

ASPÉCTOS IMUNOLÓGICOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA

Renata Alves de Oliveira Borges¹, Maria Angélica Gargione Cardoso¹,

¹Laboratório de Imunologia/ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D). Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Av. Shishima Hifumi, 2.911 – Urbanova, São José dos Campos – SP, Brasil, 12444-000. Fone: +55 3947 1120 Fax: +55 3947 1121

rborges@univap.br

Resumo - A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma tecnologia muito promissora para o tratamento do câncer, a qual utiliza uma fonte de luz, laser, e drogas fotossensíveis. Essas últimas acumulam-se preferencialmente no tecido doente. O fotossensibilizante utilizado foi uma ftalocianina de silício ($C_{44}H_{46}I_2N_{10}O_2Si$), sintetizada pelo Laboratório de Síntese Orgânica (IP&D/Univap). Embora a TFD seja um tratamento localizado, esta pode induzir efeitos sistêmicos nos tecidos linfóides secundários (baço, linfonodos, etc). Em nosso trabalho foram utilizados camundongos Balb/c injetados e.v. (veia da cauda) com o fotossensibilizante acima citado. Após 1 hora os animais foram contidos e irradiados com luz laser (thera laser®) na região do baço. Os animais (n=3) foram sacrificados em diferentes tempos: 0, 4, 8, 12, 24 e 48 horas após a irradiação com o laser. Os esplenócitos foram plaqueados (5×10^6 céls/mL) em meio RPMI 1640 completo estimulados ou não com Concanavalina A (Con-A) (SigmaTM). As placas foram incubadas por 24 e 48 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. A citocina IL-6 foi dosada com e sem estimulação da Con-A. A Ftalocianina de silício foi capaz de induzir uma produção de IL-6 sozinha e na presença de luz no tempo de 4h após a TFD.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Ftalocianina, Resposta Imune, Citocinas.

Área do Conhecimento: Engenharia

Introdução

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma tecnologia muito promissora para o tratamento do câncer, a qual utiliza uma fonte de luz ou laser, capaz de ativar drogas fotossensíveis (fotossensibilizante), essas por sua vez, acumulam-se preferencialmente no tecido doente (KWITNIEWSKI et al., 2005). Esta característica permite que a radiação atue somente na região afetada ou doente, elevando a possibilidade de sobrevivência dos pacientes para mais de 95%. O fotossensibilizante ao receber a radiação eletromagnética com comprimento de onda específico, na presença de oxigênio do meio, induz vários processos fotoquímicos envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio – ROS (1O_2 , O_2^{*-} , *OH , H_2O_2) os quais atacam centros dos sistemas celulares, desencadeando a morte dos tecidos tumorais ou apoptose celular (TAKEMURA et al., 1995; JACQUES, 1992). Três mecanismos importantes são responsáveis para uma efetiva TFD (Figura 1): (a) a célula tumoral morre diretamente devido à geração do oxigênio singlete ou das espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas após a ativação de um fotossensibilizante e luz; (b) os danos na vascularização do tumor; (c) a resposta imunológica pós-tratamento associada à estimulação dos leucócitos e a liberação de muitos mediadores inflamatórios como citocinas, fatores de crescimento, componentes do sistema complemento, proteínas de fase aguda e outros imunoreguladores (KWITNIEWSKI et al., 2005).

A participação das células imunológicas na defesa contra os tumores tem sido amplamente estudada. A TFD tem se mostrada promissora para o tratamento de muitos tipos de câncer e possivelmente pode estar envolvida em outras reações imunológicas como: doenças autoimunes, reações enxerto x hospedeiro e até nas reações de hipersensibilidade tardia (DTH) (VAN DUIJNHOFEN et al., 2003).

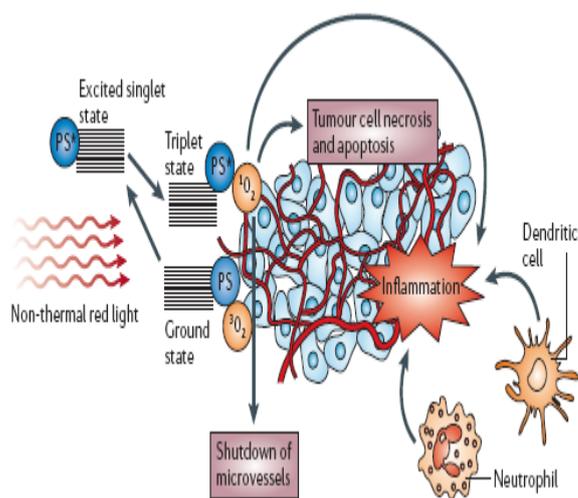


Figura 1 - Mecanismo de ação da TFD em tumores.

