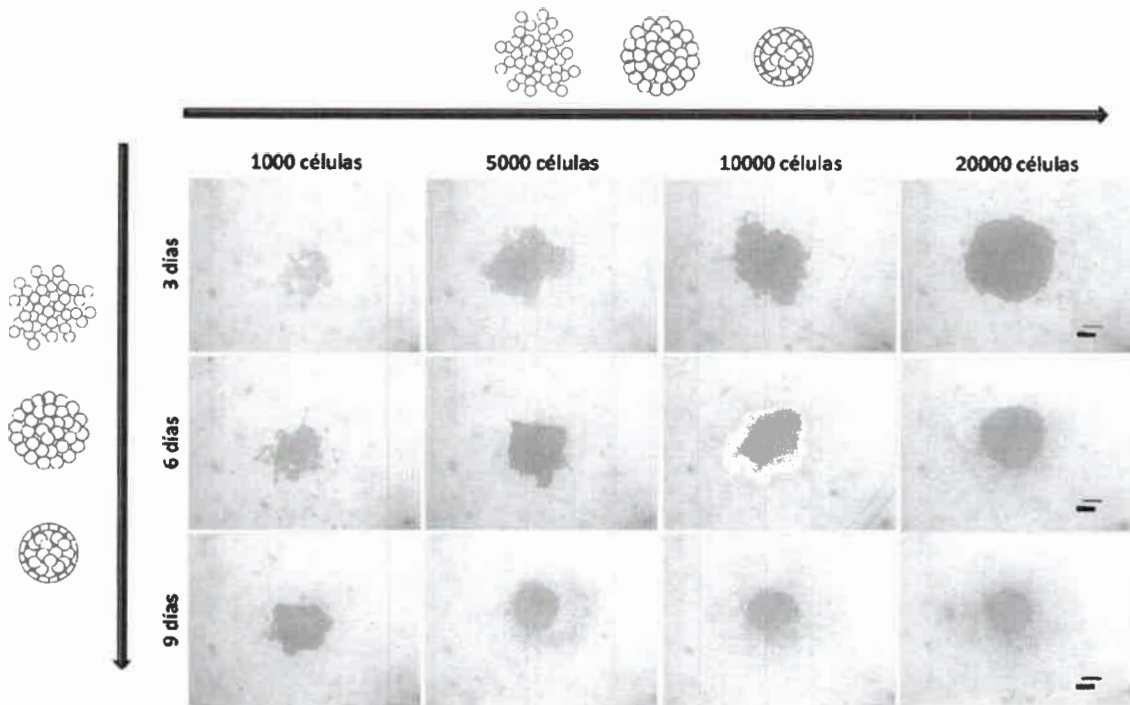


Figura 7: Crecimiento tridimensional de las células de cáncer colorrectal SW480 en función del tiempo de incubación. Imágenes representativas de esferoides de diferente número de células iniciales de la línea celular SW480 incubados durante 3, 6 y 9 días empleando la técnica de cultivo LO.

Nuevamente puede observarse la morfología característica de los esferoides de esta línea celular. Teniendo en cuenta las etapas de la formación de esferoides descriptas anteriormente, puede notarse que la compactación de los esferoides es directamente proporcional al número de células iniciales utilizadas y el tiempo de incubación empleado.

A partir de las imágenes se determinó el diámetro de los esferoides utilizando el software Image J. Por otra parte, fue determinada la cantidad de células viables presentes en

los mismos mediante la disgregación de la estructura tridimensional y el recuento con el colorante vital azul tripán (Figura 8).

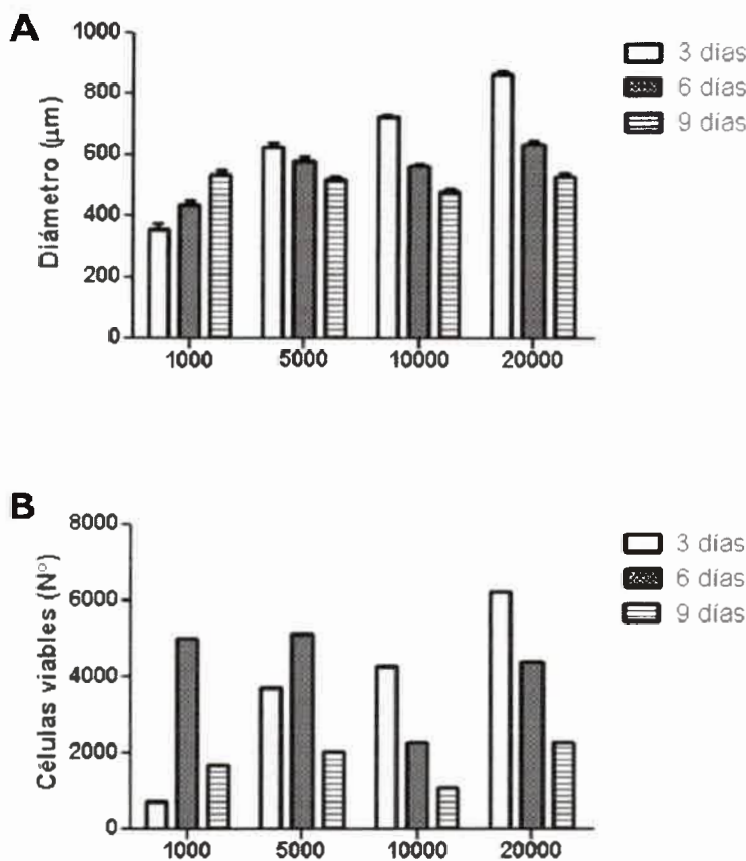


Figura 8. Crecimiento tridimensional de las células de cáncer colorrectal SW480 en función del tiempo de incubación. A: Diámetro de los esferoides tumorales determinado utilizando el software ImageJ. B: Número de células viables de los esferoides previamente disgregados e incubados con el colorante vital azul tripán.

Los esferoides generados a partir de 1000 células iniciales resultaron morfológicamente más compactos y homogéneos conforme aumenta el tiempo de incubación. Sin embargo, debido a que se observa un aumento en el diámetro de los mismos de forma proporcional, pude suponerse esto esté asociado a eventos proliferativos, lo que conlleva a un aumento en el número de células presentes. Contrariamente, en esferoides de 5000, 10000 y 20000 células iniciales, se observa un claro aumento de la

compactación mientras que se evidencia una notable disminución del diámetro de la estructura tridimensional. Estas observaciones permiten inferir que más que el tiempo de incubación, la cantidad de células presentes es lo que define el grado de compactación de la estructura tridimensional. Los valores promedio obtenidos están resumidos en la tabla 2.

Tabla 2: Diámetro y números de células viables de esferoides de células SW480 generados por LO a partir de diferentes números de células iniciales y a diferentes tiempos de incubación.

T.I.	1000			5000			10000			20000		
	3días	6días	9días	3días	6días	9días	3días	6días	9días	3días	6días	9días
Diámetro	358,1±59	434,5±34	537,7±34	625,6±41	583,1±36	520,7±31	723,6±18	564,6±18	478,5±26	864,3±28	633,7±35	531,4±31
CV (N°)	708	5014	1677	3729	5139	2063	4271	2271	1104	6229	4406	2302

T.I.: Tiempo de incubación; CV: células viables. El diámetro está expresado en μm .

Del análisis del tamaño y número de células viables se desprende que los esferoides que fueron generados a partir de 20000 células, además de tener una morfología homogénea, presentan el mayor diámetro ($864,3 \pm 28 \mu\text{m}$) y cantidad de células viables.

Desde el punto de vista de la fototerapia, las células hipóxicas representan la población más interesante, debido a que son las que están fuertemente asociadas a la resistencia del tratamiento. Por ello, es necesario establecer que condiciones de cultivo nos permiten recrear las condiciones de un cultivo *in vivo* en el que una proporción de células reciben suministro ininterrumpido de nutrientes y oxígeno mientras que otras se convierten en hipóxicas y pueden entrar en necrosis secundaria. Por lo tanto, para los ensayos posteriores, se seleccionaron los esferoides originados utilizando la técnica LO a partir de 20000 células iniciales debido a que por su tamaño representan los gradientes de oxígeno y demás nutrientes de tumores en desarrollo⁵.

4.3. Implicancia de la arquitectura tridimensional en la efectividad del tratamiento fotodinámico con ALA-Met sobre células de cáncer de colon humano SW480.

Para el desarrollo del modelo de cultivo tridimensional se emplearon los parámetros definidos previamente. Se generaron a partir de 20000 células iniciales, mediante la técnica de LO durante tres días de incubación.

En primera instancia las condiciones de tratamiento fotodinámico para esferoides tumorales fueron definidas teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el cultivo en monocapa de la misma línea celular. De esta forma se utilizaron concentraciones de ALA-Met de 0,3mM y dosis de luz variable, ya que es la influencia de este parámetro lo que se desea evaluar. El tratamiento convencional con este FS es de 4h de incubación antes de ser activado con la luz. Bajo estas condiciones, incluso a las mayores dosis de luz utilizadas, solo fue posible alcanzar una reducción del 50% de la viabilidad de los esferoides tumorales. El efecto citotóxico de la TFD fue determinado mediante un ensayo de MTT y los valores de viabilidad celular obtenidos se representan en la figura 9.

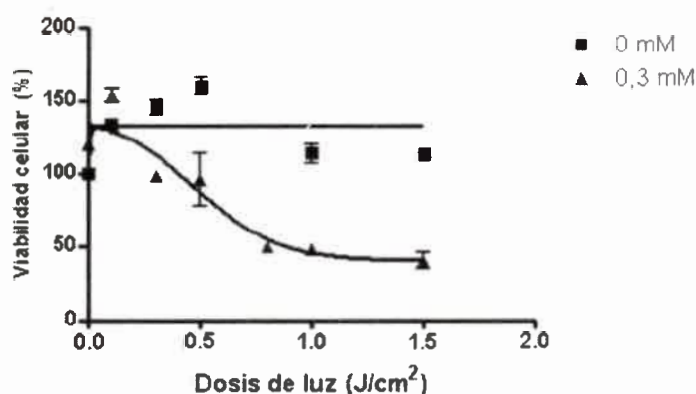


Figura 9. Viabilidad celular de SW480 en cultivos 3D. Los esferoides fueron incubados durante 4h en presencia de ALA-Met a una concentración de 0,3 mM e irradiados con diferentes dosis de luz. A las 24 h se realizó un ensayo de MTT. La supervivencia celular se expresó como porcentaje con respecto al control sin tratar. Los valores representan la media \pm SD (n=3). SD: desviación estándar.

Teniendo en cuenta la estructura tridimensional y su relevancia en el estudio de la respuesta a la terapia, ha sido ampliamente reportado que células cultivadas como esferoides tumorales resultan ser más resistentes a los tratamientos fotodinámicos que las mismas células crecidas en monocapa. Esta menor sensibilidad podría estar asociada a la absorción intracelular de drogas dentro del esferoide, ya que la concentración de fotosensibilizador es uno de los parámetros que determina la sensibilidad de los esferoides al tratamiento fotodinámico^{12,13}.

Estudios previos han demostrado que las células de la capa más externa producen mayores cantidades de PpIX que las otras capas, por lo que el tratamiento fotodinámico no afectaría de igual manera a todas las células que forman la estructura tridimensional¹⁴.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y en consideración de estos antecedentes se evaluó la cinética de formación de PpIX en cultivos 3D de SW480 variando el tiempo de incubación de la pro-droga con la finalidad de establecer las mejores condiciones de tratamiento para este modelo de estudio. Para ello, esferoides de 20000 células fueron incubados durante 4, 12 y 24 h con 0,3mM de ALA-Met y la fluorescencia de PpIX fue observada y cuantificada por microscopía confocal.

En la figura 10 se muestran las imágenes representativas y la fluorescencia expresada como porcentaje en función de los tiempos de incubación ensayados utilizando el programa ImageJ.

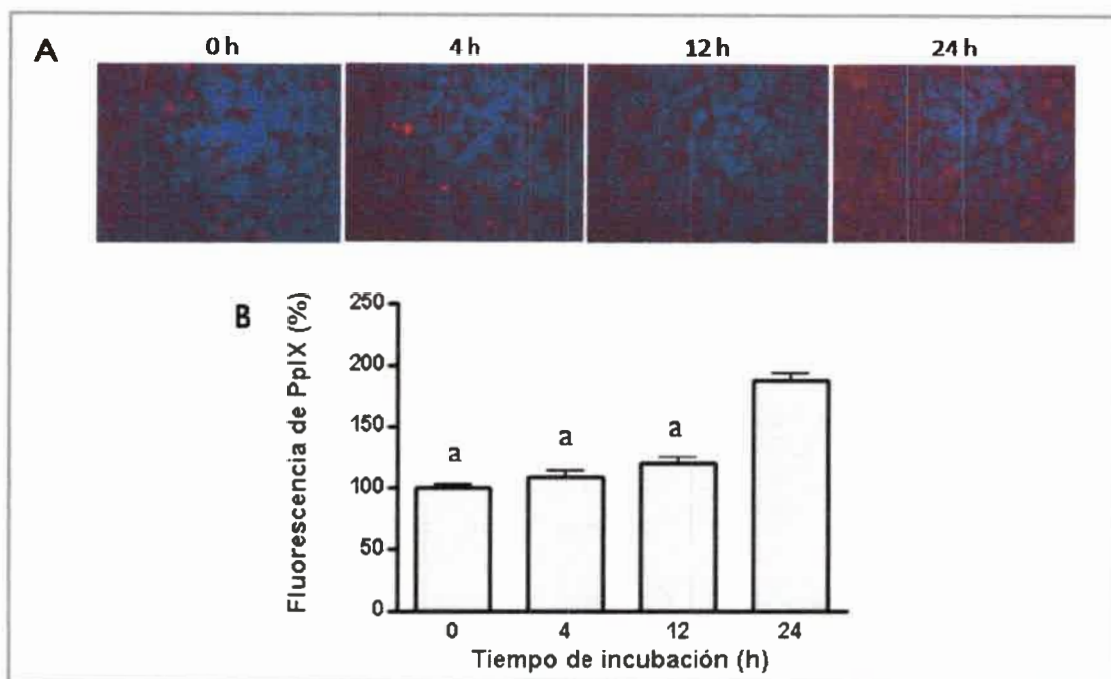


Figura 10. Cinética de formación de PpIX en función de los tiempos de incubación con ALA-Met. a) Imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia de esferoides de 20000 células de la línea SW480. b) Porcentaje de fluorescencia de PpIX en función de tiempo de incubación calculado con el software ImageJ. Análisis estadístico: Two way ANOVA. Bonferroni post test: a,b= $p < 0.001$.

Tal como se esperaba, la producción del FS aumentó 1.8 veces con respecto al control (células sin droga) cuando los esferoides fueron incubados con ALA-Met durante 24 h ($p < 0.001$), mientras que con 4 y 12 h de incubación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados nos indican que aumentando el tiempo de incubación, se consigue que ALA-Met sea incorporado de manera más eficiente en el interior del esferoide induciendo por lo tanto una mayor producción de PpIX. Por ello, fue realizado nuevamente el ensayo de viabilidad utilizando un nuevo protocolo de tratamiento en el que los esferoides fueron incubados con la prodroga durante 24 h previas a la irradiación.

Tal como se esperaba, bajo estas nuevas condiciones, fue posible aumentar el efecto citotóxico del tratamiento fotodinámico con ALA-Met (Figura 11).

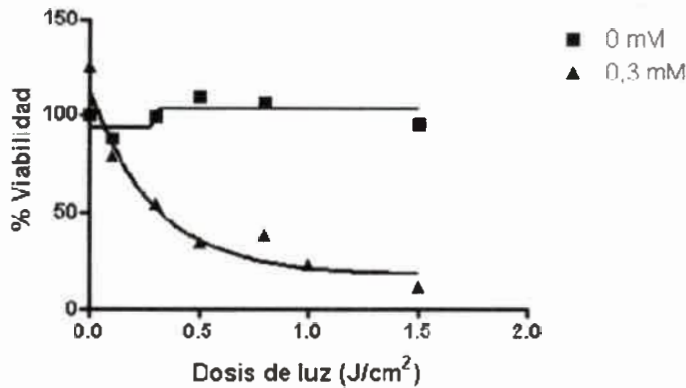


Figura 11. Viabilidad celular de SW480 en cultivos 3D. Los esferoides fueron incubados durante 24h en presencia de ALA-Met a una concentración de 0,3 mM e irradiados con diferentes dosis de luz. A las 24h se realizó un ensayo de MTT. La supervivencia celular se expresó como porcentaje con respecto al control. Los valores representan la media \pm SD (n=3). SD: desviación estándar.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el ensayo de MTT es una técnica colorimétrica que permite cuantificar el daño generado por la terapia teniendo en cuenta la pérdida o no de la actividad metabólica celular. Las células viables son capaces de transformar las sales de tetrazolio en cristales de formazán, un compuesto de color azul mientras que las células muertas no presentan coloración ya que no son capaces de transformar dicho compuesto. En la figura 12 se muestran imágenes representativas de esferoides incubados durante 4h con MTT después del tratamiento fotodinámico.

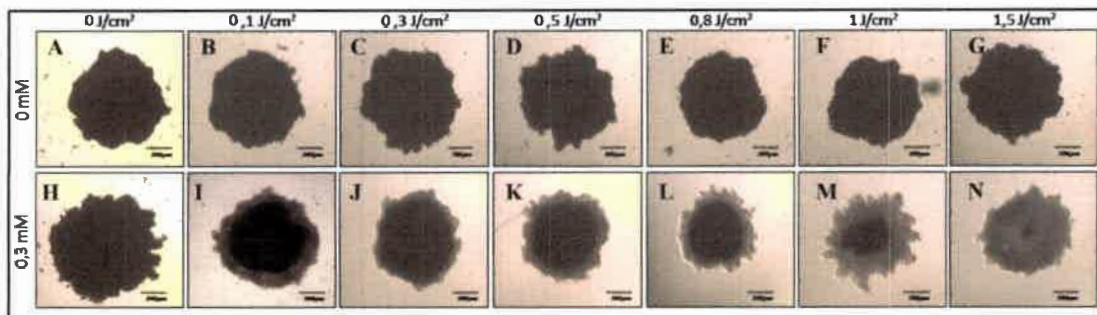


Figura 12. Fotografías de esferoides de 20000 células de la línea SW480 incubados con 0,3mM de ALA-Met durante 24h e irradiados con diferentes dosis de luz. A las 24h post-TFD se realizó un ensayo de MTT. A: control; B-G: control de dosis de luz; H: control oscuridad 0,3mM ALA-Met; I-N: tratamiento fotodinámico con 0,3mM ALA-Met a diferentes dosis de luz. Las fotografías fueron tomadas después de ser incubados durante 4h con MTT post-TFD.

La diferente sensibilidad de los cultivos de esferoides a la TFD puede estar determinada por varios factores entre los que se destacan las interacciones celulares, los mecanismos de reparación de daño celular, el estado de oxigenación y la disponibilidad de nutrientes, entre otros¹³. La estructura tridimensional de los cultivos esferoidales está asociada con el desarrollo de un núcleo celular hipóxico que le confiere mayor resistencia a la TFD^{11,15}. Estas consideraciones podrían explicar el patrón de muerte celular observado después del tratamiento fotodinámico, en donde se encontró que la región central del esferoide es la menos afectada. Analizando las imágenes resulta evidente que el daño celular ocasionado por la TFD resulta de la combinación de ambos componentes (droga y luz) ya que puede observarse la coloración homogénea en los esferoides correspondientes a los controles luz (Fig 12, B-G) y oscuridad (Fig 12, H). Sin embargo, cuando los esferoides son irradiados en presencia del FS, puede notarse la pérdida de actividad metabólica de las células de la periferia que va en aumento de forma proporcional al aumento de la dosis de luz empleada (Fig 12, I-N).

En base a estos resultados fue posible definir la DL50 para esta línea celular en las diferentes condiciones de cultivo empleando el software Graphpad Prism. Según se desprende de los datos analizados la DL50 de TFD para la línea SW480 en cultivos en monocapa es de 0,3 mM ALA-Met y 0,18 J/cm², mientras que para ocasionar la muerte del 50% de las células SW480 crecidas como esferoides, se requiere para la misma concentración de FS (0,3mM) aumentar aproximadamente el doble la dosis de luz (0,3J/cm²).

Estudios realizados sobre células derivadas de tumores gástricos y de vejiga utilizando un FS derivado de clorinas indican que dosis altas y bajas de TFD no inducen la misma respuesta citotóxica ya que involucran mecanismos de muerte celular diferentes¹⁸. Utilizando ALA como FS se observó que en pacientes con displasias de alto grado en esófago de Barrett, la eficacia de la TFD estaba fuertemente asociada a la dosis de luz utilizada¹⁹. Por otro lado, y utilizando el mismo FS, investigadores sostienen que la localización del fotodaño luego de aplicar ALA-TFD es influenciado por la irradiación y la dosis de luz aplicada²⁰. Teniendo en cuenta estos antecedentes, para los estudios desarrollados en este trabajo de Tesis se definieron dosis de luz altas (TFD-La) y bajas

(TFD-Lb) con respecto a la DL50 con la finalidad de evaluar la influencia de este parámetro en el proceso angiogénico. En la Tabla 3 se detallan las condiciones elegidas para la línea celular SW480 en ambos modelos de estudio.

Tabla 3: Condiciones de TFD para la línea celular SW480 a su DL50 y sus correspondientes tratamientos a dosis altas y bajas de luz. La concentración de ALA-Met se expresa en mM y la dosis de luz en J/cm².

Línea	DL50	TFD-Lb	TFD-La
SW480 (2D)-0,3mM	0,18 J/cm²	0,1 J/cm²	0,3 J/cm²
SW480 (3D)-0,3mM	0,3 J/cm²	0,1 J/cm²	0,7 J/cm²

La dosis de luz que causa la reducción de aproximadamente un 20% de la viabilidad celular es lo que nosotros definimos como TFD-Lb. Como puede notarse, se requiere la misma concentración de FS y dosis de luz para lograr esta mínima reducción de la viabilidad celular independientemente del modelo de estudio empleado. Sin embargo el esquema de tratamiento no es el mismo, ya que es necesario incubar más tiempo la prodrga previa activación con la luz cuando las células son crecidas como agregados tridimensionales. Esto refuerza la idea de que la complejidad estructural presente en los tumores *in vivo* (mejor representada por modelos 3D) debe ser considerada cuando se evalúan terapias antitumorales en modelos *in vitro*.

4.4. Efecto de esferoides de células tumorales sensibilizados sobre eventos del proceso angiogénico.

Como fue mencionado anteriormente, la inducción de hipoxia en los tumores tratados con TFD puede desencadenar un aumento en la expresión de factores angiogénicos inductores de neovascularización, lo cual favorece el desarrollo tumoral post-tratamiento.

Para examinar el impacto de TFD sobre la angiogénesis tumoral, se realizaron ensayos que involucran la participación de ligandos solubles que secreta el tumor (respuesta parácrina) con la finalidad de evidenciar el efecto biológico sobre células endoteliales (CE) en relación a eventos claves del proceso angiogénico.

Teniendo en cuenta la numerosa evidencia indicando que modelos de estudio tridimensionales representan mejor la dinámica de crecimiento tumoral en cuanto a la

activación de la angiogénesis por una mayor producción de moléculas involucradas en dicho proceso²¹, determinamos en primera instancia mediante PCR real time la expresión de VEGF en nuestro modelo de estudio tridimensional y en monocapa (Figura 13).

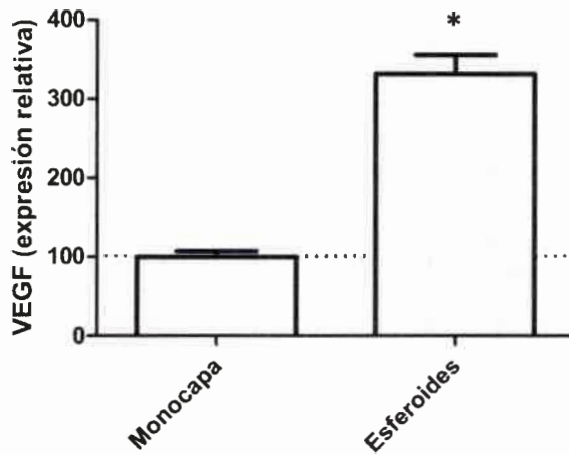


Figura 13. Expresión de VEGF en monocapas vs esferoides de células SW480. Los resultados están normalizados a la expresión de células en monocapa. T-test $p = 0.0008$.

Tal como era esperado, el crecimiento de las células tumorales como esferoides aumenta significativamente la expresión de VEGF, principal disparador de angiogénesis, por ello los ensayos planteados a continuación fueron desarrollados sólo sobre esferoides tumorales.

Para los ensayos de estimulación parácrina se utilizaron medios condicionados que contienen los factores solubles liberados por los esferoides tumorales. Se investigó en primera instancia, como la terapia fotodinámica afecta la proliferación de CE mediante el empleo de MC provenientes de esferoides de células tumorales (CT) sometidas a TFD a las dosis letales y subletales previamente establecidas (Figura 14). Como control se utilizó un medio carente de factores de crecimiento, por lo tanto los cambios observados responden a la presencia de factores solubles secretados por las células tumorales y al efecto que produce en las mismas la TFD.

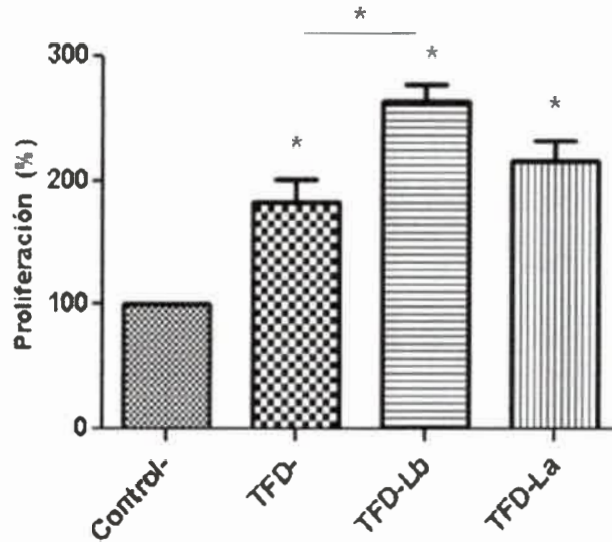


Figura 14: Ensayo de proliferación de células HMEC frente a estimulación parácrina tumoral. Cultivos subconfluentes de CE fueron estimulados durante 24 h con medios condicionados (MC) provenientes de esferoides de células SW480 sometidas a TFD. Porcentaje de proliferación mediante el ensayo de MTT respecto a células cultivadas ausencia de factores de crecimiento. Análisis estadístico: One Way ANOVA, Tukey post test * = $p < 0,05$; estadísticamente significativos con respecto al control. TFD -: sin tratamiento; TFD Lb: TFD a dosis de luz baja ($0,3\text{mM}/0,1\text{Jcm}^2$); TFD La: TFD a dosis de luz alta ($0,3\text{mM}/0,7\text{Jcm}^2$); Control-: Medio sin factores de crecimiento.

Como puede observarse en la figura 14, los esferoides de células de cáncer colorrectal no tratados con TFD aumentan significativamente la proliferación de CE.

Nuestros resultados muestran que si bien hay una inducción significativa de la proliferación de CE cuando el estímulo proviene de células tumorales tratadas con dosis letales ($0,3\text{ mM}/0,7\text{ Jcm}^2$) y subletales ($0,3\text{ mM}/0,1\text{ Jcm}^2$), sólo los esferoides tratados con dosis bajas de luz inducen un significativo aumento de la proliferación de CE en comparación con células no tratadas.

Tal como fue mencionado anteriormente, el proceso angiogénico es un evento morfológico complejo y altamente regulado que involucra la migración y proliferación de las CE hacia el estímulo angiogénico desencadenado en el microambiente tumoral. Para dar lugar a la nueva vasculatura en formación las células proliferan y se asocian en estructuras tubulares, proceso conocido como tubulogénesis. El cultivo de células endoteliales en una

matriz extracelular que le brinde el contexto fisiológico presente en un contexto *in vivo* permite imitar este fenómeno y por lo tanto proporcionar modelos experimentales para el estudio de los factores biológicos involucrados y como éstos pueden modificarse con la terapia.

En la figura 15 se muestran fotografías representativas de la formación de tubos en respuesta a la estimulación parácrina proveniente de cultivos tridimensionales de la línea celular SW480 sometidas a dosis de tratamiento fotodinámico letal y subletal.

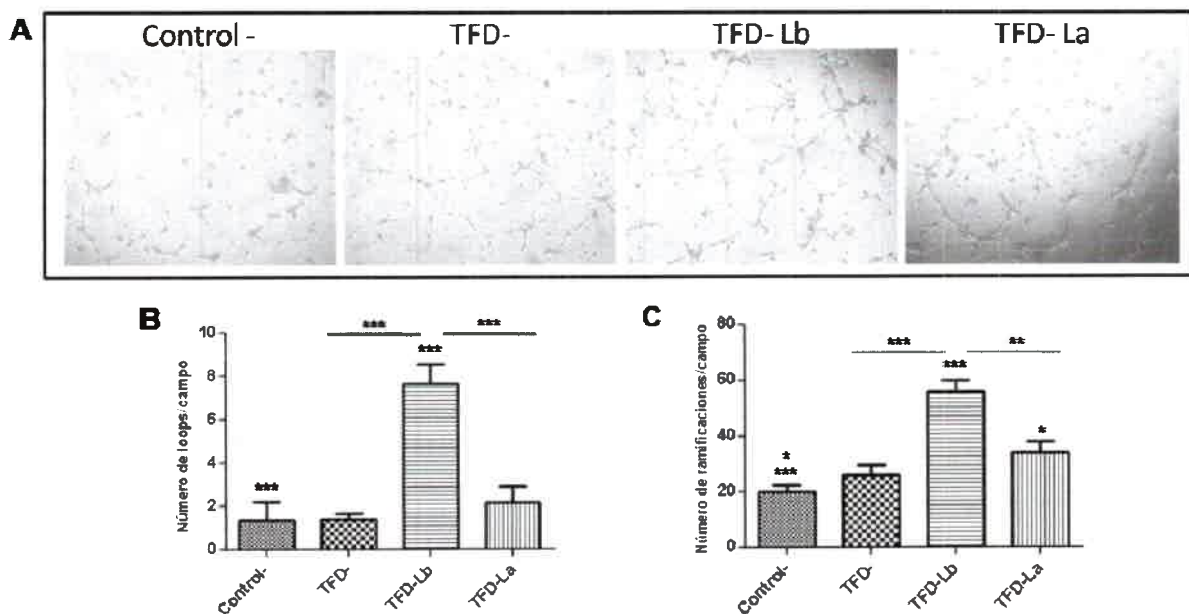


Figura 15: Formación de estructuras tubulares frente a estimulación parácrina tumoral. Células HMEC fueron crecidas sobre pocillos recubiertos de Matrigel® en presencia de MC provenientes de esferoides de células SW480 sometidos o no a TFD. **A:** Las células fueron fotografiadas a las 16 h y se muestran imágenes correspondientes a un ensayo representativo. **B y C:** Cuantificación de loops y puntos de ramificación, respectivamente, utilizando el software ImageJ. Análisis estadístico: One-way ANOVA, Tukey's post-Test, ***, *= $P < 0.05$. TFD -: sin tratamiento; TFD Lb: TFD a dosis de luz baja ($0,3\text{mM}/0,1\text{Jcm}^2$); TFD La: TFD a dosis de luz alta ($0,3\text{mM}/0,7\text{Jcm}^2$); Control-: Medio sin factores de crecimiento.

Los resultados de este experimento nos permiten confirmar que el tratamiento fotodinámico con ALA-Met a dosis de luz baja sería la condición que induce mayor expresión de factores solubles inductores de la morfogénesis de las CE. Además podemos

inferir que el tratamiento subletal confiere a las células residuales un fenotipo más pro-angiogénico que el tratamiento a dosis letal.

En base a los resultados obtenidos hasta el momento, el protocolo de tratamiento más prometedor es utilizando 0,3mM de ALA-Met a dosis de luz altas ($0,7J/cm^2$), ya que genera una notable mortalidad tumoral (aproximadamente un 70%) y no desencadena una fuerte inducción de angiogénesis post-tratamiento.

Ya hemos demostrado que los esferoides tumorales presentan una marcada expresión de VEGF, factor soluble clave en la regulación del proceso angiogénico. En este sentido, fue necesario demostrar que la falta de efecto biológico observado cuando se aplica TFD a dosis letales de tratamiento es por reducción de la expresión de VEGF. Por ello, se determinó por PCR real time la expresión de dicho factor (Figura 16)

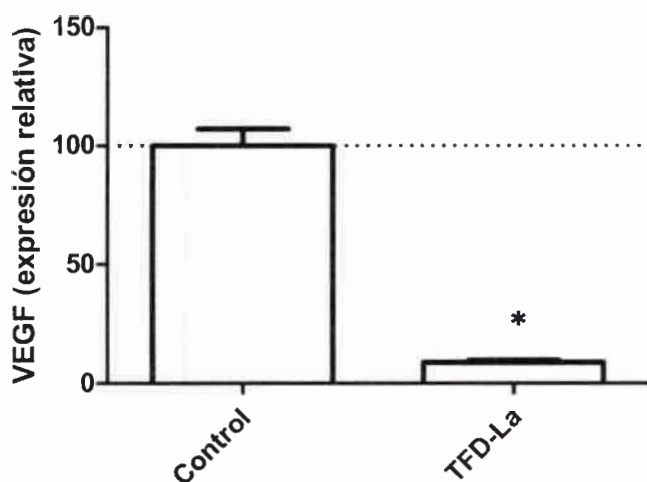


Figura 16. Expresión de VEGF en esferoides de células SW480 sometidas o no a tratamiento fotodinámico. Los resultados están normalizados a la expresión de esferoides que no fueron tratados con TFD (control) T-test $p=0.0003$.

Tal como esperábamos, se observó reducción en la expresión de VEGF en los esferoides tratados con TFD. Estas características resultarían alentadoras sólo si consideramos al tumor como un conjunto de células aisladas de su entorno. Sin embargo, actualmente se considera que las interacciones de las células tumorales con los diferentes componentes del estroma tumoral, tales como fibroblastos, células inflamatorias, matriz

extracelular, juegan un papel importante en el desarrollo neoplásico^{26,27} y consecuentemente deben considerarse al momento de evaluar una terapia anticancerígena²⁸.

Estos resultados sugieren que la TFD podría modificar propiedades inherentes al proceso angiogénico de forma dependiente de la dosis de luz empleada, por lo cual este parámetro podría estar definiendo el éxito de la terapia. Este modelo de estudio resulta atractivo para investigar la TFD sobre el microambiente tumoral. Por ello, para los ensayos que se detallan a continuación se utilizó la dosis de tratamiento letal que involucra la aplicación de 0,3mM de ALA-Met y 0,7J/cm².