Fonte: CASTANO et al. Photodynamic Therapy and Anti-Tumor Immunity. **Nature Reviews Câncer.**

A terapia ideal contra o câncer destruiria não somente o tumor preliminar, mas ao mesmo tempo provocaria o sistema imune a reconhecer e destruir as células restantes do tumor, próximas ao local ou das micro metástases distantes (CASTANO et al., 2006). Os linfócitos, células específicas do sistema imune para o combate de antígenos, tem sido relacionados com TFD. HRYHORENKO et al. (1998) mostraram o acúmulo de PpIX em linfócitos ativados, macrófagos e células dendríticas *in vitro*. Essas são células apresentadoras de antígenos (APC), e participam integralmente da maioria das respostas imunes (Figura 2). A TFD é capaz de induzir modificações na membrana plasmática e em algumas organelas, levando as inúmeras conseqüências como, por exemplo, à morte celular. Essas modificações na membrana plasmática levam a transdução de sinais que serão as responsáveis pela ativação ou inibição, entre outras, da secreção de citocinas pró-inflamatórias importantes na resposta imune contra os tumores. Embora a TFD seja um tratamento localizado, esta pode induzir efeitos sistêmicos nos tecidos linfóides secundários (baço, linfonodos, etc).

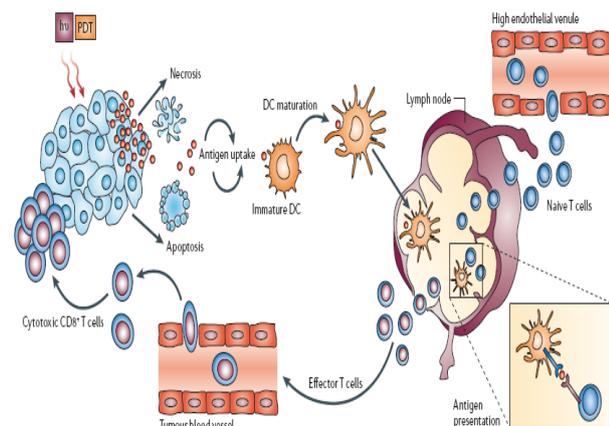


Figura 2 - TFD induz a ativação de células T. Fonte: CASTANO A P., et al. Photodynamic Therapy and Anti-Tumor Immunity. **Nature Reviews Cancer**

Estudos recentes usando Fotofrin®-TFD foram capazes de induzir uma resposta inflamatória caracterizada pela expressão de citocinas como: Interleucina-1 β (IL-1 β), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina-6 (IL-6). Estudos adicionais com o fotossensibilizante de 2ª geração (HPPH) mostraram um infiltrado de leucócitos, com predominância de neutrófilos para o tumor após TFD. O influxo dessas células estaria relacionado com o aumento da expressão transiente de quimiocinas, como MIP-2 e KC. O autor também relata um aumento na expressão de IL-6 (GOLLNICK et al., 2003). Uma vez no sítio

inflamatório ao redor do tumor, os neutrófilos e monócitos possivelmente estão envolvidos fagocitose dos corpos apoptóticos ou restos celulares oriundos de necrose (Figura 3).

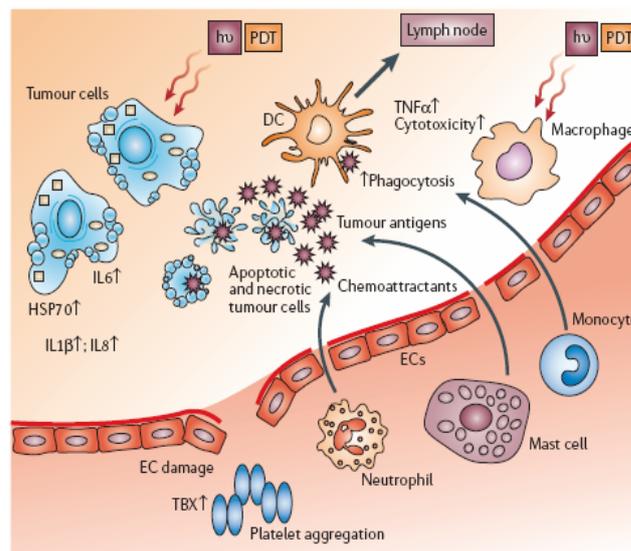


Figura 3 - Inflamação, conseqüência da TFD induzida.

Fonte: CASTANO A P., et al. Photodynamic Therapy and Anti-Tumor Immunity. **Nature Reviews Cancer**

Os estudos em sistemas isolados *in vitro* caracterizam o papel individual das células imunológicas frente à TFD, com resultados que visam à viabilidade celular, indução de apoptose e expressão de receptores de membrana (DOUGHERTY et al., 1998).