4.5. Implicancia del microambiente tumoral en el tratamiento fotodinámico.

4.5.1. Generación de plataformas combinadas de cultivo *in vitro* 2D y 3D de células tumorales y estromales para recrear interacciones presentes en un tumor *in vivo*.

El estudio específico de interacciones celulares en el microambiente tumoral se ha convertido en una de las principales líneas de investigación en la lucha contra el cáncer. El objetivo final en este campo es identificar nuevos tratamientos que puedan contrarrestar las vías de escape de las células tumorales. En este contexto, el desarrollo de modelos de estudio más complejos que imiten las características pato-fisiológicas y moleculares de los tumores humanos permite obtener resultados pre-clínicos relevantes que pueden optimizar o desestimar posteriores aplicaciones clínicas.

Mediante el desarrollo de co-cultivos es posible reproducir interacciones entre células tumorales y estromales, tales como macrófagos (MΦ), las cuales en muchos casos resultan determinantes en cuanto al comportamiento y expresión génica de la célula neoplásica.

En primera instancia fue necesario establecer los modelos de co-cultivo de células tumorales y macrófagos con la finalidad de poder evaluar el efecto de dicha interacción sobre la respuesta a la TFD. Se estableció como plataforma inicial el modelo de cultivo en esferoide multicelular. De esta forma se generaron esferoides de 20000 células compuestos por un 25% de macrófagos RAW 264.7 y 75% de células de cáncer colorrectal SW480 (esferoides heterotípicos). En este microambiente tumoral artificial (MAT) se mantuvo la

proporción de macrófagos-tumor reportado en biopsias de pacientes²⁹. Por ello, y como nuestro principal objetivo es tratar de reproducir las condiciones que imperan en un tumor *in vivo*, se realizaron los ensayos de co-cultivos manteniendo dicha proporción. En la figura 17 se muestran imágenes representativas de los esferoides homotípicos (solo células SW480) y heterotípicos (células tumorales y macrófagos).

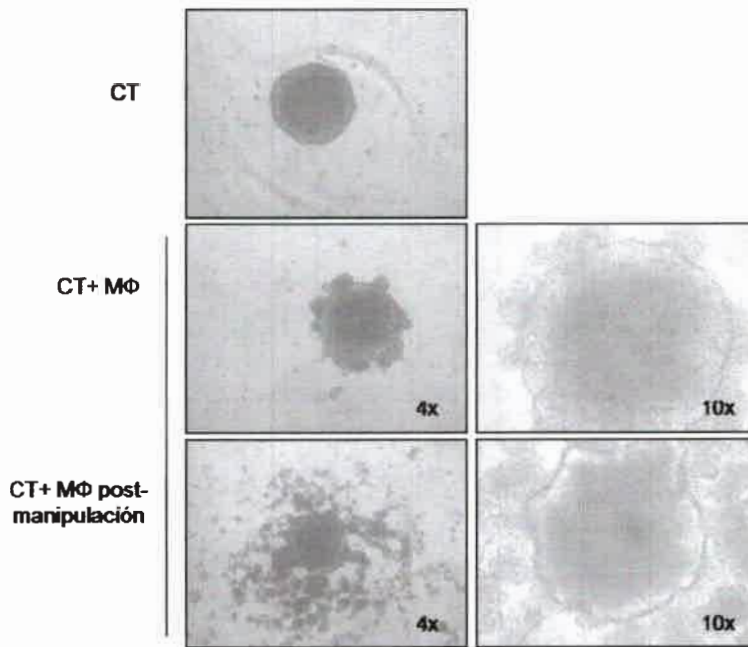


Figura 17. Estandarización de co-cultivos 3D. Imágenes representativas en campo claro de esferoides de 20000 células de la línea SW480 y RAW267.4 co-cultivados durante 72 h. Se observa disgregación de la estructura tridimensional después de ser manipulados. CT: célula tumoral, MΦ: macrófagos.

Puede observarse claramente la diferencia en la estructura de los esferoides homotípicos de aquellos en los que se le incorporan macrófagos. Al igual que lo reportado por Hauptmann y col, parecería que los macrófagos presentes en la periferia del tumor establecen uniones más laxas con las células tumorales³⁰. Esto se manifiesta además por la pérdida de la integridad del esferoide cuando son manipulados.

Teniendo en cuenta que la fluorescencia es la herramienta más conveniente para identificar las distintas poblaciones en modelos de co-cultivo³¹, con la finalidad de confirmar que son macrófagos los que se desprenden de la estructura tridimensional se

utilizó una línea tumoral estable que expresa constitutivamente GFP (SW480-G), generada en nuestro laboratorio.

En la figura 18 se muestran imágenes de fluorescencia representativas de los esferoides co-cultivados utilizando Hoescht como tinción nuclear.

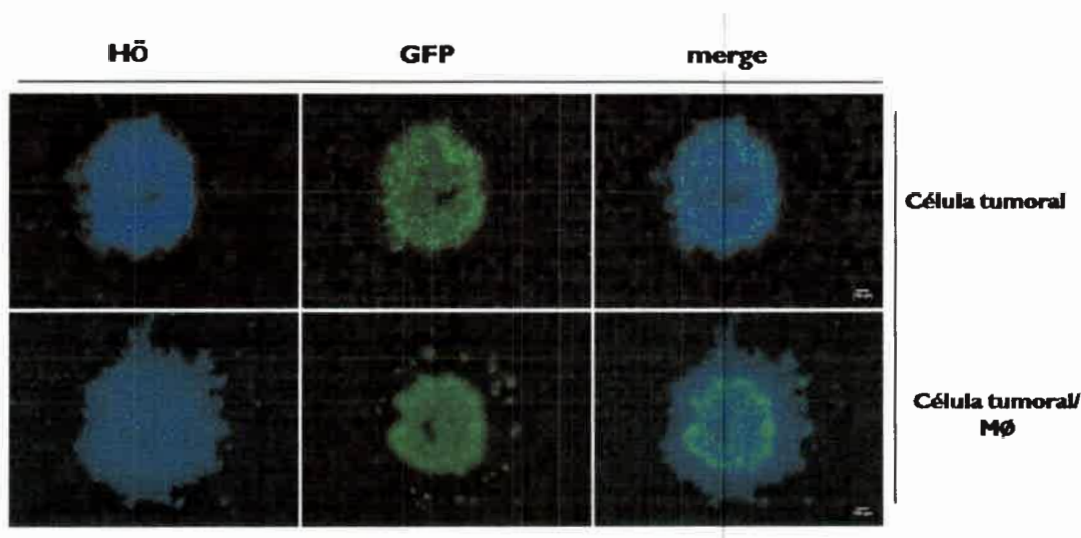


Figura 18. Estandarización de co-cultivos 3D. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de esferoides de 20000 células de la línea SW480-G y RAW267.4 co-cultivados durante 72 h. Se observa disgregación de la estructura tridimensional después de ser manipulados. HO: hoescht. CT: célula tumoral, MΦ: macrófagos.

De esta forma, pudimos corroborar que los esferoides homotípicos resultan morfológicamente más pequeños y compactos (diámetro: $1021 \pm 46 \mu\text{m}$) que los esferoides heterotípicos (diámetro: $1245 \pm 43 \mu\text{m}$), cuya morfología es marcadamente más irregular y laxa. Por otra parte, pudimos confirmar que los esferoides heterotípicos se organizaron espontáneamente en un núcleo de células tumorales (GFP +) y una capa superficial de macrófagos (GFP -) (Fig. 13). Los esferoides heterotípicos perdieron su integridad debido a que la capa periférica de macrófagos se desagregó cuando fueron manipulados (Figura 19).

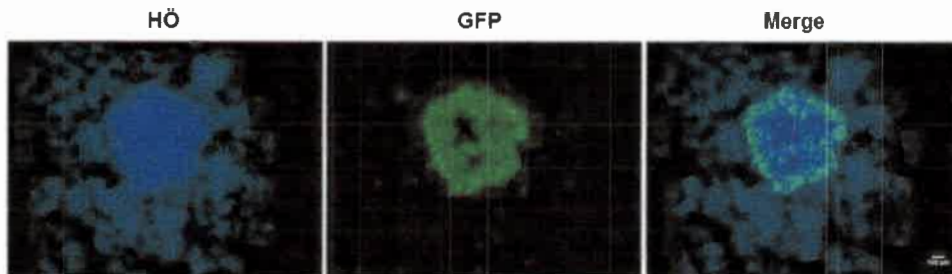


Figura 19. Disrupción de la estructura de esferoide heterotípico. Se observa la pérdida de interacción física entre tumor-estroma representada en los esferoides multicelulares compuestos por células SW480-G y RAW 264,7 después de la manipulación experimental. Para la tinción nuclear, los esferoides fueron incubados con colorante Hoechst (azul). Células tumorales SW480-G expresaron constitutivamente GFP (verde). Bar = 100 μ m. HÖ: Hoechst.

Como no fue posible la formación de una estructura tridimensional estable, reproducible y homogénea, conteniendo ambas estirpes celulares, se diseñó un ensayo de co-cultivo utilizando esferoides tumorales y monocapas de macrófagos.

Teniendo en cuenta que en el microambiente de un tumor tratado podrían coexistir tanto células tumorales y macrófagos que forman parte de la masa tumoral fotosensibilizada (residentes), como macrófagos que no han recibido terapia y migran hacia el sitio tumoral en respuesta a estímulos inflamatorios liberados por el tumor tratado (no residentes), el MAT artificial empleado en los ensayos posteriores se describe de la siguiente manera y están esquematizados en la figura 20:

(A) MAT homotípico (homMAT): esferoides como estructuras 3D compuestas sólo por las células tumorales.

(B) MAT heterotípico con macrófagos residentes (hetMAT/Res): esferoides como estructuras 3D compuestas por células tumorales co-cultivadas con monocapas de macrófagos sometidos a terapia fotodinámica antes del tratamiento antitumoral.

(C) MAT heterotípico con macrófagos no residentes (hetMAT/NRes): como estructuras 3D compuestas por células tumorales tratadas con TFD y luego co-cultivadas con monocapa de macrófagos sin tratamiento antitumoral.



Figura 20. Esquema que representa el modelo de co-cultivo 2D y 3D que simula la interacción con macrófagos residentes y no residentes. $M\Phi$: macrófagos, *homMAT*: microambiente tumoral homotípico, *hetMAT / Res*: microambiente tumoral heterotípica con macrófagos residentes, *hetMAT / NRes*: microambiente tumoral heterotípica con macrófagos no residentes, TFD: terapia fotodinámica.

4.6. Impacto de los macrófagos residentes y no residentes en la eficacia terapéutica de la TFD en un microambiente de cáncer colorrectal

4.6.1. Incidencia en la viabilidad de la célula tumoral a corto plazo.

Ya fue determinado previamente por el ensayo de MTT que aplicando $0,3\text{mM}/0,7\text{J}/\text{cm}^2$ se logra la mortalidad de aproximadamente un 70% de la masa tumoral de un esferoide de células SW480 (esferoide homotípico). Con la finalidad de comparar la eficiencia terapéutica de la intervención fotodinámica de MAT homotípicos y heterotípicos, se evaluó la respuesta citotóxica a las 24 h post-TFD mediante el ensayo de MTT. Las imágenes representativas de los esferoides después de ser incubados con MTT durante 4h se muestran en la figura 21.

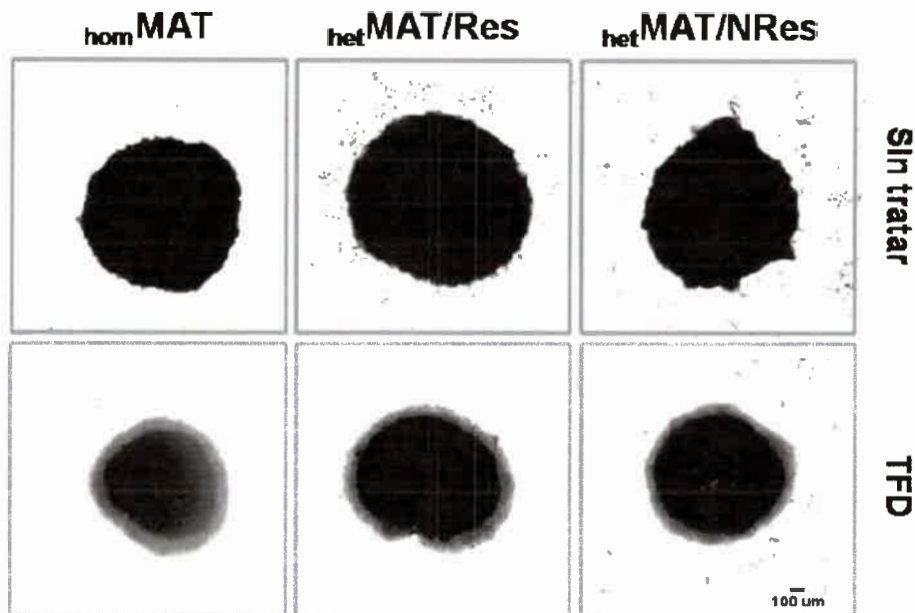


Figura 21. Esferoides de células SW480 homotípicos o co-cultivados con MΦ se incubaron durante 24 h con ALA-Met (0,3mM) y luego fueron expuestos a esquemas de tratamiento fotodinámico letal (0,7J/cm²). Imágenes representativas de esferoides bajo TFD después de una incubación de 4h con MTT. Áreas viables (MTT+) son más oscuras por la formación de sales de formazan. Bar = 100 µm. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT / NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

Como fue destacado anteriormente, el compuesto coloreado resultante de la actividad metabólica permite localizar las células viables (MTT+) y nuevamente observamos que se localizan en el centro del esferoide.

Los porcentajes de viabilidad celular definidos mediante la cuantificación por espectrometría de la actividad metabólica mitocondrial por solubilización con DMSO del formazán generado (células MTT+) se muestran en la figura 22.

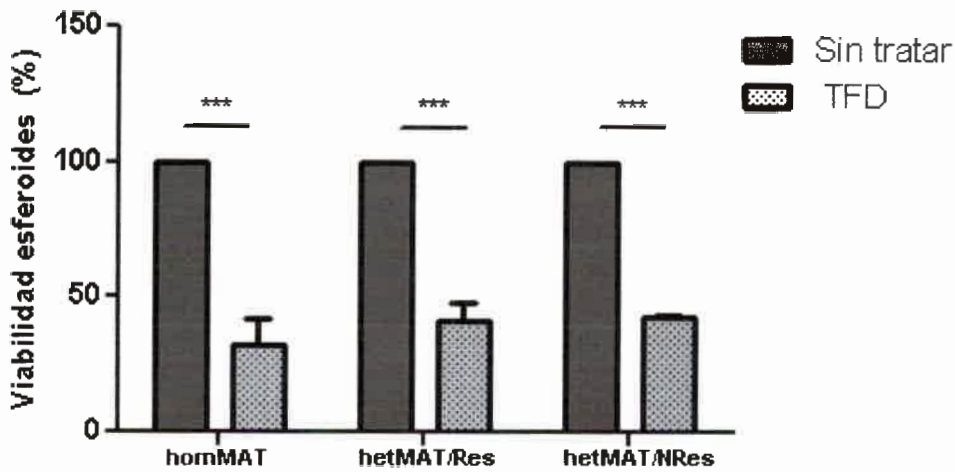


Figura 22. Esferoides de células SW480 homotípicos o co-cultivados con $M\Phi$ se incubaron durante 24 h con ALA-Met (0,3mM) y luego fueron expuestos a esquemas de tratamiento fotodinámico letal (0,7J/cm²). La viabilidad de los esferoides a través del ensayo de MTT fue evaluada a las 24 h post-TFD y referida a la condición sin tratar en cada grupo de tratamiento. Análisis estadístico: Two-way ANOVA, Bonferroni post-Test, ***: $P < 0.001$. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT/Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT/NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

Se observó reducción significativa de la viabilidad de la célula tumoral (60-70%) cuando los esferoides fueron sometidos a tratamiento fotodinámico con ALA-Met irradiados con dosis de luz alta pero esto fue independientemente de la presencia de macrófagos. Sin embargo, si comparamos los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en esferoides formados solo por células tumorales (homotípicos) y sus contrapartes co-cultivadas con macrófagos no se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los mismos. Basados en estos resultados podríamos sugerir que los macrófagos no tienen incidencia en la respuesta frente a este tratamiento a corto plazo (24h post-TFD).

La técnica de MTT cuantifica el daño generado por la terapia sobre la actividad metabólica mitocondrial, pero en un modelo de co-cultivo no permite distinguir qué población celular es la que genera la reducción del compuesto.

Para poder diferenciar las células tumorales de los macrófagos, y de esta manera realizar un análisis individual sobre esta población, utilizamos esferoides de células SW480-G que expresan constitutivamente GFP, co-cultivados con macrófagos y tratados con TFD.

En la figura 23 se muestran imágenes representativas de 24h tomadas en campo claro y con microscopía de fluorescencia para distinguir la población tumoral GFP+.

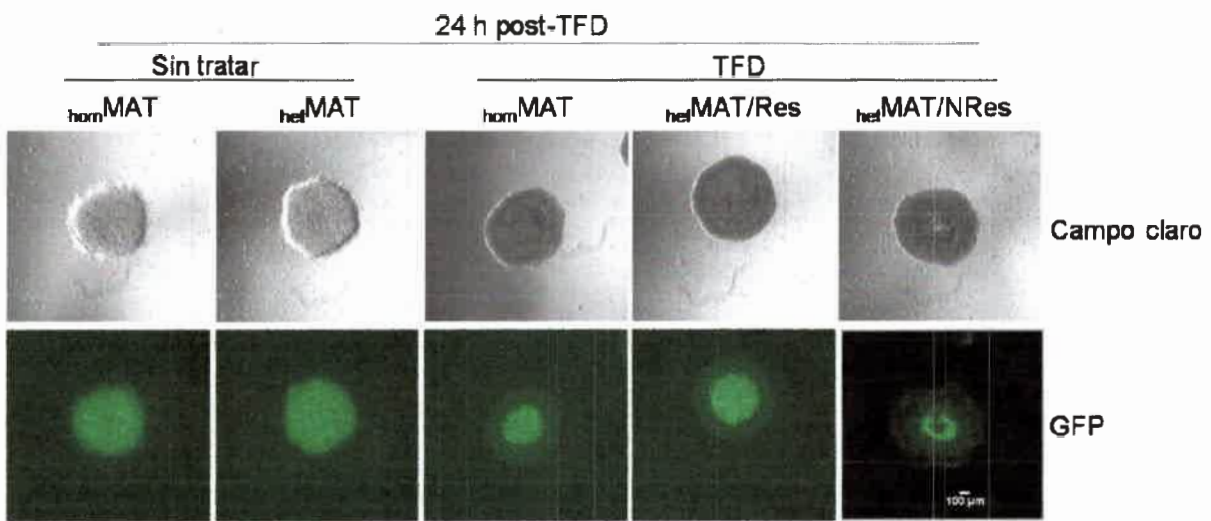


Figura 23. Esferoides de células SW480-G homotípicos y heterotípicos fueron incubados durante 24 h con Me-ALA (0,3mM) y luego sometidos a una dosis de luz alta (0,7J/cm²). Imágenes representativas de campo claro y fluorescencia después de 24 h pos-tratamiento. Células SW480-G tumorales (verde) expresaron constitutivamente GFP; Bar = 100 µm. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homTME: microambiente tumoral homotípico, hetTME / Res: microambiente tumoral heterotípica con macrófagos residentes, hetTME / NRes: microambiente tumoral heterotípica con macrófagos no residentes.

Al igual que lo observado anteriormente con el ensayo de MTT, las células viables (GFP+) se localizan preferentemente en el centro del esferoide y las células dañadas (GFP), las cuales han perdido la capacidad de expresar fluorescencia ³², se encuentran en la periferia.

El diámetro de los esferoides formado por células GFP+, que se corresponden con las células viables ³², fue cuantificado y utilizado como parámetro para evaluar el efecto de la terapia. Los datos obtenidos se presentan en la figura 24.

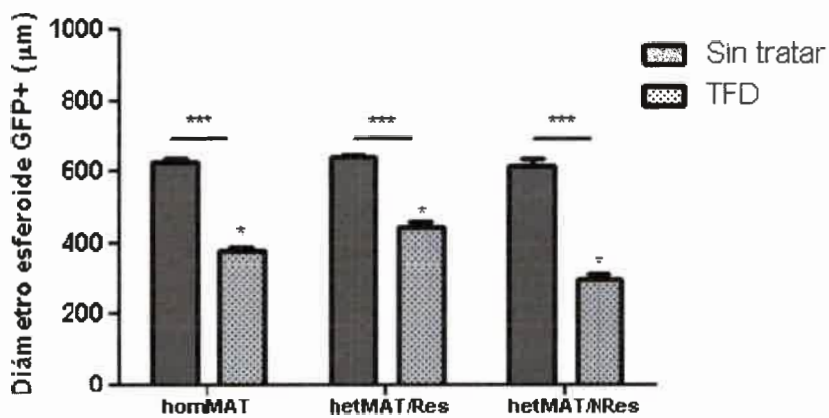


Figura 24. Esferoides de células SW480-G homotípicos y heterotípicos fueron incubados durante 24 h con Me-ALA (0,3mM) y luego sometidos a una dosis de luz alta (0,7J/cm²). Se determinó el diámetro de células GFP+ de los esferoides después de 24 h post-tratamiento con el software ImageJ. Análisis estadístico: two-way ANOVA, Bonferroni post-Test, ***:P < 0.001; *:P < 0.05. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT / NRes: microambiente tumoral heterotípica con macrófagos no residentes.

Nuevamente observamos que la intervención fotodinámica suprimió de forma significativa el crecimiento de homMAT, hetMAT/Res y hetMAT/NRes (p <0,001), comparado al control sin tratar. A diferencia de lo determinado con el ensayo de MTT, se observaron diferencias entre éstos, siendo significativamente menor el diámetro de los esferoides hetMAT/NRes.

4.6.2. Tipo de muerte celular desencadenado por el tratamiento fotodinámico

Algunos autores sugieren que la muerte celular necrótica con fuerte inducción de respuesta inflamatoria post-irradiación son eventos importantes de la estimulación inmunológica de la TFD. Sin embargo recientes estudios muestran que ciertos mecanismos apoptóticos inducidos por la TFD son altamente inmunogénicos y capaces de desencadenar una fuerte inmunidad antitumoral³³. Frecuentemente se asocia esta reacción inflamatoria como consecuencia del estrés oxidativo inducido por la TFD. Su principal función es garantizar la eliminación de las células dañadas y promover la restauración de la función normal del tejido³⁴.

El tipo de muerte celular desencadenada por la TFD fue determinada por citometría de flujo mediante la cuantificación de células apoptóticas y necróticas. Las células fueron teñidas con Anexina V-FITC y Ioduro de propidio (PI, del inglés “propidium iodide) para medir la exposición de fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana celular, respectivamente (Figura 25).

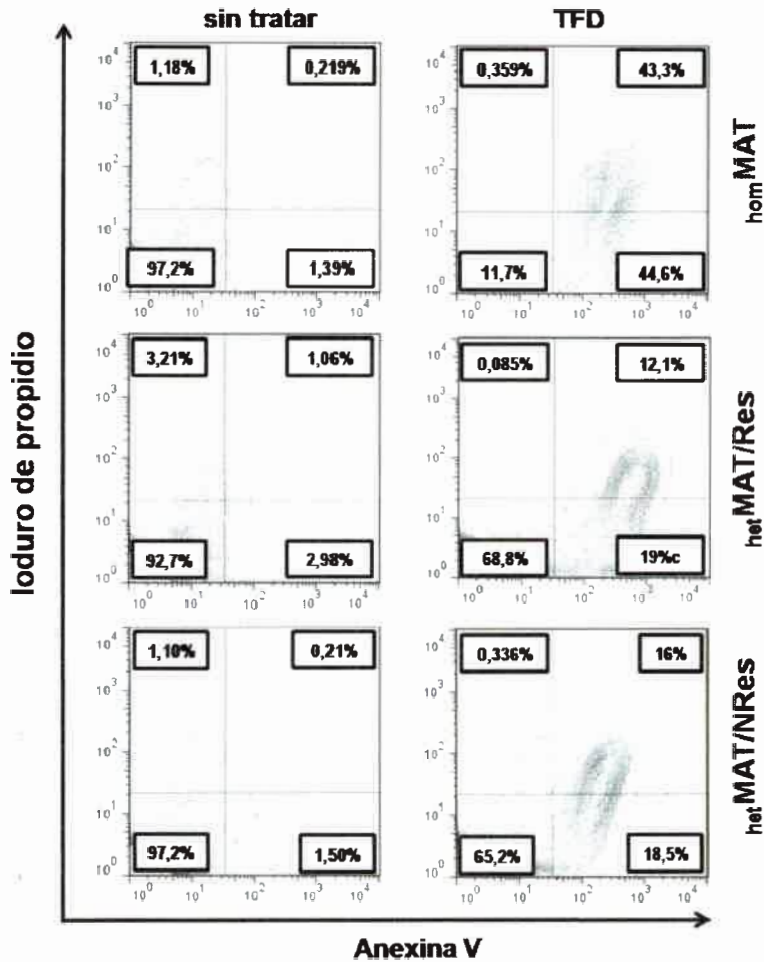


Figura 25. Esferoides de células SW480 homotípicos o co-cultivados con MΦ se incubaron durante 24 h con ALA-Met (0,3mM) y luego fueron expuestos a esquemas de tratamiento fotodinámico letal (0,7J/cm²). El tipo de muerte celular se evaluó por citometría de flujo mediante tinción con Anexina V/IP a las 24h post-TFD. Células apoptóticas tempranas son anexina V positivo y IP negativo (Anexina V-FITC⁺ / PI⁻), apoptosis tardía son doble positivo para IP y anexina V (Anexina V-FITC⁺ / PI⁺) y células necróticas son anexina V negativo e IP positivo (Anexina V-FITC⁻ / PI⁺). Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT / NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

Sorprendentemente, el porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina V + / PI-) y tardía (Anexina V + / PI +) fue significativamente menor en esferoides heterotípicos tratados con TFD en comparación con lo observado en esferoides homotípicos (p <0,05).

4.6.3. Supervivencia celular al tratamiento fotodinámico.

Los estudios sobre actividad anti-tumoral se realizan sobre la evaluación de la respuesta a corto plazo. Considerar evaluaciones a largo plazo permitiría obtener resultados más concluyentes al momento de evaluar una terapia. Por ello se realizó el mismo análisis a los 10 días post-tratamiento (Figura 26)

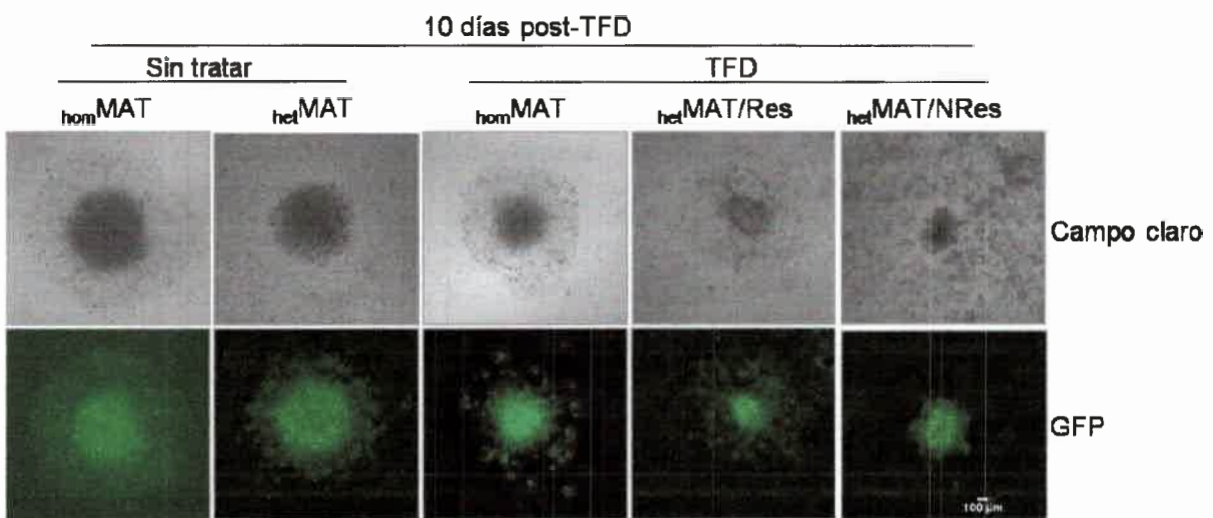


Figura 26. Esferoides de células SW480-G homotípicos y heterotípicos fueron incubados durante 10 días con Me-ALA (0,3mM) y luego sometidos a una dosis de luz alta (0,7J/cm²). Imágenes representativas de campo claro y fluorescencia después de 24 h pos-tratamiento. Células SW480-G tumorales (verde) expresaron constitutivamente GFP; Bar = 100 µm. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT / NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

De la misma forma se calculó el diámetro de los esferoides formado por células GFP+, que se corresponden con las células viables³². Los datos obtenidos se presentan en la figura 27.

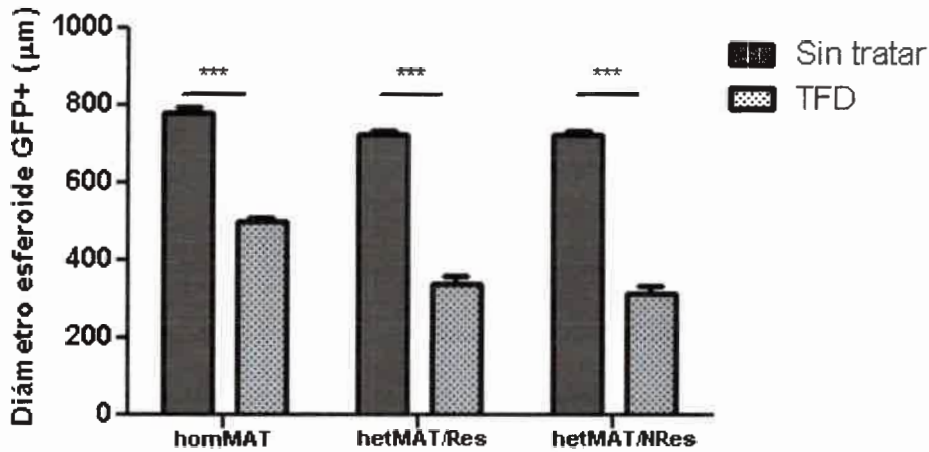


Figura 27. Esferoides de células SW480-G homotípicos y heterotípicos fueron incubados durante 10 días con Me-ALA (0,3mM) y luego sometidos a una dosis de luz alta (0,7J/cm²). Se determinó el diámetro de células GFP+ de los esferoides después de 24 h post-tratamiento con el software ImageJ. Análisis estadístico: two-way ANOVA, Bonferroni post-Test, ***:P < 0.001. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT / NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

La supervivencia a largo plazo de las células tumorales en el esferoide fue evaluada midiendo el diámetro de la capa de células tumorales (GFP +) en el microtumor a las 24 h (diámetro 0, figura 24) y 10 días posteriores al tratamiento fotodinámico (diámetro 1, figura 27). El crecimiento del esferoide se calculó para cada esferoide restando el diámetro 1 al diámetro 0 correspondiente (Figura 28).

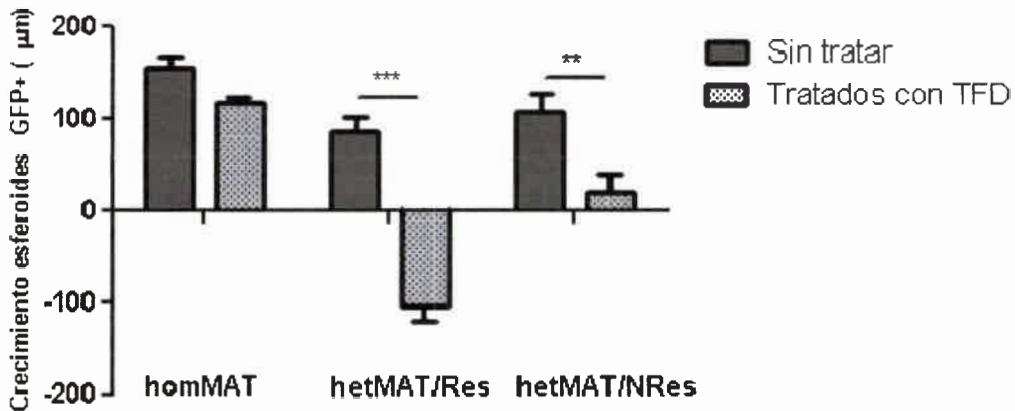


Figura 28. El crecimiento del esferoide se calculó restando el diámetro de GFP + para cada esferoide a los 10 días post-tratamiento con el diámetro correspondiente medido 24 h post-tratamiento. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT / NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

Observamos que la intervención fotodinámica suprimió de forma significativa el crecimiento de hetMAT/Res ($p < 0,01$) y hetMAT/NRes ($p < 0,001$).

Sin embargo, en las imágenes tomadas a los 10 días post-tratamiento puede observarse la presencia de un halo de migración procedente de la masa celular más compacta residual al tratamiento fotodinámico, las cuales fueron definidas para una mejor visualización por un borde blanco (Figura 29).

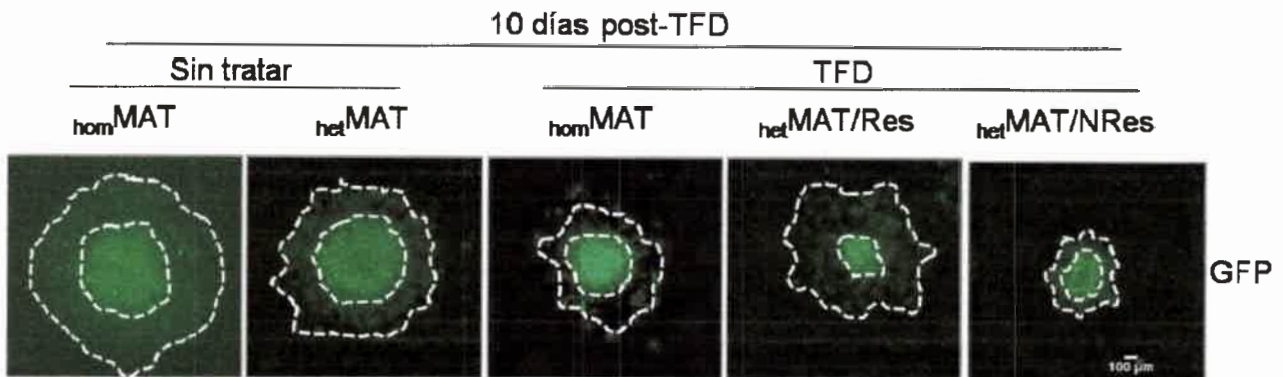


Figura 29. Imágenes representativas de fluorescencia después de 10 días pos-tratamiento. Células SW480-G tumorales (verde) expresaron constitutivamente GFP; Bar = 100 μ m. Los bordes blancos rodean áreas de migración tumoral. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT / NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

La capacidad de crecimiento radial de esferoides sobre matrices 3D o superficies adherentes, recubiertas o no con matriz extracelular, se han descrito previamente como parámetro para describir el comportamiento migratorio de las células que conforman el esferoide y que puede estar asociado a un fenotipo más metastásico^{35,36}. Por ello, y para evidenciar de qué forma se modifica la capacidad de migración de las células de cáncer de colon frente al tratamiento fotodinámico en presencia y/o ausencia de la población de macrófagos, fue cuantificado el halo de migración y los datos obtenidos se muestran en la figura 29.