A efetuação da resposta imune frente a patógenos e ainda contra os tumores envolve a interação de inúmeras células, pertencentes à imunidade inata e adquirida, com a secreção de citocinas e imunomoduladores que culminam com a ativação ou até inibição da resposta imune contra esses agentes. Citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α podem ter um potencial para a eficácia da TFD, pois regulam as respostas inflamatória e imunológica contra bactérias, vírus e tumores, entre outros. Na tentativa de elucidar esses mecanismos, alguns cientistas têm estabelecido modelos experimentais "*in vivo*", já que esses visam abordar os efeitos específicos no local do tumor e ainda nos órgãos linfóides envolvidos (KWITNIEWSKI et al., 2005; HRYHORENKO et al., 1998). Os estudos *in vitro* visam somente à participação de células tumorais isoladas sem que haja interação celular com conseqüente produção de citocinas que é o objetivo de nosso estudo.

Assim sendo, propomos a seguir, um estudo imunológico utilizando-se animais experimentais para que possamos contribuir para a elucidação desses aspectos imunológicos discutidos

anteriormente. O objetivo de nosso trabalho é avaliar o sistema imunológico de camundongos isogênicos, submetidos à terapia fotodinâmica com fotossensibilizante de última geração. A produção da citocina IL-6 “*ex-vivo*” será medida a partir de cultura de esplenócitos dos animais tratados e seus controles.

Metodologia

Animais experimentais:

Foram utilizados 40 camundongos isogênicos da linhagem Balb/c (8-12 semanas de vida). Os animais foram condicionados no Biotério do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia (IP&DII). Alojados em caixas forradas com maravalha contendo 3 animais/caixa, mantidos a temperatura 22° C com exaustão de ar, acesso livre a alimentação (ração e água) e ritmo normal de dia-noite.

Administração de Fotossensibilizante:

O fotossensibilizante (Ftalocianina de silício) foi injetado por via endovenosa (veia da cauda), na dose de 0,5 µM/Kg de peso corpóreo. Após 1 hora os animais foram contidos e irradiados com luz laser na região do baço (thera laser®) com λ=685nm, dose da luz – 10 J/cm² e 35 mW/cm². Foram feitos grupos controle paralelamente.

A Ftalocianina de silício (C₄₄H₄₆I₂N₁₀O₂Si) foi sintetizada pelo Laboratório de Síntese Orgânica do IP&D/UNIVAP (Prof. Dr. Milton Beltrame) (RÉ et al., 2006).

Coleta das amostras:

Os animais (n=3) foram sacrificados em diferentes tempos: 0, 4, 8, 12, 24 e 48 horas após a irradiação com o laser. Os esplenócitos foram plaqueados (5 x 10⁶ céls/mL) em meio RPMI 1640 completo estimulados ou não com Concanavalina A (Con-A) (SigmaTM). As placas foram incubadas por 24 e 48 horas a 37°C em estufa úmida com 5% de CO₂ (Thermo[®]) e os sobrenadantes foram coletados para dosagem de citocinas pró-inflamatórias.

Dosagem de citocinas:

A citocina pró-inflamatória IL-6 foi dosada pelo método de ELISA (BiosourceTM) de acordo com as instruções do fabricante.

Resultados

Observou-se em microscópio invertido (modelo CKX 41-Olympus®) que após o plaqueamento dos esplenócitos nos poços em tempos de 24 e 48 horas com a presença de Con-A as células (esplenócitos) apresentavam agrupamentos, de

certa forma sobreposta umas nas outras, enquanto os esplenócitos em meio RPMI 1640 somente encontravam-se distribuídos uniformemente, como um tapete, confirmando que a presença da Con-A estimula a proliferação celular. Na Tabela 1 apresentamos as concentrações de IL-6 nos diferentes grupos de animais cujos esplenócitos foram cultivados na presença ou não de Con-A em meio RPMI 1640. A produção de IL-6 apareceu nas culturas após 4 horas da irradiação com laser. Essa produção aumentou com 24 horas e diminuiu a partir de 48 horas após a irradiação com laser.

Tabela 1: Comparação das concentrações de IL-6 (pg/mL) nos grupos com a presença e a ausência de Con-A.