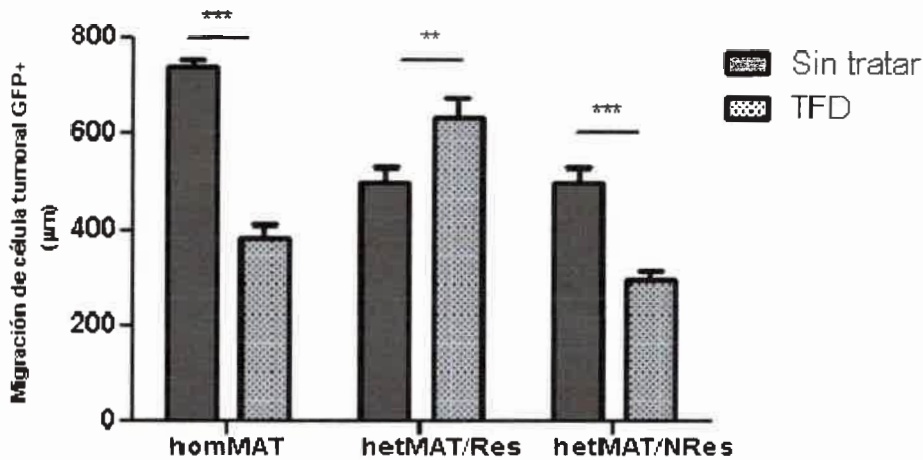


Figura 30. La migración de las células tumorales se calculó como el área de la migración de las células de los esferoides 10 días post-PDT. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT / NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

Curiosamente, se ha demostrado que mientras la TFD suprimió la migración de las células tumorales en homMAT y hetMAT/NRes comparados a sus controles ($p < 0,001$), ésta se incrementó considerablemente en hetMAT/Res tratados con TFD ($p < 0,01$) (Figura 29).

4.7. Reclutamiento de células endoteliales por la presencia de macrófagos residentes y no residentes en el microambiente tumoral intervenido por TFD.

El crecimiento de nuevos capilares sanguíneos a partir de vasculatura preexistente, conocido como angiogénesis, es un complejo proceso que involucra la activación, migración y proliferación de células endoteliales (CE) y la activación de dicho proceso ha sido asociada a la actividad de macrófagos con perfil M2. Con el propósito de examinar el efecto del MAT intervenido con TFD sobre el reclutamiento y activación de CEs se han diseñado experimentos de estimulación parácrina mediante el uso de medios condicionados. Esferoides de células HMEC fueron estimulados con medios condicionados que contienen los factores solubles provenientes de los MAT sujetos a TFD recolectados a

las 24h post-tratamiento. Las células migrantes fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ y los resultados obtenidos se muestran en la figura 31.

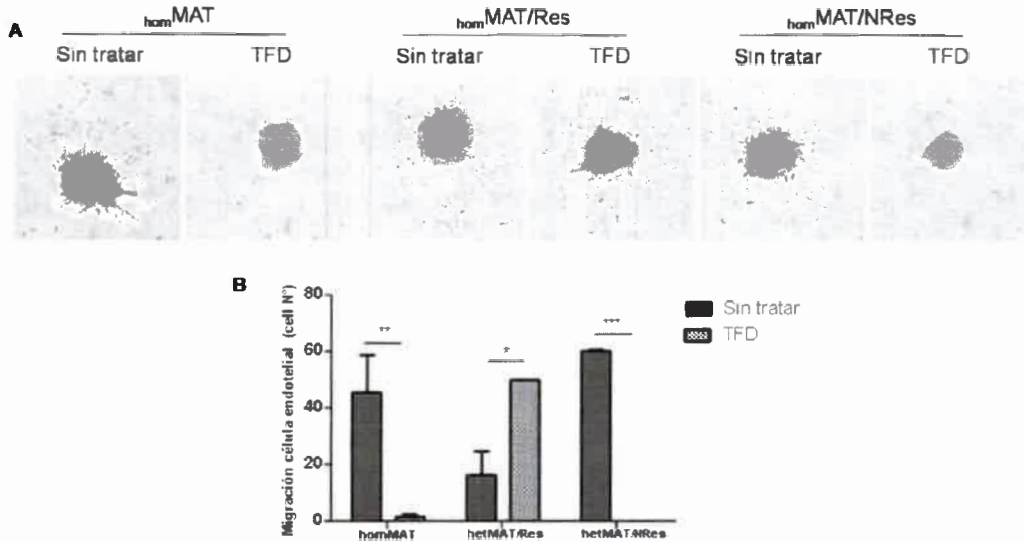


Figura 31. Ensayo de migración de células HMEC frente a estimulación parácrina de microambiente tumoral colorrectal. Diez esferoides de CE (20.000cel/esf) fueron estimulados durante 24 h con medios condicionados (MC) provenientes de esferoides tumorales homotípicos y heterotípicos sometidos o no a TFD. A: Imágenes representativas de los esferoides de CE. (B) la migración endotelial se calcula como el número de células que migran desde el esferoide mediante el software ImageJ. Análisis estadístico: Two-way ANOVA, Bonferroni post-Test, ***: $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, *: $p < 0.05$. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT/NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

En comparación con los controles no tratados, los medios condicionados provenientes de los homMAT y hetMAT/NRes disminuyeron significativamente el número de células endoteliales migrantes ($P < 0,01$ y $P < 0,001$), respectivamente). Por el contrario, la migración endotelial fue exacerbada por los factores solubles derivados de hetMAT/Res tratados con TFD ($P < 0,05$).

El estímulo angiogénico involucra la activación de múltiples vías de señalización en las CE. Una vez que migraron, deben aumentar su número para formar la vasculatura naciente. Es por ello que la proliferación es también un evento clave estimulado por los

factores de crecimiento liberados. El efecto de la terapia sobre la interacción CT- MΦ en relación a su capacidad mitogénica se muestra en la figura 32.

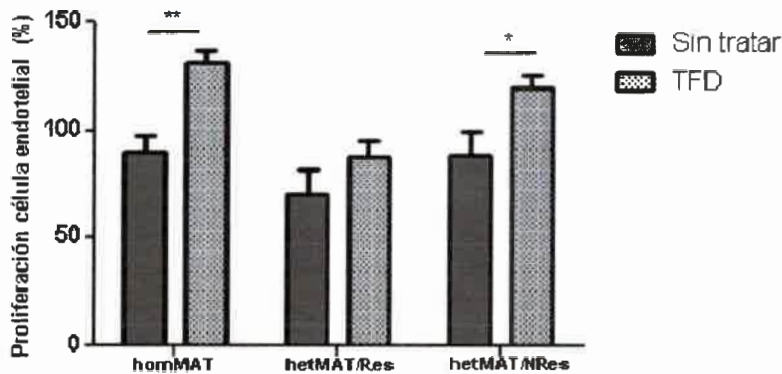


Figura 32: Ensayo de proliferación de células HMEC frente a estimulación parácrina de microambiente tumoral colorrectal. Células HMEC fueron estimulados durante 24 h con medios condicionados (MC) provenientes de esferoides tumorales homotípicos y heterotípicos sometidos o no a TFD. La proliferación endotelial fue evaluada por un ensayo de MTT y referida a células endoteliales incubadas con un medio sin factores de crecimiento (control-). Análisis estadístico: Two-way ANOVA, Bonferroni post-Test, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT/NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

Contrariamente a lo observado en cuanto a la inducción de migración, la proliferación de células endoteliales sólo fue inducida por los medios condicionados provenientes de homMAT y hetMAT/NRes ($P < 0,01$ y $P < 0,05$, respectivamente).

Se demuestra que la TFD modula de forma diferencial la proliferación y la migración endotelial dependiendo de la presencia de macrófagos residentes y no residentes en el contexto de un microambiente tumoral. Estos ensayos aportan información sobre la posible inducción de comportamiento angiogénico de la CE impulsado por la influencia directa del tratamiento fotodinámico sobre el microambiente tumoral.

4.8. Capacidad quimiotáctica de macrófagos en un microambiente celular tratado con TFD.

Como ya se mencionó, las células tumorales estimulan la infiltración de macrófagos y la promoción de la angiogénesis, sosteniendo de esta manera el crecimiento tumoral y aumentando su capacidad de invasión. Por lo tanto, la influencia de la TFD sobre células

del sistema inmune o sus reguladores inmunológicos juega un rol importante en dichos procesos. Ya hemos demostrado que en el contexto de un co-cultivo de macrófagos y esferoides de SW480 tratadas con TFD se induce la migración de células tumorales. Los resultados obtenidos por Green y colaboradores apoyan un modelo en el que la interacción de macrófagos y células de cáncer de colon las induce a adoptar rápidamente un fenotipo quimiotáctico mediado por citoquinas que son liberadas por la célula opuesta. En nuestro trabajo nos resulta relevante analizar el efecto del tratamiento fotodinámico sobre dicha interacción y cómo incide particularmente en este efecto. Ha sido reportado que células de cáncer de colon inducen en macrófagos RAW 267.4 la producción de factores inductores de proliferación, angiogénesis y de motilidad que podrían afectar la progresión del tumor ³⁷. En la figura 33 se muestran los resultados obtenidos en un ensayo de migración de macrófagos utilizando cámaras transwell y cuyo estímulo proviene de esferoides homotípicos y esferoides co-cultivados sometidos a TFD.

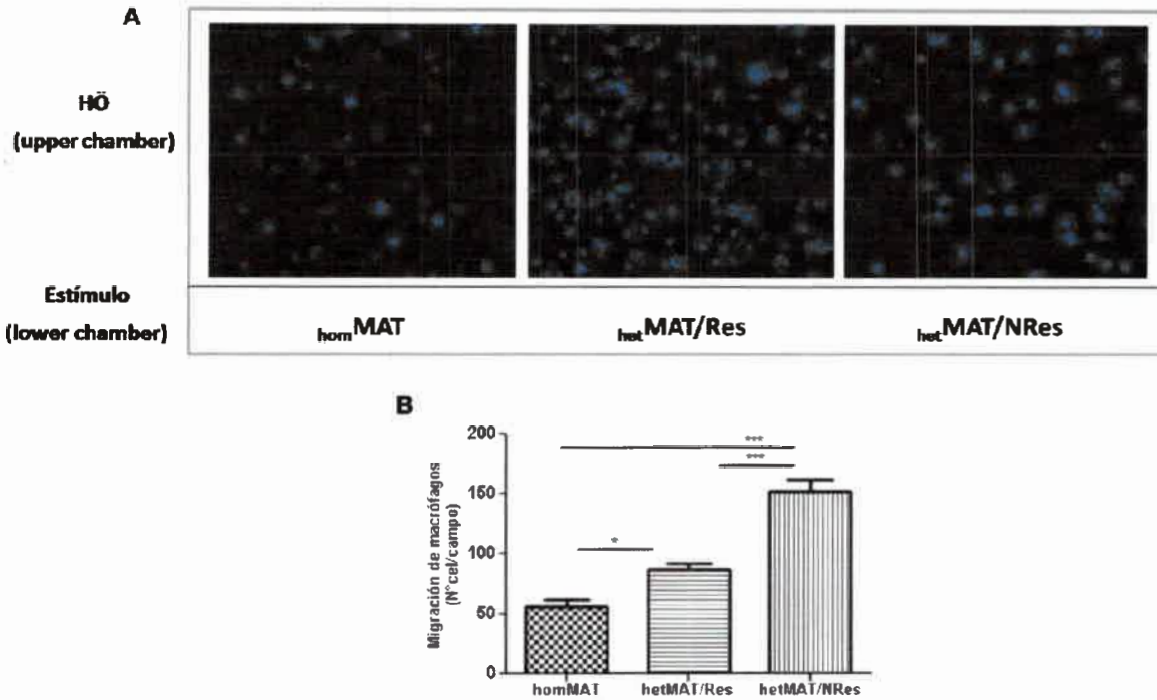


Figura 33. Ensayo de migración en transwell de macrófagos RAW267.4 en respuesta al estímulo proveniente de esferoides homotípicos y heterotípicos sometidos a TFD. A: Imágenes representativas que muestran los macrófagos migrantes teñidos con el colorante nuclear Hoescht. B: recuento de células migrantes con el software ImageJ. Análisis estadístico: One-way ANOVA, Tukey's post-Test, *: $P < 0.05$. TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT/NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

Las imágenes representativas corresponden a macrófagos migrantes teñidos con el colorante nuclear Hoescht. En este ensayo nuevamente resulta relevante el análisis del efecto de a TFD en un modelo que involucra más de una población celular. El tratamiento fotodinámico de esferoides tumorales, que permite la supervivencia de solo un 30% de las células tratadas, no incide de la misma forma sobre la migración de macrófagos en los casos de tratamiento en los que la población de macrófagos forma parte del microambiente.

Claramente, la respuesta frente al tratamiento en cuanto a la capacidad de estimular la quimiotaxis de macrófagos al sitio tumoral es diferente si se considera la presencia de TAMs residentes o no residentes. Frente al mismo tratamiento, un microambiente donde predomina la presencia de macrófagos no afectados por la terapia (hetMAT/NRes) aumenta

la capacidad de atraerlos aun más, mientras que aquellos que fueron fotosensibilizados en conjunto con la masa tumoral (hetMAT/Res) muestran un estímulo quimiotáctico 1,7 veces menor sobre la población de macrófagos.

4.9. Polarización de macrófagos residentes y no residentes frente al tratamiento fotodinámico

Teniendo en cuenta la respuesta diferencial de los macrófagos residentes y no residentes en el microambiente tumoral intervenido por la TFD, fue necesario caracterizar la polarización de dicha población mediante el análisis del perfil molecular específico de los fenotipos M1 y M2. A pesar de que se conoce una amplia gama de marcadores de macrófagos, es ampliamente conocido que la producción de óxido nítrico es característico del perfil M1 mientras que la actividad arginasa sugiere un fenotipo M2³⁸.

Basados en estos antecedentes, y con la finalidad de corroborar cual era el perfil de macrófagos predominante, fue evaluada en primera instancia la producción de óxido nítrico en medios condicionados obtenidos a 24 h y 10 días post-tratamiento a partir de macrófagos y MAT homotípicos y heterotípicos intervenidos con TFD. Como controles se utilizaron los medios condicionados provenientes de su contraparte no tratada (Figura 34).

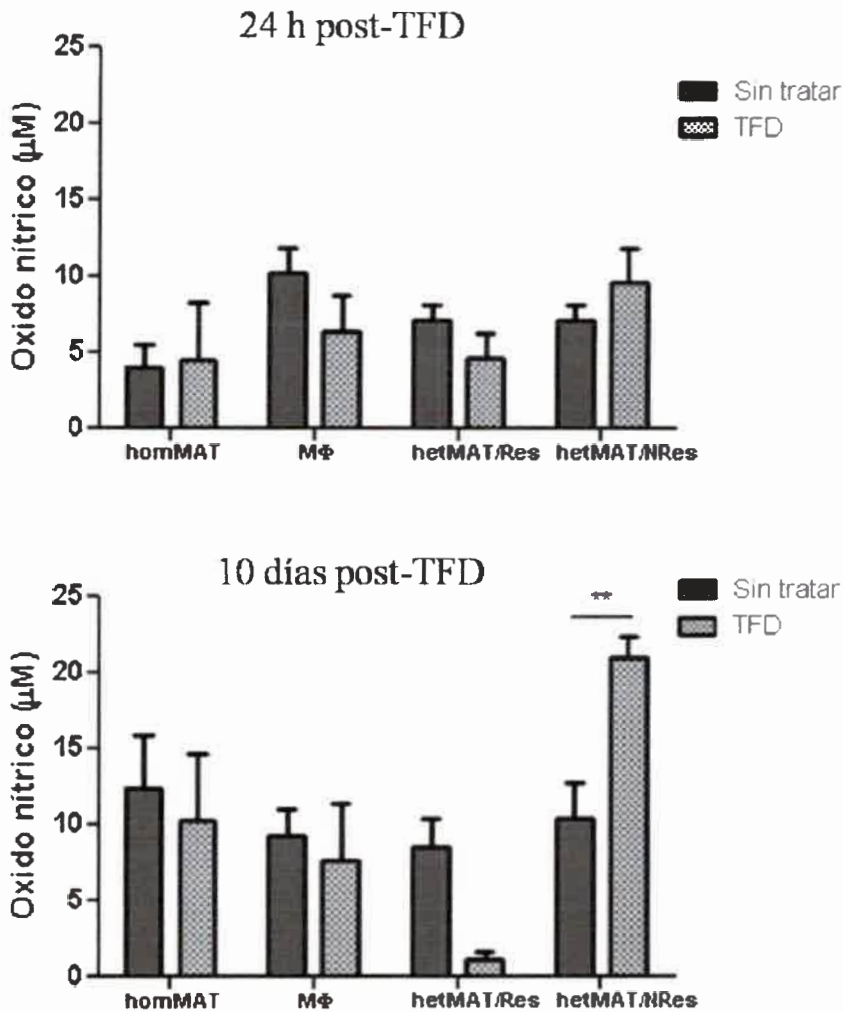


Figura 34: La producción de óxido nítrico fue determinada en los medios condicionados mediante la reacción de Griess. Análisis estadístico: Two-way ANOVA, Bonferroni post-Test, ** $p < 0.01$. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT/NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

Sólo se observa un aumento significativo en la producción de óxido nítrico en hetMAT/NRes comparado al control sin tratar a los 10 días post-fotosensibilización ($P < 0,01$), sugiriendo la inducción de un perfil M1 en los macrófagos no residentes.

Debido a que no se observó aumento en la producción de óxido nítrico en macrófagos residentes, y teniendo en cuenta el comportamiento estimulante de células endoteliales y tumorales observado en nuestros resultados, se esperaría que aumentara su

capacidad arginasa, lo que confirmaría un perfil M2. Por ello, fue determinada la actividad arginasa a partir de la proteína total de macrófagos y MAT homotípicos y heterotípicos intervenidos con TFD y sus contrapartes no tratadas utilizadas como controles (Figura 35).

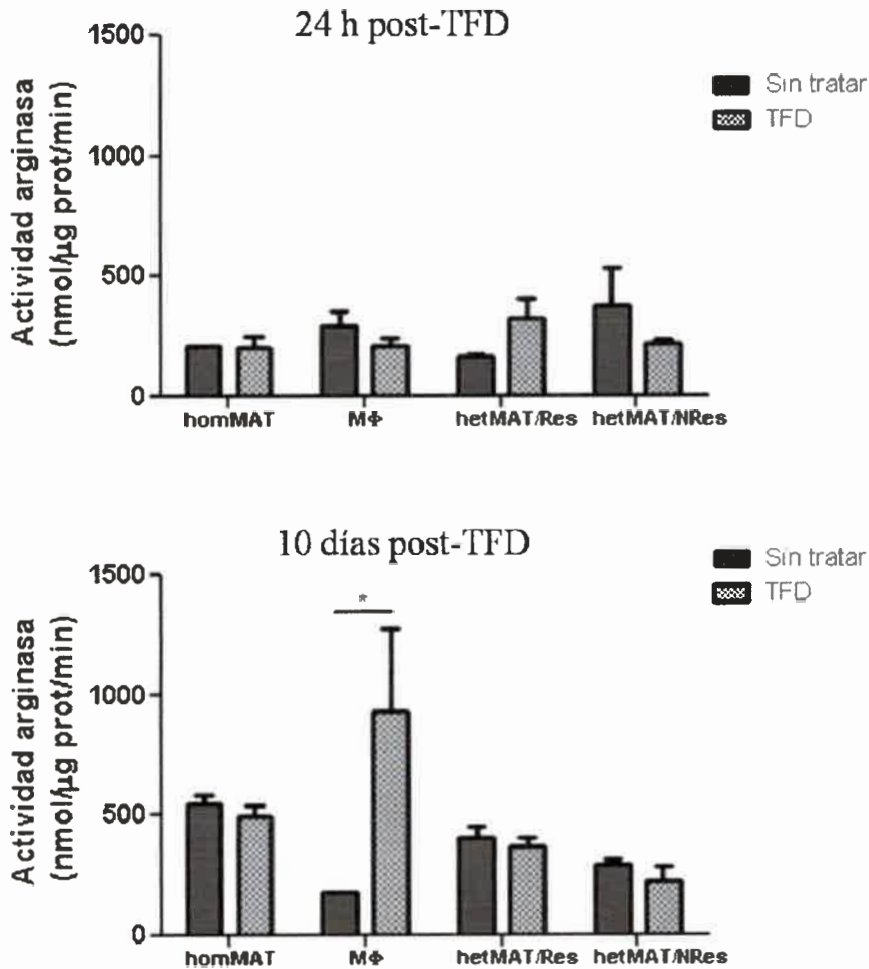


Figura 35: La actividad arginasa fue medida en el extracto proteico total. Una unidad de actividad enzimática fue definida como nmol de urea metabolizada por mg de proteína por minuto. Análisis estadístico: Two-way ANOVA, Bonferroni post-Test, * $p < 0.05$. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT/NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

En primer lugar, es importante tener en cuenta que el impacto de la TFD sólo aumentó significativamente la actividad arginasa a los 10 días post-tratamiento en comparación al control no tratado de los macrófagos ($P < 0,05$). Este resultado sugiere que la TFD induce fenotipo de macrófagos M2. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, en ninguna de las condiciones de tratamiento del microambiente tumoral se observa cambio en la actividad arginasa. Estos resultados sugieren además, que es la célula tumoral quien finalmente condiciona el efecto que tendrá la TFD sobre la población de macrófagos en cuanto a su perfil de expresión.

4.10. Determinación de la producción de citoquinas IL-6 y TNF- α en las diferentes plataformas de cultivo tratadas con TFD.

Como ya se ha mencionado, uno de los mecanismos disparados por la TFD es la inducción de una fuerte respuesta inflamatoria que puede conducir el desarrollo de inmunidad sistémica. La producción diferencial de citoquinas es una característica relevante de la polarización de macrófagos³⁸. Teniendo en cuenta que la mayoría de los reportes sobre la producción de moduladores inmunológicos en respuesta a la terapia se desarrollaron en modelos de monocultivos, en este trabajo de tesis fue analizada la liberación de citoquinas pro-inflamatorias asociadas al perfil M1 en los modelos de cocultivos en los que se mantiene el contacto célula-célula presente en el microambiente tumoral.

La liberación de citoquinas pro-inflamatorias derivadas de macrófagos como TNF- α mejora la respuesta inmune, aumentando la extravasación y activación de neutrófilos en el sitio de la lesión. Por ello, fue determinada su expresión en los medios condicionados de macrófagos y MAT homotípicos y heterotípicos intervenidos con TFD. Como controles se utilizaron los medios condicionados provenientes de su contraparte no tratada (Figura 36).

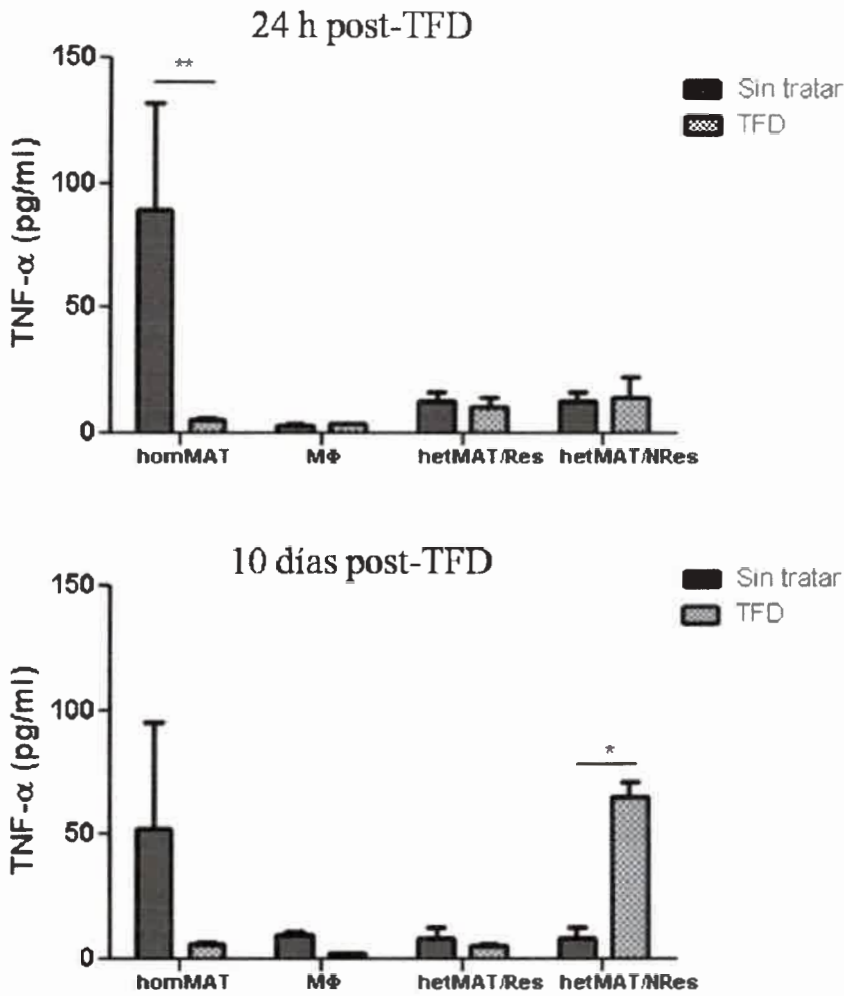


Figura 36. Producción de TNF- α de esferoides homotípicos y heterotípicos sometidos o no a TFD. Análisis estadístico: Two-way ANOVA, Bonferroni post-Test, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT/NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

Los resultados obtenidos demostraron que la intervención fotodinámica solo incrementa de forma significativa la secreción de TNF- α en hetMAT/NRes a los 10 días post-tratamiento ($P < 0,05$).

La IL-6 es otra de las citoquinas que también desempeña un papel relevante en la defensa inmunológica, promoviendo la diferenciación de linfocitos B en células secretoras

de anticuerpos y proliferación de linfocitos T, favoreciendo la inducción de una respuesta inmunológica sistémica anti-tumoral. Por lo tanto fue determinada también en los medios condicionados de macrófagos y MAT homotípicos y heterotípicos intervenidos con TFD. Como controles se utilizaron los medios condicionados provenientes de su contraparte no tratada (Figura 37).

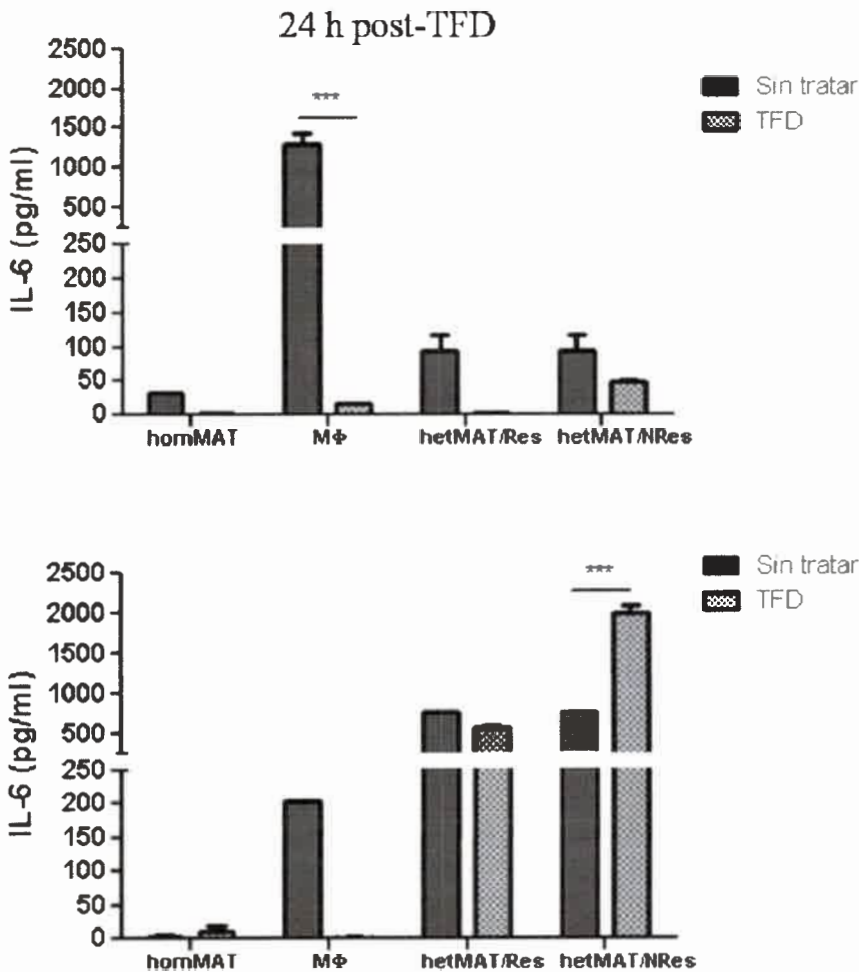


Figura 37. Producción de IL-6 de esferoides homotípicos y heterotípicos sometidos o no a TFD. Análisis estadístico: Two-way ANOVA, Bonferroni post-Test, ***: $p < 0.001$. Sin tratar: sin tratamiento fotodinámico; TFD: TFD a dosis de luz alta (0,3mM/0,7J/cm²), homMAT: microambiente tumoral homotípico, hetMAT / Res: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, hetMAT/NRes: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes.

Al igual que lo reportado por Xu y colaboradores, los macrófagos son los responsables de la elevada producción de IL-6 y no las células tumorales. La producción de niveles elevados de IL-6 por parte de los macrófagos se ve notablemente disminuida cuando se les aplica tratamiento fotodinámico.

Los resultados obtenidos demostraron que la intervención fotodinámica incrementa también de forma significativa la secreción de IL-6 en hetMAT/NRes a los 10 días post-tratamiento. Este perfil de expresión sugiere que la TFD podría inducir una polarización M1 en los macrófagos no residentes reclutados en un microambiente tumoral tratado.



Referencias

1. Hatakeyama T, Murayama Y, Komatsu S, et al. Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. *Oncol. Rep.* 2013;29(3):911–6.
2. Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature.* 2003;424(6951):870–2.
3. Mazzoleni G, Lorenzo D Di, Steimberg N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr.* 2009;4(1):13–22.
4. Pampaloni F, Reynaud E, Stelzer E. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(10):839–845.
5. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, et al. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol.* 2010;148(1):3–15.
6. Hamilton G, Westmorel C, George A. Effects of medium composition on the morphology and function of rat hepatocytes cultured as spheroids and monolayers. *Vitr. Cell Dev Biol Anim.* 2001;37(10):656–667.
7. O'Brien LE, Zegers MMP, Mostov KE. Opinion: Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(7):531–537.
8. Aranda V, Nolan M, Muthuswamy S. Par complex in cancer: a regulator of normal cell polarity joins the dark side. *Oncogene.* 2008;27(55):6878–6887.
9. Ivanov AI, Hopkins AM, Brown GT, et al. Myosin II regulates the shape of three-dimensional intestinal epithelial cysts. *J. Cell Sci.* 2008;121(Pt 11):1803–14.
10. Debnath J, Brugge JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(9):675–688.
11. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart L a. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat. Protoc.* 2009;4(3):309–24.
12. West C, Moore J. Flow cytometric analysis of intracellular hematoporphyrin derivative in human tumor cells and multicellular spheroids. *Photochem Photobiol.* 1989;50(5):665–669.
13. Dubessy C, Merlin J, Marchal C, Poincare H, Vautrin CA. Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2000;36:179 – 192.

14. Bigelow CE, Mitra S, Knuechel R, Foster TH. ALA- and ALA-hexylester-induced protoporphyrin IX fluorescence and distribution in multicell tumour spheroids. *Br. J. Cancer.* 2001;85(5):727–34.
15. Khaitan D, Chandna S, Arya MB, Dwarakanath BS. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *J. Transl. Med.* 2006;4:12.
16. West CM. Size-dependent resistance of human tumour spheroids to photodynamic treatment. *Br J Cancer.* 1989;59(4):510–4.
17. West C, Moore J. Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: a flow cytometry study. *Photochem Photobiol.* 1992;55(3):425–430.
18. Yoo J, Lim Y, Kim Y, Ha K. Differential cytotoxic responses to low- and high-dose photodynamic therapy in human gastric and bladder cancer cells. *J Cell Biochem.* 2011;112(10):3061–3071.
19. Mackenzie G, Dunn J, Selvasekar C, et al. Optimal conditions for successful ablation of high-grade dysplasia in Barrett's oesophagus using aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2009;24(5):729–734.
20. Bissonnette R, Sharfaei S, Viau G, Liu Y. Irradiance and light dose influence histological localization of photodamage induced by photodynamic therapy with aminolaevulinic acid. *Br J Dermatol.* 2004;151(3):653–655.
21. Valcárcel M, Arteta B, Jaureguibeitia A, et al. Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis. *J Transl Med.* 2008;6:57.
22. Lichtenbeld H, Blijham G. Tumor cell spheroids induce a mitogenic response in endothelial cells. *EXS.* 1992;61:261–265.
23. Acker H, Pietruschka F, Deutscher J. Endothelial cell mitogen released from HT29 tumour cells grown in monolayer or multicellular spheroid culture. *Br J Cancer.* 1990;62(3):376–377.
24. Liao D, Johnson R. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26:281–290.
25. Benstead K, Moore J V. Quantitative histological changes in murine tail skin following photodynamic therapy. *Br J Cancer.* 1989;59(4):503–509.
26. Peddareddigari VG, Wang D, Dubois RN. The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer Microenviron.* 2010;3(1):149–66.