[] IL-6	RPMI 1640 24H	RPMI 1640 CON-A 24H	RPMI 1640 48H	RPMI 1640 CON-A 48H
Laser (C)	43,23	162,11	56,43	214,35
Pc 4h	65,44	264,78	54,63	331,43
PcL 4h	51,03	446,11	61,84	470,12
Pc 24h	58,24	882,61	144,7	996,69
PcL 24h	46,23	481,53	42,62	619,03
Pc 48h	58,24	303,81	49,83	243,77
PcL 48h	78,05	383,66	67,24	457,52

* Pc= Ftalocianina

PcL= Ftalocianina + Laser

C= Controle

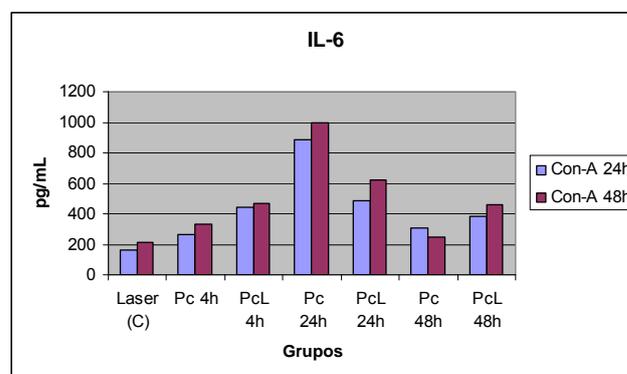


Figura 4: Comparação da produção da citocina IL-6 (pg/mL) em esplenócitos totais dos animais estimulados com Con-A por 24h e 48h.

* Pc= Ftalocianina; PcL= Ftalocianina + Laser; C= Controle

Segundo a Figura 4, podemos observar que os esplenócitos dos animais Pc 24h produziram uma maior concentração de IL-6 quando estimulados com Con-A por 24h (882,61 pg/mL) e 48h (996,69 pg/mL). Os resultados preliminares mostraram que a Pc somente já é de induzir um aumento de IL-6 independentemente da irradiação com o laser. A produção de IL-6 foi detectada em esplenócitos de animais após 4 horas de irradiação. Os

esplenócitos de animais tratados após 48 horas mostram um declínio na produção dessa citocina.

Discussão

Sabemos que a citocina IL-6 participa da resposta inflamatória de fase aguda e induz portanto, a síntese de outras proteínas pelos esplenócitos. Essa citocina também está envolvida na quimiotaxia de neutrófilos (BENJAMINI et al., 2002). Essa citocina age como mediador da inflamação em conjunto com quimiocinas a fim de garantir o desenvolvimento da resposta do hospedeiro a uma gama de estímulos (GOLLNICK et al., 2003).

A Ftalocianina de silício utilizada nesse estudo foi capaz de induzir, por si só, uma produção de IL-6 independentemente da presença de luz.

Conclusão

Considerando os vários tipos de câncer nas três décadas precedentes, poucos estudos tentaram determinar os efeitos da TFD no sistema imune humano, ou detectar a imunidade anti-tumor após o tratamento. As citocinas desempenham um papel fundamental na indução de resposta imune contra os patógenos, assim como, participam da resposta imune contra tumores. As citocinas envolvidas na resposta inflamatória aguda exercem um importante papel na defesa do hospedeiro contra inúmeros patógenos ou até mesmo contra neoplasias entre outras patologias.

Referências

- BENJAMINI, E., et al. **Imunologia**. 4ª edição. Editora Guanabara. p. 135-142, 237-245. 2002
- CASTANO A P., et al. Photodynamic Therapy and Anti-Tumor Immunity. **Nature Reviews Cancer**. V 6. p. 535-545. 2006.
- DOUGHERTY, T., et al. Photodynamic Therapy **Journal Of The National Cancer Institute**. V. 90. p. 889-905. 1998.
- GOLLNICK, S. O., et al. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. **British Journal Of Cancer**. V 88 (11): p.1772-1779. 2003.
- HRYHORENKO, E., A., et al. Antigen specific and nonspecific modulation of the immune response by aminolevulinic acid based photodynamic therapy. **Immunopharmacology**. V. 40. p. 231-240. 1998.
- JACQUES, S. L. Laser - Tissue interactions - Photochemical, photothermal and photomechanical mechanisms. **Surgical Clinics of North America**, v. 72. p. 531-558. 1992.
- KWITNIEWSKI, M., et al. Influence of diamino acid derivatives of protoporphyrin IX on mouse immunological system: Preliminary results. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** V. 81. p. 129-135. 2005.
- RÉ, M. I. et al. New PHB/PHPE microspheres obtained from Burkholderia cepacia as biodegradable drug delivery systems for photodynamic therapy. **Minerva Biotec.** V18. p. 3-9. 2006
- TAKEMURA, T., et al. I Mechanism of photodynamic therapy: Investigation of Sensitizer Dose and Light Dose-rate Effects. **SPIE Proceedings**. v. 371, p. 351-354. 1995.
- VAN DUIJNHOFEN, F. H. et al. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review. **Immunobiology**. v.207 (2): p. 105-113. 2003.