27. Ungefroren H, Sebens S, Seidl D, Lehnert H, Hass R. Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Commun Signal*. 2011;9(1):18.
28. Rumie Vittar NB, Lamberti MJ, Pansa MF, et al. Ecological photodynamic therapy: new trend to disrupt the intricate networks within tumor ecosystem. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013;1835(1):86–99.
29. Cammarota R, Bertolini V, Pennesi G, et al. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *J. Transl. Med*. 2010;8(1):112.
30. Hauptmann S, Zwadlo-Klarwasser G, Jansen M, Klosterhalfen B, Kirkpatrick CJ. Macrophages and multicellular tumor spheroids in co-culture: a three-dimensional model to study tumor-host interactions. Evidence for macrophage-mediated tumor cell proliferation and migration. *Am. J. Pathol*. 1993;143(5):1406–15.
31. Fang C, Man Y-G, Cuttitta F, et al. Novel Phenotypic Fluorescent Three-Dimensional Co-Culture Platforms for Recapitulating Tumor *in vivo* Progression and for Personalized Therapy. *J. Cancer*. 2013;4(9):755–63.
32. Palm M, Wehner J, Okabe M, Ikawa M, Horneck G. Green fluorescent protein (GFP) as a marker for cell viability after UV irradiation. 1999;9(1):37–43.
33. Wu P. Cancer related Inflammation and tumor angiogenesis. In: Ran DS, ed. *Tumor angiogenesis*.; 2012.
34. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:250–281.
35. Lambert B, Ridder L De, Vos F De, et al. Assessment of supra-additive effects of cytotoxic drugs and low dose rate irradiation in an *in vitro* model for hepatocellular carcinoma. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84(10):1021–8.
36. Hirschberg H, Sun C-H, Krasieva T, Madsen SJ. Effects of ALA-mediated photodynamic therapy on the invasiveness of human glioma cells. *Lasers Surg. Med*. 2006;38(10):939–45.
37. Green CE, Liu T, Montel V, et al. Chemoattractant signaling between tumor cells and macrophages regulates cancer cell migration, metastasis and neovascularization. *PLoS One*. 2009;4(8):e6713.
38. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23(11):549–55.



Discusión y Conclusiones

Discusión y Conclusiones

Aunque el tratamiento con ALA-TFD es considerado una estrategia antitumoral altamente prometedora¹, aún se están desarrollando investigaciones pre-clínicas y clínicas sobre el uso de su derivado metilado, ALA-Met. En la actualidad siguen siendo necesarios estudios más detallados sobre los mecanismos moleculares de la citotoxicidad de este FS para comprender mejor los resultados terapéuticos que podrían traducirse en regímenes de tratamiento más eficaces.

En el presente trabajo, en primera instancia, se analizó la efectividad del tratamiento en dos líneas diferentes de cáncer colorrectal con diferente grado de diferenciación celular. Células de CCR más diferenciadas Caco-2 sujetas a tratamiento fotodinámico con ALA-Met-TFD en un cultivo en monocapa resultaron ser más resistentes a esta terapia que células SW480 más indiferenciadas (Figura 2 y 4; Tabla 1). Esto puede deberse a la diferencia en la producción de PpIX en ambas líneas celulares. Fue previamente reportado que hay una diferencia en la actividad de enzimas clave en la ruta biosintética del hemo, responsable de la producción de PpIX, en líneas con diferente grado de diferenciación celular. Estos estudios demostraron que el contenido de PpIX intracelular está principalmente determinado por la actividad de las enzimas porfobilinógeno deaminasa (PBGD) y ferroquelatasa (FC) en células de cáncer de colon. Posiblemente la mayor sensibilidad de las células SW480 sea consecuencia del aumento en la actividad de la enzima PBGD, lo que genera una mayor acumulación de PpIX, mientras que en células Caco-2 se evidencia un aumento en la actividad de la enzima FC, removedora de PpIX².

Si bien numerosos estudios han examinado el uso de la TFD para erradicar pólipos en el tracto intestinal así como también diferentes tumores colorrectales, su uso está todavía bajo estudios experimentales debido a la falta de datos que apoyen su aplicación, la mayoría de los cuales han sido desarrollados en modelos en monocapa utilizando una única línea celular y ALA como fotosensibilizador³.

Con la finalidad de aportar nuevos conocimientos sobre el efecto de la TFD aplicando ALA-Met como FS, en este trabajo de Tesis se ha desarrollado un modelo de estudio de mayor complejidad para determinar el grado de importancia de la arquitectura

tumoral en el tratamiento del cáncer de colon. Para los estudios desarrollados en este trabajo fueron diseñados modelos de cultivo tridimensional utilizando el cultivo celular como esferoides. Estos permiten recapitular al menos en parte el microambiente tumoral presente en modelos *in vivo*. La arquitectura tridimensional en los esferoides imita un tumor avascular, en el que se establece un gradiente de difusión, una reducción en la tasa de proliferación e incremento en la resistencia a drogas.

En cuanto a su incidencia en la respuesta al tratamiento, mediante el análisis comparativo de los modelos de cultivo 2D y 3D hemos demostrado que los cultivos tridimensionales muestran mayor resistencia a la TFD, siendo las células más resistentes las que se encuentran en el centro del esferoide (Figura 11 y 12, Tabla 3). Estos resultados son comparables a los obtenidos por *West y colaboradores*, quienes demostraron que esferoides de células de carcinoma de colon humano fueron más resistentes al tratamiento con Hpd-TFD comparados con su contraparte en monocapa^{4,5}.

Como ya hemos mencionado, la concentración y óptima producción del FS endógeno es uno de los parámetros que condiciona la respuesta al tratamiento. Para nuestro modelo de estudio, la cinética de producción del FS endógeno PpIX en los esferoides es dependiente del tiempo de incubación con la prodroga (Figura 10). Esta característica, similar a lo que podría acontecer *in vivo*, demuestra que la arquitectura tumoral gobierna y limita la incorporación de ALA-Met condicionando la producción del FS propiamente dicho, por lo que resulta un factor clave para considerar al momento de evaluar la eficiencia de un tratamiento antitumoral.

Por otro lado, el conocimiento sobre eventos claves de la biología del desarrollo del cáncer aporta información relevante que debe considerarse si se pretende erradicar el tumor de forma eficaz. El estudio sobre esferoides tumorales intenta recrear lo que acontece dentro de los tumores sólidos en donde se genera un gradiente de oxígeno negativo desde la periferia hacia el centro, debido principalmente a la incapacidad de la vasculatura tumoral de suplir de oxígeno y otros nutrientes a la masa tumoral en crecimiento desmedido⁶. La hipoxia (disminución de la presión de oxígeno) que caracteriza a las neoplasias en expansión es reguladora clave de etapas que conducen a la célula tumoral al fenotipo maligno, como lo es la iniciación de la angiogénesis⁷. Para que se lleve a cabo el proceso de angiogénesis, se requiere del re-direccionamiento del perfil transcripcional de las células

neoplásicas hacia la inducción de un grupo de genes que codifican para factores solubles que se secretan y conforman la estimulación parácrina tumoral sobre la células endotelial (CE)⁸. El principal factor liberado por la célula tumoral y que gobierna el “*switch angiogénico*” es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). En este sentido, y al igual que lo reportado por varios investigadores^{9,10}, hemos demostrado que hay un aumento en la expresión de VEGF por parte de las células de cáncer de colon crecidas como esferoides en comparación a su contraparte en monocapa (Figura 13). En este sentido, se ha reportado que medios condicionados de esferoides de células de cáncer colorrectal aumentan la capacidad mitogénica de células endoteliales^{11,12}. En nuestros estudios, hemos demostrado que los esferoides de células de cáncer colorrectal no tratados con TFD aumentan significativamente la proliferación de CE (Figura 14).

Teniendo en cuenta el éxito limitado que han tenido las terapéuticas convencionales (cirugía, radio y quimioterapia) aplicadas al CCR, ha surgido la necesidad de la comprensión del microambiente tumoral y su contribución precisa en la respuesta a las terapias. En el contexto del CCR se ha propuesto a la TFD como apropiada para prevenir la recurrencia local después de la escisión del tumor. Si bien se han reportado casos de erradicación de la enfermedad, otros datos revelan una respuesta completa al tratamiento (individuos libres de tumor) dentro de las primeras semanas, y recurrencia a largo plazo¹³. Este pronóstico desfavorable podría ser consecuencia del daño vascular observado luego de la aplicación del tratamiento y del consumo fotoquímico de oxígeno involucrado en su mecanismo de acción. Estos eventos han señalado a la TFD como inductora de hipoxia y por lo tanto inductora de angiogénesis post-tratamiento^{14,15}. Los gradientes de concentración de oxígeno característicos de los tumores, y que pueden imitarse en los cultivos tridimensionales, generan poblaciones heterogéneas de células que difieren en la respuesta a las terapias dependientes del oxígeno, tales como la TFD. Se observó en colas de ratones inyectadas con meso-tetra(sulfonafenil) porfirina y luego irradiadas un incremento en el número de vasos sanguíneos a dosis de luz bajas, pero no cuando fueron iluminadas a dosis que desencadenaban eventos necróticos¹⁶.

En nuestro esquema de tratamiento, analizando la respuesta biológica asociada a los eventos claves de la angiogénesis, hemos demostrado que sólo la TFD a dosis de luz baja (daño citotóxico menor) desencadena un aumento significativo de la proliferación (Figura

14) y capacidad de formar tubulos de las CE (Figura 15). Estos resultados sugieren que la TFD podría modificar propiedades inherentes al proceso angiogénico de forma dependiente de la dosis de luz empleada, por lo cual este parámetro podría estar definiendo el éxito de la terapia. Consideramos por ello, que el protocolo de tratamiento más prometedor fue cuando aplicamos dosis de luz altas ($0,7\text{J}/\text{cm}^2$), ya que con esta condición se genera una notable mortalidad tumoral (aproximadamente un 70%) y no desencadena una fuerte inducción de angiogénesis post-tratamiento. En este sentido, confirmamos mediante PCR real time que el satisfactorio efecto biológico observado aplicando este protocolo de tratamiento podría ser consecuencia de la marcada reducción en la expresión de VEGF observada en esta condición (Figura 16).

Por lo tanto nos resultó interesante continuar evaluando en el contexto del microambiente tumoral la dosis de tratamiento letal que involucra la aplicación de $0,3\text{mM}$ de ALA-Met y $0,7\text{J}/\text{cm}^2$.

El microambiente tumoral (MAT), que involucra a las células estromales (fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, entre otras), la matriz extracelular, y procesos tales como angiogénesis y respuesta inmune, puede tener efectos significativos sobre el crecimiento, la diseminación del tumor y consecuentemente en la respuesta a las terapias antitumorales. Particularmente con la TFD se ha demostrado que este tipo de terapia tiene una fuerte influencia sobre células del sistema inmune y en la expresión de sus reguladores inmunológicos y esto está fuertemente asociado a la dosis de tratamiento aplicada.

Una de las poblaciones más abundantes del estroma tumoral son los macrófagos¹⁷, comúnmente denominados macrófagos asociados a tumor (TAMs), localizados en estrecha proximidad del tumor o dentro de la masa tumoral¹⁸. Los TAMs modulan la respuesta inmune, la angiogénesis y la migración de células tumorales mediante la producción de citquinas y factores de crecimiento específicos. Esta población celular se caracteriza por su capacidad de adoptar fenotipos diferentes que cumplen funciones antagónicas durante el desarrollo neoplásico. La subpoblación conocida como M1 muestra un fenotipo fagocítico en respuesta al interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$) y cumple funciones antitumorales y pro-inflamatorias mediante la producción de óxido nítrico, IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$). Por otro lado, la subpoblación M2 se asocia con la promoción del

crecimiento del tumor por producción de citoquinas tales como IL-10 y factores angiogénicos tales como VEGF y FGF, entre otros¹⁹.

Estudios realizados sobre muestras clínicas de cáncer de vejiga²⁰, mama²¹, próstata²², cuello uterino²³ y glioma²⁴, demostraron que la presencia de macrófagos en el tejido tumoral y que ejercen un fenotipo pro-tumoral, está asociado al pronóstico desfavorable de este tipo de tumores. Contrariamente, en el cáncer colorrectal, los macrófagos desarrollan un perfil pro-inflamatorio fuertemente anti-tumoral y se asocian a una buena prognosis²⁵. En este sentido, se ha reportado además que en los estadios más avanzados de este tipo de tumores es donde ocurre menor infiltración de macrófagos^{26,27}.

En la última década, el desarrollo terapéutico ha mejorado las tasas de supervivencia para los pacientes con CCR metastásico y existen muchas más opciones de tratamiento para la enfermedad avanzada que incluyen una combinación de quimioterapia con terapia dirigida²⁸. Sin embargo, muchas de estas terapias tienen efecto limitado, por lo que es necesario explorar en el entendimiento más profundo de los factores que subyacen a la progresión del cáncer. El éxito limitado logrado por sólo atacar a las células tumorales pone de relieve la importancia de comprender el papel del microambiente tumoral y su precisa contribución a la eficacia de las terapias antineoplásicas. Como ya se mencionó, uno de los campos prometedores en el tratamiento de CCR es el desarrollo de regímenes inmunomoduladores²⁹.

En este sentido, el tratamiento antitumoral ideal debería unificar la acción citotóxica directa sobre la célula tumoral con un potente efecto inmunoestimulante de células efectoras inmunes que reconozcan determinantes moleculares inmunogénicos en las células que mueren.

La capacidad de un tratamiento de inducir una muerte celular inmunogénica (ICD, del inglés "*Immunogenic Cell Death*") es clínicamente relevante ya que se asocia a una respuesta inmune contra el tumor reforzando el efecto terapéutico. La TFD es una novedosa modalidad de tratamiento que sin duda se asocia a la inducción de ICD en células cancerígenas³⁰. La erradicación del tumor esta mediada por las fuertes reacciones inflamatorias inducidas por la TFD mediante la cual se recluta rápidamente células inmunes al sitio tumoral tratado. Varios reportes sugieren que la eliminación de las células tumorales sobrevivientes al tratamiento fotodinámico directo se lleva a cabo gracias a la infiltración

de linfocitos y macrófagos en el tejido fotosensibilizado como consecuencia de la activación de una respuesta inmune posterior al tratamiento³⁰.

En este contexto, los macrófagos se consideran un arma de doble filo, ya que debido a su plasticidad funcional pueden desempeñar roles críticos en la destrucción final del tumor o bien promover su recurrencia³¹. Sin embargo, la correlación entre la presencia de los diferentes linajes de macrófagos en los diferentes escenarios que caracterizan el MAT colorrectal y el éxito del tratamiento fotodinámico es aún una cuestión controversial. Por lo tanto la hipótesis central de este estudio fue que el resultado de la TFD es influenciado en forma sustancial por la heterogeneidad de los macrófagos presentes.

Sin embargo, para representar apropiadamente el MAT, además de contemplar el crecimiento en un contexto tridimensional, para reflejar con mayor precisión el microambiente tumoral, debería incluirse a las poblaciones que forman parte del estroma tumoral. Por ello, en este trabajo de Tesis, fue desarrollado un modelo de co-cultivo 3D de cáncer colorrectal con la finalidad de evaluar la interacción entre macrófagos y células tumorales. Mediante la utilización de una línea celular de cáncer colorrectal transfectada de forma estable con GFP, el fenotipo de la célula tumoral fue preservado y permitió la discriminación de la población estromal en el microambiente heterotípico *in vitro* (Figura 18).

Previamente ha sido reportado que, los macrófagos en los tumores malignos se acumulan en áreas específicas y no al azar en el tejido neoplásico³². En el sistema de co-cultivo 3D utilizado en este trabajo, las células tumorales se cultivaron como esferoides y el contacto con los macrófagos fue sólo en la superficie de dicha estructura (Figura 18). Esto se asemeja a lo que acontece *in vivo*, donde se encontró que los macrófagos asociados a tumores predominan en la interfase tumor-estroma³². Desafortunadamente, esta plataforma de co-cultivo heterotípico perdió integridad cuando fue manipulada experimentalmente por lo que no fue posible establecer una interacción física tumor-estroma estable (Figura 19).

Los macrófagos residentes de tejidos, a excepción de las células de Langerhans en la piel y la microglía en cerebro, derivan de monocitos reclutados desde sangre periférica³³. Del mismo modo, los TAM derivan de monocitos circulantes o macrófagos residentes de tejido y ha sido reportado que los diferentes fenotipos de macrófagos tienen distintos efectos sobre células de tumor colorrectal³⁴.

Para desarrollar las plataformas experimentales utilizadas en este estudio, fue relevante considerar esta heterogeneidad de la población de macrófagos. Por ello, se diseñaron modelos de microambiente tumoral heterotípicos que contemplen tales condiciones (Figura 20). En primer lugar, MAT heterotípicos con macrófagos residentes (hetMAT/Res) permitieron la interacción física y parácrina entre las células tumorales y estroma antes del tratamiento con TFD, simulando a los macrófagos asociados a tumores. Por otro lado, en el MAT heterotípico con macrófagos no residentes (hetMAT/NRes), los esferoides tumorales fueron sometidos a terapia fotodinámica en ausencia de macrófagos. De este modo, los macrófagos en el hetMAT/NRes representan células inmunes que infiltran el tumor después del tratamiento.

Por lo tanto, el propósito de este estudio fue investigar la respuesta de los diferentes escenarios que caracterizan el MAT colorrectal a la fotosensibilización en presencia de macrófagos residentes o infiltrantes del tumor.

Debido a la plasticidad funcional de los TAMs, esta población desempeña un complejo y crítico rol en el resultado del tratamiento fotodinámico de tumores³¹.

Aun cuando no se observó una diferencia significativa en la reducción de la viabilidad celular entre los homMAT, hetMAT/Res y hetMAT/NRes a las 24h post-tratamiento (Figura 22 y 24), la presencia de macrófagos incidió en la tasa de apoptosis en los MAT fotosensibilizados (Figura 25). La disminución del porcentaje de células apoptóticas tempranas y tardías en hetMAT/Res y hetMAT/NRes post-TFD sugiere que la presencia de macrófagos activa un tipo de muerte celular no apoptótico.

Sin embargo, cuando se evaluó la respuesta a largo plazo al tratamiento fotodinámico el crecimiento del tumor fue inhibido fuertemente por la presencia de macrófagos (Figura 28). La capacidad de crecimiento radial de esferoides ha sido reportada previamente como parámetro para determinar la migración celular, la cual se asocia generalmente a un fenotipo más metastásico^{35,36}. Nuestros estudios permitieron demostrar que la intervención fotodinámica suprime la migración de las células tumorales en hetMAT/NRes, pero se exagera en hetMAT/Res tratados con TFD (Figura 30).

En concordancia con nuestros resultados, se ha reportado que la respuesta a la TFD por parte de macrófagos puede resultar en la regresión completa del tumor³⁷ o su recurrencia con posterioridad al tratamiento por estimulación del proceso angiogénico³⁸.

La migración de las células endoteliales es uno de los eventos más importante que se requiere para iniciar la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura preexistente³⁹. En el presente trabajo, se demostró que la promoción de la migración de células tumorales en hetMAT/Res fotosensibilizados (Figura 30) se asoció con una inducción de la migración endotelial (Figura 31). Además, la TFD en esta condición suprime la liberación de óxido nítrico, una molécula asociada al perfil pro-inflamatorio M1 (Figura 34). Debido a que los macrófagos con perfil M2 presentan propiedades anti-inflamatorias, pro-angiogénicas y pro-oncogénicas, estos datos sugieren que los macrófagos presentes en hetMAT/Res tratados con TFD responden de acuerdo a macrófagos bajo una polarización de tipo M2, los que cuales resultan ser moduladores críticos de la promoción del microambiente tumoral.

Se ha informado que las lesiones fotooxidativas de los lípidos de las membranas celulares empleando fotosensibilizantes porfirínicos desencadenan la activación de mediadores de la inflamación que atraen macrófagos al sitio tumoral y que éstos, dependiendo del contexto fisiológico imperante, pueden favorecer la eliminación de células tumorales o su activación⁴⁰. En este contexto, se ha reportado que la TFD desencadena una fuerte inducción en la secreción de TNF- α e IL-6 y esto ha sido asociado con una respuesta inmune antitumoral⁴¹. Aquí hemos demostrado que después de la intervención fotodinámica de hetMAT/NRes, el crecimiento del tumor es fuertemente inhibido (Figura 28) y no hay inducción de migración tumoral (Figura 30). Este hecho se puede explicar, al menos en parte, por un aumento en la liberación de mediadores pro-inflamatorios, tales como IL-6, TNF- α y ON (Figura 36 y 37). Nuestros resultados son coincidentes con estudios que indican que tumores de cáncer colorrectal infiltrados por macrófagos que expresan iNOS, y por lo tanto un aumento en la producción de ON, presentan un pronóstico mucho más favorable²⁵. Teniendo en cuenta que los macrófagos con perfil M1 están implicados en la respuesta inflamatoria y la inmunidad antitumoral, es posible que la TFD induzca polarización M1 en los macrófagos que habitan en hetMAT/NRes. Estos resultados son consistentes con lo observado en varios ensayos *in vitro* e *in vivo* los cuales sugieren que dosis letales de TFD permiten suprimir la actividad estimulante de los macrófagos en el crecimiento tumoral.

CONCLUSIONES

Comportamiento de los hetMAT/Res fotosensibilizados

- Disminuyen el porcentaje de células apoptóticas
- Disminuyen la supervivencia celular
- Estimulan la migración de la célula tumoral
- Aumentan la migración de células endoteliales

Comportamiento de los hetMAT/NRes fotosensibilizados

- Disminuyen el porcentaje de células apoptóticas
- Disminuyen la viabilidad y supervivencia tumoral
- Estimulan la migración de macrófagos
- Estimulan la producción de óxido nítrico, TNF- α e IL-6.

En la Figura 1 del presente capítulo se ilustra esquemáticamente un resumen del comportamiento de hetMAT/Res y hetMAT/NRes fotosensibilizados sobre el crecimiento y diseminación tumoral, angiogénesis y respuesta inflamatoria observados en nuestros estudios.

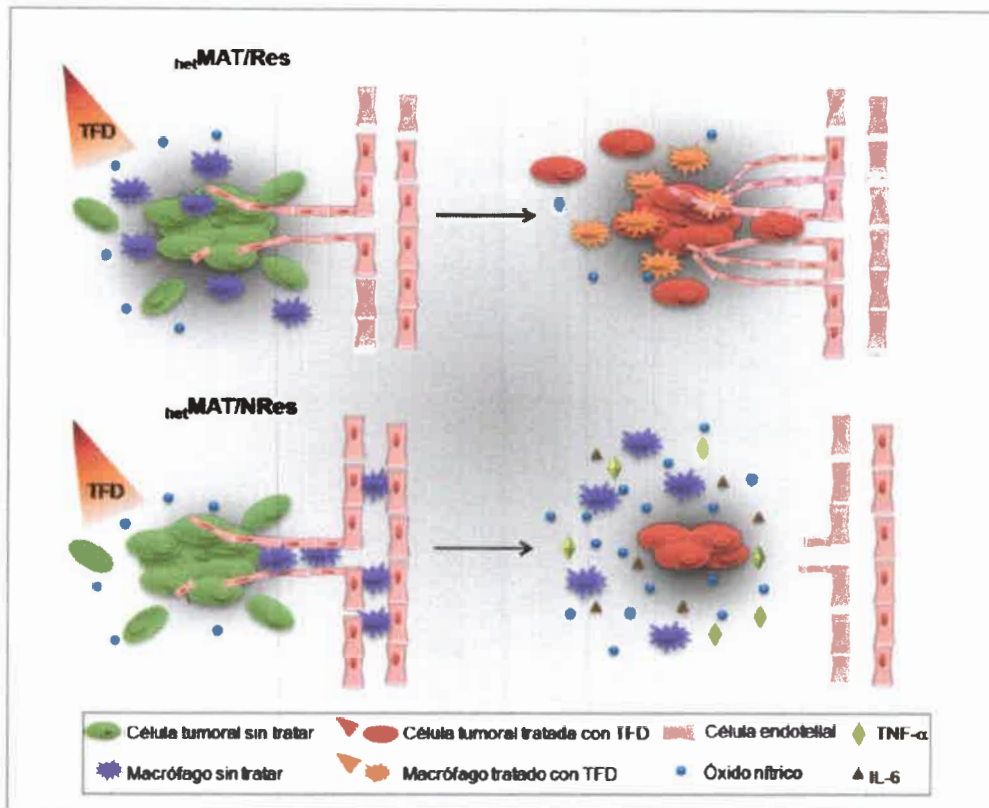


Figura 1. Ilustración esquemática del comportamiento de *hetMAT/Res* y *hetMAT/NRes* fotosensibilizados sobre el crecimiento tumoral, la migración tumoral y la angiogénesis. Los *hetMAT/Res* tratados con TFD muestran una disminución a largo plazo del crecimiento del esferoide tumoral, pero al mismo tiempo inducen migración de la célula tumoral y endotelial y supresión de la producción de ON. Por otro lado, la TFD también inhibió el crecimiento de *hetMAT/NRes* pero sin inducir migración endotelial y/o tumoral. La secreción de mediadores proinflamatorios (IL-6, TNF- α y ON) fue incrementada en *hetMAT/NRes* tratados con TFD. *homMAT*: microambiente tumoral homotípico; *hetMAT/Res*: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos residentes, *hetMAT/NRes*: microambiente tumoral heterotípico con macrófagos no residentes, TFD: terapia fotodinámica, IL-6: Interleucina-6, TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa, ON: óxido nítrico.

En conclusión, los macrófagos resultan ser de gran importancia en la respuesta de los tumores a la TFD, debido a su rol multifuncional en eventos de promoción o supresión tumoral. Sobre la base de estos resultados, resultaría alentador el desarrollo de una estrategia terapéutica que amplifique la actividad de los macrófagos, eliminando de forma selectiva TAMs residentes (perfil M2) y favoreciendo el reemplazo de esta población por macrófagos M1.

Referencias

1. Wachowska M, Muchowicz A, Firczuk M, et al. Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. *Molecules*. 2011;16(5):4140–4164.
2. Krieg RC, Messmann H, Rauch J, Seeger S, Knuechel R. Metabolic characterization of tumor cell-specific protoporphyrin IX accumulation after exposure to 5-aminolevulinic acid in human colonic cells. *Photochem. Photobiol.* 2002;76(5):518–25.
3. Hatakeyama T, Murayama Y, Komatsu S, et al. Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. *Oncol. Rep.* 2013;29(3):911–6.
4. West CM. Size-dependent resistance of human tumour spheroids to photodynamic treatment. *Br J Cancer*. 1989;59(4):510–4.
5. West C, Moore J. Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: a flow cytometry study. *Photochem Photobiol.* 1992;55(3):425–430.
6. Bertout J, Patel S, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2008;8(12):967–975.
7. Rohwer N, Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat.* 2011;14(3):191–201.
8. Herbert SP, Stainier DYR. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(9):551–564.
9. Sonoda T, Kobayashi H, Kaku T, Hirakawa T, Nakano H. Expression of angiogenesis factors in monolayer culture, multicellular spheroid and in vivo transplanted tumor by human ovarian cancer cell lines. *Science (80-.).* 2003;196:229–237.
10. Valcárcel M, Arteta B, Jaureguibeitia A, et al. Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis. *J Transl Med.* 2008;6:57.
11. Lichtenbeld H, Blijham G. Tumor cell spheroids induce a mitogenic response in endothelial cells. *EXS.* 1992;61:261–265.
12. Acker H, Pietruschka F, Deutscher J. Endothelial cell mitogen released from HT29 tumour cells grown in monolayer or multicellular spheroid culture. *Br J Cancer.* 1990;62(3):376–377.

13. Shishkova N, Kuznetsova O, Berezov T. Photodynamic Therapy in Gastroenterology. *J Gastrointest Cancer*. 2013;44(3):251–259.
14. Allison R, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc*. 2013;46(1):24–29.
15. Bhuvaneswari R, Gan YY, Lucky SS, et al. Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy. *Mol Cancer*. 2008;7:56.
16. Benstead K, Moore J V. Quantitative histological changes in murine tail skin following photodynamic therapy. *Br J Cancer*. 1989;59(4):503–509.
17. Erreni M, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) and inflammation in colorectal cancer. *Cancer Microenviron*. 2011;4:141–154.
18. Forssell J, Öberg Å, Henriksson ML, et al. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin. Cancer Res*. 2007;13(24):1472–1479.
19. Galli SJ, Borregaard N, Wynn T a. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol*. 2011;12(11):1035–44.
20. Hanada T, Nakagawa M, Emoto A, et al. Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *Int J Urol*. 2000;7(7):263–269.
21. Leek R, Lewis C, Whitehouse R, et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*. 1996;56(20):4625–4629.
22. Lissbrant I, Stattin P, Wikstrom P, et al. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int J Oncol*. 2000;17(3):445–451.
23. Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I, Tamaya T. Clinical implications of expression of interleukin 8 related to angiogenesis in uterine cervical cancers. *Cancer Res*. 2000;60(10):2632–2635.
24. Nishie A, Ono M, Shono T, et al. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res*. 1999;5(5):1107–1113.
25. Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, et al. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PLoS One*. 2012;7(10):e47045.
26. Håkansson L, Adell G, Boeryd B, Sjögren F, Sjö Dahl R. Infiltration of mononuclear inflammatory cells into primary colorectal carcinomas: an immunohistological analysis. *Br. J. Cancer*. 1997;75:374–380.
27. Nakayama Y, Nagashima N, Minagawa N, et al. Relationships between tumor-associated macrophages and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2002;22(6c):4291–4296.

28. Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*. 2014;1(6):400–406.
29. Pernot S, Terme M, Voron T, et al. Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014;20(14):3738–3750.
30. Panzarini E, Inguscio V, Dini L. Immunogenic Cell Death: Can It Be Exploited in PhotoDynamic Therapy for Cancer? *Biomed Res. Int.* 2013;2013:1–18.
31. Korbelyk M, Hamblin MR. The impact of macrophage-cancer cell interaction on the efficacy of photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015.
32. Hauptmann S, Zwadlo-Klarwasser G, Hartung P, et al. Association of different macrophage phenotypes with infiltrating and non-infiltrating areas of tumor-host interface in colorectal carcinoma. *Pathol Res Pr.* 1994;190(2):159–167.
33. Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (80-)*. 2010;327:656–661.
34. Hauptmann S, Zwadlo-Klarwasser G, Jansen M, Klosterhalfen B, Kirkpatrick CJ. Macrophages and multicellular tumor spheroids in co-culture: a three-dimensional model to study tumor-host interactions. Evidence for macrophage-mediated tumor cell proliferation and migration. *Am. J. Pathol.* 1993;143(5):1406–15.
35. Lambert B, Ridder L De, Vos F De, et al. Assessment of supra-additive effects of cytotoxic drugs and low dose rate irradiation in an in vitro model for hepatocellular carcinoma. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006;84(10):1021–8.
36. Hirschberg H, Sun C-H, Krasieva T, Madsen SJ. Effects of ALA-mediated photodynamic therapy on the invasiveness of human glioma cells. *Lasers Surg. Med.* 2006;38(10):939–45.
37. Korbelyk M, Cecic I. Contribution of myeloid and lymphoid host cells to the curative outcome of mouse sarcoma treatment by photodynamic therapy. *Cancer Lett.* 1999;137(1):91–98.
38. Deininger M, Weinschenk T, Morgalla M, Meyermann R, Schluesener H. Release of regulators of angiogenesis following Hypocrellin-A and -B photodynamic therapy of human brain tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298(520-530).
39. Lamalice L, Boeuf F Le, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ. Res.* 2007;100:782–794.
40. Nowis D, Stoklosa T, Legat M, et al. The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2(4):283–298.
41. Kick G, Messer G, Plewig G, Kind P, Goetz AE. Strong and prolonged induction of c-jun and c-fos proto-oncogenes by photodynamic therapy. 1996:30–36.

PUBLICACIONES

- "Contribution of resident and recruited macrophages to the photodynamic intervention of colorectal tumor microenvironment". **María Florencia Pansa^a**, María Julia Lamberti^a, Ingrid Sol Cogno^a, Silvia Graciela Correa^b, Natalia Belén Rumie Vittar^{a**} and Viviana Alicia Rivarola^{a**}. En revisión (Tumor Biology)

- "Photodynamic therapy potentiates the paracrine endothelial stimulation by colorectal cancer". María Julia Lamberti*, **María Florencia Pansa***, Renzo Emanuel Vera, Natalia Belén Rumie Vittar and Viviana Alicia Rivarola. Laser Phys. 2014. **24**: 115602 (8pp).

- "Cationic porphyrin derivatives for application in photodynamic therapy of cancer". Autores: Bárbara P. Prack McCormick*, **M. Florencia Pansa***, Laura N Milla Sanabria, Carla M B Carvalho, M Amparo F Faustino, Maria Graça P M S Neves, José A S Cavaleiro, Natalia B Rumie Vittar and Viviana A. Rivarola. Laser Phys. 2014. **24**: 045603 (8pp).

- "Ecological Photodynamic Therapy: New trend to disrupt the intricate networks within tumor ecosystem". Autores: Rumie Vittar NB*, Lamberti MJ*, **Pansa MF***, Vera RE, Rodríguez ME, Cogno IS, Milla Sanabria L, Rivarola VA. BBA Reviews on Cancer. 2013; 1835(1):86-99.

- "Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment". Autores: Milla Sanabria L*, Rodríguez ME*, Cogno IS*, Rumie Vittar NB, **Pansa MF**, Lamberti MJ, Rivarola VA. BBA Reviews on Cancer. 2013; 1835(1):36-45.

Capítulo de libro: 1

- Chapter 8. "Cell Death and Resistance Mechanisms Triggered by Photodynamic Therapy". Autores: Rivarola VA, Rumie Vittar NB, Lamberti MJ, Milla Sanabria L, **Pansa MF**, Fernandez IM, Cogno IS, Rodríguez ME. Libro: Photodynamic Therapy: New Research. Nova Science Publisher. 2013, **ISBN**: 978-1-62417-660-9.

PRESENTACIÓN A CONGRESOS CIENTÍFICOS

- "La hipoxia intratumoral como modulador de la resistencia a la terapia fotodinámica" (poster). Autores: Lamberti MJ, **Pansa MF**, Rumie Vittar NB, Rivarola V. SAIC, Mar del Plata, 20/11/2013.

- "Implicancia de poblaciones estromales asociadas al tumor en la respuesta a la terapia Fotodinámica en un modelo de cáncer de colon" (poster). Autores: **Pansa MF**, Lamberti MJ, Rumie Vittar NB, Rivarola V. SAIC, Mar del Plata; 21/11/2013.

- "Influencia de la arquitectura tumoral sobre la respuesta al tratamiento fotodinámico de células de cáncer de colon" (poster). Autores: Lamberti MJ, **Pansa MF**, Rumie Vittar NB,

Rivarola VA. Segunda reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos (IIGRAFOB), Córdoba, 22 al 25 de octubre 2013.

– “La terapia fotodinámica como moduladora de la interacción tumor-endotelio en carcinoma colorrectal” (póster). Autores: **Pansa MF**, Lamberti MJ, Rumie Vittar NB, Rivarola V. SAIC, Mar del Plata, 17/11/2011.

FINANCIAMIENTO

PICT-2011-1328, FONCyT (2011-2013). “Terapia fotodinámica en cáncer de piel y colon: estudios de resistencia y microambiente tumoral”.

PID 2010, MINCyT del Gobierno de Córdoba (2011-2013). “Efecto de la terapia fotodinámica sobre el microambiente tumoral como estrategia antineoplásica: valoración de la respuesta integral en modelos de cultivos tridimensional”. Miembro de equipo.

PPI, SECyT, UNRC (2011-2012). “Estudios in vitro de agentes fotosensibilizadores y su aplicación en terapia fotodinámica”.